

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16230

研究課題名（和文）顕性遺伝型栄養障害型表皮水疱症へのCRISPR-Cas3の治療応用

研究課題名（英文）Therapeutic Application of CRISPR-Cas3 for dominant dystrophic Epidermolysis Bullosa

研究代表者

森坂 広行（Morisaka, Hiroyuki）

大阪大学・大学院医学系研究科・特任助教（常勤）

研究者番号：60826840

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：表皮水疱症は遺伝子異常により容易にびらんを形成する重篤な疾患であるが、根治的な治療法はない。近年、我々は、ゲノムに大規模欠失を引き起こす遺伝子編集ツールであるCRISPR-Cas3を開発した。顕性栄養障害型表皮水疱症（DDEB）はドミナントネガティブな疾患であり、Cas3により変異アレルを欠失させることで根治治療になりうると考えた。Cas9により、不死化ヒト角化細胞を用いてDDEB、潜性栄養障害型表皮水疱症（RDEB）の細胞モデルをそれぞれ作成した。Western blot、蛍光免疫染色では、RDEBモデル細胞ではVII型コラーゲンの発現がなく、モデル細胞となっていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子治療は以前から待望されていたが、CRISPRの登場により現実的な治療となってきた。しかし、Cas9は米国が特許を持ち、日本の研究開発は後れを取っている現状がある。表皮水疱症を含むドミナントネガティブな疾患に対する変異アレルの欠失は、Cas9を含め既存の技術では困難であり、国産技術であるCRISPR-Cas3により始めて実現可能になる。本研究により、CRISPR-Cas3の遺伝子治療を評価する細胞モデルが確立できた。また、本研究により、表皮水疱症以外のドミナントネガティブな疾患への応用も十分に考えられ、今後の実際の医療への展開も大きく期待できる。

研究成果の概要（英文）：Epidermolysis bullosa is a serious disease characterized by genetic abnormalities, however, there is still no curative treatment. Recently, we have developed a gene editing tool called CRISPR-Cas3 that causes large deletions in the genome. We hypothesized it would be relevant to therapeutic benefit for dominant dystrophic epidermolysis bullosa (DDEB), which is a dominant-negative disease, if the mutated allele is successfully skipped by Cas3 gene editing. To establish a disease model, Cas9 protein were transfected to immortalized human keratinocyte cells. Sanger sequencing after cloning revealed clone 1 had 6nt deletion including a glycine codon in one allele, and clone 2 had premature stop codons in both alleles. Immunofluorescence staining and western blot showed almost no type VII collagen in clone2, whereas Clone1 had type VII collagen. These results suggest that clone 1 and clone 2 may be cell models for DDEB and recessive dystrophic epidermolysis bullosa, respectively.

研究分野：皮膚科学

キーワード：CRISPR 表皮水疱症 Gene editing Cas3

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

表皮水疱症は皮膚基底膜領域における接着構造タンパクの遺伝子異常により表皮、真皮間の接着構造が破綻し、日常生活の軽微な外力により表皮が剥離して水疱、潰瘍を形成する遺伝性疾患である(図1)。有病率は約10-20万人に1人と比較的珍しい疾患であるが、繰り返す潰瘍形成などの日常生活への支障や、慢性のびらんからの有棘細胞癌の発症など重篤な疾患として知られている。現在まで線維芽細胞や間葉系幹細胞による治療や骨髄移植、cDNAの導入など様々な治療研究が行われているが、根治的な治療法は未だ確立されていない。

近年CRISPR-Cas9を始めとする遺伝子編集技術が注目を集めるようになった。CRISPRによる遺伝子編集は非常に効率が高く、遺伝子治療を実現しうる画期的な技術となっており、CRISPR-Cas9の開発者である2人の女性は2020年のノーベル化学賞を受賞した。欧米ではCRISPR-Cas9による眼科や血液領域での遺伝子治療の治験がすでに行われている。近年、我々は、Cas9とは全く違った特徴を持つ遺伝子編集ツールであるCRISPR-Cas3のヒト細胞での利用に成功した¹⁾。CRISPR-Cas3はCas9とは異なり、狙った1カ所での二重鎖切断ではなく、数百から数万塩基の広範囲欠失を起こす特徴を持つ(図2)。申請者は広範囲欠失をドミナントネガティブな疾患に用いることで、変異アレルのみを欠失させ、正常アレルのみからタンパクを産生させる治療の仮説を立てた。本研究では、CRISPR-Cas3を用いた表皮水疱症の根治的治療を目的とする。

