

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15415

研究課題名(和文) 不活化変異の導入を治療原理とした多変異対応型遺伝子医療の実証的研究

研究課題名(英文) Empirical study of gene therapy applicable to genetic diseases due to variable mutations, based on introduction of confining mutations

研究代表者

秋山 真志 (AKIYAMA, Masashi)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：60222551

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)：KID症候群の変異遺伝子で、症例および研究報告の多い、GJB2-G12R、GJB2-G45E、GJB2-D50N mutantsの3系統の変異遺伝子について、BLACK-6Jのマウスを用いてトランスジェニックマウスを作成した。作成したトランスジェニックマウスの組織からPCRで変異遺伝子の存在を確認したが、生体でのタンパク質発現が確認できなかった。この原因として、げっ歯類の胎盤にGJB2がコードするコネクシン26が発現しており、これによって胎生期に胎児へのグルコース輸送を阻害され胎生致死にいたっている可能性や、変異遺伝子がうまく発現されないゲノム領域に挿入されているなどの可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Transgenic mice of BLACK-6J mouse background were prepared for three mutant genes carrying the mutations, GJB2-G12R, GJB2-G45E and GJB2-D50N, which are frequent found in human patients and research reports of KID syndrome. The existence of the mutated gene was confirmed by PCR from the tissue of the transgenic strains. But the protein expression in vivo was unable to be confirmed. As a cause of this phenomenon, it is speculated that abnormal connexin 26 encoded by the mutant GJB2 is expressed in the rodent placenta, which may inhibit glucose transport to the fetus during embryonic period, resulting in embryonic lethality (Gabriel HD, et al. J Cell Biol. 1998) or that the mutant genes were inserted in regions on the genome, where gene expression cannot be expected.

研究分野：皮膚科学

キーワード：皮膚科学 KID症候群 GJB2 トランスジェニックマウス

1. 研究開始当初の背景

(1)申請者らは、これまで知られていなかった、「パンドラの箱」型遺伝子疾患発症メカニズムを世界で初めて発見し、報告した(Ogawa Y... Akiyama M. *PLoS Genet* 2014)。疾患遺伝子のアレルに優性の病原性変異が存在したとしても、それを打ち消す「不活化」ミスセンス変異が共存する場合、このキャリアには疾患は発症しない。しかし、このキャリアの子供の遺伝子上で復帰突然変異が起きて、後者の不活化変異が失われた場合、子供には疾患が発症する(図1)。

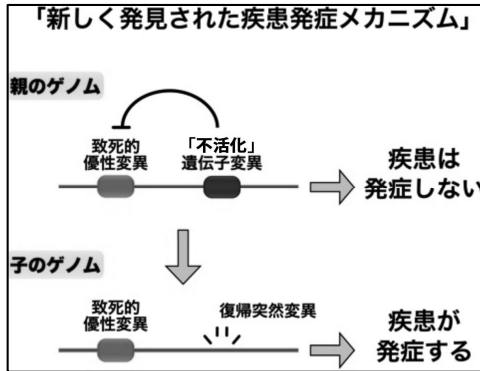


図1 申請者らが発見した新しい遺伝病発現メカニズム。不活化変異により抑制されていた疾患原変異の病原性が、復帰突然変異により、顕性化する。

実際の症例では KID 症候群の原因遺伝子である *GJB2* 遺伝子上に G45E という致死性の変異があり、これにより疾患が発症した。患児の母親は G45E 変異を保持していたが、同時に Y136X という不活化変異を持っていたため、疾患を生じなかった(図2)。

