

2018, 12/26 (水)

第14回「ヒト胚の取扱いに関する基本的考え方」見直し等に係るタスク・フォース
中央合同庁舎第4号館4階共用第2特別会議室



ヒト受精胚にゲノム編集を用いた 病態解明基礎研究の可能性



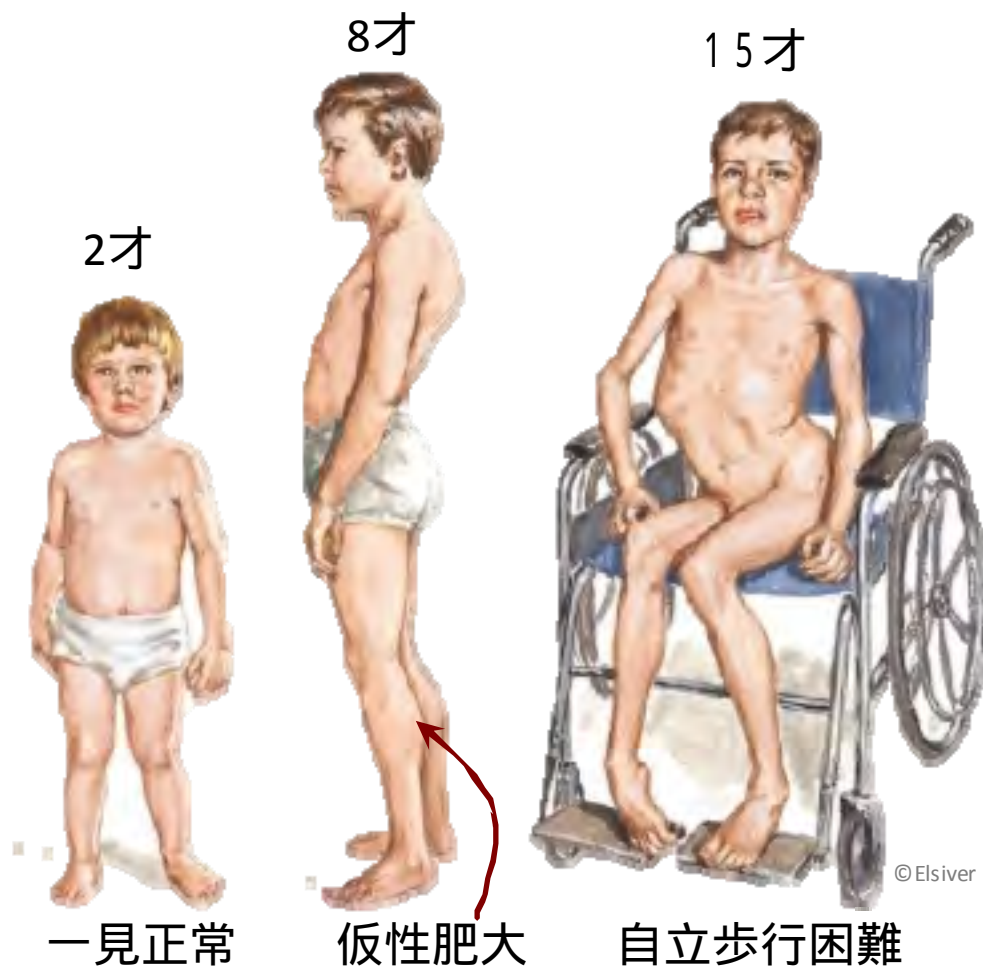
京都大学 iPS細胞研究所(CiRA)
臨床応用研究部門

堀田 秋津 (Hotta Akitsu)

はじめに

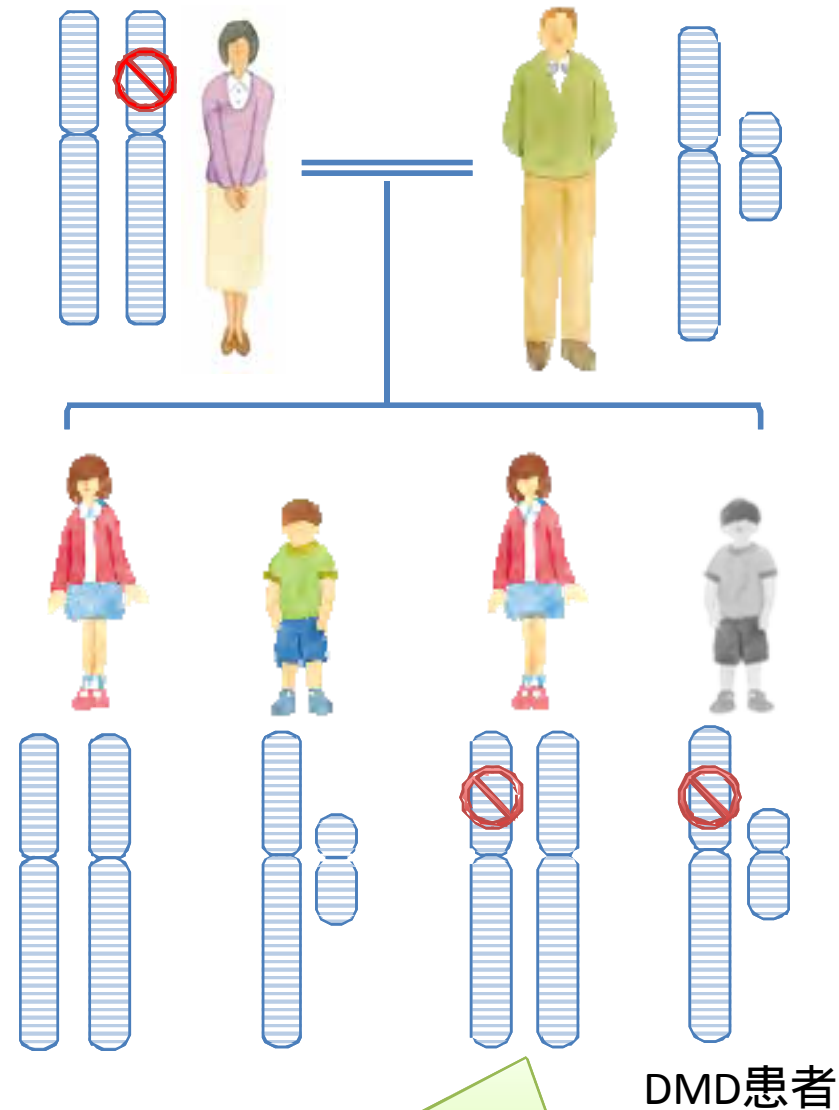
- 自身は筋ジストロフィーなどの難病に対する遺伝子治療研究を行っており、筋組織等でのゲノム編集治療開発を目指している。
- 正確な統計は見つけられなかったが、少なくとも年間数千から数万規模の余剰受精卵が生じている現状。
- ドナーが希望する場合、ES細胞研究以外の基礎研究への道筋を整備することは、社会的・倫理的にも必要ではないかと考える。
- 本日の話題：基礎研究として、余剰胚にゲノム編集等の遺伝子改変技術を用いると、どのような科学的メリットが想定されるか？

デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)



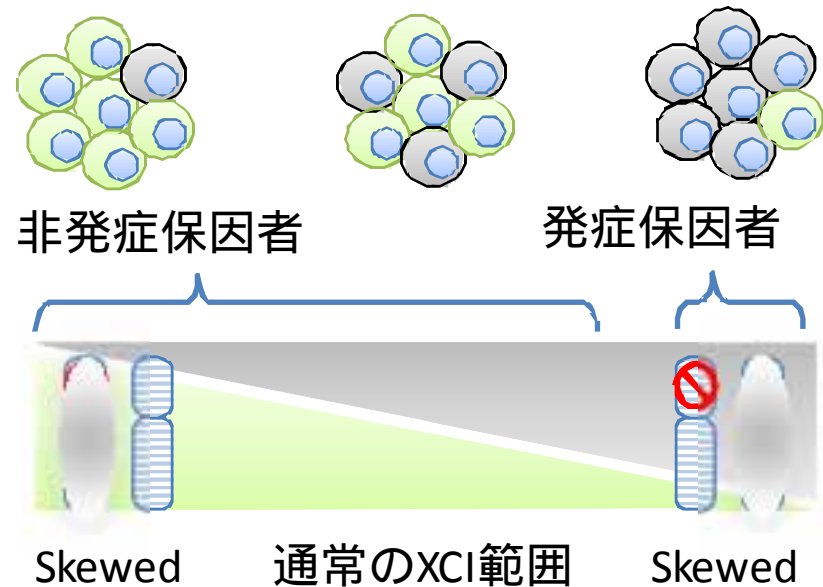
- 進行性の筋萎縮
 - 筋ジストロフィー(指定難病113)の中で最も重症
 - 全身の運動機能低下
 - 呼吸および心機能低下
 - 平均寿命: 31 ± 5 歳
- 推定患者数
 - 国内: 約3,500人
 - 世界: 約250,000人
- X染色体連鎖
 - 主に男児で発症
 - 女性は無症状が多い
 - 希に発症女性が存在
 - : Manifesting carrier

女性のDMD患者の場合

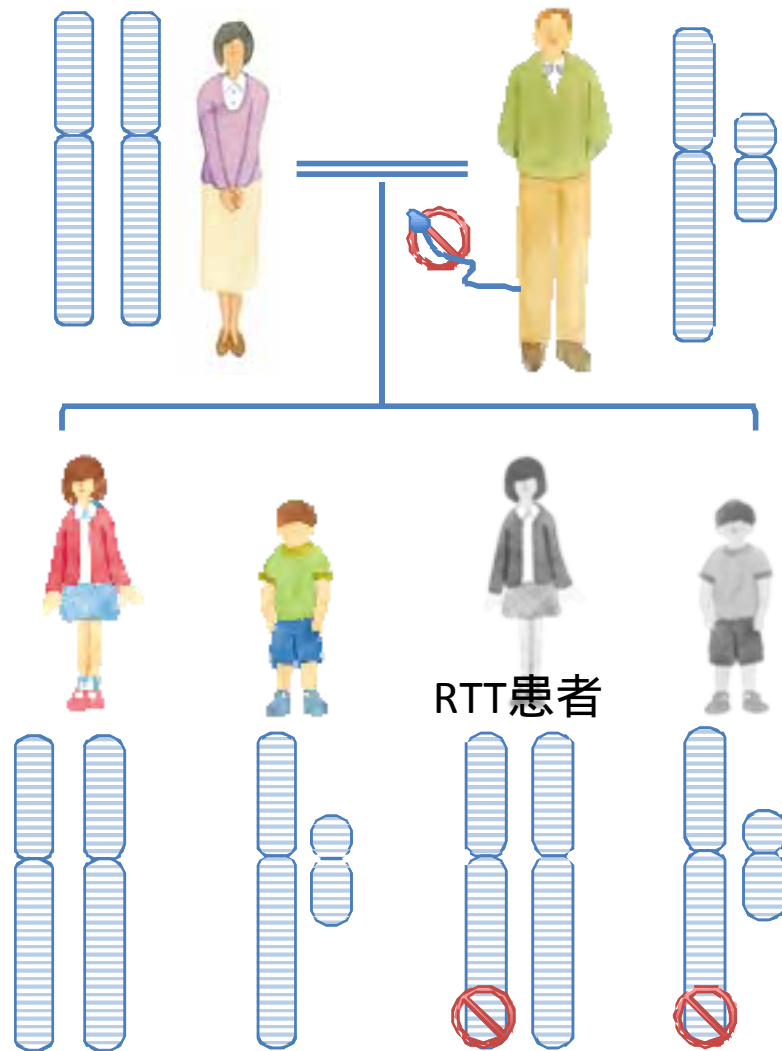


一般的に女性は発症しないが...

