

令和 2 年 4 月 28 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05089

研究課題名(和文) 遺伝子編集した表皮水疱症患者由来iPS細胞を用いた多角的再生医療の開発

研究課題名(英文) Regenerative therapy using gene-edited iPS cells derived from an epidermolysis bullosa patient

研究代表者

新熊 悟 (Shinkuma, Satoru)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：00613788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：劣性栄養障害型表皮水疱症は、全身の皮膚、粘膜に水疱、びらんを生じる遺伝性疾患である。CRISPR/Cas9などの遺伝子編集技術を用いて遺伝子治療を施したiPS細胞から分化させた線維芽細胞および表皮細胞を患部に直接投与する局所的治療と、造血系/間葉系幹細胞の全身投与による全身的治疗を組み合わせたことにより根治的治療法を開発できると考えた。本研究課題では、この治療法を実用化させるために、表皮水疱症患者由来の表皮角化細胞からiPS細胞を樹立し、さらに間葉系幹細胞への分化誘導が可能であることを確認した。さらに日本人患者に多く認められる遺伝子変異に対し、特異的に効率良く遺伝子を修復する技術を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体において免疫は他人の細胞を排除するように働くため、再生医療には自己の細胞を用いる必要がある。遺伝性疾患では、患者細胞には遺伝子変異があるため、患者の細胞に遺伝子治療を施して、再度患者自身に戻す必要がある。この治療法を実用化するためには、細胞を必要分増殖させること、また遺伝子治療した細胞を全身に行き渡らせる必要があった。本研究では、患者由来細胞の遺伝子治療法を確立し、さらに自己増殖が可能なiPS細胞を皮膚細胞や全身に遊走することができる細胞に分化させることに成功し、遺伝性皮膚疾患の遺伝子・再生医療に向けた実証実験を行った。

研究成果の概要(英文)：Recessive dystrophic epidermolysis bullosa is an inherited disorder characterized by blisters and erosions on the whole body. It was considered that a radical treatment could be developed by combining a local treatment in which fibroblasts and epidermal keratinocytes differentiated from iPS cells genetically treated using gene editing technology such as CRISPR/Cas9 are directly administered to the affected area and a systemic treatment by systemic administration of hematopoietic/mesenchymal stem cells. In this study, we established iPS cells from epidermal keratinocytes derived from patients with epidermolysis bullosa, and confirmed the possibility of differentiation into mesenchymal stem cells. Furthermore, we have established a technology to specifically and efficiently repair gene mutations that are frequently found in Japanese patients.

研究分野：皮膚科学

キーワード：表皮水疱症 reframing治療 遺伝子治療 iPS細胞 遺伝子編集

1. 研究開始当初の背景

劣性栄養障害型表皮水疱症は、全身の皮膚、粘膜に水疱、びらんを生じる遺伝性疾患である(図1)。根治的治療法はなく、感染症や二次的な悪性腫瘍により若年期に死に至る。著しい臨床症状から、患者支援団体が世界中で設立されるなど、医療分野のみならず、一般社会においても非常に注目されており、治療法の確立は喫緊の課題である。



図1 劣性栄養障害型表皮水疱症の臨床像

劣性栄養障害型表皮水疱症は表皮角化細胞や真皮線維芽細胞から分泌される表皮-真皮接着タンパクである7型コラーゲンをコードする COL7A1 遺伝子の異常により発症する(Shinkuma S, et al. Clin Dermatol 2011, Shinkuma S, et al. Clin Cosmet Investig Dermatol 2015)。