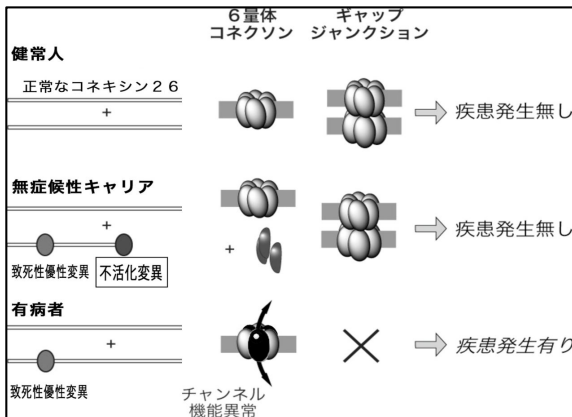


図2 KID 症候群において、不活化変異が、共存する優性変異の病原性を抑制するメカニズム。GJB2 の産物であるコネクシン 26 は細胞膜上で6量体のヘミチャンネルを形成する。G45E は過剰なチャンネル活性を生む病原性変異である。Y136X というナンセンス変異が共存すると、この分子はヘミチャンネルに取り込まれなくなり、病原性を失う。

この発見により、申請者は不活化変異を人為的に導入することが、疾患ごとに汎用性を持つ遺伝子治療法略になりうると考えるに至った。

(2)本研究はパンドラの箱型遺伝子疾患発症メカニズムの発見という、独自性の高い研究から着眼点を得ている。近年の遺伝子編集技術と iPS 技術の発展は、先天性疾患が今後、根源的に治療されうる事を強く示唆しているが、不活化変異の導入はその際の主導的な治療方略となりうる。

(3)多くの遺伝性皮膚疾患において、現在は有用な治療法が存在しない。近年の CRISPR-Cas 法を始めとした遺伝子編集技術は、塩基単位の正確さを持って目的とする遺伝子上の領域に、目的とする変異を導入する事を可能にしつつある。このようにして導入された変異は厳密に特異的であり、また off target にもたらされる変化も実際には非常に少ない事が最近の研究で明らかになっている。これらの研究の潮流は、遺伝性皮膚疾患の抜本的治療法が近い将来に生まれてくる可能性を力強く示している。しかし、個々の遺伝子変異に個別に対応する事は、それぞれの配列に応じたベクターの開発において有効性と安全性の検証の為に多大な労力を要するために、この事が遺伝子編集による治療を行う上でのボトルネックになると予想される。不活化遺伝子変異の導入に成功すれば、少なくとも一部の優性変異による先天性疾患において、pre-design された汎用ベクターセットを用いた治療を行う事ができるようになる事が示される(図3)。この事は、遺伝子編集技術を用いた遺伝子治療の現実的な応用可能性を飛躍的に高めると期待される。

また、KID 症候群のモデルマウスを作成する事は、遺伝子治療技術開発の理想的プラットフォームとして、iPS 技術や表皮シート作成および移植等の今後の実践的研究を可能にする。

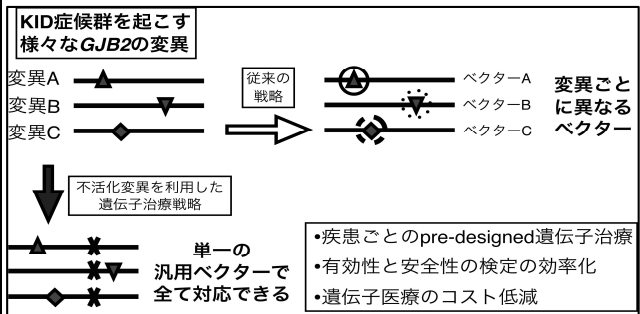


図3 KID 症候群の不活化変異の導入を原理とする、遺伝子治療戦略。

複数の異なる病原性変異に対し、単独の CRISPR-Cas ベクターセットにより治療が可能になる事により、個々の患者の変異配列に対応する必要がなくなり、治療可能性が飛躍的に向上する。

- 疾患ごとのpre-designed遺伝子治療
- 有効性と安全性の検証の効率化
- 遺伝子医療のコスト低減

2. 研究の目的

現在の遺伝子治療研究は、CRISPR-Cas 法を始めとした遺伝子編集技術(genome editing)と iPS 技術の向上により、新たな段階を迎えている。来るべき遺伝子治療の新時代の到来に備え、本申請では、特に gain-of-function 型優性変異による遺伝性疾患において、「不活化変異導入法」という新規遺伝子治療法略を提唱し、その実証研究を目的とする。具体的には以下の目標を達成する。