X染色体不活性化(XCI)のパターンにより、
希に筋ジス症状が出る場合がある。
(DMD保因者の3-8%)

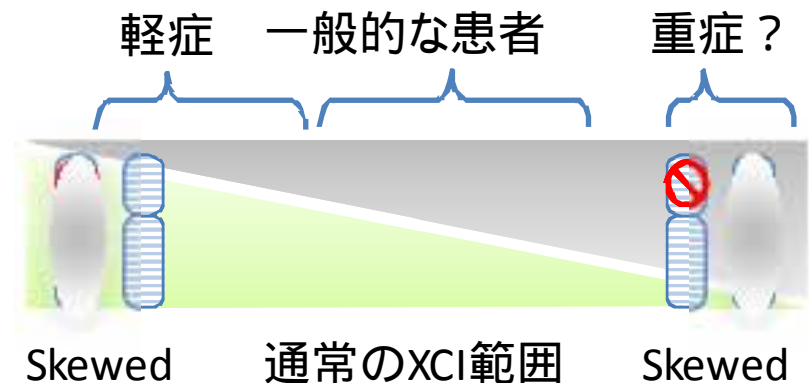


レット症候群の場合

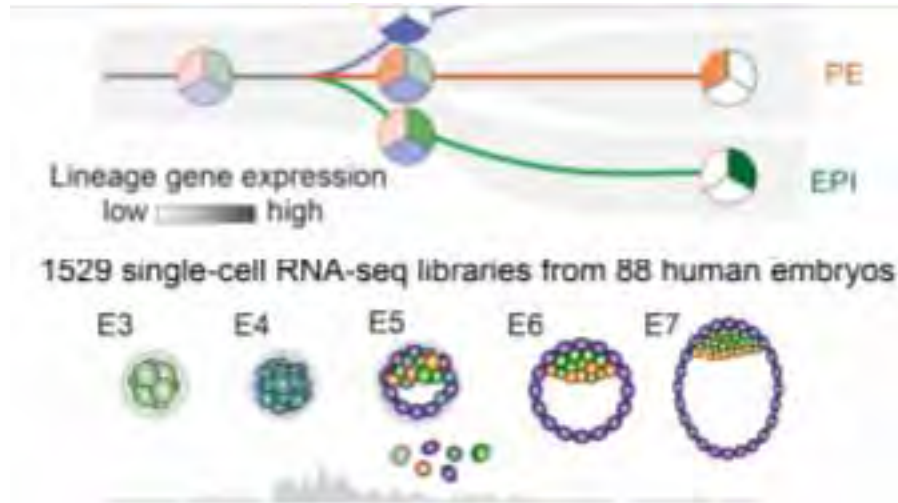


Rett症候群

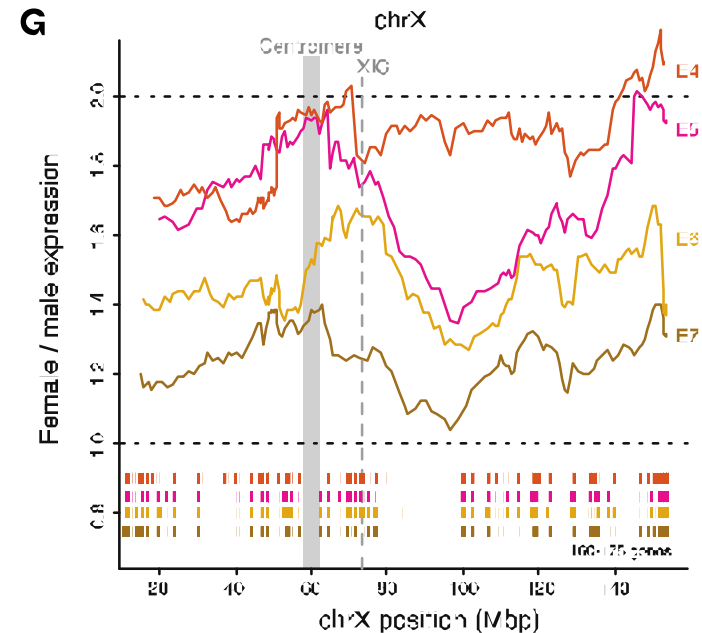
- 進行性神経疾患(指定難病156)
- 99.5%が女児孤発性
- 推定国内患者:約5,000人
- X染色体MECP2遺伝子変異
 - 主に女児で発症
 - 男児は基本Lethal
 - 軽症女児はSkewed XCI



ヒトのX染色体不活性化(XCI)