我々は劣性栄養障害型表皮水疱症患者を対象に患者由来表皮角化細胞を用いた自家培養表皮シートの臨床研究を行っている(Shinkuma S, et al. Acta Derm Venereol 2014)。しかし、患者細胞は遺伝子変異を伴い、また病変が全身に及ぶため、効果は限定的であった。そのため、申請者が所属する研究室では、7型コラーゲンを分泌する表皮細胞や線維芽細胞に分化転換する造血系/間葉系幹細胞に着目し、表皮水疱症モデルマウスに対し、野生型マウスの幹細胞移植療法の有効性を見いだした(Inokuma D et al, Stem Cells 2006, Fujita Y et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 2010)。実際に、米国などで同種造血幹細胞移植(Wagner JE et al, N Engl J Med 2010)が少数例で施行され、効果が確認されているが、移植関連死が問題となり本邦での実現には至っていない。

近年、CRISPR/Cas9などの遺伝子編集技術が開発され、配列特異的ヌクレアーゼと鋳型となるドナー遺伝子を細胞に導入することによって相同組換え修復を誘導させる遺伝子治療が可能になった。しかし、その遺伝子修復効率は限定的であり、その理由の一つとして配列特異的ヌクレアーゼがドナー遺伝子をも切断するため、その組換え効率が低くなることが推測されている。また、たとえ正しく遺伝子治療を行ったとしても、正しく遺伝子治療を施せた表皮細胞や造血系/間葉系幹細胞を用いた細胞療法ではリソースの量的限界がある。そこで、iPS細胞を遺伝子治療の対象とし(Shinkuma S, et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016) 遺伝子編集を介してiPS細胞の遺伝子治療を行い、そのiPS細胞を大量に自己複製させることにより、細胞の数的問題が解決可能になると考えた。また、遺伝子変異部位を特異に認識する変異部特異的ヌクレアーゼを用いることにより、正常ドナー遺伝子に影響しない効率的な相同組換え修復が可能になると考えた。さらに劣性栄養障害型表皮水疱症患者由来のiPS細胞から分化させた線維芽細胞および表皮細胞を患部に直接投与する局所的治療と、造血系/間葉系幹細胞の全身投与による全身的治疗を組み合わせることにより劣性栄養障害型表皮水疱症の根治的治療法を開発できると考えた(図2、3)。

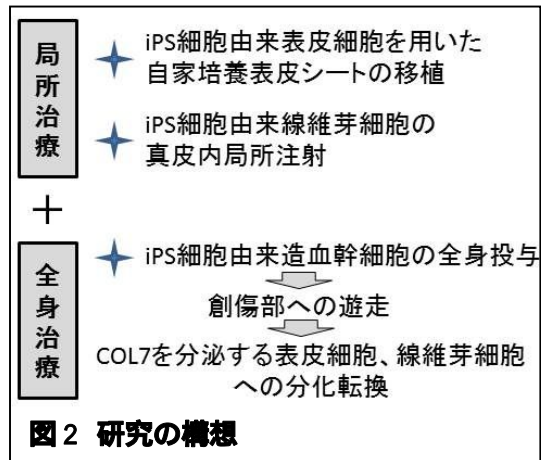


図2 研究の構想

さらに劣性栄養障害型表皮水疱症患者由来のiPS細胞から分化させた線維芽細胞および表皮細胞を患部に直接投与する局所的治療と、造血系/間葉系幹細胞の全身投与による全身的治疗を組み合わせることにより劣性栄養障害型表皮水疱症の根治的治療法を開発できると考えた(図2、3)。