(1) KID 症候群の疾患モデルマウスを作成し、遺伝子治療研究開発プラットフォームとする。

(2) CRISPR-Cas システムを用いて、不活化突然変異導入を行い、実際に疾患発症を抑制する事で、この治療方略の有用性を実証する。これらの成果を、今後の実践的治療法開発に活用しうる基盤的技術として確立する。

3. 研究の方法

本研究では、(1) KID 症候群のモデルマウスを作成し、(2) CRISPR-Cas システムによって受精卵に不活化変異を導入し、疾患の症状を抑制する事を確認する。これにより、不活化変異導入による多変異対応型の遺伝子治療戦略の有用性を実証する。

(1) KID 症候群モデルマウスの作成

従来個々の遺伝子変異に個別に対応する方向で遺伝子編集による治療が研究されてきたが、当研究の不活化遺伝子を導入する治療法では、複数の遺伝子変異に効果を示す不活化変異を導入する汎用ベクターセットで治療できる可能性がある。*GJB2-G45E mutant* のみの KID 症候群モデルマウスで検討するのでは十分でなく、複数の遺伝子変異のマウスモデルを作成する必要がある。したがって、KID 症候群の変異遺伝子で、症例および研究報告の多い、*GJB2-G12R*、*GJB2-G45E*、*GJB2-D50N mutants* の 3 系統のモデルマウスを作成する。*G45E* を人為的に導入する事で、KID 症候群と相同の皮膚症状を示すモデルマウスが、既に海外のグループによって作成されている (Mese G, et al. Mol Biol Cell 2011、図 4)。この作製法を一部変更して新たなモデルマウスを作成する。

具体的には、優性変異である KID 症候群の変異遺伝子、上記 3 系統について、それぞれ FLAG-tag を付加した融合タンパクに加え、緑色蛍光タンパクである EGFP を IRES の存在下で発現するコンストラクトを作成する。

BLACK-6J のマウスを使用し、pIRES2-AcGFP1 ベクター (タカラバイオ株式会社) に上記コンストラクトを乗せ換えて使用する。発現プロモーターは、pIRES2-AcGFP1 ベクターの CMV プロモーターをそのまま使用する。

表皮の変化を組織学的、及び免疫組織学的に確認し、外来性の *GJB2-G45E* の存在を PCR に

より確認する。また疾患モデルマウスがヒト *GJB2-G45E* と別個に EGFP を発現する事を確認する。



図 4 KID 症候群モデルマウス。 *G45E* 変異を持つヒト *GJB2* をドキシサイクリン誘導性のプロモーター下に導入し、表皮特異的に発現させる。上: KID 症候群モデルマウス。下: 正常対照。

(2) CRISPR-Cas システムによって受精卵に不活化変異を導入し、疾患の症状を抑制する事を確認する予定であったが、KID 症候群モデルマウスの作成が間に合わず、次年度以降の研究課題とした。

4. 研究成果

従来個々の遺伝子変異に個別に対応する方向で遺伝子編集による治療が研究されてきたが、当研究の不活化遺伝子を導入する治療法では、複数の遺伝子変異に効果を示す不活化変異を導入する汎用ベクターセットで治療できる可能性がある。*GJB2-G45E mutant* のみの KID 症候群モデルマウスで検討するのでは十分でなく、複数の遺伝子変異のマウスモデルを作成する必要がある。したがって、KID 症候群の変異遺伝子で、症例および研究報告の多い、*GJB2-G12R*、*GJB2-G45E*、*GJB2-D50N mutants* の 3 系統のモデルマウスを作成することを検討した。

