

Title	Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient iPS Cells by TALEN and CRISPR-Cas9( Abstract_要旨 )
Author(s)	Li, Hongmei
Citation	Kyoto University (京都大学)
Issue Date	2015-03-23
URL	<a href="http://dx.doi.org/10.14989/doctor.k18870">http://dx.doi.org/10.14989/doctor.k18870</a>
Right	
Type	Thesis or Dissertation
Textversion	ETD

京都大学	博士 (医学)	氏名	李 紅梅
論文題目	Precise Correction of the Dystrophin Gene in Duchenne Muscular Dystrophy Patient iPS Cells by TALEN and CRISPR-Cas9 (デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者由来 iPS 細胞における TALEN や CRISPR-Cas9 を用いたジストロフィン遺伝子の修復)		
(論文内容の要旨) デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、筋細胞内のジストロフィンが欠損することで、進行性の筋力低下を特徴とする重篤な X 連鎖劣性遺伝子疾患である。現在、DMD には有効な治療法がないため、多くの患者は 30 歳代に心不全あるいは呼吸不全により死に至る。ジストロフィン遺伝子の変異が原因であることは古くから知られているが、ジストロフィン遺伝子はエクソンが 79 もあり巨大であるために、従来の遺伝子補完法での遺伝子治療は技術的に困難であった。一方、近年の人工ヌクレアーゼ技術の進歩、特に TALEN や CRISPR-Cas9 の登場により、精密なゲノム編集が可能となってきた。さらに、iPS 細胞は遺伝疾患患者から樹立可能であるため、iPS 細胞における遺伝子改変は、疾患病態解明や、免疫拒絶リスクの少ない細胞治療への応用が期待されている。 本研究では、エクソン 44 欠損型 DMD 患者由来 iPS 細胞において、TALEN や CRISPR を用いることで、ジストロフィン遺伝子を修復して機能性ジストロフィンを回復させることを目的とする。エクソン 44 欠損型 DMD 患者においては、タンパク質の読み枠が 1 塩基ずれることでジストロフィンの C 末端が欠損している。そこで、TALEN や CRISPR のゲノム編集技術を用いて、エクソン 45 スキッピング、フレームシフトの誘導、またはエクソン 44 の挿入の三つのアプローチにより、ジストロフィンタンパク質の修復を試みた。 まず、非特異的なゲノムへの結合を減少させるために、TALEN や CRISPR はゲノム上のユニークな配列部位をターゲットしなければならない。そのため、ヒトゲノム上で特異性の高い配列が一目で分かるように、 <i>k</i> -mer 配列データベースを作製した。このデータを用いて、ジストロフィン遺伝子のエクソン 45 に複数の TALEN や CRISPR を設計し、非相同組換え (NHEJ) による切断活性を種々の方法を用いて評価した。そして、DMD-iPS 細胞において高い切断活性の TALEN および CRISPR を得た。 次に、テンプレートを使用せずにエクソン 45 スキッピングとフレームシフトの誘導を、または修復用テンプレートを使用してエクソン 44 の挿入の三つのアプローチにおいて、ジストロフィン遺伝子読み枠を修復した iPS クローンを樹立した。 TALEN や CRISPR を遺伝子治療に用いる際に最も懸念されるのは、オフターゲットリスクである。本研究では、目的部位以外への変異導入を厳密に評価した。その結果、類似ターゲットサイト解析では変異導入が認められなかった。さらに、全ての修復したクローンに関して核型とコピー数変異 (CNV)、エクソームシーケンス解析を行ったが、検出された変異はごく少数であり、何れも COSMIC データベースに登録されているガン関連変異に該当しなかった。 最後に、それぞれの修復された iPS クローンから分化した骨格筋細胞におい			

て、ジストロフィンタンパク質の発現を確認した。遺伝子修復 DMD-iPS 細胞を、Dox 誘導型の MyoD 強制発現系を用いた分化方法により、骨格筋細胞へと分化させた。そして、発現しているジストロフィン mRNA の配列を解析したところ、読み枠が回復していることが確認できた。次に、免疫染色によりジストロフィンタンパク質が細胞膜部分に局在していることを確認した。さらに、ウェスタンブロットで正常型と同サイズのジストロフィンタンパク質の発現を確認した。

以上の結果より、TALEN や CRISPR を用いた「ゲノム手術」による遺伝子修復は、機能性ジストロフィン発現を回復させる為の手段として、遺伝子治療や iPS 細胞移植治療への応用が期待される。

(論文審査の結果の要旨)

デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、ジストロフィン遺伝子の機能不全により引き起される、進行性の筋力低下を特徴とする重篤な X 連鎖劣性遺伝疾患である。本研究では、DMD 患者より樹立した iPS 細胞において、最新のゲノム編集技術である TALEN や CRISPR を用いることで、ジストロフィン遺伝子の修復を行った。エクソン 44 欠損型の DMD 患者においては、遺伝子の読み枠が 1 塩基ずれることでエクソン 45 に終止コドンが現れ、ジストロフィンの C 末端が欠損している。そこで、エクソン 45 スキッピング、フレームシフトの誘導、またはエクソン 44 の挿入の三つのアプローチにより、ジストロフィン遺伝子の読み枠修復に成功した。修復した複数の iPS 細胞株に対して、核型解析、SNP アレイを用いたゲノムコピー数解析、エクソーム解析、および類似配列部位の T7EI アッセイにより、目的部位以外への変異導入は確認されなかった。最後に、修復 iPS 細胞を骨格筋細胞へと分化させ、細胞免疫染色及びウェスタンブロット法にて正常型と同様のジストロフィンタンパク質の発現を確認した。

以上の研究はゲノム編集技術を用いることで高精度のジストロフィン遺伝子修復が可能であることを示す成果であり、将来の遺伝子治療や iPS 細胞移植治療への応用に寄与するところが大きい。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 26 年 01 月 26 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降