表皮水疱症は原因遺伝子や変異のパターンによって複数の病型に分かれる。その一つに、栄養障害型と呼ばれる病型がある。栄養障害型表皮水疱症(Dystrophic Epidermolysis Bullosa: DEB)は、表皮と真皮の接合部の接着を担うタンパクの一つであるVII型コラーゲンの変異、消失により発症する。VII型コラーゲンは三量体を形成して働く。また、遺伝子の両アレルに変異をきたす潜在性遺伝型(Recessive DEB: RDEB)と、片アレルに変異をきたす顕性遺伝型(Dominant DEB: DDEB)の2つの遺伝形式がある。RDEBはVII型コラーゲンの発現がなく、症状も重篤となる。一方、DDEBでは正常と変異両方のVII型コラーゲンが含まれる三量体が作られることで症状が出現する、ドミナントネガティブな疾患である。この場合、変異アレルの欠失により、変異VII型コラーゲンの産生をなくすことで、正常なアレルからの正常VII型コラーゲンのみが産生され、疾患の治癒につながるとの仮説を立てた。CRISPR-Cas3を用いた、変異アレルの欠失によるDDEBの根治的治療実現の可能性を考えた(図3)。

2. 研究の目的

本研究の目的はCRISPR-Cas3を用いたDDEBの治療法の開発である。CRISPR-Cas9を用いて、種々の遺伝子変異を持つDDEBの細胞モデルを作成し、VII型コラーゲンの発現、機能について検討する。DDEB細胞モデルを用いて、CRISPR-Cas3による変異アレル欠失を誘導し、VII型コラーゲンの機能改善について評価する。

3. 研究の方法

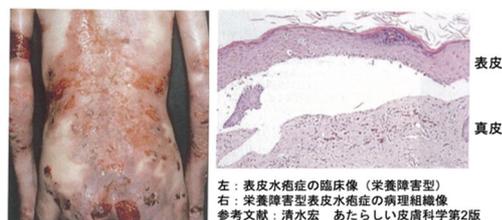
細胞培養

hTERT不死化ヒト線維芽細胞(BJ-5ta)、hTERT不死化ヒト角化細胞(Ker-CT)を用いた。KGM-Gold™ BulletKit™ (Lonza)を用いて37℃, 5% CO2で培養した。

gRNAデザイン

COL7A1に対するgRNAはIntegrated DNA Technology's (IDT) online custom Alt-R® CRISPR-

図1 表皮水疱症の臨床像と病理組織像



皮膚表皮真皮境界部での接着構造の遺伝子異常

日常生活により水疱、びらん、潰瘍形成

図2 Cas9とCas3の比較

	Cas9	Cas3
Target配列	20塩基+NGG	AAG(or ATG)+27塩基
component	Cas9+gRNA	Cas3+Cascade+crRNA
切断部位	PAM(NGG)から3-4塩基間のピンポイントでの二重鎖切断	Target配列から一方方向性に数百から数万塩基の広範囲欠失

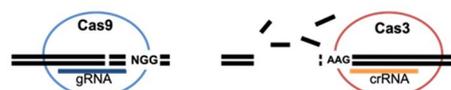
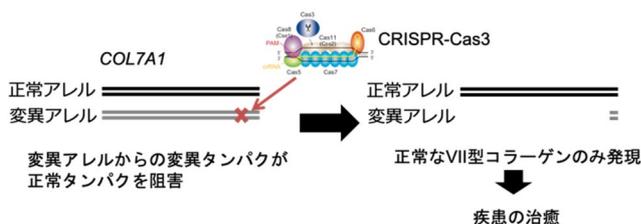


図3 CRISPR-Cas3を用いた表皮水疱症の治療戦略

顕性遺伝型栄養障害型表皮水疱症

- ・原因遺伝子 COL7A1 (VII型コラーゲン)
- ・ドミナントネガティブ



Cas9 guide RNA tool を用いてデザイン、オーダーし作成した。

CRISPR-Cas9/gRNA RNP (Ribonucleoprotein) 複合体

440pmol の Alt-R® CRISPR-Cas9 crRNA (IDT) と 440pmol の Alt-R® CRISPR-Cas9 tracrRNA (IDT) とを 10 μ l で 95 °C、5 分温め、ゆっくり室温まで戻すことでアニーリングした。22pmol の アニーリングした gRNA (crRNA + tracrRNA) と 18pmol の Alt-R® S.p.Cas9 Nuclease V3 (IDT) とを RNA duplex buffer (IDT) に入れ室温で 15 分インキュベートした。

