

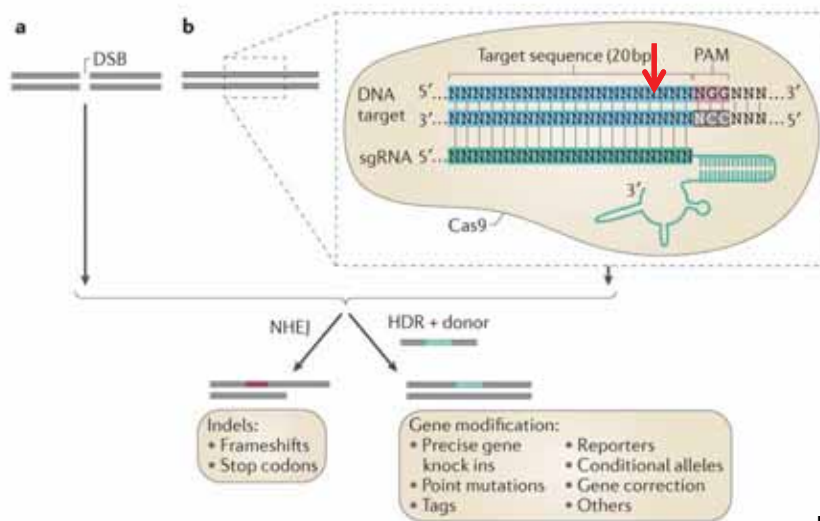
ヒト受精胚にゲノム編集を用いる、 遺伝病の病態解明等に資する 基礎的研究について

八代健太

京都府立医科大学

生体機能形態科学部門・解剖学

Genome Editing (ゲノム編集)



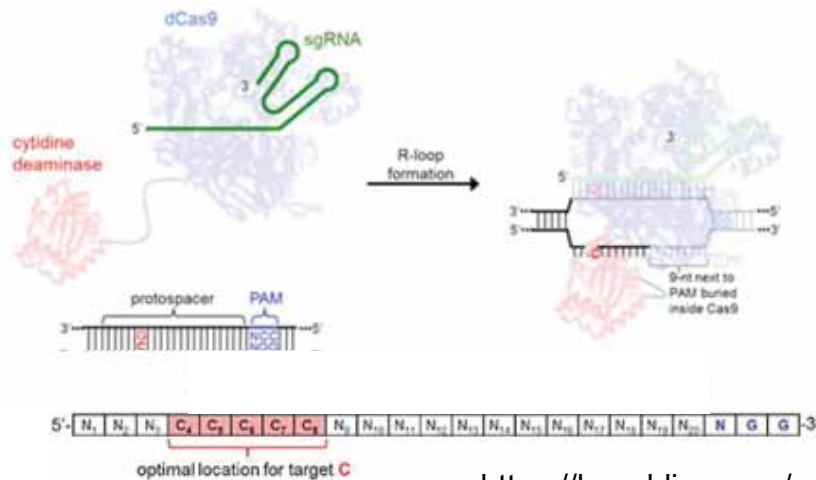
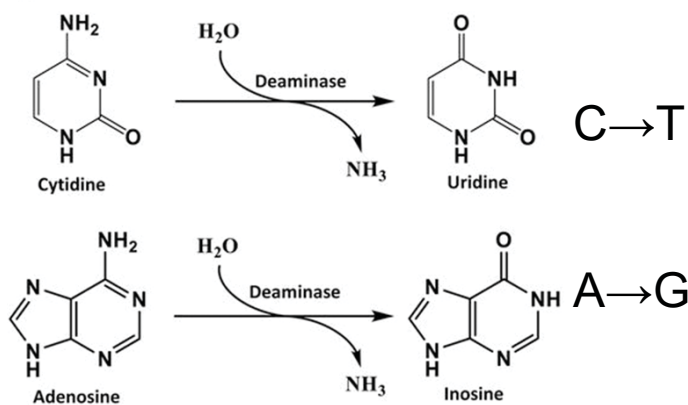
SpCas9
 化膿連鎖球菌
 (Streptococcus pyogenes)
 由来

PAM: protospacer adjacent motif
 sgRNA: single guide RNA

NHEJ: Non Homologous End Joining
 HDR: Homology Directed Repair

Nature Review Cancer (2015) 15: 387–395.

Base Editing (塩基編集)



<https://benchling.com/pub/liu-base-editor>

今までに行われたヒト胚に対するゲノム編集の例

著者	方法	国	論文
Tang, L. <i>et al.</i>	CRISPR-Cas9	中国	<i>Mol Reprod Dev</i> 85 , 461-463, (2018).
Zhou, C. <i>et al.</i>	Base Editing	中国	<i>Protein Cell</i> 8 , 772-775, (2017).
Tang, L. <i>et al.</i>	CRISPR-Cas9	中国	<i>Mol Genet Genomics</i> 292 , 525-533, (2017).
Ma, H. <i>et al.</i>	CRISPR-Cas9	米国	<i>Nature</i> 548 , 413-419, (2017).
Liang, P. <i>et al.</i>	Base Editing	中国	<i>Protein Cell</i> 8 , 811-822, (2017).
Li, G. <i>et al.</i>	Base Editing	中国	<i>Protein Cell</i> 8 , 776-779, (2017).
Fogarty, N. <i>et al.</i>	CRISPR-Cas9	英国	<i>Nature</i> 550 , 67-73, (2017).
Kang, X. <i>et al.</i>	CRISPR-Cas9	中国	<i>J Assist Reprod Genet</i> 33 , 581-588, (2016).
Liang, P <i>et al.</i>	CRISPR-Cas9	中国	<i>Protein Cell</i> 6 , 363-372, (2015).

