

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461530

研究課題名(和文) CRISPR/Cas9システムを用いた遺伝子治療に向けた基礎的研究

研究課題名(英文) Basic studies toward CRISPR/Cas9-mediated cell therapy

研究代表者

宮下 俊之 (Miyashita, Toshiyuki)

北里大学・医学部・教授

研究者番号：60174182

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：母斑基底細胞癌症候群(NBCCS、Gorlin 症候群)4症例の線維芽細胞より疾患特異的 induced pluripotent stem cell (iPS) 細胞を樹立した。またそれらの細胞においてCRISPR/Cas9システムを用いて遺伝子編集を行い、PTCH1遺伝子の両アレルとも変異をもつiPS細胞、および遺伝子変異が修復されたiPS細胞の作製に成功した。

NBCCS特異的iPS細胞から発生した奇形腫の全例に髄芽腫様組織が含まれていた。また両アレルとも変異をもつiPS細胞は親細胞に比べ細胞増殖速度が速く、Gli標的遺伝子の発現も上昇が見られ、ヘッジホッグシグナル伝達の亢進が見られた。

研究成果の概要(英文)：We have successfully established nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS)-specific induced pluripotent stem cells (iPS cells). Medulloblastoma was formed in all the teratomas generated from all NBCCS-specific iPSC clones established from 4 different patients. These results demonstrated that NBCCS-specific iPSCs can be a good model of NBCCS-derived medulloblastoma, and thereby used for drug screening to prevent or treat medulloblastomas. In addition, by using CRISPR/Cas9 system, we also generated iPS cells in which mutation was introduced in remaining normal PTCH1 allele. These cells exhibited accelerated cell growth and expression of Gli target genes indicating up-regulation of hedgehog signaling. Moreover, we generated iPS cells in which mutated allele was edited and corrected.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：母斑基底細胞癌症候群 CRISPR/Cas9システム iPS細胞 遺伝子編集

1. 研究開始当初の背景

遺伝性疾患の多くが難治性で治療法が開発されている疾患は少ない。その中で遺伝子治療は有望な治療手段として社会の注目を集めてきたものの、現時点で遺伝子治療による劇的な改善を収めた症例は少ない。最近注目を浴びている induced pluripotent stem cell (iPS) 細胞は遺伝性疾患を始めとする疾患に対する再生医療に向けた切り札と考えられている。しかし遺伝性疾患の原因となる遺伝子異常は、iPS 細胞でも保持されたままであることが再生医療の障壁と言われている。

CRISPR/Cas9 は標的遺伝子を極めて効率よく切断することが可能なシステムであり、その修復過程で生じる相同組換えを利用してゲノム配列を編集できることから、遺伝性疾患患者由来細胞がもつ遺伝子変異も同様の方法で正常配列に編集する(戻す)ことの可能性が示唆されている。

我々の研究室では、いち早く上記システムの中心となるベクターを入手し、ヒト細胞株を用いて基礎的実験を行った。その結果、一定の遺伝子導入の効率を得られれば、比較的容易にかつ効率よく目的とする遺伝子を編集することに成功した。一方で、当研究室は以前より、PTCH1 遺伝子の変異によって生ずる常染色体優性遺伝病であり、小奇形と高発癌を特徴とする母斑基底細胞癌症候群(NBCCS、Gorlin 症候群)の遺伝子解析を行っていた。

2. 研究の目的

- (1) 遺伝子変異が確定している NBCCS 患者より疾患特異的 iPS 細胞を樹立する。
- (2) 樹立した iPS 細胞の特性を細胞生物学、分子生物学的に解析する。
- (3) 樹立した iPS 細胞を用いて CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子の修復を目指す。

3. 研究の方法

4人のNBCCSの患者由来線維芽細胞よりセンダイウイルスベクター法によりiPS細胞を樹立した。得られた疾患iPS細胞が、多能性幹細胞としての特性を持つことを確認するために、未分化性、増殖性、安定性について評価し、分化能についてin vivo、in vitroの両面から検討した。その中でin vivo多能性を示す疾患特異的iPS細胞の免疫不全マウスへの移植実験については、得られたテラトーマから組織切片を作製して、組織学的観察に加え、レーザーマイクロディセクション法による病理学的に詳細な解析を行った。