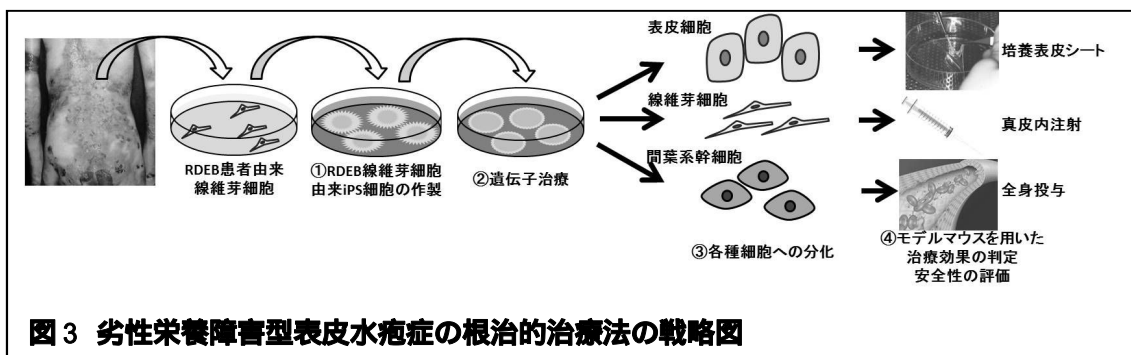


図3 劣性栄養障害型表皮水疱症の根治的治療法の戦略図

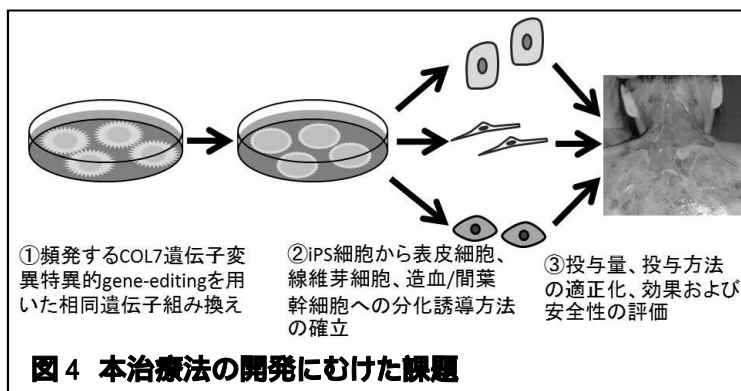
## 2. 研究の目的

劣性栄養障害型表皮水疱症患者を治療するうえで、問題点として、遺伝子編集技術を用いた遺伝子治療の効率の低さ、そして、皮膚だけでなく全身治療が可能な細胞種への iPS 細胞の分化する手法の確立が急務であると考え、本研究課題では、以下の事項を明らかにすることとした。

- (1) 遺伝子挿入のない劣性栄養障害型表皮水疱症患者由来 iPS 細胞の樹立  
リソースの量的限界を解決するため、自己複製能の高い iPS 細胞の使用が必須であると考える。iPS 細胞を用いた再生医療を実用化させるうえで、遺伝子挿入のないヒト iPS 細胞を作製することは必須の事項である。本研究では、Sendai ウイルスベクターを用いて劣性栄養障害型表皮水疱症患者由来の iPS 細胞が樹立可能か確認する。
- (2) iPS 細胞から間葉系幹細胞への分化誘導法の確立  
これまで、iPS 細胞から皮膚の主な構成細胞である表皮角化細胞や真皮線維芽細胞への分化誘導を行ってきた。しかし、これらの細胞を用いた治療では、局所的な治療効果は見込めるものの、全身的治療が困難である。そこで、本研究では iPS 細胞から間葉系幹細胞への分化誘導が可能か確認する。
- (3) 遺伝子変異特異的 gene-editing を応用した劣性栄養障害型表皮水疱症患者由来細胞の遺伝子治療

ゲノム編集技術は DNA 上の特定部位を切断できるヌクレアーゼを用いて標的の遺伝子配列を欠失・置換・挿入する技術である。生体には二本鎖 DNA 切断が生じた際、それを修復する機構が備わっている。その修復機構として、時に数塩基の挿入や欠失を伴って再結合する非相同末端再結合、および相同性の高い DNA 配列との間で交叉が起こり修復する相同組換えの二つの経路がある。これらのうち、遺伝子変異を有する染色体と正常な配列を有する相同性のある外来 DNA との間で組換えを誘導することが可能な相同組換えによる染色体の修復が、より理想的な表皮水疱症の治療法として考えられている。しかし、相同組換えの生じる頻度は非常に低いため、相同組換えを介した遺伝子治療を実臨床で応用するためには、正しく遺伝子が修復された細胞のみを抗生剤カセットなどの選択マーカーを用いて分離する必要がある。しかし、抗生剤カセットはその後 Cre/loxP システムなどを用いて除去されるが、loxP 配列の痕跡が残ることも問題である。

