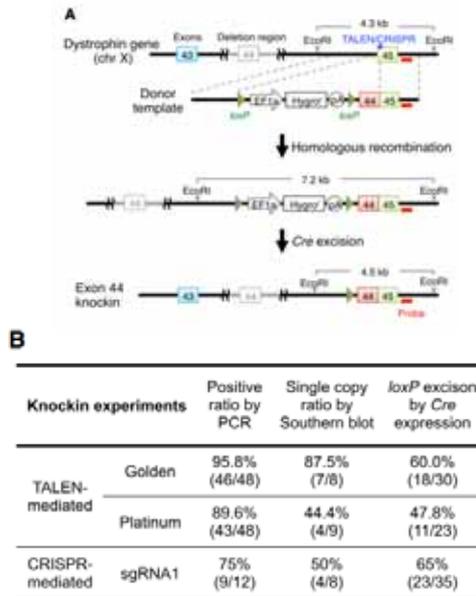
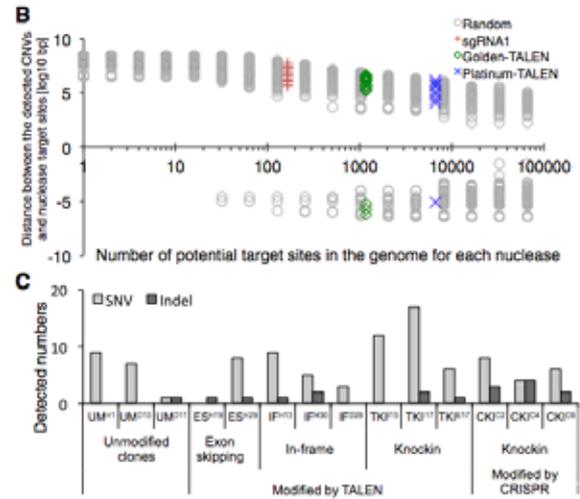


# 筋ジストロフィー患者由来のipsを作成、 変異を修復した上で筋肉に分化

## 修復の評価



## オフターゲットの評価



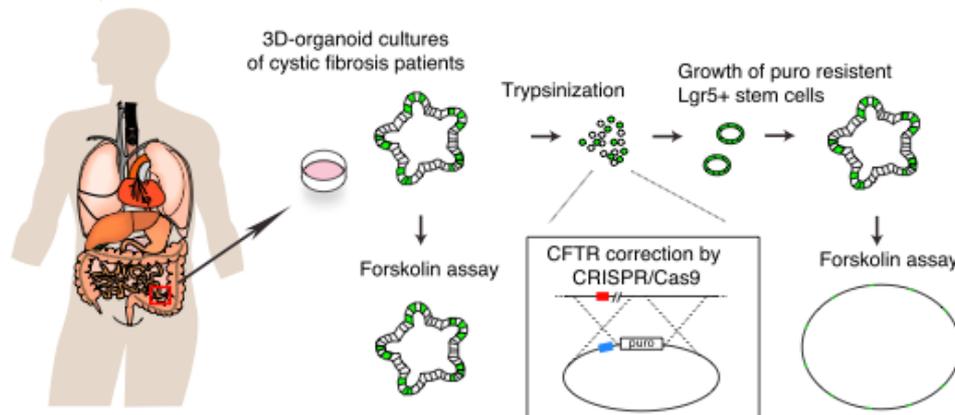
25

Li et al. Stem Cell Reports. 2015 Jan 13;4(1):143–54.

# Cystic Fibrosisの患者由来の幹細胞の 変異を修復して表現型の回復を確認

## Functional Repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in Intestinal Stem Cell Organoids of Cystic Fibrosis Patients

Gerald Schwank,<sup>1,2,7</sup> Bon-Kyoung Koo,<sup>1,2,7,8</sup> Valentina Sasselli,<sup>1,2</sup> Johanna F. Dekkers,<sup>3,4</sup> Inha Heo,<sup>1,2</sup> Turan Demircan,<sup>1</sup> Nobuo Sasaki,<sup>1,2</sup> Sander Boymans,<sup>1</sup> Edwin Cuppen,<sup>1,6</sup> Cornelis K. van der Ent,<sup>3</sup> Edward E.S. Nieuwenhuis,<sup>5</sup> Jeffrey M. Beekman,<sup>5,6</sup> and Hans Clevers<sup>1,2,\*</sup>



26

Schwank et al. Cell Stem Cell. 2013 Dec 5;13(6):653–8.