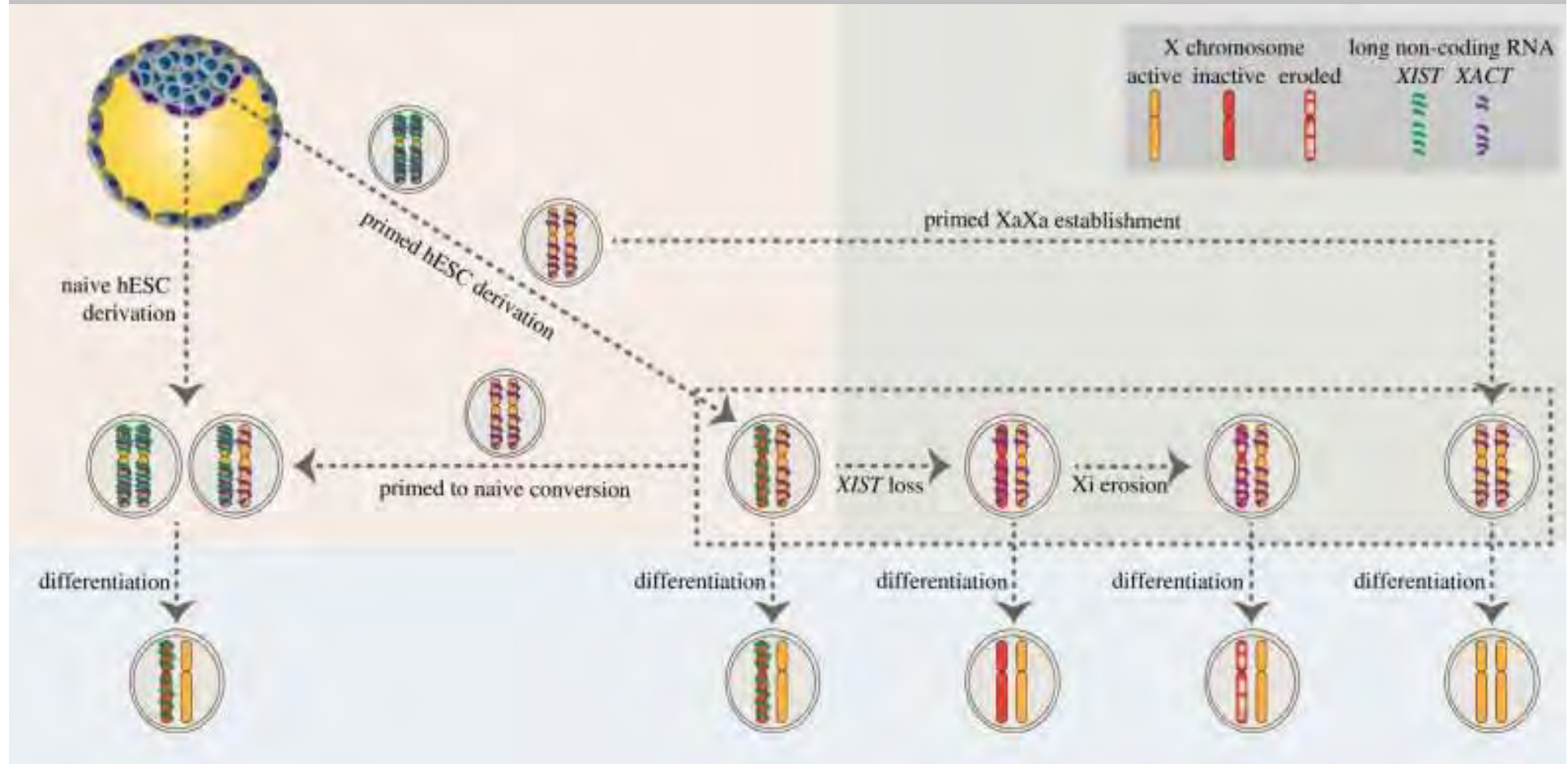


[Petropoulos S et al., Cell, 2016]



- 女性(XX)はX染色体を2本持ち、男性(XY)よりもX染色体からの遺伝子発現量が多くなってしまふ。
- 片方の染色体を不活性化することで、X染色体からの発現量を調整。(X chromosome inactivation: XCI)
- X染色体遺伝子変異疾患例: 血友病、X-SCID、脆弱性X症候群、アルポート症候群、球脊髄性筋萎縮症、等々...
- XCIは着床前初期胚の段階で決定される。

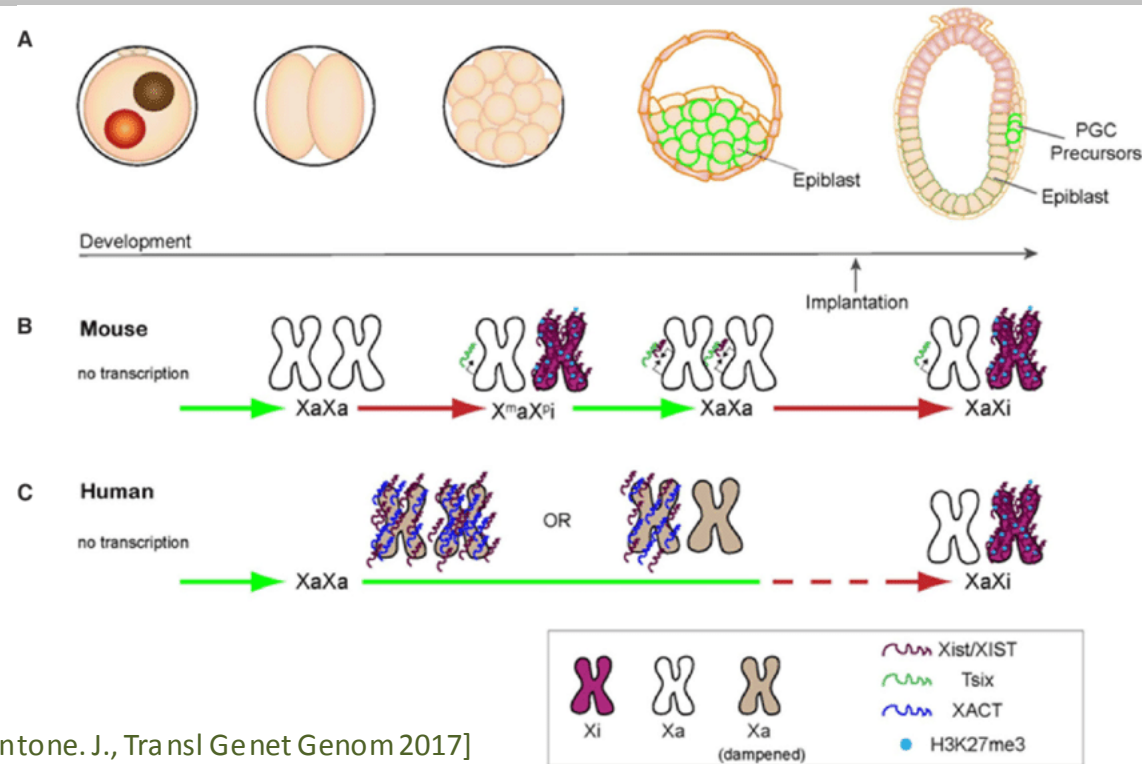
ES/iPS細胞はXCIパターンが不安定



[Sahakyan A, Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2017]

ES/iPS細胞は樹立方法や株毎にXCIの状態が異なる。
XCIの成立過程を解明するためには受精卵での解析が必要

XCI分子機構はヒトとマウスで異なる



[Cantone. J., Transl Genet Genom 2017]

