

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670030

研究課題名(和文)人工ヌクレアーゼを用いた早老症 iPS 細胞の遺伝子修正と治療への応用

研究課題名(英文) Gene correction in iPS cells of premature aging syndrome toward clinical application by genome editing

研究代表者

嶋本 顕 (Shimamoto, Akira)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授

研究者番号：70432713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ウェルナー症候群(Ws)は、皮膚潰瘍、糖尿病、動脈硬化、がんなどを早期に発症する早老症である。本研究では、患者iPS細胞の変異遺伝子を人工ヌクレアーゼにより修正し、正常で拒絶のない患者iPS細胞を樹立することを目的とする。

正常WRN遺伝子を含むターゲティングベクターをWRN遺伝子標的TALEヌクレアーゼとともに患者iPS細胞に導入し、ターゲティングベクターが変異WRN遺伝子の標的部位と置き換わったクローンを選択し、さらにシーケンシングによりMut-4が正常に修正されているクローンを同定した。

今後はQOL低下の原因である皮膚潰瘍の治療への応用に向け、遺伝子修正iPS細胞の性状解析を進める。

研究成果の概要(英文)：Werner syndrome (WS) is a rare human autosomal recessive premature aging disorder characterized by early onset of aging-associated diseases, chromosomal instability, and cancer predisposition. Severe symptoms of the disease, such as leg ulcers, cause a significant decline in the quality of life in patients with WS. This study was aimed to establish rejection-free iPS cells whose mutation in WRN gene is corrected by genome editing, and to develop a new therapeutic strategy for WS. Patient-specific iPS cells were generated and transfected with TALE nuclease vector targeted to the mutated WRN gene and a donor vector designed to replace with the mutated allele, and clones whose WRN mutation was successfully corrected were identified.

These clones will be evaluated that show characteristics equivalent to iPS cells from healthy individuals when differentiated into affected cells in the patient.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ウェルナー症候群 iPS細胞 人工ヌクレアーゼ ゲノム編集 遺伝子修正

1. 研究開始当初の背景

ウェルナー症候群 (WS)はDNA修復ヘリカーゼ遺伝子(WRN)の突然変異による劣性遺伝病で、加齢にともなう疾患を20代から加速的に発症し、50歳前後で死亡する早老症である。治療はいずれも対症療法で根治されることはなく、現在のところ根本的に治療する方法は開発されていない。臨床症状の中でとくに問題となるのは、白内障、糖尿病、皮膚潰瘍、高脂血症、動脈硬化、癌であり、白内障以外は症状の改善が困難であることが知られている。

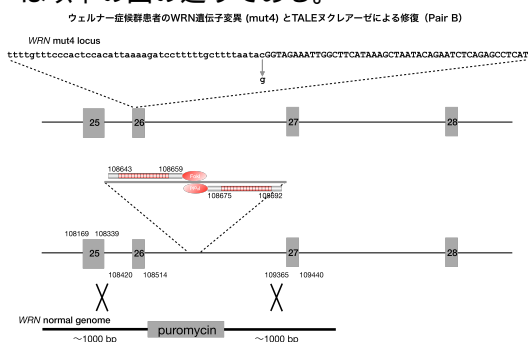
人工多能性幹細胞 (iPS細胞) は線維芽細胞などの体細胞に4つの遺伝子 Oct3/4, Sox2, Klf4, c-myc (所謂山中4因子) を導入して樹立された細胞で、胚性幹細胞 (ES細胞) の特徴である分化全能性と無限増殖能を併せもつ。WSの臨床症状の根本的な治療法として、細胞の移植によって失われた組織の機能を補う再生医療は有効な手段であると考えられる。WSでは下肢の傷は細胞老化による皮膚の治癒能力の低下により極めて治りにくく、皮膚潰瘍を引き起こす。このために多くの患者は下肢の切断手術を受け、このことがとくに患者のQOL低下の原因となっている。WS患者由来の細胞からiPS細胞 (WS-iPS細胞) を樹立し、様々な組織細胞に分化させることができれば、皮膚潰瘍や糖尿病などに対するオーダーメイド細胞移植治療法の開発に道が開ける。

