

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19540

研究課題名（和文）新たな細胞医薬戦略を目指した体細胞復帰変異発生機序の解析と制御法の開発

研究課題名（英文）Analysis of generation mechanisms of somatic revertant mutations and development of their control methods aiming at new cell medicine strategy

研究代表者

秋山 真志（AKIYAMA, Masashi）

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60222551

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、先天性魚鱗癬の一種のichthyosis with confetti（IWC）に着目した。この疾患では、異常な高頻度で体細胞復帰突然変異によるモザイク現象を生じている。体細胞復帰突然変異によるモザイク現象を起こした健康組織は、患者本人の細胞からなり、免疫原性が認められない為、細胞医薬として理想的である。IWCでは、原因遺伝子KRT1、KRT10の特定の領域に変異が集中するが、体細胞復帰突然変異によるモザイク現象が高頻度に生じる理由は不明である。本研究では、IWCのモデル細胞系とモデル動物系を作成と、それらの系を用いた体細胞復帰突然変異によるモザイク現象の分子的機序の解明を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではichthyosis with confetti（IWC）のモデル実験系の作成を目指し、体細胞復帰突然変異によるモザイク現象を人為的に発生させる技術の創出を目標とした。IWCにおいて体細胞復帰突然変異によるモザイク現象が多発する事は、mitotic recombinationの発生頻度を調節する未知のメカニズムが細胞内に存在する事を示している。その意義は不明であるが、病的遺伝子存在下での個体の健全性を担保している可能性が示唆される。mitotic recombinationの発生頻度を調節する未知のメカニズムが解明されれば、細胞生物学的に新しい概念が提示されることになる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on ichthyosis with confetti (IWC), a subtype of epidermolytic ichthyoses caused by heterozygous KRT1 or KRT10 mutations. In this disease, somatic revertant mosaicism occurs at an abnormally high frequency. Healthy tissue made by somatic revertant mosaicism is ideal as a cell medicine because it consists of the patient's own cells and does not have immunogenicity. In IWC, mutations are concentrated in specific regions of the causative genes KRT1 and KRT10, but the reason why the somatic revertant mosaicism occurs frequently is unknown. Since the genome size of KRT1 is as small as about 4.5 kb and it is extremely suitable for genetic manipulation. In this study, we tried to create a model cell line and a model animal system of IWC by introducing heterozygous gene mutations into the KRT1 gene by CRISPR-Cas9, and aimed to elucidate the molecular mechanism of the somatic revertant mosaicism using those systems.

研究分野：皮膚科学

キーワード：遺伝子 体細胞復帰変異 モザイク 魚鱗癬 表皮

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者は30年近くにわたり一貫して先天性角化異常症の原因解明に従事し、その治療法の開発に取り組んできた。その過程で ichthyosis with confetti (IWC) の症例に関わり、natural gene therapy とも言える体細胞復帰変異によるモザイク現象の臨床応用を確信するに至った。皮膚表皮細胞は、細胞医薬の臨床応用対象として、特別な有用性を持つ。すなわち、病変表皮を切削して新たな表皮シートを移植し、瘢痕を残さず治癒する事が可能である。また、遺伝子治療で常に問題になる発癌リスクについても、移植部での早期検出が容易であり、万一がん化した際の治療も容易かつ根治的である。将来的に体細胞復帰変異が人為的に制御できるようになれば、治療応用は加速度的に進むことが想定される。研究代表者らは表皮における先天性疾患で、このような正常化皮膚シート移植が望まれる症例を多数診療しており、現実に根治的治療を届けたいという強い願望が、本研究を推進する動機付けとなっていた。

