

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2015

課題番号：15K15392

研究課題名(和文) ゲノム編集による高IgE症候群の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a therapeutic genome editing for hyper-IgE syndrome

研究代表者

峯岸 克行 (MINEGISHI, Yoshiyuki)

徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・教授

研究者番号：10343154

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)：高IgE症候群はSTAT3の片アレルの1塩基置換により発症する疾患であるため、その治療には、STAT3の変異アレルを特異的に切断し、野生型アレルを切断しないCRISPR/Cas9を発見する必要がある。そこで、2重鎖切断によりGFPの発現が誘導されるレポーターアッセイを開発し、野生型のStat3を持つレポーターに対してはGFPの発現を誘導せず、変異型を持つレポーターではGFPを発現するCRISPRを探索した。このレポーターアッセイによりStat3変異体遺伝子を特異的に切断し、Stat3野生型遺伝子は切断しないCRISPRを見出すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Hyper-IgE syndrome is characterized by the extremely high serum IgE levels, severe atopic dermatitis, and recurrent staphylococcal infections to the skin and lung. This disorder is caused by a substitution of a single nucleotide of a single allele of STAT3 gene. To treat this disorder with genome editing, we need to establish a CRISPR/Cas9, which could discriminate a difference of the single nucleotide. To this end, we established a reporter assay, specifically detect double strand break by CRISPR/Cas9. With this model system, we successfully identified a CRISPR/Cas9, which specifically cleave mutant STAT3 allele, but not cleave wild-type STAT3 allele.

研究分野：小児科学

キーワード：免疫学 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

高 IgE 症候群は、1966 年に最初に報告された原発性免疫不全症であるが、その病因は長らく不明であった。2007 年に我々が、その主要な原因が Stat3 遺伝子のドミナントネガティブ(dominant negative; DN)変異であることを世界に先駆けて明らかにした (Minegishi *et al.*, *Nature*, 2007)。しかし、原因遺伝子が同定された後も、その病態形成機構は不明で根治療法は存在しない。そこで、本研究計画では STAT3 の変異により発症する高 IgE 症候群の新規治療法を開発する目的で、Stat3-DN を発現する高 IgE 症候群のモデルマウスを樹立し、この疾患モデルマウスより iPS 細胞を作成、これを CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)/Cas9 によるゲノム修復を利用した遺伝子修復型の遺伝子治療法を開発することにより、高 IgE 症候群を根治する治療法を開発する。CRISPR/Cas9 によるゲノム編集は、これまでに試みられた多くの哺乳類細胞への 2 重鎖切断技術と比較して、作成の容易さと効率性で上回る最先端のゲノム編集技術である。これらの再生医療とゲノム編集の技術を結集し、高 IgE 症候群の新規治療法開発へと繋げていく。

2. 研究の目的

我々は、40 年間以上原因が不明であった原発性免疫不全症、高 IgE 症候群の原因が STAT3 のドミナントネガティブ(DN)変異であることを世界で初めて明らかにした。その新規治療法を確立するために Stat3-DN を発現する高 IgE 症候群のモデルマウスを樹立し、このマウスを用いてゲノム編集を利用した高 IgE 症候群の新規治療法を開発を行う。このモデルマウスの線維芽細胞に山中 4 因子を導入し induced pluripotent cell (iPS)細胞を樹立し、ゲノム編集により遺伝子修復型の遺伝子治療を施行、分化誘導後の細胞を個体に戻

し、生体モデルで新規遺伝子治療の効果を検討する。

3. 研究の方法

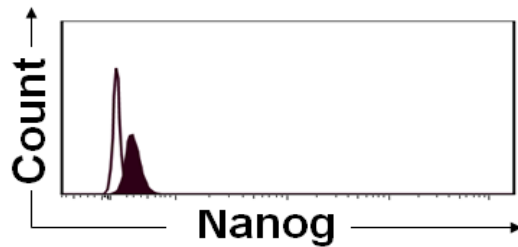
我々は、40 年以上に渡ってその原因が不明であった原発性免疫不全症、高 IgE 症候群の原因が STAT3 のドミナントネガティブ(DN)変異であることを世界で初めて明らかにした。その新規治療法を確立するために Stat3-DN を発現する高 IgE 症候群のモデルマウスを樹立し、このマウスを用いてゲノム編集を利用した高 IgE 症候群の新規治療法を開発を行う。このモデルマウスの線維芽細胞に山中 4 因子を導入し iPS 細胞を樹立、ゲノム編集により遺伝子修復型の遺伝子治療を実施、分化誘導後の細胞を個体に戻し、生体モデルで新規遺伝子治療法の効果を検討する。

4. 研究成果

本研究計画においては、高 IgE 症候群の新規治療法を開発するため、高 IgE 症候群のモデルマウスを樹立した。正常の STAT3 遺伝子を利用して、ES 細胞における STAT3-DN の発現を防ぎ、コンディショナルに Stat3-DN を発現するマウス系統を樹立、これを全身に Cre recombinase を発現するマウスと交配することにより、ヒトと同様に全身組織に STAT3-DN を発現する疾患モデルマウスを樹立した。

このマウスの線維芽細胞に Oct4, Sox2, Klf4, cMyc の山中 4 因子を Dr. Rudolf Jaenisch に供与された FUW-OSKM Dox-inducible lentiviral vector にて導入、4 週間フィーダー細胞と leukemia inhibitory factor (LIF)、doxycycline (DOX) 存在下で培養した。3 週間経過後より、マウス iPS 細胞に特徴的な形態の細胞集団を認めた。この細胞集団は、DOX 添加時から Nanog タンパクを発現し、Nanog タンパクの発現は DOX を培地から除去した後も持続した(図 1)。