2. 研究の目的

本研究は、患者iPS細胞の変異遺伝子を人工ヌクレアーゼにより修正し、正常で拒絶のない患者iPS細胞を樹立し、修正されたiPS細胞の安全性と性状、主な病変部として分化誘導した表皮、脾臓細胞、血管内皮細胞の病態改善の検証を進め、安全で効果の期待できるウェルナー症候群のためのテララーメイド細胞移植治療の開発を行う。

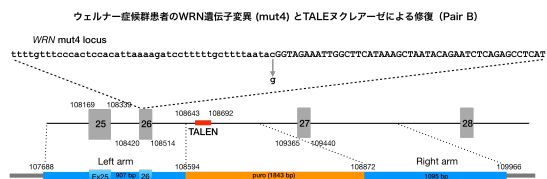
3. 研究の方法

ウェルナー症候群原因遺伝子WRNを標的とした人工ヌクレアーゼと、変異遺伝子を修正するためのターゲティングベクターをウェルナー症候群患者iPS細胞に導入し、相同組換えを介して変異WRN遺伝子が修正されたiPS細胞クローンを選択し樹立した。WRN遺伝子の変異領域の配列と遺伝子修正ストラテジーは以下の図の通りである。



日本人患者に高頻度で認められる WRN 変異 (Mut4)は第 26 エクソンの直前のイントロン配列における 1 塩基置換 (C → G)であり、本研究で用いた TALE ヌクレアーゼは第 26 エクソンの直後のイントロン中の配列を標的として切断する。一方、ターゲティングベクターはマーカー遺伝子として puromycin 耐性遺伝子の上流と下流に、WRN 遺伝子の第 25, 26 エクソンを含む領域と、第 27 エクソンを含む領域がそれぞれ位置する構造である。TALE ヌクレアーゼが標的配列を切断した後に、ターゲティングベクターが相同組換えによって Mut4 領域を含む WRN 遺伝子領域と置き換わり、変異部位が正常配列に修正されることが期待される。

また、ターゲティングベクターの詳細な構造を以下の図に示す。



4. 研究成果

日本人のウェルナー症候群患者で高頻度で認められる WRN 遺伝子変異 Mut-4 (c.3139-1G>C)を相同組換えにより修復するために、エクソン 26 とエクソン 27 の間のイントロンの塩基配列を認識する WRN 遺伝子標的 TALE ヌクレアーゼ (WRN_TALEN) を構築した。Single strand annealing assay により、高い標的切断活性を有する WRN_TALEN を同定した。患者 iPS 細胞が有する WRN 遺伝子変異 Mut-4 の領域を含むエクソン 25~27 をカバーする正常 WRN 遺伝子を、健康者ゲノム DNA を鋳型として増幅し、この領域を組み込んだターゲティングベクターを構築した。そして、WRN_TALEN とターゲティングベクターを iPS 細胞に導入し、ターゲティングベクターのイントロン部分に組み込まれた puromycin 耐性遺伝子をマーカーとして、puromycin 耐性の iPS 細胞クローンを選択培養により多数樹立した。ターゲティングベクターでカバーされた WRN 遺伝子領域のより上流及びより下流のプライマーと、puromycin 耐性遺伝子にデザインされたプライマーを組み合わせて、PCR によりターゲティングベクターが iPS 細胞の染色体における WRN 遺伝子標的部位と置き換わっているクローンを選択し、さらにシーケンシングにより Mut-4 が正常に修正されているクローンを同定した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 7 件)

嶋本 顕、田原栄俊、細胞老化研究の新展開、基礎老化研究 39 巻 1 号:3-11. (2015) [査読有り]