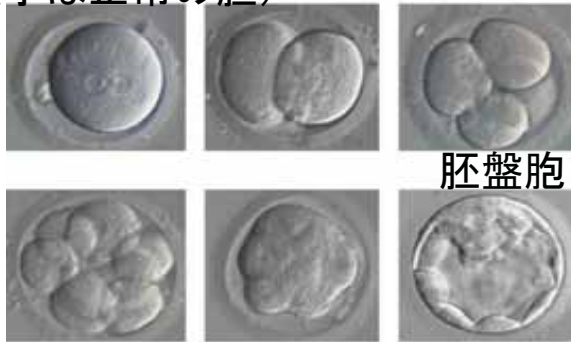
CRISPR-Cas9 6報; 米国1, 英国1, 中国4
Base Editing 3報; 中国3 /9報

英国で行われたヒト受精卵に対するゲノム編集を用いた基礎研究の例

研究の背景: 現在は、IVFで出生にまで至る確率が低く、手間とコストがかかりすぎる。

現状の生殖医療でのIVFイメージ

100の受精卵
(遺伝子は正常の胚)



胚盤胞: 半分以下

25を子宮へ → 10胚が3ヶ月齢以上に発生・成長

なぜこのように確率が低いのか、発生しない原因を解明し、生殖医療の手間とコストを軽減する目的。

BBCより引用

<https://www.bbc.com/news/health-41269200>

生殖医療をより洗練したものにする目的の研究を2016年にHFEAが認可

ARTICLE

doi:10.1038/nature24033

Genome editing reveals a role for OCT4 in human embryogenesis

Norah M. E. Fogarty¹, Afshan McCarthy¹, Kirsten E. Snijders², Benjamin E. Powell³, Narda Kubikova⁴, Paul Blakeley¹, Rebecca Lea¹, Kay Elder², Sissy E. Wamatha¹, Daesik Kim⁴, Valdone Maciulyte³, Jens Kleinjung¹, Jin-Soo Kim^{4,5}, Dagan Wells⁴, Ludovic Vallier^{2,6,10}, Alessandro Bertero¹⁰, James M. A. Turner⁷ & Kathy K. Nakan¹

Nature 550, 67-73 (2017)

分かったこと;

- ✓ OCT4の異常により胚盤胞へ発生できなくなる(マウスは発生できる)

米国で行われたヒト受精卵に対するゲノム編集を用いた遺伝病治療への基礎研究の例

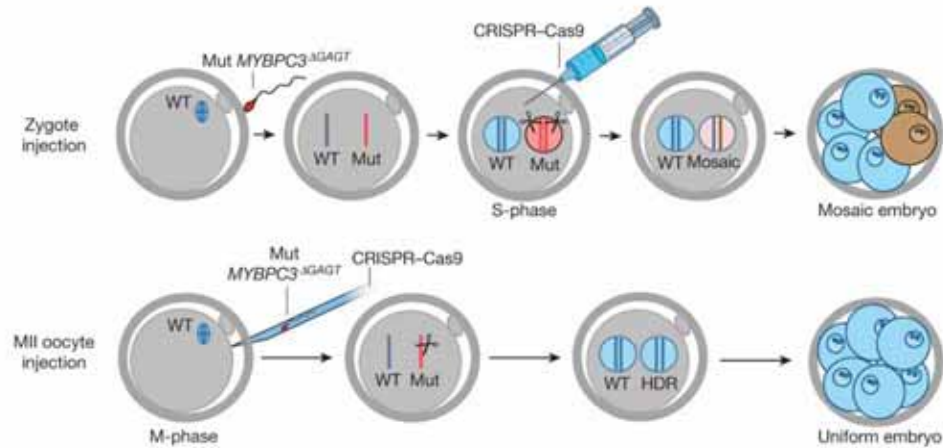
ARTICLE

doi:10.1038/nature23305

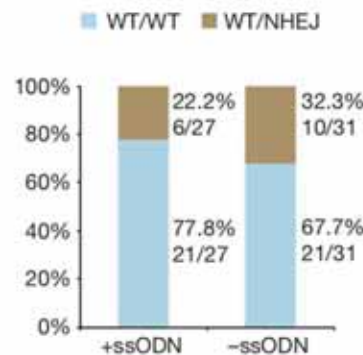
Correction of a pathogenic gene mutation in human embryos

Hong Ma¹, Nuria Martí-Guerra^{2*}, Sang-Wook Park^{3*}, Jun Wu^{3*}, Yeonmi Lee², Keisshiro Suzuki², Amy Koski², Dongmei Ji¹, Tomonari Hayama¹, Riffat Ahmed¹, Hayley Darby¹, Crystal Van Dyken¹, Ying Li¹, Eunju Kang¹, A. Reum Park², Daesik Kim¹, Sang-Tae Kim², Ranshi Gong^{1,2,3}, Ying Gu^{1,2,3}, Xun Xu^{1,2,3}, David Battaglia^{1,2}, Sacha A. Krieg¹, David M. Lee¹, Diana H. Wu¹, Don P. Wolf¹, Stephen B. Heitman¹, Juan Carlos Izpisua Belmonte¹, Paula Amato^{1,4}, Jin-Soo Kim^{1,4}, Sanjiv Kaul^{1,4} & Shoukhrat Mitalipov^{1,2,3}