そこで、二本鎖 DNA 切断後の修復経路として相同組換えと比べ高頻度に生じる非相同末端再結合では、数塩基の欠失や挿入が誘導されることが多い。この数塩基の挿入や欠失を意図的に誘導することで、フレームシフト変異を in-frame 化することができれば、選択マーカーを用いるなどの複雑な工程を経ずに効率に遺伝子治療が行えると考えた。そこで本研究では劣性栄養障害型表皮水疱症の日本人患者で多く認められるフレームシフト変異である c.5819delC 遺伝子変異に着目し、COL7A1 遺伝子の c.5819delC の変異部位を特異的に認識する CRISPR/Cas9 を用いて、フレームシフト変異を in-frame 化する reframing 治療が可能か確認する。



## 3. 研究の方法

- (1) 遺伝子挿入のない劣性栄養障害型表皮水疱症患者由来 iPS 細胞の樹立  
日本人に高頻度に認められ、重症型を呈する 5819delC の遺伝子変異を有する劣性栄養障害型表皮水疱症患者由来の表皮角化細胞に *c-MYC*, *SOX2*, *OTT3/4*, *KLF4* を Sendai ウイルスベクターを用いて一過性に遺伝子導入し、iPS 細胞を作製する。さらに、作製した iPS 細胞の幹細胞マーカーの発現、多分化能の有無を確認する。
- (2) iPS 細胞から間葉系幹細胞への分化誘導法の確立  
上記で作製した iPS 細胞を用いて、Activin A, BIO, BMP4, bFGF, EGF を用いて分化させ、さらに CD105 陽性細胞のみを選択する。次いで、フローサイトメトリー法を用いて、作製した細胞が間葉系幹細胞に類似した性質を有するか確認し、さらに間葉系幹細胞としての多分化能の有無を確認する。

(3) 遺伝子変異特異的 gene-editing を応用した劣性栄養障害型表皮水疱症患者由来細胞の遺伝子治療

劣性栄養障害型表皮水疱症患者由来の不死化した真皮線維芽細胞を用いた研究患者由来の不死化した真皮線維芽細胞に対し、変異部位を特異的に認識するCRISPR/Cas9を用いて非相同末端再結合を誘導し、正しくreframeされた単一細胞クローンを単離する。さらにreframeされた7型コラーゲンの機能を*in vitro*および*in vivo*で解析する。

劣性栄養障害型表皮水疱症患者由来の初代培養真皮線維芽細胞を用いた研究次に、不死化していない真皮線維芽細胞を用いて、同様に火相同末端再結合を誘導する。この際、細胞クローンを単離せず、細胞群として7型コラーゲンの発現量を遺伝子およびタンパク質レベルで解析し、さらに、表皮水疱症モデルマウスにこの治療した細胞群を投与し、生体内での機能を解析した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子挿入のない劣性栄養障害型表皮水疱症患者由来 iPS 細胞の樹立

日本人に高頻度に認められ、重症型を呈する 5819delC の遺伝子変異を有する劣性栄養障害型表皮水疱症患者由来の表皮角化細胞に *c-MYC*, *SOX2*, *OTT3/4*, *KLF4* を Sendai ウイルスペクターを用いて一過性に遺伝子導入し、iPS 細胞を作製した(図5)。さらに、作製した iPS 細胞の幹細胞マーカーの発現、多分化能の有無を確認した(図6)。

