

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09789

研究課題名(和文)人工多能性幹細胞を用いた先天性表皮水疱症に対する遺伝子・細胞療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of Gene and Cell Therapy for Epidermolysis Bullosa using iPSC technology

研究代表者

伊藤 宗成 (Itoh, Munenari)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：20408371

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)：本研究では、日本初の技術である人工多能性幹細胞(iPSC)を用いて、先天性表皮水疱症の遺伝子・細胞治療の確立を目指した。先天性表皮水疱症は、生まれつき型コラーゲンの遺伝子変異により、表皮と真皮の接着が脆弱であり、僅かな外力で水疱を来し、瘢痕形成を生じる疾患である。我々は、患者血液細胞からiPSCを樹立し、最新の遺伝子改変システム(CRISPR/CAS9)を用いて、iPSC内の遺伝子変異の修復を試みた。また今回の手法では、遺伝子変異の修復に必要なvector作製の際に、Transposonの原理も応用することで、元の遺伝子に傷跡を残さないような工夫を施し、実現しうる手法かどうか、検証した。

研究成果の概要(英文)：In our study, we attempted to establish gene and cell therapy for recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) using induced pluripotent stem cell (iPSC) technology. RDEB is an inherited skin disorder caused by the mutation in the type VII collagen gene, an important component for skin integrity between epidermis and dermis, resulting in skin fragility. Therefore, RDEB is characterized by repeated and incurable skin blisters with minor trauma. We first generated iPSC from T cells isolated from the patient with RDEB using Sendai virus vector to avoid viral gene insertion. We next tried to correct pathogenic gene mutation in RDEB-derived iPSCs using homologous recombination-based CRISPR/CAS9 system. In this trial, we modified template DNA plasmid by installing drug-resistance gene flanked by transposon inverted repeat sequence to completely remove drug-resistance gene after gene correction, and confirmed whether our system worked well or not.

研究分野：幹細胞、遺伝性疾患

キーワード：人工多能性幹細胞 先天性表皮水疱症 遺伝子治療 細胞治療

1. 研究開始当初の背景

先天性表皮水疱症 (Epidermolysis Bullosa: 以下 EB) は、皮膚の表皮真皮接合部を構成する重要な蛋白質をコードする遺伝子の異常によって生じる。病型によっては致死的であり、経過も非常に凄惨な疾患である。なかでも、表皮と真皮を結合させる係留線維の主成分である 7 型コラーゲンの遺伝子異常で生じる栄養障害型 EB (Recessive dystrophic EB: 以下 RDEB) では、皮膚が脆弱になり、再発性かつ難治性の水疱を形成し癒痕治療を繰り返す。その結果、指趾は癒合・脱落に至り、時には腸管狭窄なども生じ、Quality of Life を大きく損なう。また皮膚欠損部から感染症を起こし敗血症に至ることも少なくなく、さらに高率に皮膚有棘細胞癌に合併することも知られており、予後は非常に悪く、若くして亡くなる患者が大半を占める。しかし、RDEB に対する従来の治療はあくまで対症的なもので、根本的な治療方法がなかった。近年、ウイルスベクターを用いた表皮細胞への遺伝子治療や、他家線維芽細胞注入療法や他家骨髄移植といった細胞療法など、いくつかの革新的かつ挑戦的な治療法の試みが進んでいる。特に骨髄幹細胞 (以下 BMSC) の可塑性を利用した骨髄移植では、移植した BMSC が皮膚に遊走し、皮膚の細胞に分化し、7 型コラーゲンを供給することが示されて注目を集めているが (Kiuru M, Itoh M et al. Dermatol Clin. 2010)、骨髄移植には強力な前処置が必要で、その安全性や評価はまだ定まったものではない。申請者は、無限の増殖能と多分化能を持ち、移植しても拒絶されない iPSC の大きな可能性にいち早く着眼し、EB の治療への iPSC の応用を模索してきた。申請者は RDEB 患者の線維芽細胞 (以下 FB) から iPSC を樹立し、さらにその iPSC を正常機能を有した表皮細胞 (以下 KC) に直接効率良く分化誘導することに初めて成功した (Itoh M et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2011)。これは皮膚科領域においても iPSC が再生医療における無尽蔵の細胞ソースになり得ること、そして遺伝子疾患の遺伝子改変治療のターゲットになり得ることを示したものであり、様々な文献や総説で引用されている。しかし iPSC を EB の治療に応用するにはまだ数多くの問題を解決する必要がある。今回の研究を着想した。本研究計画は、過去の様々な知見と、以下のような我々の今迄の研究成果、さらには平成 24 年度「研究活動スタート支援」の支援により得られたデータを基に、iPSC を EB の治療に臨床応用していくための基礎研究である。