Transfection

NEON Electroporation system (ThermoFisher) を用いて Ker-CT にトランスフェクションした。Ker-CT をトリプシンにて回収し、R buffer に溶き 2 x 10⁷ 個/ml とした。細胞に RNP 複合体 (上述) と 21.6pmol の Alt-R® Cas9 Electroporation Enhancer (IDT) とを 10 μ l Neon transfection tip (ThermoFisher) にて 20ms 1700V 1pulse で導入した。その後、予め温めておいた 1ml の培養液で 24 ウエルプレートに播種した。

DNA 抽出

DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN) を用いた。

タンパク抽出

細胞がコンフルエントの状態、PBS で wash 後に培養液 (上述、50 μ g/ml アスコルビン酸を含む) で 48 時間培養した。細胞を PBS で wash 後に、回収し、RIPA buffer (Sigma-Aldrich、10mM EDTA、10mM Protease inhibitors (Sigma-Aldrich) を含む) に溶解した。サンプルを Amicon Ultra-100,000 Centrifugal Filter Devices (Millipore) にて脱塩、濃縮した。

サンガーシーケンス

抽出 DNA を鋳型に COL7A1 の Exon73 を含む領域を PCR で増幅した。PCR 産物を TA クローニング法 (pGEM®-T EASY Vector System, Promega) にてクローニングし、サンガー法 (BigDye® Terminator cycle sequencing kit v3.1 compatible with ABI 3500® Genetic analyzer) により配列を確認した。

免疫蛍光染色

細胞を前日に 2 x 10⁴ 個/well で Lab-Tek®II Chamber slide™ system (ThermoFisher) に播種した。PBS で wash 後に 4% PFA で 30 分、4 °C で固定し、serum-free blocking solution (Dako)、5% normal goat serum (Dako)、0.5% TritonX-100 (Nacalai tesque) で室温、30 分処理した。Anti-Collagen Type VII antibody LH7.2 (1:200) を 1 次抗体として 4 °C、オーバーナイトで処理し、PBS wash 後に Donkey anti-Mouse IgG Antibody, Alexa Flour™ 488 (Invitrogen, A-21202) を 2 次抗体とした。核を DAPI で染色した。画像は蛍光顕微鏡 (DP-71; Olympus) にて撮影した。

Western blot

抽出タンパクを 95 °C で 5 分インキュベートし、4-20% ポリアクリルアミドゲル (BIORAD) にて分離した。1 次抗体に COL7A1 Rabbit polyclonal Antibody (1:1000, BIORAD) で 18 時間、4 °C でインキュベートし、2 次抗体に Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (1:25000, Cell Signaling Technology) で 40 分、室温でインキュベートした。化学発光には Supersignal West Atto (ThermoFisher) を用いた。

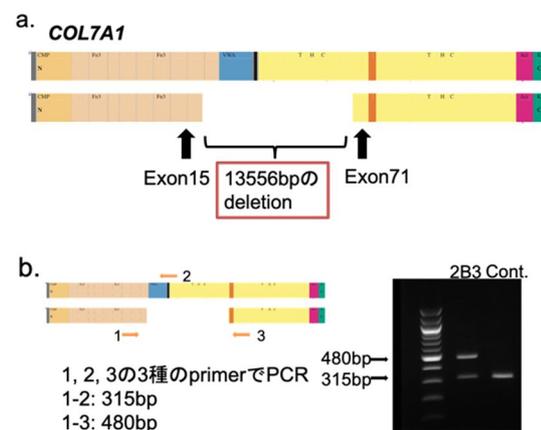
4. 研究成果

我々は、予備的な結果として、CRISPR-Cas3 発現プラスミドを用いてヒト線維芽細胞の遺伝子編集、細胞クローニングに成功している。Exon15 から Exon70 までを含む約 13000bp の大規模欠失を片アレルのみで起こしていることを PCR によって確認した (図 4)。