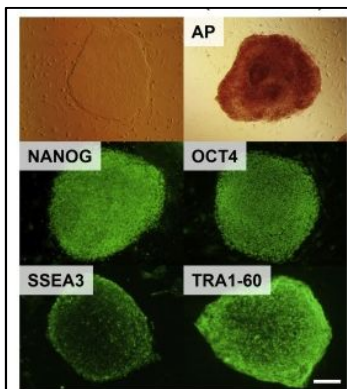


図5 劣性栄養障害型表皮水疱症患者由来 iPS 細胞の樹立

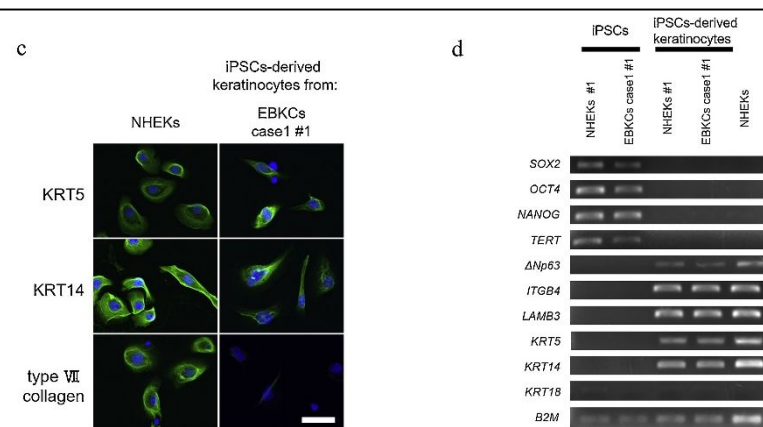


図6 作製した iPS 細胞の角化細胞様細胞への分化誘導実験

(2) iPS 細胞から間葉系幹細胞への分化誘導法の確立

作製した iPS 細胞を用いて、Activin A, BIO, BMP4, bFGF, EGF を用いて分化させ、さらに CD105 陽性細胞のみを選択した。次いで、フローサイトメトリー法を用いて、作製した細胞が間葉系幹細胞に類似した性質を有するか確認し、さらに間葉系幹細胞としての多分化能の有無を確認した(図7)。

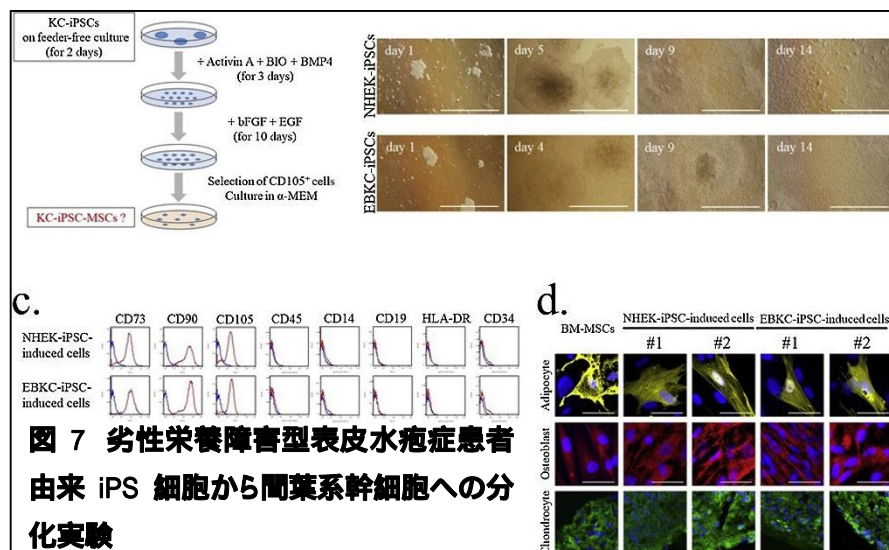


図7 劣性栄養障害型表皮水疱症患者由来 iPS 細胞から間葉系幹細胞への分化実験

(3) 遺伝子変異特異的 gene-editing を応用した劣性栄養障害型表皮水疱症患者由来細胞の遺伝子治療

劣性栄養障害型表皮水疱症患者由来の不死化した真皮線維芽細胞を用いた研究  
 まず患者由来の不死化した真皮線維芽細胞に対し、変異部位を特異的に認識する CRISPR/Cas9 を用いて非相同末端再結合を誘導し、正しく reframe された単一細胞クローンを単離した。これらの細胞クローンでは mRNA およびタンパクレベルで VII 型コラーゲンの発現が増加していた。さらにこれらの細胞クローンを免疫不全マウスの真皮内に投与し、表皮 - 真皮境界部に正しくヒト VII 型コラーゲンが沈着していることを確認した (図 8)。