Shimamoto A, Yokote K, & Tahara H Werner Syndrome-specific induced pluripotent stem cells: recovery of telomere function by reprogramming. *Frontiers in Genetics* 6. 10.3389/fgene.2015.00010 (2015) [査読有り]

Shimamoto A, Kagawa H, Zensho K, Sera Y, Kazuki Y, Osaki M, Oshimura M, Ishigaki Y, Hamasaki K, Kodama Y, Yuasa S, Fukuda K, Hirashima K, Seimiya H, Koyama H, Shimizu T, Takemoto M, Yokote K, Goto M, & Tahara H Reprogramming Suppresses Premature Senescence Phenotypes of Werner Syndrome Cells and Maintains Chromosomal Stability over Long-Term Culture. *PLoS One* 9:e112900. (2014) [査読有り]

Hosoi T, Inoue Y, Nakatsu K, Matsushima N, Kiyose N, Shimamoto A, Tahara H, & Ozawa K TERT attenuated ER stress-induced cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 447:378-382. (2014) [査読有り]

Hirashio S, Nakashima A, Doi S, Anno K, Aoki E, Shimamoto A, Yorioka N, Kohno N, Masaki T, & Tahara H Telomeric g-tail length and hospitalization for cardiovascular events in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 9:2117-2122. (2014) [査読有り]

Yamasaki S, Taguchi Y, Shimamoto A, Mukasa H, Tahara H, Okamoto T. Generation of human induced pluripotent stem (Ips) cells in serum- and feeder-free defined culture and TGF- β 1 regulation of pluripotency. *PLoS One*. 9(1): e87151. 2014 [査読有り]

Takemoto M, Mori S, Kuzuya M, Yoshimoto S, Shimamoto A, Igarashi M, Tanaka Y, Miki T, Yokote K. Diagnostic criteria for Werner syndrome based on Japanese nationwide epidemiological survey. *Geriatr Gerontol Int*. 13(2):475-81. 2013 [査読有り]

[学会発表](計 5 件)

日本薬学会第 135 年会、神戸学院大学、2015 年 3 月 26 日(木) 遺伝子発現プロファイルから見た細胞の老化と若返り、嶋本 顕, 田原栄俊

第 73 回日本癌学会学術総会、パシフィコ横浜、2014 年 9 月 27 日(土) リプログラミングはウェルナー症候群細胞の早期老化を抑制する、嶋本 顕, 田原栄俊

第 37 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2014 年 11 月 25 日(火) Progeroid syndrome as a model of aging-related metabolic disorders, Koutaro Yokote, Takahiko Shimizu, Akira Shimamoto and Minoru Takemoto

第 36 回日本分子生物学会年会、神戸国際会議場、2013 年 12 月 5 日(木) 人工多能性幹細胞における X 線に対する高感受性細胞死の p53 依存的な誘導機構の解明、香川 晴信, 河合 秀彦, 佐久間 哲史, 山本 卓, 塩谷 文章, 嶋本 顕, 田原 栄俊

June 23-27, 2013 Seoul, Korea
The 20th International Association of Gerontology and Geriatrics / World Congress of Gerontology and Geriatrics
GENERATION OF INDUCED PLURIPOTENT STEM CELLS FROM WERNER SYNDROME PATIENTS
Akira SHIMAMOTO, Hidetoshi TAHARA

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

嶋本 顕 (SHIMAMOTO, Akira)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・准教授
研究者番号: 70432713

(2) 研究分担者

河合 秀彦 (KAWAI, Hidehiko)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号： 3 0 3 7 9 8 4 6

(3)連携研究者

山本 卓 (YAMAMOTO, Takashi)

広島大学・理学研究科・教授

研究者番号： 9 0 2 4 4 1 0 2

(4)連携研究者

古江 美保 (FURUE, Miho)

独立行政法人医薬基盤研究所・細胞資源研究室・研究リーダー

研究者番号： 8 0 2 5 7 3 1 0