- マウス: Xist RNAがXCI誘導に大切
- ヒト: XIST RNAは存在するが、XCIパターンと相関しない場合もある (特にES/iPS細胞)。最近XACT RNAが発見され、こちらの方がより重要な可能性。

[Val lot Cet al., Nat Genet, 2013]

ヒト受精卵でXCI関連遺伝子をゲノム編集し、XCI状態を解析することで、XCI誘導や維持に関わる遺伝子群の同定が期待される。

受精卵でXCIを研究する意義

- XCIの分子メカニズム解明

なぜSkewed XCIは発生するのか？どのような分子が関わっているのか？ In vitroで受精卵のXCI過程を再現しつつ、ゲノム編集や遺伝子導入でXCI関連遺伝子を操作することで、XCI誘導の有無を調べることは可能ではないか。

- XCIの人為的誘導

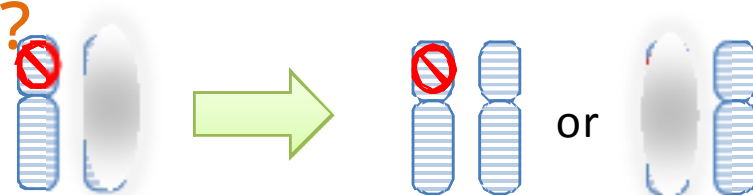
ヒトのXCI誘導に必要な分子が解明されれば、人為的にXCIを誘導し、特定の染色体全体を不活性化できる可能性。

変異X染色体を体細胞で不活性化できれば、女性筋ジス等の治療に応用できるのでは？



- XCIの人為的解除

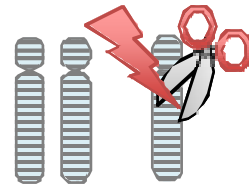
正常X染色体を体細胞で活性化できれば、レット症候群等の治療に応用できるのでは？



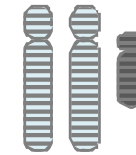
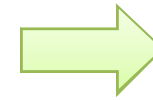
ダウン症や他の染色体異常症への応用可能性

ダウン症候群の治療法？

21番染色体
トリソミー



XIST(または*XCI*誘導因子)を
ゲノム編集でノックイン



染色体全体の転写抑制誘導

[Jiang J. et al., Nature, 2013]

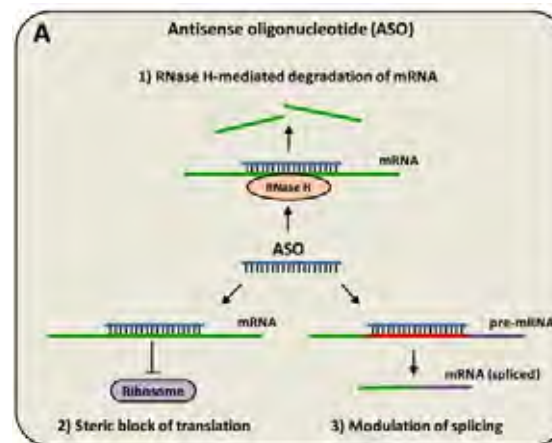
[Chiang JC et al., Nat Commun 2018]

ヒト*XCI*誘導機構を理解し、任意の染色体で*XCI*誘導を再現できれば、
ダウン症等の染色体異常症や部分トリソミーの治療法開発に応用
できるのでは？

染色体異常症

- ダウン症候群 (chr 21 trisomy)
- エドワーズ症候群 (chr 18 trisomy)
- クラインフェルター症候群 (XXY)
- 部分トリソミー