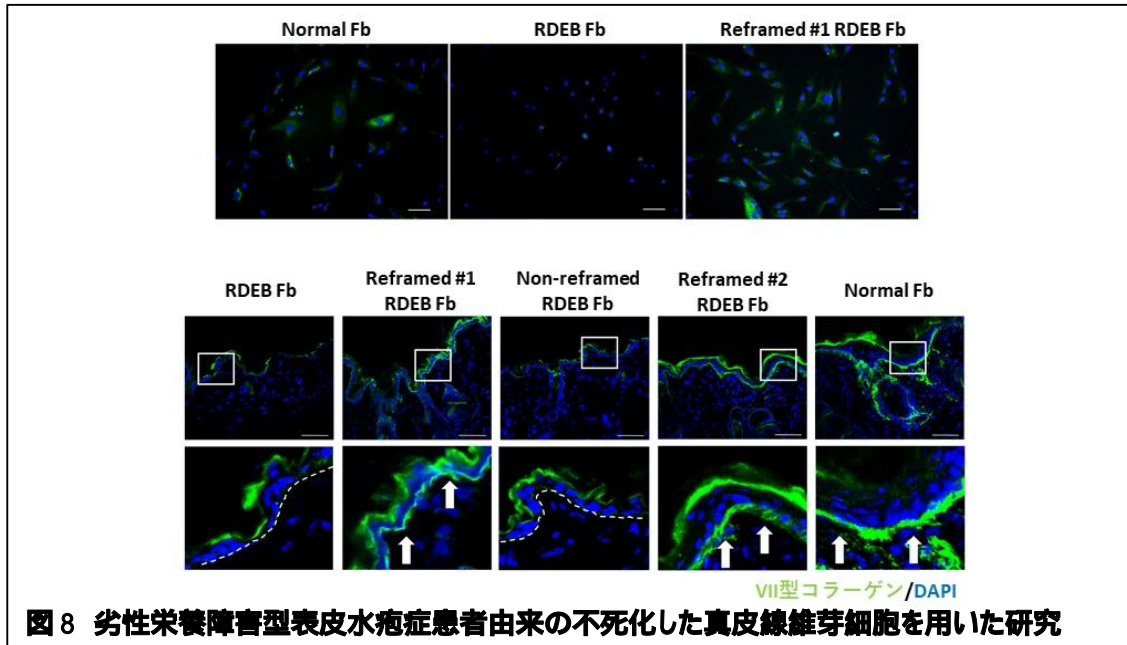


図 8 劣性栄養障害型表皮水疱症患者由来の不死化した真皮線維芽細胞を用いた研究

劣性栄養障害型表皮水疱症患者由来の初代培養真皮線維芽細胞を用いた研究  
 ついで患者由来の初代培養真皮線維芽細胞に対し、変異部位を特異的に認識する CRISPR/Cas9 を用いて非相同末端結合を誘導し、正しく in-frame 化した細胞を含む様々な遺伝子修飾を誘導した細胞集団を用いて、ウェスタンブロット法、リアルタイム PCR 法、および生体内における機能解析を行った。ゲノム編集前の細胞群と比較して、mRNA およびタンパクレベルにおける 7 型コラーゲンの発現量は増加しており、また免疫不全マウスを用いた生体内における機能解析においてもヒト 7 型コラーゲンが正しく表皮 - 真皮境界部に発現していた (図 9)。またゲノム編集後の患者由来線維芽細胞群を 7 型コラーゲンノックアウトマウスに投与し電子顕微鏡で観察したところ、基板直下に係留線維の形成を認めた。本研究の結果はフレームシフト変異で発症する劣性栄養障害型表皮水疱症において、非相同末端結合を介した遺伝子治療は相同組換えを介した遺伝子治療よりも簡便に行うことができ、かつ臨床応用が可能な治療選択肢の一つであることを示した。