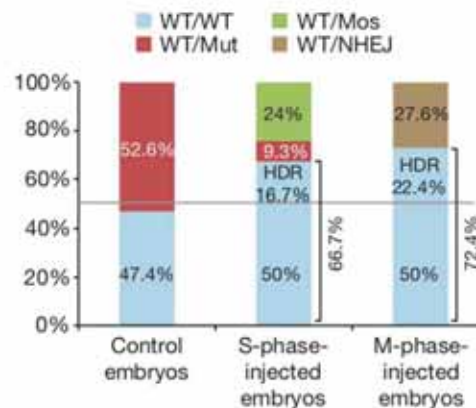
Oregon Health & Science University
Nature 548, 414-419 (2017)



d HDR with and without ssODN



e Embryo genotype distribution



WT:野生型
Mut: 元々の4bpの欠失変異
NHEJ: 非相同末端結合修復
Mos:モザイク

このような研究は、新規作成胚を用いなければ行えない

分かったこと;

- ✓ 鋳型としてのオリゴDNAは要らない
- ✓ 胚全部の細胞が修復される確率が、第2減数分裂分裂(M II)期の場合のほうが、DNA合成(S)期に作用させるよりも良い

単一遺伝子異常に拠る疾患の例

疾患	遺伝様式	原因遺伝子	症状
血友病	伴性潜性	第8／9因子	血が固まらない
嚢胞線維症	常染色体潜性	CFTR	呼吸不全,肝不全
デュシャンヌ型筋ジストロフィー	伴性潜性	ジストロフィン	筋力低下, 心不全,呼吸不全
マルファン症候群	常染色体顕性	フィブリリン1またはTGFB2	解離性大動脈瘤
フェニールケトン尿症	常染色体潜性	フェニルアラニン水酸化酵素	精神発達遅延
副腎白質ジストロフィー	伴性潜性	ABCD1	退行
フリードライヒ運動失調症	常染色体潜性／顕性	フラタキシン	筋力低下,呼吸不全
フォン・レックリングハウゼン病	常染色体顕性	NF1	神経に多発する神経線維腫
ウィルソン病	常染色体潜性	ATP7B	銅代謝異常に拠る肝不全
遺伝性乳がん・卵巣がん	常染色体顕性	BRCA1/2	乳がん, 卵巣がん
家族性大腸ポリポーシス	常染色体顕性	APC	多発性ポリープ・がん
リー・フラウメニ症候群	常染色体顕性	TP53	多くの臓器にがんが多発
網膜芽細胞腫	常染色体顕性	RB1	網膜の腫瘍