補足：核酸医薬により、標的遺伝子発現抑制も可能
必ずしもゲノム配列を改変しなくても良い可能性



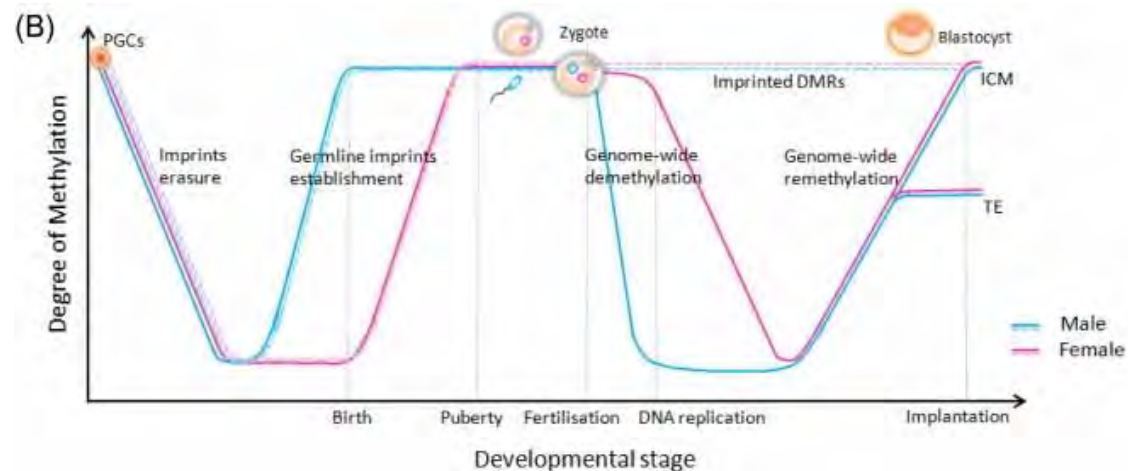
脊髄性筋萎縮症治療薬
SMN2タンパク質発現を誘導
するアンチセンス核酸



ヌシネルセン

12 mg: 932万円

インプリンティング研究の可能性



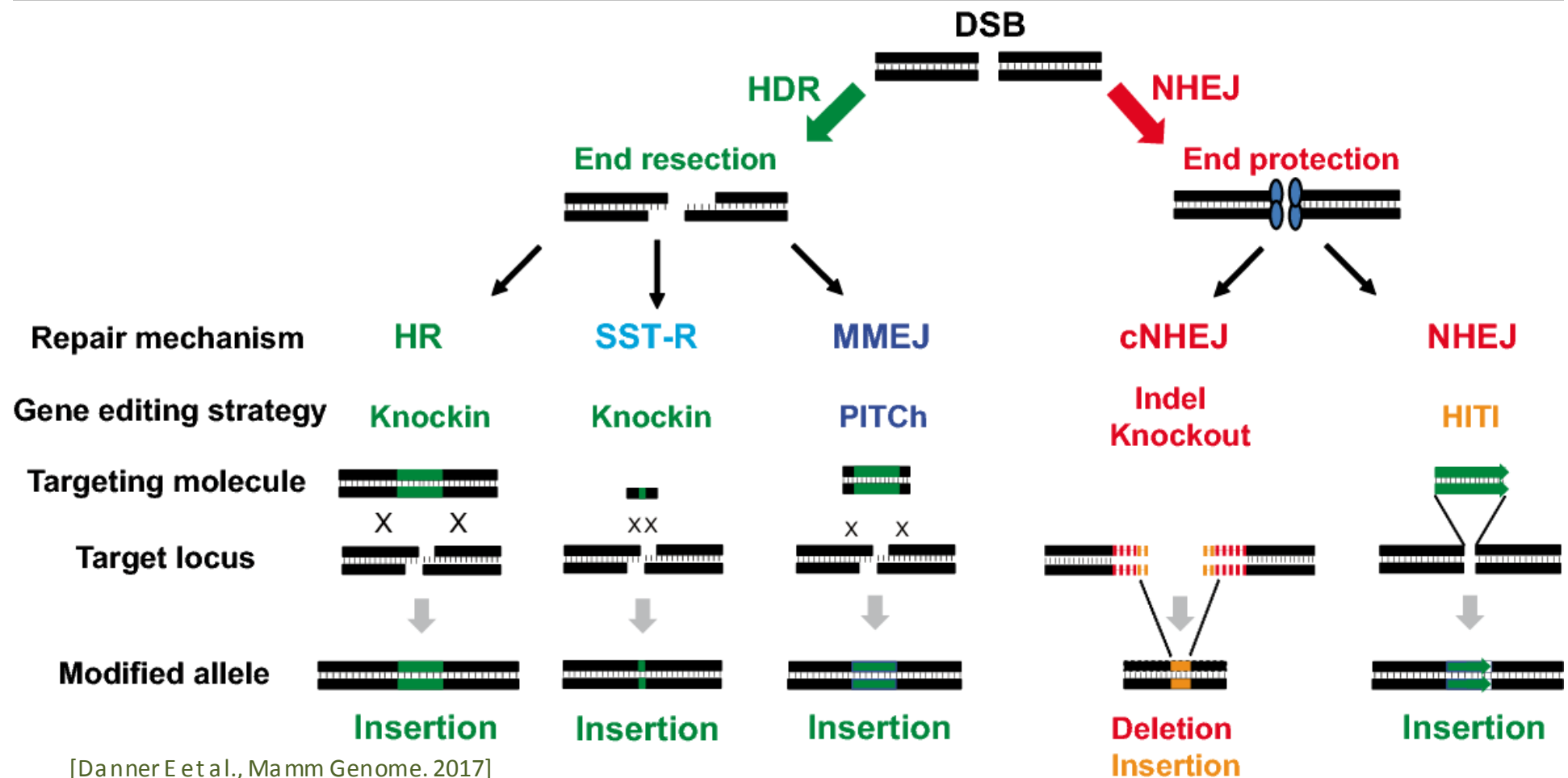
DNAメチル化やインプリンティングも初期胚で確立される。

インプリンティング誘導や維持の分子機構が解明されれば、インプリンティング異常症の発症原因解明や治療法の開発に繋がる可能性。

先天性インプリンティング異常症の例

- Angelman症候群
- 偽性副甲状腺機能低下症タイプIb
- Silver-Russell症候群
- 新生児一過性糖尿病
- Prader-Willi症候群
- Beckwith-Wiedemann症候群
- 網膜芽細胞腫 (Retinoblastoma)

ゲノム編集は細胞のDNA修復経路に依存



国内外で様々なゲノム編集手法が開発されているが、細胞種に応じて使用できる手法や効率が大きく異なる。
受精卵の分裂スピードに追いつけるゲノム編集技術も必要か。

DNA修復機構は細胞種に依存

オフターゲット変異検出有

- Fu Y et al., Nat Biotech, 2013 (CRISPR in U2OS, HEK293 and K265 cells)
- Hsu PD et al., Nat Biotech, 2013 (TALENs/CRISPR in 293T cells)
- Cradick TJ, et al., Nuc Acids Res, 2013 (CRISPR/ in HEK 293T cells)
- Lin Y et al., Nuc Acid Res, 2014 (CRISPR in HEK 293T cells)
- Tsai SQ et al., Nat Biotech, 2014 (CRISPR in HEK 293 and U2OS cells)
- Liang P et al., Protein Cell, 2015 (CRISPR in Trippronuclear zygotes)
- Schaefer KA et al., Nat Methods, 2017 (CRISPR [plasmid + RNP] in mice)