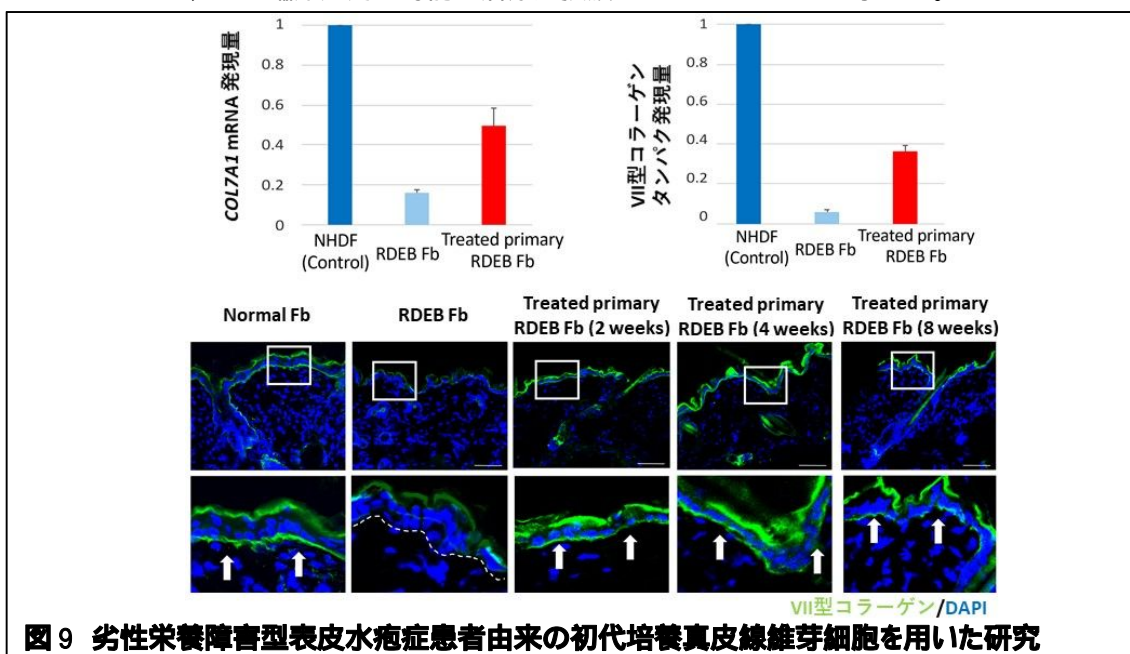


図 9 劣性栄養障害型表皮水疱症患者由来の初代培養真皮線維芽細胞を用いた研究

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takashima Shota, Shinkuma Satoru, Fujita Yasuyuki, Natsuga Ken, Nomura Toshifumi, Hida Tokimasa, Ishikawa Shuku, Nakamura Hideki, Abe Riichiro, Shimizu Hiroshi	4. 巻 45
2. 論文標題 Novel COL7A1 mutation in a family with bullous dermolysis of the newborn: Phenotypic variability associated with a COL7A1 mutation within the same family	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 e260 ~ e261
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14287	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 Nakayama Chihiro, Fujita Yasuyuki, Matsumura Wakana, Ujiie Inkin, Takashima Shota, Shinkuma Satoru, Nomura Toshifumi, Abe Riichiro, Shimizu Hiroshi	4. 巻 91
2. 論文標題 The development of induced pluripotent stem cell-derived mesenchymal stem/stromal cells from normal human and RDEB epidermal keratinocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 301 ~ 310
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2018.06.004	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 Watanabe Mika, Natsuga Ken, Shinkuma Satoru, Shimizu Hiroshi	4. 巻 45
2. 論文標題 Epidermal aspects of type VII collagen: Implications for dystrophic epidermolysis bullosa and epidermolysis bullosa acquisita	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 515 ~ 521
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.14222	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 Takashima Shota, Shinkuma Satoru, Fujita Yasuyuki, Nomura Toshifumi, Ujiie Hideyuki, Natsuga Ken, Iwata Hiroaki, Nakamura Hideki, Vorobyev Artem, Abe Riichiro, Shimizu Hiroshi	4. 巻 139
2. 論文標題 Efficient Gene Reframing Therapy for Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa with CRISPR/Cas9	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 1711 ~ 1721.e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.jid.2019.02.015	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 Matsumura Wakana, Fujita Yasuyuki, Nakayama Chihiro, Shinkuma Satoru, Suzuki Shotaro, Nomura Toshifumi, Abe Riichiro, Shimizu Hiroshi	4. 巻 89
2. 論文標題 Establishment of integration-free induced pluripotent stem cells from human recessive dystrophic epidermolysis bullosa keratinocytes	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Dermatological Science	6. 最初と最後の頁 263 ~ 271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdermsci.2017.11.017	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 Shinkuma S, Nakamura H, Maehara M, Takashima S, Nomura T, Fujita Y, Hasegawa S, Sato-Matsumura K, Abe R, Shimizu H	4. 巻 99