(図 1) FACS による Nanog 発現の検討
(Anti-Nanog と isotype control による
染色)



この iPS 細胞に対して CRISPR/Cas9 による DNA 2 重鎖切断を誘導した。この状況では STAT3-DN アレルを切断し、野生型 (WT) の STAT3 アレルは切断しない CRISPR/Cas9 を使用することが必要である。そこで、まず 2 重鎖切断により GFP の発現が誘導されるレポーターアッセイを行った。このレポーターは GFP を 2 つに分割し 482bp のオーバーラップ領域を導入、その間に野生型または、変異体の STAT3 アレルを導入している。2 重鎖切断が誘導されると、分割され蛍光を発しない GFP が single strand annealing によりオーバーラップ領域を介して活性を持つ GFP となり蛍光を発する。このため、野生型の Stat3 を持つレポーター (Stat3-WT) に対しては GFP の発現を誘導せず、変異体 (Stat3-DN) を持つレポーターでは GFP を発現する CRISPR をスクリーニングする。このレポーターアッセイにより CRISPR- Δ V463-1 は Stat3-DN 変異体遺伝子座を特異的に切断し、Stat3-WT 遺伝子座は切断しないが、CRISPR- Δ V463-2 は Stat3-DN 変異体遺伝子座を切断するが、Stat3-WT 遺伝子座に対しても切断活性を持つことが明らかになった。そこで、今後の iPS 細胞における修復型の遺伝子治療には Δ V463-1 のガイドシーケンスが有用であることが明らかにされた。

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 8 件)

(1) Kreins AY, Ciancanelli MJ, Okada S, Kong XF, Ramírez-Alejo N, Kilic SS, El Baghdadi J, Nonoyama S, Mahdaviani SA, Ailal F, Bousfiha A, Mansouri D, Nievas E, Ma CS, Rao G, Bernasconi A, Sun Kuehn H, Niemela J, Stoddard J, Deveau P, Cobat A, El Azbaoui S, Sabri A, Lim CK, Sundin M, Avery DT, Halwani R, Grant AV, Boisson B, Bogunovic D, Itan Y, Moncada-Velez M, Martinez-Barricarte R, Migaud M, Deswarte C, Alsina L, Kotlarz D, Klein C, Muller-Fleckenstein I, Fleckenstein B, Cormier-Daire V, Rose-John S, Picard C, Hammarstrom L, Puel A, Al-Muhsen S, Abel L, Chaussabel D, Rosenzweig SD, Minegishi Y, Tangye SG, Bustamante J, Casanova JL, Boisson-Dupuis S. Human TYK2 deficiency: Mucobacterial and viral infections without hyper-IgE syndrome. *J Exp Med.* 2015, 212, 1641-1662 doi: 10.1084/jem.20140280. (査読有)

(2) Ma CS, Wong N, Rao G, Avery DT, Torpy J, Hambridge T, Bustamante J, Okada S, Stoddard JL, Deenick EK, Pelham SJ, Payne K, Boisson-Dupuis S, Puel A, Kobayashi M, Arkwright PD, Kilic SS, El Baghdadi J, Nonoyama S, Minegishi Y, Mahdaviani SA, Mansouri D, Bousfiha A, Blincoe AK, French MA, Hsu P, Campbell DE, Stormon MO, Wong M, Adelstein S, Smart JM, Fulcher DA, Cook MC, Phan TG, Stepensky P, Boztug K, Kansu A, İkinçioğullari A, Baumann U, Beier R, Roscioli T, Ziegler JB, Gray P, Picard C, Grimbacher B, Warnatz K, Holland SM, Casanova JL, Uzel G, Tangye SG. Monogenic mutations differentially affect the quality of T follicular helper cells in patients with human primary immunodeficiencies.

J Allergy Clin Immunol. 2015 136, 993-1006
doi: 10.1016/j.jaci.2015.05.036. (査読有)

(3) 峯岸克行 原発性免疫不全症の原因遺伝子探索の新展開 医学のあゆみ 第1土曜特集 ヒト免疫学の新機軸 252, 5-9, 2015 (査読無)

(4) 峯岸克行 高IgE症候群 臨床免疫アレルギー科 63, 251-253, 2015 (査読無)

(5) 峯岸克行 小児内科増刊号 「小児疾患診療のための病態生理2 改訂5版」 高IgE症候群 47, 697-701, 2015 (査読無)

(6) 峯岸克行 AD-HIES (Job's症候群) 日本臨床 免疫症候群 III 34 235-237 2015 (査読無)

(7) 峯岸克行 Comel-Netherton症候群 日本臨床 免疫症候群 III 34 238-239 2015 (査読無)

(8) 峯岸克行 PGM3欠損症 日本臨床 免疫症候群 III 34 240-241 2015 (査読無)

[学会発表](計 3件)

Minegishi Y, "Molecular mechanisms and therapeutic approaches of hyper-IgE syndrome" The 4th Bizan Immunology symposium Jan 29-30 2015 Tokushima University Fujii Memorial Hall (徳島市・徳島県)

Nishikawa Y, Minegishi Y "Dysregulation of IgE homeostasis in hyper-IgE syndrome." The third Bizan Immunology symposium Jan 29-30, 2015 Tokushima University Fujii Memorial Hall (徳島市・徳島県)

Minegishi S, Urabe K, Inoue F, Minegishi Y, "Specific DSB induction to *STAT3* mutations by CRISPR/Cas9"

Keystone symposium "Precision Genome Engineering and Synthetic Biology, Jan 11-16, 2015, Big Sky MN, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

峯岸 克行 (MINEGISHI, Yoshiyuki)
徳島大学・疾患プロテオゲノム研究センター・教授
研究者番号: 10343154