RDEB 患者由来 FB からレトロウイルスベクターを用いて iPSC を樹立し、非常に効率良く KC に直接分化誘導させ、その iPSC 由来 KC が 3 次元培養上で正常な機能を有することを示した (Itoh M et al. Proc Natl Acad Sci U S A 2011)。

iPSC から FB へ再分化させることに成功し、iPSC 由来の KC および FB の双方を用いて、iPSC 由来ヒト三次元培養皮膚を初めて作製した (Itoh M et al. PLoS One 2013)。

Revertant mosaicism を持つ EB 患者から、自然に遺伝子修復された細胞を抽出して、遺伝子治療の必要ない iPSC を樹立、治療応用への可能性を示した (Umegaki-Arao N, Pasmooij AMG, Itoh M et al. Sci Transl Med Accepted)。iPSC 由来色素細胞含有 iPSC 由来ヒト三次元培養皮膚を作成 (共著者として論文投稿中)

2. 研究の目的

本研究では、iPSC を用いた EB の治療の確立を目指し、EB 患者由来 iPSC 内での遺伝子治療の是非、iPSC の分化誘導による細胞治療の可能性について検討する。

3. 研究の方法

前述の背景およびこれまでの知見、我々の研究成果を基に、本研究は iPSC を EB の治療に臨床応用していくための基盤となる基礎研究を以下の手順に沿って行う。

ウイルス由来遺伝子がゲノム遺伝子に挿入されていない、安全で、将来の臨床研究にも使用可能な EB 患者由来 iPSC を、センダイウイルスベクターを用いて樹立する。

ウイルスベクターなどによって欠損遺伝子の機能を補う (cDNA の導入など) だけではなく、遺伝子相同組換え技術を用いて、安全かつ安価に遺伝子異常の修復を行う方法を確立し、EB 患者由来 iPSC の中で遺伝子治療を実際に行う。相同組換えでは、遺伝子変異部位に対応する正常な遺伝子配列を持った鋳型 DNA を作製し、RDEB 患者由来 iPSC 内に導入することで、遺伝子異常の修復を図る。鋳型 DNA には、細胞株選別のために必要な薬剤耐性遺伝子を intron 領域に組み込んでおき、相同組換え iPSC を薬剤により選別できるようにしておく。従来の鋳型 DNA の設計では、薬剤耐性遺伝子は両端に loxP site を置いた状態で鋳型 DNA 内に組み込まれ、細胞株選別の後、Cre recombinase にてゲノム遺伝子から除去される方法が主流であった。しかし、この方法ではたとえ薬剤耐性遺伝子を除去しても、片方の loxP 配列 (数十 bp) がゲノム内に残存してしまう。残存部位はイントロン領域内とはいえ、位置によってはスプライシングに影響を与え、遺伝子発現に差が生じる可能性

も否定できず、安全とは言い難い。そのため申請者は、薬剤耐性遺伝子を Transposon の inverted repeat sequence (IRS) で挟み込んでおき、選別後は Transposase の発現により除去できるように設計した。Transposon を使った場合、外来遺伝子を iPSC のゲノムから残存なく全てを削除できることが大きな利点となる。従来の electroporation による相同組換えではその発生率は極めて低いため、予め設定した特異的部位での二本鎖 DNA 切断を起こせて、相同組換えの発生率を飛躍的に増大させる遺伝子改変酵素 (Clustered Regularly Interspaced Short Repeat (CRISPR)) を使用する。相同組換えのうち、薬剤選別により得られた iPSC 株内で、実際の遺伝子異常が修復されていることを、サザンブロット法と Direct sequence により確認する。その後、相同組換え iPSC 内で Transposase を発現させ、薬剤耐性遺伝子を除去したのち、遺伝子改変操作により、他の遺伝子に不適切な変異が入っていないことも確認する。

EB 患者では Revertant mosaicism (以下 RM) という現象が観察されることがある。これは創傷治癒を繰り返すために、原因となっている遺伝子変異とは別の突然変異が起こり、その結果、元の遺伝子異常が自然と修復されてしまう現象である。この現象が観察される患者では、RM から iPSC をつくることで、「自然に遺伝子治療が施された」 iPSC が作れる可能性があるため、このアプローチが遺伝子治療・細胞治療の別のオプションとなり得るかを確かめる。

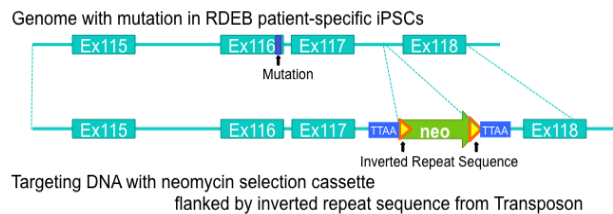
過去の報告から細胞治療に有用とおもわれる細胞 (KC、FB、BMSC) への効率良い分化誘導方法を確立し、遺伝子修復後の患者由来 iPSC から分化誘導を行う。その後、修復された遺伝子でコードされている蛋白質の発現が見られるか確認する。分化誘導した細胞を *in vivo* で機能解析を行い、適切に分化できているかを確認する。