必要に応じてiPS樹立の元となった症例の血液等を用いて次世代シーケンサーを用いてディープシーケンスを行なう。

4. 研究成果

NBCCS 特異的 iPS 細胞は、多能性幹細胞としての特性を持つことが示された。PTCH1 遺

伝子のヘテロ変異は、増殖能や分化能において影響がないことが示唆された。

一方で、テラトーマの組織切片を観察すると、4人から得られたいずれのラインにおいても、その一部に髄芽腫様の組織を認めた。そこでさらにその病変部をレーザーマイクロディセクション法により採取して遺伝子解析を行った。その結果、PTCH1 遺伝子の Loss of Heterozygosity が生じていることがわかった(図1)。得られた結果は、本疾患で発症する可能性のある髄芽腫を疾患 iPS 細胞による in vivo 多分化能試験において再現し、この iPS 細胞が疾患モデル細胞としての可能性を示唆するものであると考えられた。今後、この疾患 iPS 細胞を用いて、癌発症機構について分子レベルでの研究が可能となり、NBCCS や PTCH1 に起因する腫瘍細胞に対する薬剤スクリーニングへつながることが期待される。

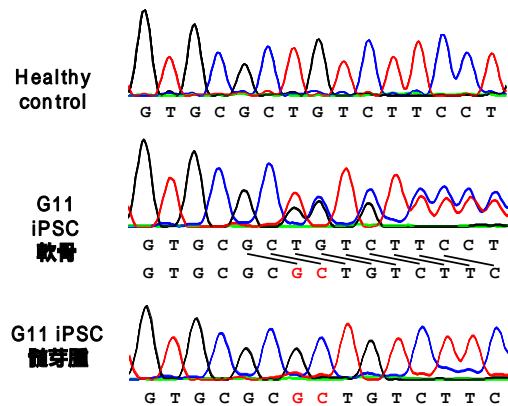


図1 髄芽腫の遺伝子解析

更に CRISPR/Cas9 システムを用いて上記の iPS 細胞に残存する正常アレルの破壊を行い、両アレルとも PTCH1 遺伝子に変異をもつ iPS 細胞株を作製した。これらの細胞株は親株に比べて細胞増殖速度が速く、ヘッジホッグシグナル伝達の標的遺伝子の発現が亢進していた。一方、同システムを用いて変異アレルを編集し、両アレルとも正常である iPS 細胞細胞株の樹立にも成功した。

一方で、iPS 細胞株の一部で、PTCH1 の胚細胞変異 (c.272delG) と異なる予期しない変異 (c.274delT) を見出した。この症例由来の末梢血、頬粘膜、線維芽細胞等について、次世代シーケンサーを用いてディープ・シーケンスを行なったところ、全ての組織において iPS 細胞の一部で見出されたものと同一の c.274delT が存在することがわかった。2個の変異が近接していること、両方の変異をもつアレルは存在しなかったこと、いずれの組織でも約半数で正常アレルが検出されたことなどより、2個の変異が独立に生じたとは極めて考えにくく、c.274delT は発生早期に生じた c.272delG の修復エラーであることが推測された(図2)。

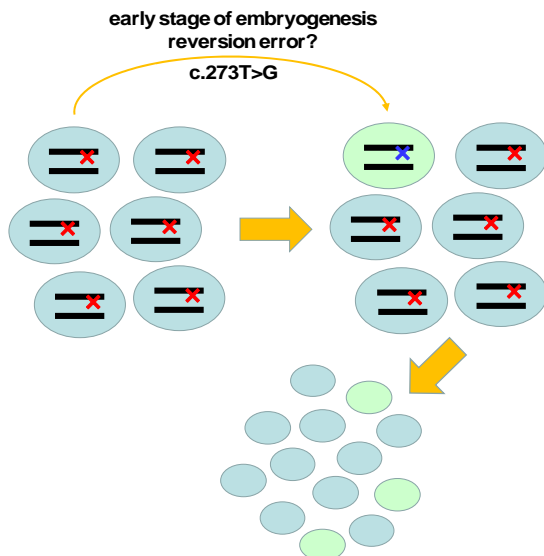


図2 モザイク発生のメカニズム

iPS 細胞や次世代シーケンサーを用いた解析を行なうことで、各種遺伝性疾患において、モザイク症例が予想以上に発見される可能性があると考えられる。また症例の蓄積により、復帰エラーの頻度や分子メカニズムも明らかになると思われる。本成果は研究課題の追求から付随的に生じたものではあるが、遺伝学にとって意義深いものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Ikemoto, Y., Takayama, Y., Fujii, K., Masuda, M., Kato, C., Hatsuse, H., Fujitani, K., Nagao, K., Kameyama, K., Ikehara, H., Toyoda, M., Umezawa, A. and Miyashita, T. Somatic mosaicism containing double mutations in *PTCH1* revealed by generation of induced pluripotent stem cells from nevoid basal cell carcinoma syndrome. *J. Med. Genet.* 査読有 2017 in press DOI: 10.1136/jmedgenet-2016-104490