(2) 体細胞復帰変異によるモザイク現象は1988年に Lesch-Nyhan 症候群において初めて報告され、主に血液疾患で知られてきたが、その機序については、詳細な研究は行われていない。また、皮膚疾患での体細胞復帰変異によるモザイク現象は、偶発的に極稀に生じる例外的な現象とされてきた。しかし、2010年に ichthyosis with confetti (IWC) では特異的に高頻度で体細胞復帰変異が生じる事が報告され、体細胞復帰変異によるモザイク現象は単に偶発的に生じる現象ではなく、その発生頻度を制御しうる未知の分子的機序が存在する事が明らかになった。このような時点で、体細胞復帰変異によるモザイク現象についての研究の進展を阻む最大の要因として、適切な研究対象が実際の患者のみであり、また疾患自体が稀少であることが挙げられた。本研究は IWC のモデル実験系を世界に先駆けて作成する事により、現状にブレークスルーをもたらす萌芽的研究として計画された。さらには、作成したモデル系を応用し、体細胞復帰変異を人為的に制御して発生させる技術を創成し、既存の組織工学や iPS 技術と組み合わせ、これ迄に無い利点を持つ新しい細胞/組織医薬を創出し、将来の遺伝子治療を革新する事を目指した。また、IWC において体細胞復帰変異が多発する事は、mitotic recombination の発生頻度を調節する未知のメカニズムが細胞内に存在する事を示していた。その意義は不明であるが、病的遺伝子存在下での個体の健全性を担保している可能性や、発癌に関わっている可能性が示唆された。本研究は、このメカニズムを解明する類例のない試みであり、細胞生物学的にも、全く新しい概念を提示するものであった。この概念は複製、修復、組換え等の既存の学問領域を結び、細胞生物学の分野においても新しい研究領域を創出することが期待された。

2. 研究の目的

本研究は「体細胞復帰変異によるモザイク現象」の解析を通じて、細胞医薬の実臨床への普及を可能にする、新たな方法論を提示する事を目的とした。細胞医薬の実臨床への応用が実現しつつ有る近年の状況において、先天性疾患の遺伝子レベルでの根治的治療は現実的な目標であった。一方で、患者自身の細胞を治療応用するには、まだ技術的な課題があった。例えば、CRISPR-Cas9 を始めとする遺伝子編集は、個別化した治療を行うには高コスト、かつ、煩雑な検証が必要である。また、ウイルスベクター等による遺伝子導入についても、未解決の問題が多い。「体細胞復帰変異によるモザイク現象」とは、遺伝子異常による先天性疾患において、一部の体細胞が突然変異を起こし、病理性変異が失われる現象であり、結果として、病変な組織と健常な組織によるモザイクを生じる。体細胞復帰変異によるモザイク現象は、時に遺伝子疾患の症状を改善するため、natural gene therapy とも呼称されていた。体細胞復帰変異によるモザイク現象を起こした組織は、患者本人の細胞からなり、一般に免疫原性が認められない為、組織培養や iPS 応用要素の材料として理想的である。そこで、本研究の目的は、体細胞復帰変異を人為的に制御して発生させる技術を創成し、既存の組織工学や iPS 技術と組み合わせ、新しい細胞/組織医薬を創出し、将来の遺伝子治療を革新することであった。

3. 研究の方法

本研究では、ケラチン1、または、ケラチン10の遺伝子変異による先天性魚鱗癬である表皮融解性魚鱗癬の一亜型である ichthyosis with confetti (IWC) という疾患に着目した。この疾患では、他の先天性疾患と比較して、異常な高頻度で体細胞復帰変異を生じている事が近年判明している。IWC では、原因遺伝子である *KRT1* もしくは *KRT10* の特定の領域に変異が集中するが、それらの遺伝子変異の部位、性質と、体細胞復帰変異によるモザイク現象が高頻度で生じることとの関連性は不明である。本研究では、IWC のモデル細胞系とモデル動物系を世界に先駆けて作成する事を通じ、その分子的機序を解析し、明らかにすることを計画した。具体的には、平成30年度から令和元年度に(1)不死化ケラチノサイトを用いた IWC 皮膚表皮細胞のモデル系とスクリーニングプラットフォームの構築、及び、(2)薬剤投与により誘導可能な IWC モデルマウスの作成を計画した。さらに、令和元年度から令和2年度にはこれらの系を利用して、(3)モデル細胞系を用いた体細胞復帰変異によるモザイク現象発生の分子機序の解析、体細胞復帰変異によるモザイク現象の発生を制御しうる低