など

>10,000疾患, ヒト全体で2%程度の頻度

Vector A.McKusickら, Mendelian Inheritance in Man

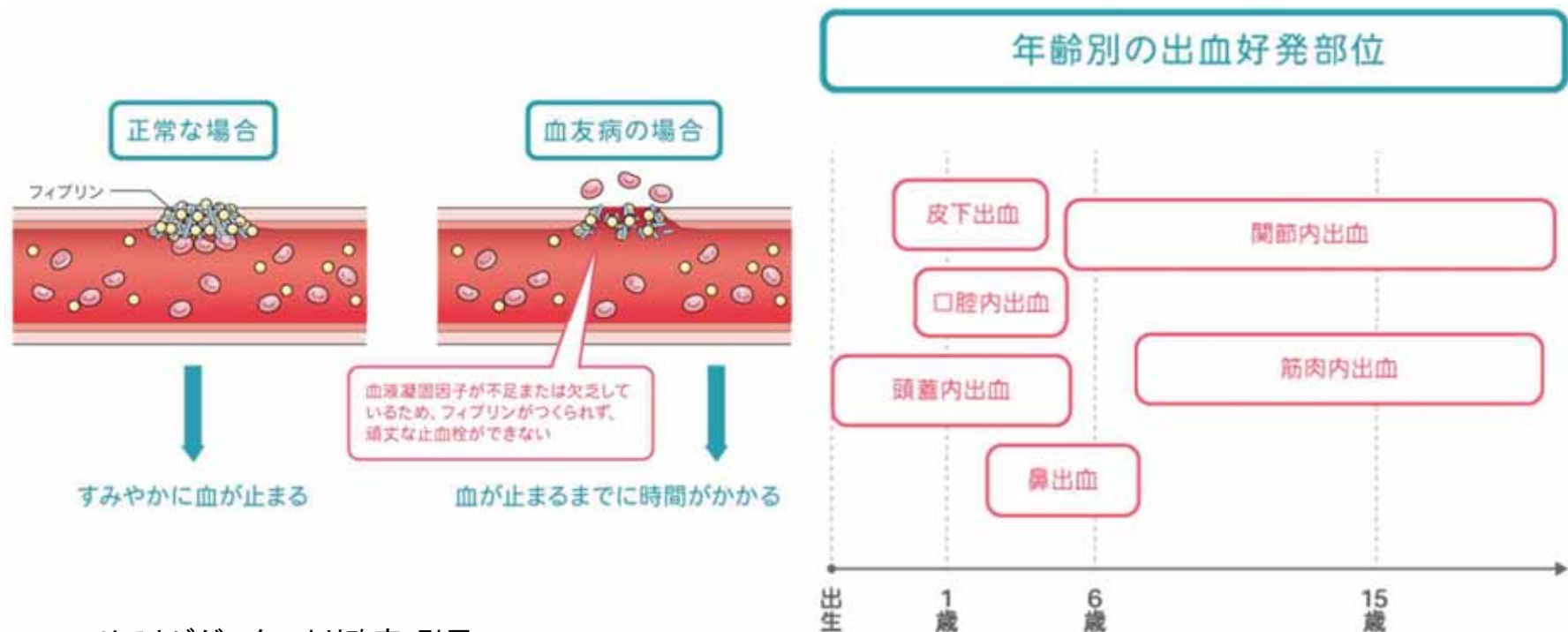


川崎医療福祉学会誌14, 1-9 (2004)より改変・引用

理論上は、単一遺伝子に拠る異常で生じる疾患は、すべて治療対象にできる。

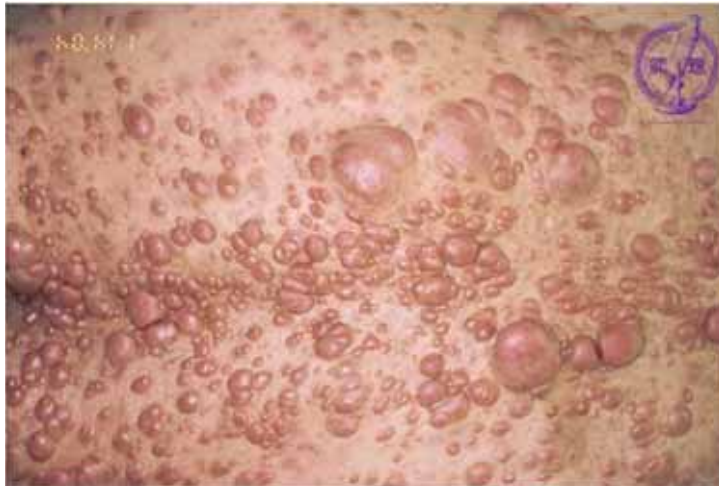
血友病

- ✓ 第VIII, IX因子遺伝子の異常
- ✓ 伴性潜性遺伝
- ✓ 男児出生数の5000~1万人に1人. 日本に約6千人
- ✓ 出血傾向
- ✓ 生涯、第VIIIもしくはIX因子製剤の定期的投与を要する
- ✓ ロシア皇帝ニコライ2世の皇太子アレクセイ



フォン・レックリングハウゼン病 (神経線維腫症1型)

- ✓ *NF1*遺伝子の異常
- ✓ 常染色体顕性遺伝
- ✓ 1/3000の発症率. 日本で約4万人
- ✓ 多発する末梢の神経線維腫
- ✓ 度重なる腫瘍の切除が必要



多発する神経線維腫とカフェオレ斑
社団法人 日本病理学会 教育委員会編集
病理コア画像より引用
<http://pathology.or.jp/corepictures2010/20/c06/01.html>

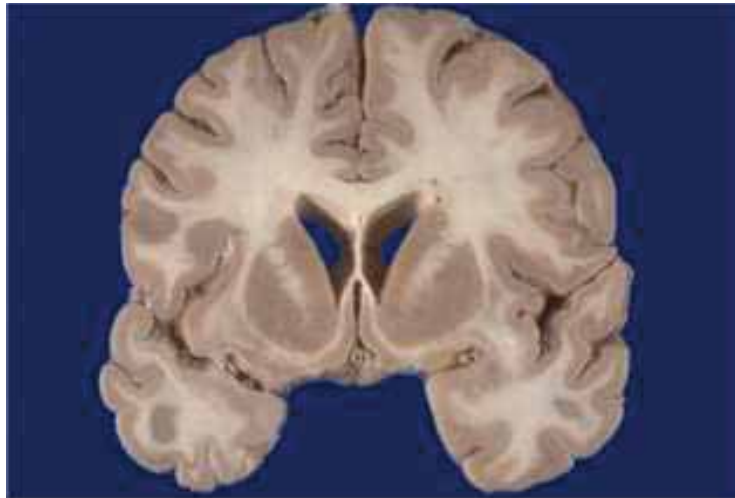
ジョセフ・メリック氏 1862 –1890
(エレファント・マン)



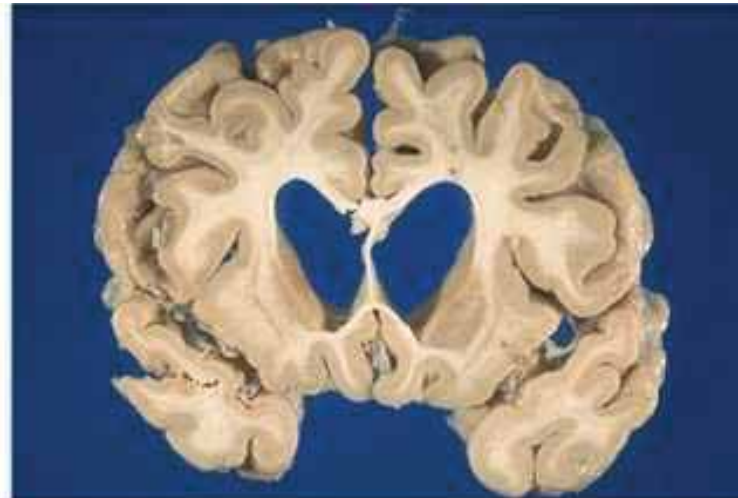
BBCより引用
<https://www.bbc.com/news/uk-england-leicestershire-36478601>