優性変異である KID 症候群の変異遺伝子上記 3 系統について、それぞれ FLAG-tag を付加した融合タンパクに加え、緑色蛍光タンパクである EGFP を IRES の存在下で発現するコンストラクトを作成した。構築する遺伝子改変マウスを 3 系統に増やす必要上、ドキシサイクリン依存性転写配列をノックインするのではなく、遺伝子導入された時点から変異遺伝子が発現するトランスジェニックマウスを作成する方針へ計画を修正した。

BLACK-6J のマウスを使用し、pIRES2-AcGFP1 ベクター (タカラバイオ株式会社) に上記コンストラクトを乗せ換えて使用した。発現プロモーターは、pIRES2-AcGFP1 ベクターの CMV プロモーターをそのまま使用した。作成したトランスジェニックマウスの組織から PCR で

変異遺伝子の存在を確認した。しかし、FLAG 融合タンパクおよび EGFP の発現を確認できず、生体でのタンパク質発現が確認できなかった。

そこで、細胞実験でのタンパク質発現を調べた。内在性のコネキシンを持たない HeLa 細胞に 3 系統のベクターをトランスフェクションした。蛍光免疫染色にて、EGFP の発色および FLUG の発現を確認し、ウエスタンブロットでもタンパク質発現を確認した。

トランスジェニックマウスでは、タンパク質発現が確認できず、細胞実験では、タンパク質の発現が確認できた理由としては下記の 2 点の仮説が考えられる。1 点目は、げっ歯類の胎盤に GJB2 がコードするコネキシン 26 が発現しており、これによって胎生期に胎児へのグルコース輸送を阻害され、変異コネキシンのタンパク質の発現がある個体は、胎生致死にいたっている可能性 (Gabriel HD, et al. J Cell Biol. 1998) がある点である。変異コネキシンが発現している個体は母体の子宮内で死亡して生まれてこず、タンパク質が発現しない個体のみが選択的に出生している可能性が考えられた。2 点目の仮説としては、変異遺伝子がうまくタンパク質発現されない場所に挿入されているなどの可能性が考えられた。

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 3 件)

Taki T, Ogawa Y, Sakakibara A, Kono M, Akiyama M.

Unilaterally dominant
acrokeratoelastoidosis (punctate
palmoplantar keratoderma type 3). 査読有

Br J Dermatol (印刷中)

doi: 未定

Takeichi T, Liu L, Abdul-Wahab A, McMillan JR, Stone KL, Akiyama M, Simpson MA, Parsons M, Mellerio JE, McGrath JA.

Large intragenic *KRT1* deletion underlying atypical autosomal dominant keratinopathic ichthyosis. 査読有

J Invest Dermatol 136(10): 2095-2098, 2016. doi:

10.1016/j.jahg.2017.01.014.

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022202X16313677>

Takeichi T, Sugiura K, Hsu C-K, Nomura T, Takama H, Simpson MA, Shimizu H, McGrath JA, Akiyama M.

Erythrokeratoderma variabilis caused by p.Gly45Glu in connexin 31: the importance of the first extracellular loop glycine residue of connexins for gap junction function. 査読有

Acta Dermato-Venereol 96: 557-559, 2016. doi: 10.2340/00015555-2307.

<https://www.medicaljournals.se/acta/content/abstract/10.2340/00015555-2307>

〔学会発表〕(計 3 件)

秋山真志

シンポジウム 1 皮膚難病克服への挑戦：魚鱗癬・魚鱗癬症候群の病態解明と克服への挑戦

第 67 回 日本皮膚科学会 中部支部学術大会、2016 年 10 月 22 日、大阪府大阪市、大阪国際会議場

秋山真志

先天性魚鱗癬の病態解明

平成 28 年度愛知県難病教育講演会、2016 年 10 月 22 日、愛知県名古屋市、愛知県医師会館

秋山真志

教育講演：皮膚のバリア機能を担う分子と構造（かたち）

第 43 回皮膚かたち研究学会学術大会、2016 年 6 月 19 日、東京都台東区、ヒューリックホール

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 真志 (AKIYAMA, Masashi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：60222551