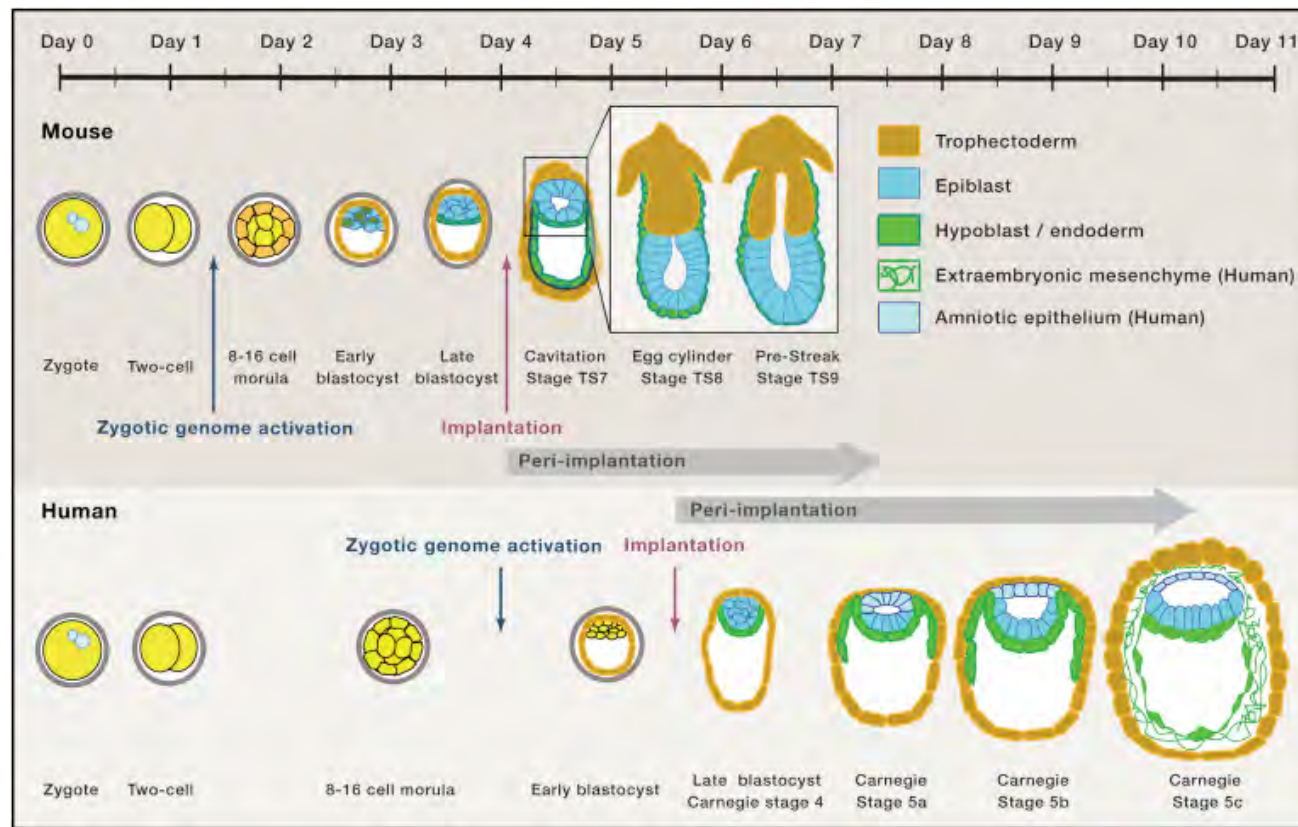
オフターゲット変異検出無

- Yusa K et al., Nature, 2011 (TALENs in iPS cells)
- Ousterout DG et al., Mol Ther, 2013 (TALENs in immortalized myoblasts)
- Smith C et al., Cell Stem Cell, 2014 (CRISPR in iPS cells)
- Veres A et al., Cell Stem Cell, 2014 (CRISPR in ES/iPS cells)
- Suzuki et al, Cell Stem Cell, 2014 (TALENs in iPS cells)
- Li HL et al., Stem Cell Reports, 2015 (TALENs/CRISPR in iPS cells)
- Iyer V et al., Nat Methods, 2015 (CRISPR [RNA] in mice)

ヒト受精卵での下記情報はほとんど不明。

- ゲノム編集効率？ DNA修復機構？ オフターゲット変異リスク？
- 変異導入パターンおよびDNA修復経路 (NHEJ, MMEJ, HDR, etc..)？
そもそもゲノム編集がどこまで利用できるのかも検討が必要。

「ヒトの発生・分化・再生機能の解明」

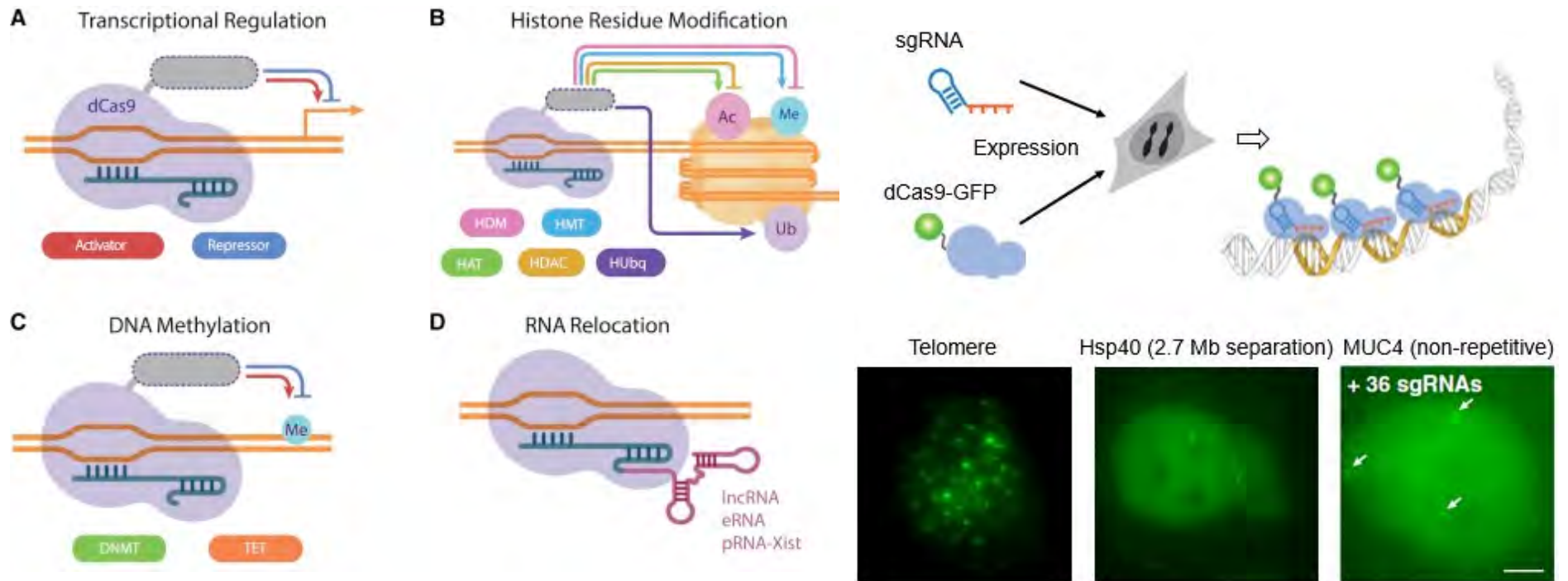


[Rossant J, Tam PPL., Cell Stem Cell, 2017]