ハンチントン病

- ✓ huntingtin遺伝子の異常
- ✓ 常染色体顕性遺伝
- ✓ 5~6人/100万人の発症率. 日本に約1千人
- ✓ 大脳中心部にある線条体尾状核の神経細胞の変性
- ✓ 進行性
- ✓ 舞踏運動などの不随意運動、精神症状、行動異常、認知障害など
- ✓ 30~40台で発症. 発症から約10~20年の罹病期間



正常



ハンチントン病

ヒト受精卵に対するゲノム編集を用いた 病態解明研究の可能性

- ✓ 14日ルール
- ✓ 通常は6~7日しか技術的に培養できないが、最近13日間培養できる技術が開発

Self-organization of the human embryo in the absence of maternal tissues

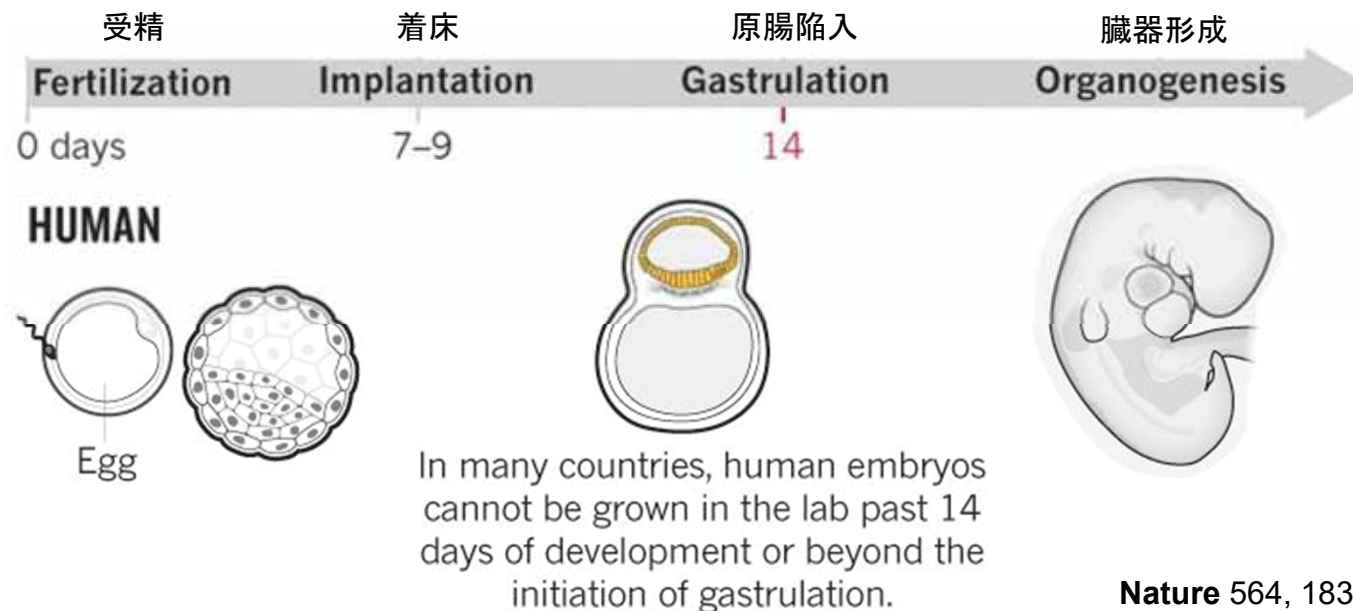
Marta N. Shahbazi^{1,2}, Agnieszka Jedrusik^{1,2}, Sanna Vuoristo^{1,2}, Gaelle Recher^{1,2}, Anna Hupalowska¹, Virginia Bolton², Norah M. E. Fogarty¹, Alison Campbell¹, Liani G. Devito², Dusko Ilic², Yakoub Khalaf², Kathy K. Niakan¹, Simon Fishel¹ and Magdalena Zernicka-Goetz^{1,2}

NATURE CELL BIOLOGY 18, 700-708 (2016)

Self-organization of the *in vitro* attached human embryo

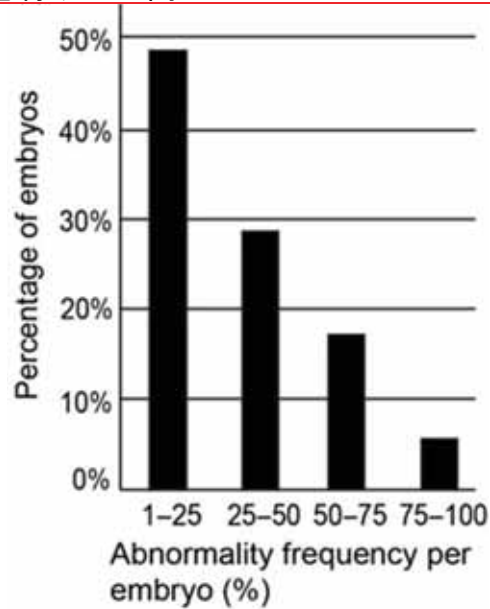
Alessia Deglincerti^{1*}, Gist F. Croft^{1*}, Lauren N. Pietila¹, Magdalena Zernicka-Goetz², Eric D. Siggia¹ & Ali H. Brivanlou¹

NATURE 533, 251-254 (2016)