# 筋ジストロフィーモデルマウスの 初期胚のゲノムの変異を修復

GENOME EDITING

## Prevention of muscular dystrophy in mice by CRISPR/Cas9-mediated editing of germline DNA

Chengzu Long,<sup>1\*</sup> John R. McAnally,<sup>1\*</sup> John M. Shelton,<sup>2</sup> Alex A. Mireault,<sup>1</sup> Rhonda Bassel-Duby,<sup>1</sup> Eric N. Olson<sup>1†</sup>

Duchenne muscular dystrophy (DMD) is an inherited X-linked disease caused by mutations in the gene encoding dystrophin, a protein required for muscle fiber integrity. DMD is characterized by progressive muscle weakness and a shortened life span, and there is no effective treatment. We used clustered regularly interspaced short palindromic repeat/Cas9 (CRISPR/Cas9)-mediated genome editing to correct the dystrophin gene (*Dmd*) mutation in the germ line of *mdx* mice, a model for DMD, and then monitored muscle structure and function. Genome editing produced genetically mosaic animals containing 2 to 100% correction of the *Dmd* gene. The degree of muscle phenotypic rescue in mosaic mice exceeded the efficiency of gene correction, likely reflecting an advantage of the corrected cells and their contribution to regenerating muscle. With the anticipated technological advances that will facilitate genome editing of postnatal somatic cells, this strategy may one day allow correction of disease-causing mutations in the muscle tissue of patients with DMD.

マウス受精卵にhCas9/gRNAと  
一本鎖DNAをインジェクションし  
mdxマウスの変異を修復。  
ジストロフィンの回復を観察

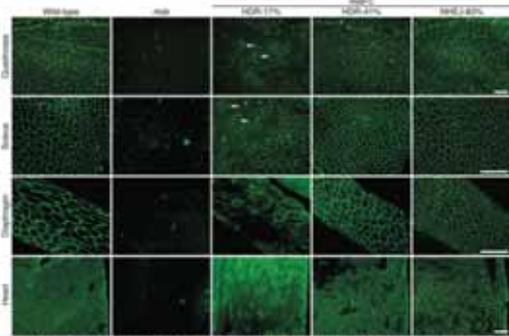
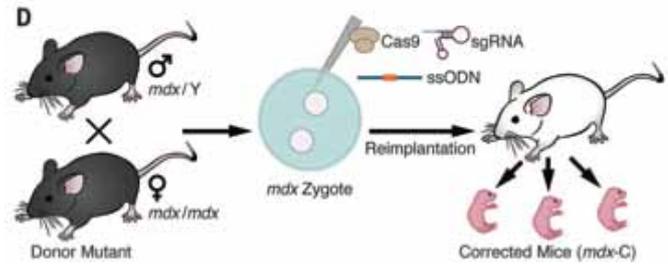


Fig. 2. Histological analysis of muscles from wild-type, *mdx*, and *mdx-C* mice. Immunostaining and histological analysis of muscles from 7- to 8-week-old wild-type mice, and *mdx-C* mice (3-CR 17%, 4-CR 42%, or 10-CR 62%). Dystrophin immunoreactivity (green) in wild-type mice is present in all muscle, including quadriceps, soleus, diaphragm, and heart, and is absent from *mdx* muscle except for a single myofiber fiber or several myofibers. Skeletal muscle from the 10-CR 62% mosaic mice is characterized by a mosaic pattern of clusters of dystrophin-positive fibers adjacent to clusters of dystrophin-negative fibers, whereas 4-CR 42% or 10-CR 62% *mdx-C* skeletal muscle is characterized by dystrophin-positive myofibers, only white arrowheads indicate the apparent clusters of dystrophin-positive fibers. Scale bar, 100  $\mu$ m.

27

Long et al. Science. 2014 Sep 5;345(6201):1184-8.

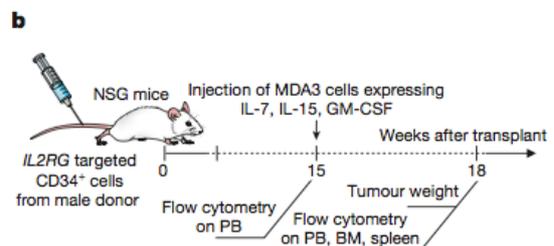
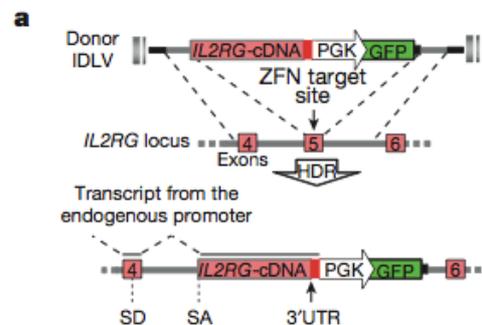
# 免疫不全症の患者由来 造血幹細胞の変異を修復し マウス体内で機能回復を評価