現状、ヒトの初期発生過程はまだ未知のブラックボックス。

初期胚の維持機構や分化能力を解明するために、遺伝子改変、細胞のラベリングやレポーター挿入等のゲノム編集技術が有用。

最先端の“切らない”ゲノム編集技術

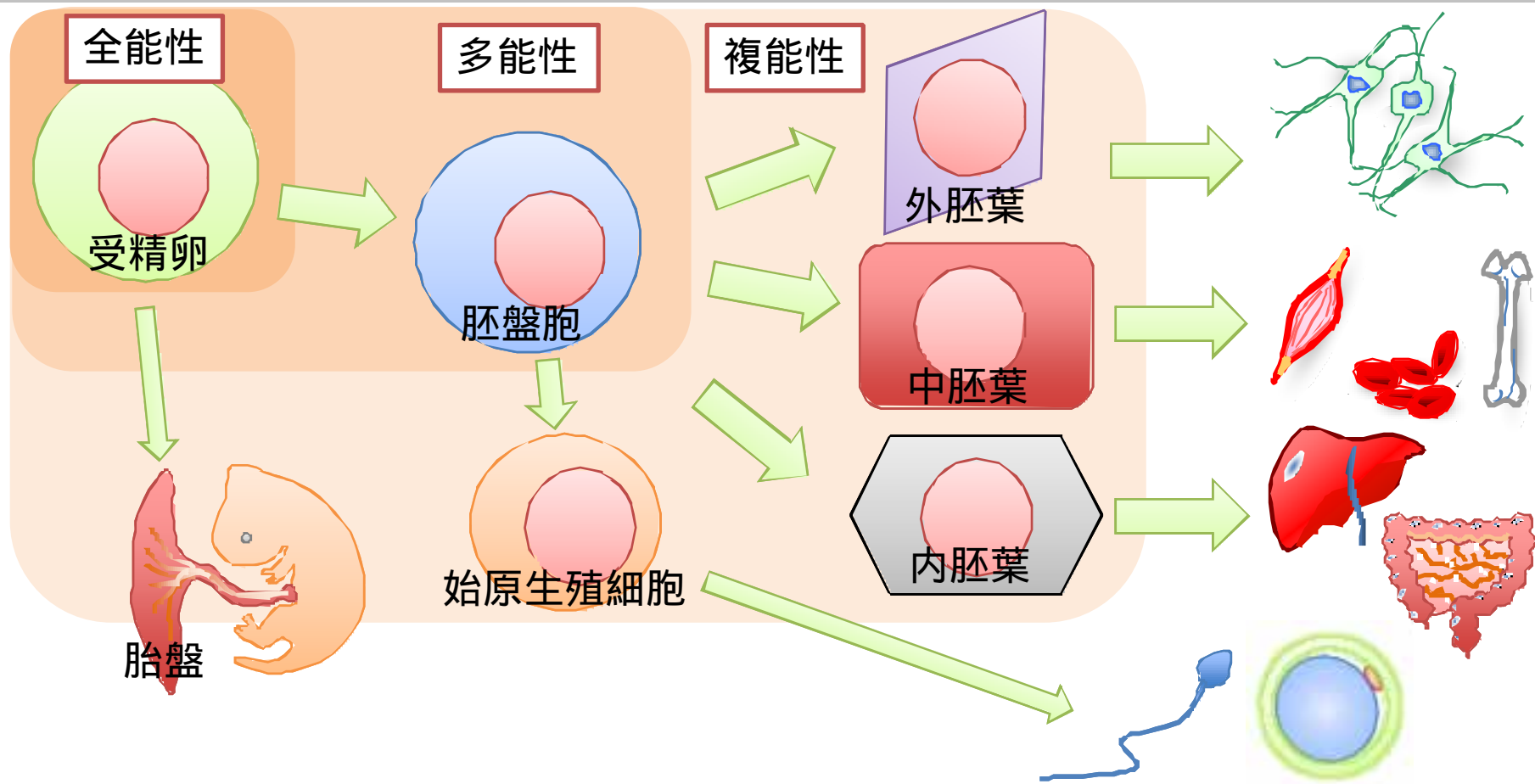


[Pulecio et al., Cell Stem Cell, 2017]

[Chen B et al., Cell, 2013]

- **狭義のゲノム編集**: 二本鎖DNA切断を誘導し、宿主のDNA修復機構によってDNA配列を書きかける。
- **広義のゲノム編集**: 任意のDNA配列部位に任意の機能ドメインをリクルートすることにより、塩基置換(Base editor)、エピゲノム改変、可視化等の様々な局所的変更を誘導する。
今後、治療研究等へも応用される可能性大。

iPS細胞を超える分化全能性細胞が樹立可能に？



ES/iPS細胞(多能性幹細胞)には胎盤系列への自然分化能力は無い。
初期胚の維持機構に大切な遺伝子群が解明されれば、iPS細胞を超える「人工全能性幹細胞 (iTS細胞)」が誘導可能になる可能性。

総括

受精卵や生殖細胞に対して、ゲノム編集等の遺伝子改変技術を用いることで、科学的に意義があると想定される基礎研究の提案例。

新規ゲノム編集方法論開発

初期胚でのDNA修復機構解明

XCIやDNAメチル化等のエピジェネティック機構解明

発生過程の可視化、遺伝子破壊や制御

ゲノム編集胚からのES細胞樹立

新規幹細胞の樹立

受精卵を単に観察するだけでなく、遺伝子改変などの介入実験を行うことにより、発生過程の理解や疾患解明、治療研究に繋がる知見が得られると考えられる。