図 4 CRISPR-Cas3 によるヒト線維芽細胞の遺伝子編集

a. CRISPR-Cas3 による遺伝子編集クローンの変異模式図
b. 3 箇所の primer を用いた PCR による変異の確認 (2B3 が得られたクローン)。コントロールでは見られない、primer1 と 3 によるバンドが見られている。

図4 CRISPR-Cas3によるヒト線維芽細胞の遺伝子編集



ヒト初代細胞であっても、遺伝子編集ができることを確認できたので、今後のアッセイに十分な量の細胞を使用できるように不死化ヒト線維芽細胞を用いた。しかし、western blot による VII 型コラーゲンタンパクの検出が上手くいかず、不死化ヒト角化細胞である Ker-CT を用いて実験を進めた。

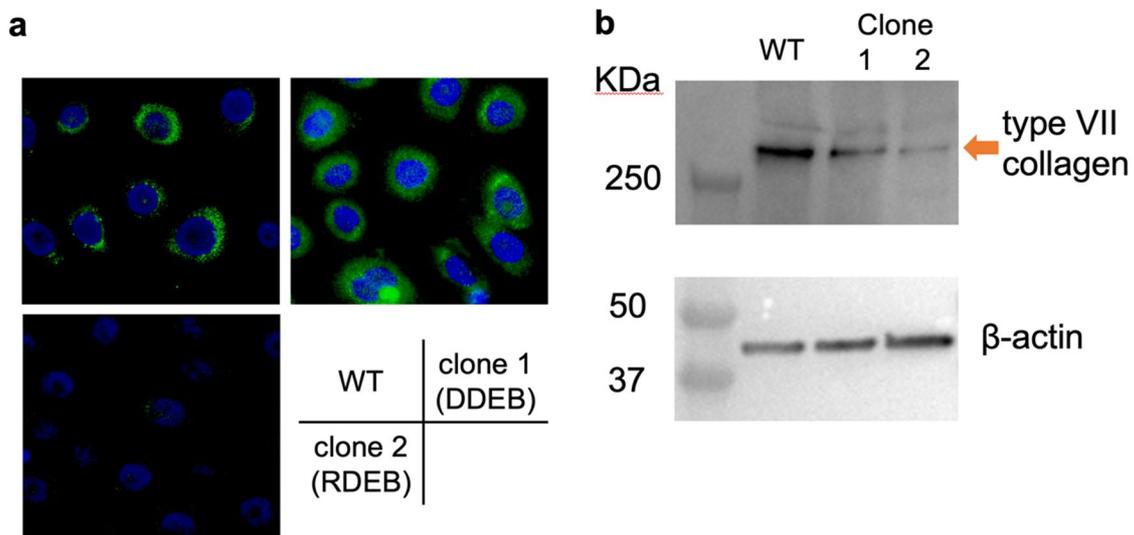
CRSIPR-Cas9 を用いて *COL7A1* の Exon73 をターゲットにゲノム編集を行い、限界希釈法にてクローニングした。クローニングした細胞をサンガーシーケンスにより DNA 配列を確認し、複数のクローンが得られた。合計で 22 クローンが得られ、代表的な 2 クローンを示す (図 5)。クローン 61E8 では片アレルは正常で、もう片アレルには 6 塩基の欠失により変性した *COL7A1* タンパクを発現すると考えられた。また、クローン 62F3 ではそれぞれのアレルで 3 塩基、9 塩基の欠失がみられ、両アレルともにナンセンス変異によりタンパク発現が消失すると考えられた。配列からは 61E8 が DDEB (顕性遺伝型)、62F3 が RDEB (潜性遺伝型) の栄養障害型表皮水疱症のモデル細胞となることが予想された。

図 5 CRISPR-Cas9 を用いて作出した EB 細胞モデルの遺伝子配列

WT		GGC CCC ATC GGC TTT CCT GGA GAA CGC GGG CTG ...		
		gRNA AUC GGC UUU CCU GGA GAA CGC PAM		
		CCG GGG TAG CCG AAA GGA CCT CTT GCG CCC GAC ...		
		Exon73		
61E8	Allele 1	GGC CCC ATC GGC TTT CCT GGA GAA CGC GGG CTG	WT	
		Gly Pro Ile Gly Phe Pro Gly Glu Arg Gly Leu		expected as DDEB
	Allele 2	GGC CCC ATC GGC TTT CCT G-- -AA --- GGG CTG	6nt deletion	
		Gly Pro Ile Gly Phe Pro Glu Gly Leu		
62F3	Allele 1	GGC CCC ATC GGC TTT CCT GGA GAA TAA CGC GGG CTG	3nt insertion	expected as RDEB
		Gly Pro Ile Gly Phe Pro Gly Glu Ter		
	Allele 2	GGC CCC ATC GGC T-- --- --- -AA CGC GGG CTG	9nt deletion	
		Gly Pro Ile Gly Ter		