すでに「iPSC の樹立」については平成 24 年度「研究活動スタート支援」の支援を得て、目的を達成しているため、本研究期間内では以下を推進していく。

4. 研究成果

Transposon は、遺伝子内の TTAA 配列を認識し、IRS に挟まれた配列を挿入・切断を行うため、病因となる遺伝子変異の近傍のイントロン内の TTAA 配列を選び、そこに薬剤耐性

遺伝子が入るように鋳型 DNA を作製した (図 1)。



【図 1】鋳型 DNA の作製

作製した鋳型 DNA を、CRISPR/CAS9 を発現させる vector と共に iPSC に electroporation にて導入し、遺伝子変異の改変を行った。薬剤耐性にて選別を行い、iPSC 株をピックアップしたのち、まずは Direct sequence により遺伝子変異の改変が起きていると思われる株に当たりをつけ、さらにサザンブロット法により、正確な位置で遺伝子改変が行われているか、確認を行った。その結果、複数の遺伝子改変 iPSC 株を取得することに成功した。

その後、IRS に挟まれた薬剤耐性遺伝子を除去するため、Transposase 発現 vector を遺伝子改変 iPSC 株に導入した。しかしながら、薬剤耐性遺伝子が除去された iPSC 株を取得することはできず、様々な条件検討などを行ってみたものの、その原因を特定するには至らなかった。

そこで、鋳型 DNA を再度一から作製し直すこととなった。この際に以下のような改善を行った (図 2)。

前回、薬剤耐性遺伝子の挿入位置が不適切だったために、薬剤耐性遺伝子が除去できなかった可能性を考慮し、もうひとつの病因遺伝子変異近くの TTAA 配列を選び出し、鋳型 DNA を再作製した。

薬剤耐性遺伝子だけでなく、HSV-TK 遺伝子も挿入し、薬剤耐性遺伝子が除去されたか否かを、のちにガンシクロビルによる negative selection で選別できるようにした。

Transposase 発現 vector 内にも薬剤耐性遺伝子 (blasticidin : Bsd) が挿入されたものを使用し、iPSC 内に導入した際、薬剤選別により Transposase の発現の是非が判定できるようにした。



【図 2】鋳型 DNA の再作製

これにより、Transposase 発現 vector が導入され、Transposase が十分に発現した iPSC 株が、Bsd による選別で生き残り、さらにガンシクロビルによる選別を行うと、Transposase により IRS で挟まれた薬剤耐性遺伝子が除去された iPSC 株が取得できることとなる。前回の鋳型 DNA と比較して、各段

階での確認作業がより明確に進むものと考えられた。

またさらに、遺伝子改変を行う CRISPR/CAS9 にも工夫を施した。それまでは発現 vector の形で iPSC 内に導入することが一般的であったが、導入効率の向上や、off target の軽減などを目的として、CRISPR/CAS9 を RNA の形で導入する方法を新たに採用した。

新たな鋳型 DNA と CRISPR/CAS9 RNA を iPSC に導入し、相同組換え体である遺伝子変異が改変された iPSC 株の取得を試みた。薬剤選別と Direct sequence により、遺伝子改変されたと思われる iPSC 株を複数取得することができた。その後、サザンブロット法によるさらなる遺伝子改変の確認を行うこととしたが、正確なバンドを得ることができなかった。その原因を探るべく、様々な条件検討を行ったところ、最終的な原因は、不適切な DNA 抽出方法によるものであった。しかしながら、この軽微な差に気づき、結果に改善が得られるまではかなりの時間と労力を費やした。サザンブロット法による確認の末、遺伝子変異の改変された「遺伝子治療 iPSC 株」を数株樹立することができた。この遺伝子治療 iPSC 株に対して、前述の Bsd 耐性遺伝子含有 Transposase 発現 vector を導入し、Bsd による薬剤選別を行った後、ガンシクロビルによるさらなる選別を行ったが、現時点ではまだ「薬剤耐性遺伝子が除去された遺伝子治療 iPSC 株」の取得には至っていない。実験進行中、Bsd およびガンシクロビルを作用させるタイミングと期間については事前に条件検討を重ねていたが、実験進行中、細胞の死滅・生存率により大きな差が出るのが明確になってきたため、さらなる条件検討を行い、目的とする iPSC 株の樹立を目指す。

いくつかの予期せぬトラブルにより、研究計画は大幅に遅れているが、ひとつひとつの課題を解決し、少しずつ前進しているものと思われる。今後もさらなる研究成果を得るため、尽力していきたいと考えている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 宗成 (ITO, Munenari)
東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号：20408371

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

河越 しほ (KAWAGOE, Shiho)