

京都大学	博士 ( 医科学)	氏 名	北 悠人
論文題目	Dual CRISPR-Cas3 system for inducing multi-exon skipping in DMD patient-derived iPSCs (DMD 患者由来 iPSC 細胞におけるマルチエクソンスキッピング誘導に向けた Dual CRISPR-Cas3 システム)		
(論文内容の要旨)			
【背景と目的】 デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は、ジストロフィンの欠失によって生じる進行性の筋疾患である。この変異の修復手法として、コドンの読み枠がずれたエクソンをゲノム編集により除去するクソンスキッピングがある。しかし、患者ごとに欠失パターンは大きく異なるため、単一エクソンを標的とした場合、最大でも 15%程度の患者にしか適用できない。変異が集中するエクソン 45-55 領域をまとめて除去するマルチエクソンスキッピング (MES) が可能となれば、60%以上の DMD 患者に適用可能となる。しかし、340 kb 以上にわたるゲノム領域の削除は従来の CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集技術では困難であった。そこで、長鎖欠失を得意とする CRISPR-Cas3 に着目し、MES 誘導方法を検討した。			
【方法と結果】 先行研究から CRISPR-Cas3 は crRNA 結合部位から一方向に巨大欠失を誘導できることは知られているが、100 kb 以上の長鎖欠失は極めて稀である。そこで、欠失領域を挟み込むように 2 つの crRNA を設計し、欠失効率を ddPCR 法で測定した。結果、100 kb 程度までは dual-Cas3 が dual-Cas9 よりも効率よく欠失誘導でき、340 kb の欠失も低効率ながら誘導できることが確認できた。 次に、dual-Cas3 を用いてゲノム編集された iPSC 細胞サブクローンを効率良く取得するために、Cas3 が標的配列に切断を誘導した場合に発光する Single strand annealing (SSA) レポーターを構築した。このレポーター陽性細胞をセルソートすることにより Cas3 による切断が誘導された細胞群を濃縮可能となった。 続いて、欠失パターンの異なる 3 名の DMD 患者 (エクソン 46, 47 欠失、51-53 欠失、48-52 欠失) より樹立された iPSC 細胞に対し、dual-Cas3 を導入後、SSA ベクターを用いた濃縮を行い、各細胞株から MES 誘導に成功したサブクローンを取得した。これらのサブクローンで筋原性転写因子 MYOD1 を強制発現させることにより骨格筋細胞へと分化誘導し、ジストロフィンタンパク質の回復を免疫細胞化学染色で確認した。 最後に、継代数の異なる患者由来 iPSC 細胞 (NC1 と NC2) からそれぞれ dual-Cas3 を用いて MES を誘導した株を得た。全ゲノムシーケンスにより Copy Number Valiation (CNV) コールを行った。自然発生の CNV と Cas3 による CNV を区別するために、検出された CNV に最も近い crRNA 結合候補配列を塩基配列探索ツール GGGenome で探索した所、5 kb 以内に検出されたのはオンターゲット配列のみであった。以上から、検出された CNV が Cas3 によるオフターゲット切断の結果生じた可能性は、極めて低いことが示唆された。			
【結論と考察】 本研究により、dual-Cas3 は複数の DMD 患者細胞で MES 誘導が可能であることが示された。また、単独の CRISPR-Cas3 で誘導可能な数 kb の巨大欠失を超える、340 kb もの大規模欠失を二種類の Cas3 を組み合わせることで誘導できることを示した。本手法の適用可能な DMD 患者数が 60%以上に拡大するため、将来の in vivo ゲノム編集治療への応用が期待される。加えて、MES 誘導された DMD 患者由来 iPSC 細胞は今後、自家細胞移植治療のリソースになりうると思われる。			

(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)患者のおよそ 6 割は、エクソン 45-55 の領域に変異を持つことから、340 kb におよぶ DNA 領域を削除する戦略によって、ジストロフィンタンパク質の発現回復が可能となる。そこで本研究では、長鎖 DNA の切断活性を持つ CRISPR-Cas3 を用い、340 kb のゲノム領域を削除する方法の検証を DMD 患者由来 iPSC 細胞を用いて実施した。初めに、削除標的である DNA 領域の両端に Cas3-crRNA を設計する Dual-CRISPR-Cas3 法を用い、Cas9 と同等かそれ以上のゲノム欠失誘導の可能性を見出した。次に、ゲノム欠失が誘導された細胞を濃縮する目的で、Cas3 による DNA 切断の誘導後、GFP や RFP 蛍光を発する SSA レポーターベクターを構築、Cas3 の活性依存的に発光することを確認した。この二色のレポーターを Cas3 と共導入し、GFP と RFP が共陽性となった細胞集団を単離し、ゲノム編集に成功した iPSC 細胞を濃縮することにも成功した。同手法を用いて三名の DMD 患者由来 iPSC 細胞においてゲノム編集を実施し、サブクローン樹立後、骨格筋へと分化誘導を実施した。その結果、ジストロフィンタンパク質の発現が部分的に回復していることを細胞免疫染色で確認した。全ゲノムシーケンス解析によるオフターゲット変異解析では、複数の CNV (コピー数多型) が観察されたが、いずれの CNV も Cas3-crRNA が結合すると想定される部位から 5 kb 以上離れており、導入した Cas3 によって生じた CNV では無いと推測された。

以上、Dual CRISPR-Cas3 技術を活用し、エクソン 45-55 領域に欠失変異を持つ 6 割を超える DMD 患者に対してジストロフィンタンパク質の発現回復が可能であることを示しており、将来の遺伝子治療や iPSC 細胞由来細胞を用いた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 (医科学) 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、令和 5 年 1 1 月 8 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