2. 論文標題 Electron Microscopic and Immunohistochemical Findings of the Epidermal Basement Membrane in Two Families with Nail-patella Syndrome	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Acta Dermato Venereologica	6. 最初と最後の頁 1110-1115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2340/00015555-3318	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 Ansai O., Shinkuma S., Kabata Y., Katsumi T., Hagiwara R., Tomii K., Fujikawa H., Matsubara M., Abe R.	4. 巻 34
2. 論文標題 Amino acid charge and epidermolysis bullosa simplex severity: genotype phenotype correlations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology	6. 最初と最後の頁 e87-e90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdv.15990	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 Ansai O, Shinkuma S, Hayashi R, Tomii K, Deguchi T, Aizawa A, Fujiwara H, Shimomura Y, Abe R.	4. 巻 in press
2. 論文標題 Functional analysis of keratin filament network formation indicates clinical severity of epidermolysis bullosa simplex.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdv.16495	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Shota Takashima, Satoru Shinkuma, Yasuyuki Fujita, Toshifumi Nomura, Hideki Nakamura, Hiroshi Shimizu
2. 発表標題 Efficient reframed gene therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa using CRISPR/Cas9.
3. 学会等名 The 7th International Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Chihiro Nakayama, Yasuyuki Fujita, Wakana Matsumura, Shota Takashima, Satoru Shinkuma, Toshifumi Nomura, Riichiro Abe, Hiroshi Shimizu
2. 発表標題 The development of mesenchymal stem/stromal cells from keratinocyte-derived induced pluripotent stem cells (iPSCs)
3. 学会等名 The 42nd Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 S Takashima, S Shinkuma, Y Fujita, T Nomura, H Ujiie, R Abe, H Shimizu
2. 発表標題 Gene-edition targeting mutation site recovers null-expression of type VII collagen caused by frameshift mutation via non-homologous end joining in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa
3. 学会等名 the 76th annual meeting of society for investigative dermatology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hong Ha Nguyen, Satoru Shinkuma, Osamu Ansai, Yudai Kabata, Shota Takashima, Masashi Mori, Masahito Ikawa, Hiroshi Shimizu, Riichiro Abe
2. 発表標題 Frameshift mutations in different exons of Col17a1 lead to distinctive phenotype of junctional epidermolysis bullosa model mice
3. 学会等名 The 44th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Satoru Shinkuma
2. 発表標題 Exploring the possibilities of genome editing therapy for dystrophic epidermolysis bullosa via non-homologous end-joining pathway
3. 学会等名 The 4th Annual Meeting of Chinese Society for Investigative Dermatology (国際学会)
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----