遺伝的素因に拠って生じる疾患(癌を含む)の病理病態を解析することは、多くの場合にこの方法では難しい。

発生初期に生じる染色体異常の頻度は想像以上に高い



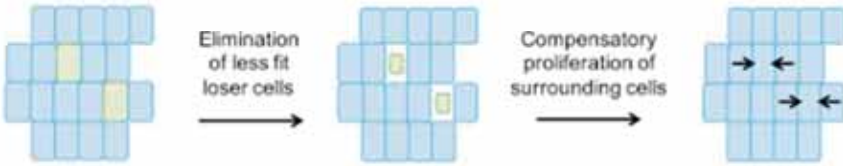
Human Reproduction 31, 312-323 (2016)

Cell competition: elimination of less-fit cells in heterotypic cell populations

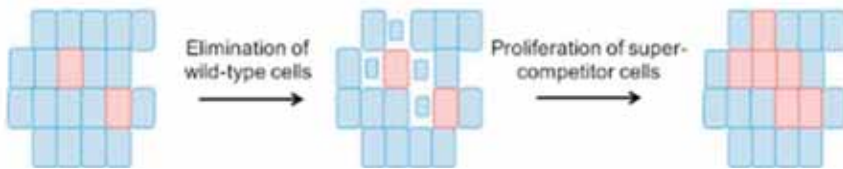
Homotypic population



Heterotypic population



Super-competition



細胞競合？

■ = Fitter cell
■ = Less-fit cell
■ = Super-competitor cell

Dev Cell 38, 621-34 (2016)

- ✓ なぜ卵割開始後の初期には染色体の異常が生じやすいのか？
- ✓ 染色体異常が生じた卵割球が失われて行くメカニズムは？細胞競合？
- ✓ 特定の遺伝子異常・染色体異常が生じていても、なぜ発生してしまうのか？



生殖医療補助目的の基礎研究と、目的がオーバーラップ

ヒトの胚を研究せねば分からない例

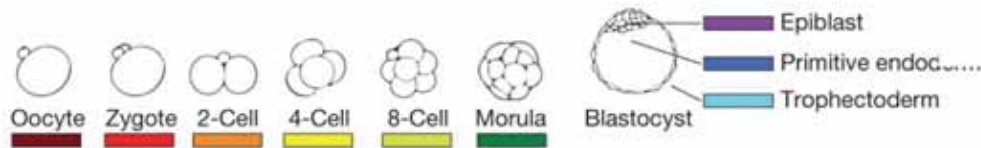
LETTER

doi:10.1038/nature14308

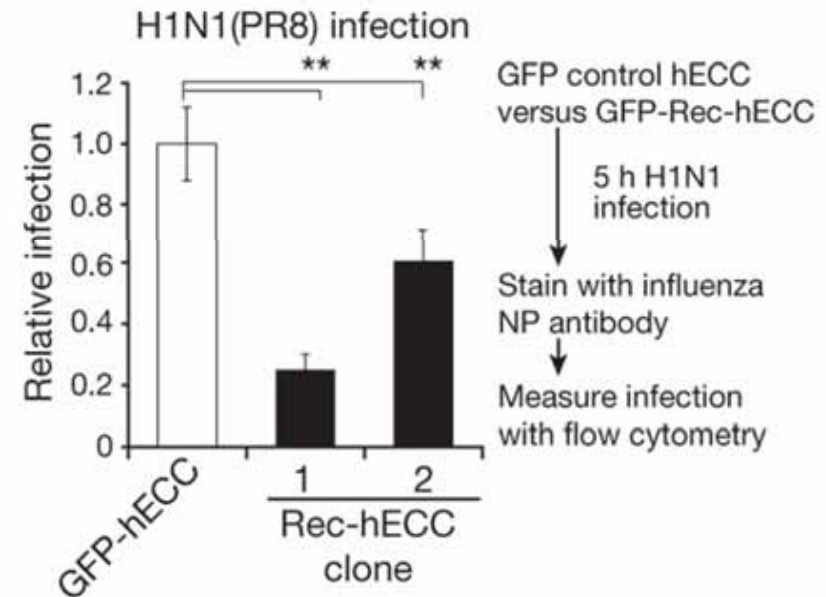
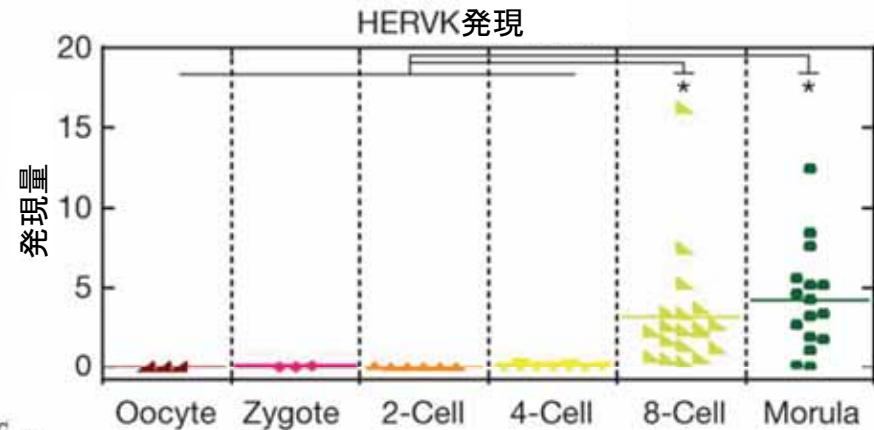
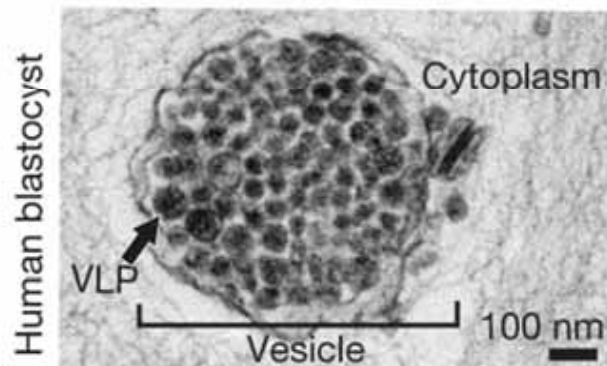
Intrinsic retroviral reactivation in human preimplantation embryos and pluripotent cells