Shiohama, T., Fuji, K., Miyashita, T., Mizuochi, H., Uchikawa, H., Shimojo, N. Brain morphology in children with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Am. J. Med. Genet. A* 査読有 173, 2017, 946-952, DOI: 10.1002/ajmg.a.38115

Kato, C., Fujii, K., Arai, Y., Hatsuse, H., Nagao, K., Takayama, Y., Kameyama, K., Fujii, K., and Miyashita, T. Nevoid basal cell carcinoma syndrome caused by splicing mutations in the *PTCH1* gene. *Fam. Cancer* 査読有 16, 2017, 131-138, DOI: 10.1007/s10689-016-9924-2

Akizawa, Y., Miyashita, T., Sasaki, R.,

Nagata, R., Aoki, R., Ishitani, K., Nagashima, Y., Matsui, H. and Saito, K. Gorlin syndrome with an ovarian leiomyoma associated with a *PTCH1* second hit. *Am. J. Med. Genet. A* 査読有 170A, 2016, 1029-1034, doi: 10.1002/ajmg.a.37517

宮下俊之. *PTCH1, PTCH2, SUFU*, 日本臨牀 査読無 73, 2015, 375-379, doi:なし

Fujii, K. and Miyashita, T. Gorlin syndrome (nevoid basal cell carcinoma syndrome): Update and literature review. *Pediatr. Int.* 査読有 56, 2014, 667-674, DOI: 10.1111/ped.12461

〔学会発表〕(計 7 件)

渡邊敦, 柚津晋平, 大城浩子, 赤羽弘資, 合井久美子, 犬飼岳史, 藤井克則, 宮下俊之, 杉田完爾. 角化嚢胞性歯肉性腫瘍を合併した B 前駆細胞型急性リンパ性白血病の一例. 第 58 回日本小児血液・がん学会学術集会 2016 年 12 月 15 日~2016 年 12 月 17 日, 品川プリンスホテル(東京都港区)

高山吉永, 長尾一右, 藤井克則, 宮下俊之. Entire *PTCH1* deletions detected in 9 families with nevoid basal cell carcinoma syndrome, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016 年 10 月 06 日~2016 年 10 月 08 日, パシフィコ横浜(横浜市)

池本 優, 豊田 雅士, 那須 道世, 初瀬 洋美, 長尾 和右, 高山 吉永, 亀山 孝三, 梅澤 明弘, 宮下 俊之. Gorlin 症候群患者由来 iPS 細胞を用いた髄芽腫の作製, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月 30 日~2016 年 12 月 02 日, パシフィコ横浜(横浜市)

塩浜直, 藤井克則, 宮下俊之, 内川英紀, 水落弘美, 池原甫, 福原知之, 下条直. Gorlin 症候群における脳形態解析 - ヘッジ ホッグシグナルのヒト脳への影響 -, 第 58 回日本小児神経学会学術集会, 2016 年 06 月 03 日~2016 年 06 月 05 日, 京王プラザホテル(東京都新宿区)

宮下俊之, 藤井克則. 母斑基底細胞癌症候群におけるスプライシング変異の検討, 第 22 回日本家族性腫瘍学会学術集会, 2016 年 06 月 03 日~2016 年 06 月 04 日, ひめぎんホール(愛媛県松山市)

加藤千勢, 長尾和右, 初瀬洋美, 高山吉永, 亀山孝三, 宮下俊之. CRISPR/Cas9 システムを用いた 2 点同時切断による目的ゲノム領域除去細胞株の作製, 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015 年 12 月 01 日~2015 年 12 月 04 日, 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

長尾和右, 高山吉永, 宮下俊之.
Establishment of the cell lines with a large
genomic deletion by CRISPR/Cas9 system. 第
74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 08
日 ~ 2015 年 10 月 10 日, 名古屋国際会議場
(愛知県名古屋市)

〔図書〕(計 1 件)

宮下俊之, 藤井克則. 最新遺伝性腫瘍・家
族性腫瘍研究と遺伝カウンセリング, メデ
ィカルドゥ, 2016, 336

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.med.kitasato-u.ac.jp/~molgen/index.h
tml](http://www.med.kitasato-u.ac.jp/~molgen/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮下 俊之 (MIYASHITA, Toshiyuki)
北里大学・医学部・教授
研究者番号: 60174182

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

長尾 和右 (NAGAO, Kazuaki)
北里大学・医学部・講師
研究者番号: 60392487

亀山 孝三 (KAMEYAMA, Kohzoh)

北里大学・医学部・講師
研究者番号: 40214556

高山 吉永 (TAKAYAMA, Yoshinaga)

北里大学・医学部・講師
研究者番号: 90245407

(4) 研究協力者

なし