OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Targeted Genome Replacement via Homology-directed Repair in Non-dividing Cardiomyocytes
Author(s)	石津, 宜丸
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69398
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）　石津　宜丸

論文審査担当者	（職）	氏　名
主　査	大阪大学教授	坂田泰史
副　査	大阪大学教授	竹ノ下
副　査	大阪大学教授	松村泰志

論文審査の結果の要旨

拡張型心筋症は遺伝子変異が発症に関与する難病であり、近年注目されているCRISPR/Cas9を用いた心筋細胞における遺伝子変異の修復が根本的治療法になる可能性がある。しかしこれまでに、非分裂心筋細胞におけるCRISPR/Cas9システムおよび相同組換え(HDR)を用いた正確なゲノム修復を試みた報告はない。

発表者はまず、Cas9恒常発現マウス由来の培養心筋細胞に遺伝子導入を行い、ハイコンテントイメージングサイトメーターにより観察を行うことにより、心筋細胞においてHDRが起こることを見出した。さらに、同様の方法により、心筋症の原因として知られるトロポニンT遺伝子変異を有しCas9を恒常発現するマウス由来の心筋細胞において心筋症原因遺伝子変異の修復を試み、12.5%の効率でHDRによる変異修復に成功した。これらの知見は、CRISPR/Cas9によるHDRを介したゲノム修復は非分裂心筋細胞においても有効であることを示しており、本研究は遺伝子変異を原因とする心筋症に対する新たな治療法への応用の可能性を示す有用な研究であると考えられる。

以上の論文審査の結果、申請者石津宜丸が大阪大学博士（医学）学位授与に値すると判断する。

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	石津　宜丸
論文題名 Title	Targeted Genome Replacement via Homology-directed Repair in Non-dividing Cardiomyocytes （非分裂心筋細胞における相同組換えを介したゲノム修復）

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

指定難病である拡張型心筋症は、心臓移植の適応となる重症心不全の原因の多くを占める。高速シークエンサー技術の発展により心筋症の遺伝的要因が明らかとなる一方、病的遺伝子変異そのものに対する治療介入は行われていない。また、CRISPR/Cas9ゲノム編集技術は遺伝性疾患への応用が期待されるが、正確な遺伝子改変を可能とするHDRは分裂細胞においてのみ生じるとされ、非分裂心筋細胞における治療効果は不明である。本研究では、第一に心筋細胞においてHDRを介したゲノム修復が可能かを検証するため、Cas9恒常発現マウスより単離した培養心筋細胞に対し、ガイドRNA及び修復DNAテンプレートを、アデノ随伴ウイルスベクター(AAV)を用いて導入し、ミオシン軽鎖遺伝子C末端へのtdTomato蛍光タンパク質挿入によるHDR検出を試みることを目的とした。第二に、トロポニンT遺伝子変異をもつ拡張型心筋症モデルマウス由来の培養心筋細胞において、HDRによる遺伝子変異修復を試みることを目的とした。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

我々は、まずCas9恒常発現新生仔マウスより単離した培養心筋線維芽細胞に対し、ガイドRNA及び修復DNAテンプレートを組み込んだAAVを導入し、βアクチン遺伝子C末端へのtdTomato蛍光タンパク質挿入によるHDR検出を試みた。ハイコンテントイメージングサイトメーターを用いた解析により、βアクチン-tdTomato融合タンパク質は正確に細胞骨格上に局在し、tdTomato陽性細胞は導入AAVの用量依存性に約20％まで増加し、線維芽細胞において高確率でHDRが起こっていることが確認された。

ハイコンテントイメージング解析を用いたHDR検出方法を確立することができたため、次に非分裂心筋細胞において同様の実験を行った。Cas9恒常発現新生仔マウスより単離した培養心筋細胞に対し、ガイドRNA及び修復DNAテンプレートを組み込んだAAVを導入し、ミオシン軽鎖遺伝子C末端へのtdTomato蛍光タンパク質挿入によるHDR検出を試みた。ハイコンテントイメージングサイトメーターにより定点経時的観察を行ったところ、AAV導入2日後より分裂、遊走を認めない心筋細胞においてtdTomatoによる蛍光シグナルが検出され、経時的にそのシグナルは増強した。さらに、これらの心筋細胞からゲノムDNAを抽出しサンガーシークエンス解析を行ったところ、tdTomato配列がミオシン軽鎖遺伝子に正確に挿入されており、培養心筋細胞におけるHDRが確認できた。続いて、野生型新生仔マウスの培養心筋細胞を用いて、HDRが起こるか検証を行った。上述のAAVを導入し、12時間後にmRNAでCas9を導入したところ、低効率ながら野生型マウスの培養心筋細胞でもHDRが確認された。

一般にHDRには分裂細胞における細胞周期のS期侵入、DNA合成が必要であり、G0、G1期の細胞には起こらないとされている。そこで、心筋細胞におけるHDRとDNA合成との関連を評価するため、AAV導入前からDNAアナログであるEdU連続標識を行ったところ、HDRが起こった心筋細胞のうちEdUが陽性であった細胞は5％であり、心筋細胞におけるHDRにDNA合成は必ずしも必要ではないことが示唆された。

最後にヒト拡張型心筋症家系において同定されたトロポニンT遺伝子変異（ΔK210）をノックインした拡張型心筋症モデルマウスとCas9恒常発現マウスを交配し、ダブルノックインマウスを作成し、新生仔培養心筋細胞における遺伝子変異修復を試みた。トロポニンTタンパク質発現への影響を避けるため、変異エクソン部位下流のイントロンに対して特異的ガイドRNAを設計し、修復DNAとともにAAVを用いて培養心筋細胞に導入した。ターゲット配列をサンガーシークエンスにて確認したところ、非相同末端結合（NHEJ）を42.5%で認めた一方、12.5%の効率でHDRによる変異遺伝子のゲノム修復に成功した。次のステップとして、臨床応用には分裂能を失った成獣マウス心筋細胞で効率の高いHDRを起こすシステムの開発が必要と思われる。また、12.5％において正確な修復が得られた一方、多くのNHEJを認めたことは、安全性の面で今後の大きな課題である。

〔総　括(Conclusion)〕

CRISPR/Cas9によるHDRを介したゲノム編集は、非分裂心筋細胞においても有効であり、遺伝子変異を原因とする心筋症に対する新たな治療法となり得る。