## Targeted genome editing in human repopulating haematopoietic stem cells

Pietro Genovese<sup>1</sup>, Giulia Schirolli<sup>1,2</sup>, Ghislain Escobar<sup>1,2</sup>, Tiziano Di Tomaso<sup>1</sup>, Claudia Ffritto<sup>1</sup>, Andrea Calabria<sup>1</sup>, Davide Mol<sup>1</sup>, Roberta Mazzieri<sup>1</sup>, Chiara Bonini<sup>1</sup>, Michael C. Holmes<sup>2</sup>, Philip D. Gregory<sup>1</sup>, Mirjam van der Burg<sup>2</sup>, Bernhard Gentges<sup>1,2</sup>, Eugenio Montini<sup>1</sup>, Angelo Lombardo<sup>1,2\*</sup> & Luigi Naldini<sup>1,2\*</sup>

Targeted genome editing by artificial nucleases has brought the goal of site-specific transgene integration and gene correction within the reach of gene therapy. However, its application to long-term repopulating haematopoietic stem cells (HSCs) has remained elusive. Here we show that poor permissiveness to gene transfer and limited proficiency of the homology-directed DNA repair pathway constrain gene targeting in human HSCs. By tailoring delivery platforms and culture conditions we overcome these barriers and provide stringent evidence of targeted integration in human HSCs by long-term multilineage repopulation of transplanted mice. We demonstrate the therapeutic potential of our strategy by targeting a corrective complementary DNA into the *IL2RG* gene of HSCs from healthy donors and a subject with X-linked severe combined immunodeficiency (SCID-X1). Gene-edited HSCs sustained normal haematopoiesis and gave rise to functional lymphoid cells that possess a selective growth advantage over those carrying disruptive *IL2RG* mutations. These results open up new avenues for treating SCID-X1 and other diseases.

SCID-X1 patientから採取したCD34+細胞の  
IL2RG遺伝子座に野生型のIL2RG-cDNAをノックイン  
マウスに移植し生着および機能型タンパク質の  
(一部)回復を観察



28

Genovese et al. Nature. 2014 Jun 12;510(7504):235-40.

## 小括2

ゲノム編集技術を用い臨床へ向けた研究は主に  
疾患モデルの作成  
疾患変異の修復  
の2つアプローチで行われている。

実験動物を用いる系では個体や培養細胞を用いた研究が、  
ヒト組織を用いる系では培養細胞レベルでの研究が行われている。  
現段階では技術的な可能性の探求段階の研究が多いと考えられる。

今後は のアプローチから病態の解明や創薬のためのモデル作成が、  
のアプローチから遺伝子治療等の進展が期待される。

29

## 日本におけるゲノム編集ネットワーク

**ゲノム編集コンソーシアム**  
Genome Editing Consortium

ホーム	ゲノム編集 (Genome Editing) とは、人工ヌクレアーゼのZinc Finger Nucleases (ZFNs) やTranscription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs)、CRISPR/Casシステムを用いてゲノム上の特定の遺伝子の破壊やレポーター遺伝子のメックインなどを可能にする技術である。ゲノム編集は動物や植物、培養細胞 (ES細胞やIPS細胞を含む) において利用可能であることから、次世代の遺伝子改変技術として注目されている (Dong and Sander, Nat Rev Mol Cell Biol, 2012; Barrangou, Nat Biotechnol, 2012)。
活動の目的	
ゲノム編集とは	
運営メンバー	ゲノム編集コンソーシアムでは、人工ヌクレアーゼ (TALEN) の作製および様々な生物でのゲノム編集利用の支援、情報提供を行うことによって、日本のゲノム編集のレベルアップを図る。
研究会	
講習会	
ゲノム編集支援	
関連論文	
リンク	

氏名	所属
山本 卓 (代表)	広島大学大学院理学研究科教授
野地澄晴	徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス研究部教授
芹川忠夫	関西実験動物研究会会長
真下知士	京都大学大学院医学研究科附属動物実験施設准教授
阿形清和	京都大学大学院理学研究科生物科学専攻教授
八木 健	大阪大学大学院生命機能研究科教授
川原敦雄	理化学研究所生命システム研究センターユニットリーダー
刑部敬史	徳島大学農工商連携センター特任教授
笹倉靖徳	筑波大学下田臨海実験センター准教授

30