Edward J. Grow¹, Ryan A. Flynn², Shawn L. Chavez^{3,4,5}, Nicholas L. Bayless⁶, Mark Wossidlo^{1,3,4}, Daniel J. Wesche⁷, Lance Martin⁷, Carol B. Ware², Catherine A. Blish⁸, Howard Y. Chang⁹, Renee A. Reijo Pera^{1,3,4,9} & Joanna Wysocka^{3,10,11}

NATURE 522, 221-225 (2016)



HRVK:
Human endogenous retrovirus K



- ✓ ヒト胚で、レトロウイルスが再活性化
- ✓ IFITM1: interferon-induced transmembrane protein 1 が活性化され、感染に抵抗性を発揮
- ✓ 初期胚でのウイルス感染に対する防御策

SOX17 Is a Critical Specifier of Human Primordial Germ Cell Fate

Naoko Irie,^{1,2,3,4,5} Leehee Weinberger,^{4,5} Walfred W.C. Tang,^{1,2,3,5} Toshihiro Kobayashi,^{1,2,5} Sergey Viukov,⁶ Yair S. Manor,⁴ Sabine Dietmann,³ Jacob H. Hanna,^{4,5,6} and M. Azim Surani^{1,2,3,5,7}

¹Wellcome Trust Cancer Research UK Gurdon Institute, Tennis Court Road, University of Cambridge, Cambridge CB2 1QN, UK

²Department of Physiology, Development and Neuroscience, Downing Street, University of Cambridge, Cambridge CB2 3EG, UK

³Wellcome Trust-Medical Research Council Stem Cell Institute, Tennis Court Road, University of Cambridge, Cambridge CB2 3EG, UK

⁴The Department of Molecular Genetics, Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel

⁵Co-first author

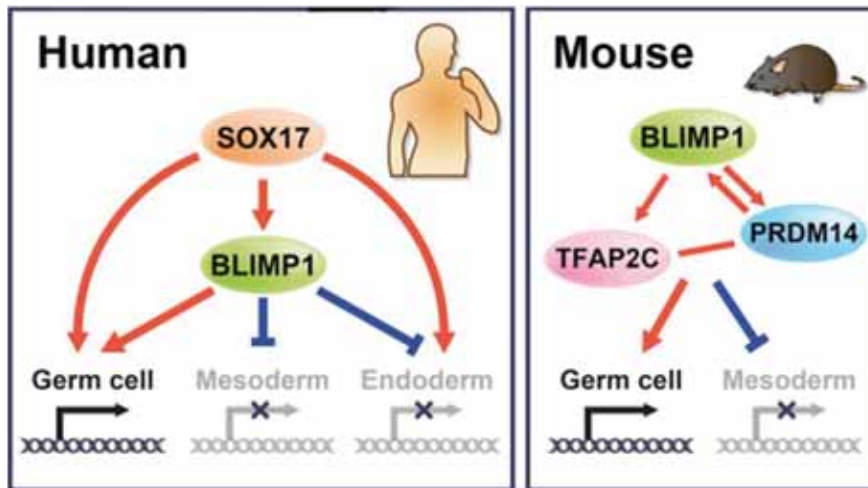
⁶Co-senior author

*Correspondence: jacob.hanna@weizmann.ac.il (J.H.H.), a.surani@gurdon.cam.ac.uk (M.A.S.)

<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2014.12.013>

This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

Cell 160, 253-268 (2015)



- ✓ マウスと違い、ヒトではSOX17遺伝子を含む特異な遺伝プログラムが生殖細胞系列を生み出す(ヒトES細胞)
- ✓ マウスと異なり、サルでは生殖細胞系列は「羊膜 (aminion)」から生じる
- ✓ ヒトでもサルと同じ機構なのか？

The Germ Cell Fate of Cynomolgus Monkeys Is Specified in the Nascent Amnion

Kotaro Sasaki,^{1,2} Tomonori Nakamura,^{1,2} Ikuhiro Okamoto,^{1,2} Yukihiro Yabuta,^{1,2} Chizuru Iwatani,^{2,3} Hideaki Tsuchiya,^{2,3} Yasunari Seita,^{2,3} Shinichiro Nakamura,^{2,3} Naoto Shiraki,⁴ Tetsuya Takakuwa,⁵ Takuya Yamamoto,^{5,6,7} and Mitonori Saitou^{1,2,3,4,8}

¹Department of Anatomy and Cell Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Yoshida-Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

²JST, ERATO, Yoshida-Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

³Research Center for Animal Life Science, Shiga University of Medical Science, Beta-Tsukinawa-cho, Otsu, Shiga 520-2192, Japan