WT, 61E8 (clone 1), 62F3 (clone 2) のそれぞれの細胞を用いて蛍光免疫染色を行うと、WT, clone 1 では細胞内に *COL7A1* 抗体にて蛍光されるタンパクがみられたが、clone 2 では蛍光染色されるタンパクはみられなかった。また、western blot では WT, clone 1 では 290kDa 付近に *COL7A1* タンパクのバンドが得られたが、clone 2 では同様のバンドはみられなかった。これらの結果は、clone 1 においては DDEB、clone 2 では RDEB の VII 型コラーゲンタンパクの特徴と矛盾しない結果であった。

図 6 VII 型コラーゲンタンパクの検出



- a. 蛍光免疫染色: WT, clone 1 (61E8) では VII 型コラーゲン (緑) が染色されているが、clone 2 (62F3) では VII 型コラーゲンが検出されていない。青: DAPI
- b. western blot: WT, clone 1 (61E8) では VII 型コラーゲンタンパク (290kDa) が検出できているが、clone 2 (62F3) では検出できていない。

Clone 61E8 はタンパク発現が WT と同様に見られているが、変異アレルからの変異タンパクが正常タンパクを阻害するドミナントネガティブ効果を持つかどうかはトリプシンアッセイなどの機能評価アッセイにて確認する必要がある²⁾。また、今回の実験では 61E8 などの細胞を用いて CRISPR-Cas3 による変異アレルの大規模欠失を起こしたクローンを得るところまでは実験が進まなかった。原因として、CRISPR-Cas3 発現プラスミドを用いた Ker-CT 細胞へのトランスフェクション効率の低さが一因を担っている。効率を高めるために薬剤によるセレクションも試行したが、効率的なクローニングには成功していない。CRISPR-Cas9 を用いた遺伝子編集では Cas9 タンパクを用いた系が主流となっている。プラスミドを用いる系と比較して、タンパクを用いた方が効率良く遺伝子編集を行え、意図しないプラスミドの genome integration も防ぐことができる。2023 年より CRISPR-Cas3 のタンパクも販売されるようになっており、今後は Cas3 タンパクを用いて実験を進めていく予定である。

引用文献

1. Morisaka H, Yoshimi K, Okuzaki Y, Gee P, Kunihiro Y, Sonpho E, Xu H, Sasakawa N, Naito Y, Nakada S, Yamamoto T, Sano S, Hotta A, Takeda J, Mashimo T. CRISPR-Cas3 induces broad and unidirectional genome editing in human cells. *Nat Commun.* 2019 Dec 6;10(1):5302. doi: 10.1038/s41467-019-13226-x. PMID: 31811138; PMCID: PMC6897959.
2. Fritsch A, Spassov S, Elfert S, Schlosser A, Gache Y, Meneguzzi G, Bruckner-Tuderman L. Dominant-negative effects of COL7A1 mutations can be rescued by controlled overexpression of normal collagen VII. *J Biol Chem.* 2009 Oct 30;284(44):30248-56. doi: 10.1074/jbc.M109.045294. Epub 2009 Sep 2. PMID: 19726672; PMCID: PMC2781580.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森坂 広行
2. 発表標題 CRISPR-Cas3による遺伝子治療とRegnase-1による炎症制御
3. 学会等名 第75回日本皮膚科学会西部支部学術大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroyuki Morisaka, Mikiro Takaishi, Shigetoshi Sano and Manabu Fujimoto
2. 発表標題 Creation of cell models of dystrophic epidermolysis bullosa for therapeutic application of CRISPR-Cas3
3. 学会等名 the International Societies for Investigative Dermatology 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 森坂 広行
2. 発表標題 優性型栄養障害型表皮水疱症へのCRISPR-Cas3の治療応用
3. 学会等名 第43回水疱症研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森坂 広行
2. 発表標題 先天性表皮水疱症へのCRISPR-Cas3の治療応用
3. 学会等名 第121回日本皮膚科学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------