分子化合物の探索、及び、(4) IWC マウスモデルの表現型解析を計画した。IWCは *KRT1*もしくは*KRT10*のヘテロ接合性変異によって生じるが、*KRT1*のゲノムサイズは約4.5kbと小さく、*in situ*での遺伝子操作が極めて適しているため、本研究では、*KRT1*変異によるモデル系を作成する計画であった。

4. 研究成果

本研究では、ケラチン1、または、ケラチン10の遺伝子変異による先天性魚鱗癬である表皮融解性魚鱗癬の一亜型である ichthyosis with confetti (IWC) という疾患を対象とした。この疾患では、異常な高頻度で「体細胞創発突然変異によるモザイク現象」(revertant somatic mosaicism)を生じている。体細胞創発突然変異によるモザイク現象を起こした健康組織は、患者本人の細胞からなり、一般に免疫原性が認められない為、細胞医薬として理想的である。IWCでは、原因遺伝子 *KRT1*、*KRT10*の特定の領域に変異が集中するが、いまだに、体細胞創発突然変異によるモザイク現象が高頻度に生じる理由は不明である。本研究では、IWCのモデル細胞系とモデル動物系を世界に先駆けて作成し、それらの系を用いて、体細胞創発突然変異によるモザイク現象の分子的生機を解析することを目指した。

(1) 不死化ケラチノサイトを用いた IWC 皮膚表皮細胞のモデル系とスクリーニングプラットフォームの構築

*KRT1*のゲノムサイズは約4.5kbと小さく、*in situ*での遺伝子操作が極めて適しているため、本研究では *KRT1*変異によるモデル系の作成を目指した。*KRT1*遺伝子にCRISPR-Cas9によるヘテロ接合性遺伝子変異導入を行い、野生型および変異*KRT1*を有する不死化ケラチノサイトの作成を試み、それぞれ異なる蛍光蛋白で標識することで、野生型および変異*KRT1*の発現を識別する計画であった。*KRT1*遺伝子の変異をCRISPR-Cas9によりヘテロ接合性に導入し、変異*KRT1*を有する不死化表皮細胞を作成し、復帰体細胞変異を頻発するモデル細胞系をスクリーニング系として樹立することを目指し、実験を繰り返し施行した。しかし、復帰体細胞変異を頻発するモデル細胞が、培養条件のためか、予定通りには、樹立できなかった。そこで、復帰体細胞変異を促進する培養条件についてのスクリーニングプラットフォームの構築を行い、種々の培養条件を検討した。最終的に、人工的に制御可能な復帰体細胞変異を頻発するモデル細胞を樹立するまでには至らなかった。今後、本研究の延長線上の研究において、復帰体細胞変異を頻発するモデル細胞の系の樹立を目指し、これらのIWCモデル細胞をスクリーニング系として、体細胞創発突然変異によるモザイク現象を促進する条件についてのケミカルスクリーニング、DNAストレス、siRNAスクリーニングなどの各種スクリーニングを施行することを予定している。

(2) 薬剤投与により誘導可能な体細胞創発突然変異によるモザイク現象と、その延長上でのIWCモデルマウスの作成

本研究計画では、*KRT1*遺伝子の変異をCRISPR-Cas9によりヘテロ接合性に導入し、変異*KRT1*を有する *Krt1*-EGFP ノックインマウスの作成を目指した。表皮特異的 CreER 発現マウスは購入可能であり、4-OHT 誘導性 mRFP および変異*KRT1*発現カセットをCRISPR-Cas9によるゲノム編集によりヘテロ接合性に導入したマウスと、上記2種のマウスと掛け合わせる事により、IWC症状を薬理誘導的に発症するモデルマウスの作成実験を施行した。しかしながら、復帰体細胞変異を頻発するモデル細胞が、培養条件のためか、予定通りに樹立できず、復帰体細胞変異を促進する培養条件についてのスクリーニングプラットフォームの構築に想定以上の時間を要したことも影響し、当初計画された、有意に高頻度な体細胞創発突然変異によるモザイク現象を、人為的に誘導可能なIWCモデルマウスを樹立するまでには至っていない。