⁴Human Health Sciences, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Shogoin Kawahara-cho 53, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

⁵Center for iPS Cell Research and Application, Kyoto University, 53 Kawahara-cho, Shogoin, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan

⁶Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University, Yoshida-Ushinomiya-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

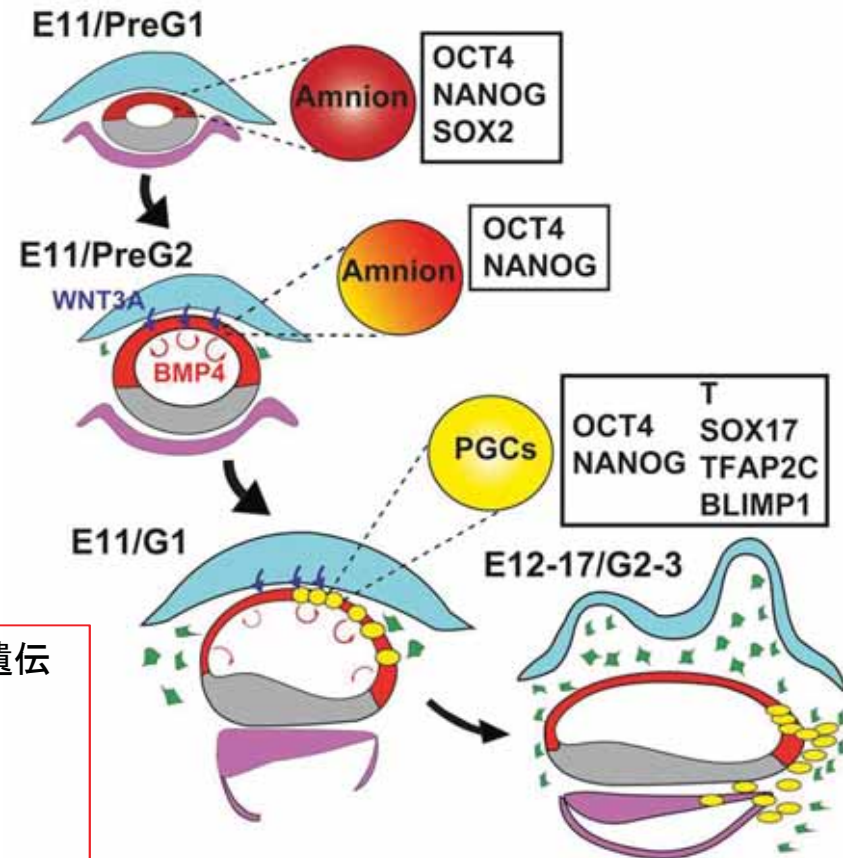
⁷AMED-CREST, AMED, 1-7-1 Otemachi, Chiyoda-ku, Tokyo 100-0004, Japan

⁸Lead Contact

*Correspondence: saitou@anat2.med.kyoto-u.ac.jp

<http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2016.09.007>

Dev Cell 39, 169-185 (2016)



ナフィールド生命倫理審議会 (NCB: Nuffield Council on Bioethics)

- ✓ 1991年にNuffield財団によって設立され、1994年からは財団と英国 Medical Research Council、Wellcome Trustの資金で運営されている独立機関。
- ✓ 生命倫理の分野で、英国政府の政策に対して影響力を有し、国際的にも高く評価されている。



ナフィールド生命倫理審議会レポート ～ゲノム編集とヒトへの生殖医療～

2018年7月

- ✓ 現在の科学的知見、技術、医学的要請、国際的観点からの倫理的側面を精査した結果、将来の医学的な可能性を考慮すると、遺伝病治療を目的とした基礎研究を禁止せねばならない根拠は見当たらない。
- ✓ 2つの原則：
 - (1) 次世代の福祉・幸福:これを保証し、これに矛盾しない
 - (2) 社会の正義と連帯:分断、差別、不利益を増大させない
- ✓ 研究機関への勧告:(1)安全基準と実施法の確立,(2)ゲノム編集による 生じ得る社会福祉的問題の精査
- ✓ 政府への勧告:(1)社会的議論を尽くし、(現在は禁止されている)‘heritable genome editing interventions’を可能にするべく法を改正,(2)社会的議論をするための独立機関の設置
- ✓ 臨床応用へ向けた勧告:徹底したリスクアセスメント, ライセンス付与による規制, 個別に審査, 個人と集団の長期モニタリング



Nuffield Council on Bioethicsより引用

<http://nuffieldbioethics.org/project/genome-editing-human-reproduction>

まとめ

✓ ゲノム編集ツール

CRISPR-Cas9とBase Editorが主流。

✓ 現在まで行われたヒト胚に対するゲノム編集を用いた研究例

9例(米国1, 英国1, 中国7)。

✓ ヒト胚に対するゲノム編集により治療の可能性がある遺伝病

単一遺伝子異常に拠るもの。> 10,000疾患。特に常染色体顕性遺伝の疾患。

✓ ヒト胚に対するゲノム編集による病態研究の可能性

14日以内のみ。限定的。卵割時の染色体異常に関する研究、など。

✓ ヒトの特異性／特殊性(ヒト胚からしか得られない知見)

初期胚のウイルス感染防御システム、始原生殖細胞の発生過程、など。

✓ 英国ナフィールド生命倫理審議会レポート 2018年7月

臨床での治療法確立を目指したヒト胚にゲノム編集を施す「基礎研究」を容認。