<引用文献>

- Choate KA, Lu Y, Zhou J, Choi M, Elias PM, Farhi A, Nelson-Williams C, Crumrine D, Williams ML, Nopper AJ, Bree A, Milstone LM, Lifton RP. Mitotic recombination in patients with ichthyosis causes reversion of dominant mutations in *KRT10*. *Science* 330: 94-97, 2010.
- Choate KA, Lu Y, Zhou J, Elias PM, Zaidi S, Paller AS, Farhi A, Nelson-Williams C, Crumrine D, Milstone LM, Lifton RP. Frequent somatic reversion of *KRT1* mutations in ichthyosis with confetti. *J Clin Invest* 125: 1703-1707, 2015.
- Nomura T, Suzuki S, Miyauchi T, Takeda M, Shinkuma S, Fujita T, Nishie W, Akiyama M, Shimizu H. Chromosomal inversions as a hidden disease-modifying factor for somatic recombination phenotypes. *JCI Insight* 3: e97595, 2018.
- Suzuki S, Nomura T, Miyauchi T, Takeda M, Fujita Y, Nishie W, Akiyama M, Ishida-Yamamoto A, Shimizu H. Somatic recombination underlies frequent revertant mosaicism in loricrin keratoderma. *Life Sci Alliance* 2: e201800284, 2019.
- Takeichi T, Liu L, Abdul-Wahab A, McMillan JR, Stone KL, Akiyama M, Simpson MA, Parsons M, Mellerio JE, McGrath JA. Large intragenic *KRT1* deletion underlying atypical autosomal dominant keratinopathic ichthyosis. *J Invest Dermatol* 136: 2095-2098, 2016.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nomura T, Suzuki S, Miyauchi T, Takeda M, Shinkuma S, Fujita T, Nishie W, Akiyama M, Shimizu H.	4. 巻 3
2. 論文標題 Chromosomal inversions as a hidden disease-modifying factor for somatic recombination phenotypes.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 JCI Insight	6. 最初と最後の頁 e97595
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1172/jci.insight.97595.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki S, Nomura T, Miyauchi T, Takeda M, Fujita Y, Nishie W, Akiyama M, Ishida-Yamamoto A, Shimizu H.	4. 巻 2
2. 論文標題 Somatic recombination underlies frequent revertant mosaicism in loricrin keratoderma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Sci Alliance	6. 最初と最後の頁 e201800284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.201800284.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tanabe Y, Yamane M, Kato M, Teshima H, Kuribayashi M, Tatsukawa H, Takama H, Akiyama M, Hitomi K.	4. 巻 286
2. 論文標題 Studies on differentiation-dependent expression and activity of distinct transglutaminases by specific substrate peptides using three-dimensional reconstituted epidermis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS J	6. 最初と最後の頁 2536-2548
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/febs.14832.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takeichi T, Suga Y, Mizuno T, Okuno Y, Ichikawa D, Kono M, Lee JYW, McGrath JA, Akiyama M.	4. 巻 100
2. 論文標題 Recurrent KRT10 variant in ichthyosis with confetti.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Dermato-Venereol	6. 最初と最後の頁 adv00209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2340/00015555-3570.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Murase Y, Tanahashi K, Takeichi T, Sugiura K, Aiyama A, Nishida K, Mitsuma T, Akiyama M.	4. 巻 47
2. 論文標題 Mild epidermolytic ichthyosis with palmoplantar keratoderma due to the KRT1 mutation p.I1le479Thr.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Dermatol	6. 最初と最後の頁 e336-e339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.15476.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 秋山真志
2. 発表標題 表皮融解性母斑を持つ父と表皮融解性魚鱗癬の子の親子例：次世代での表皮融解性魚鱗癬発症リスク予測
3. 学会等名 第466回日本皮膚科学会大阪地方会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋山真志
2. 発表標題 皮膚科医である私の表皮細胞生物学への取り組み
3. 学会等名 第118回日本皮膚科学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋山真志
2. 発表標題 角化症を科学する
3. 学会等名 第71回日本皮膚科学会中部支部学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

名古屋大学大学院医学系研究科皮膚科学分野のホームページ
<https://www.med.nagoya-u.ac.jp/derma/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------