



2023年10月4日

自治医科大学

東京医科大学

東京大学

患者由来 iPS 細胞とゲノム編集による血友病 A 原因遺伝子の同定

発表概要

自治医科大学生化学講座病態生化学部門、東京医科大学臨床検査医学科、および東京大学の研究グループは、エクソン内に遺伝子に原因を同定できない血友病 A 患者のイントロン深部（イントロン 14）の点変異（注 1）が異常スプライスを引き起こすことで血友病 A を発症することを、患者由来 iPS 細胞（注 2）、ならびにゲノム編集技術を用いて証明しました。本研究成果は、通常の手法で遺伝子異常が明らかでない血友病に対する新たな遺伝子診断法を提言するものであり、研究成果が米国血液学会の Blood Advances 誌に掲載されました。

発表のポイント

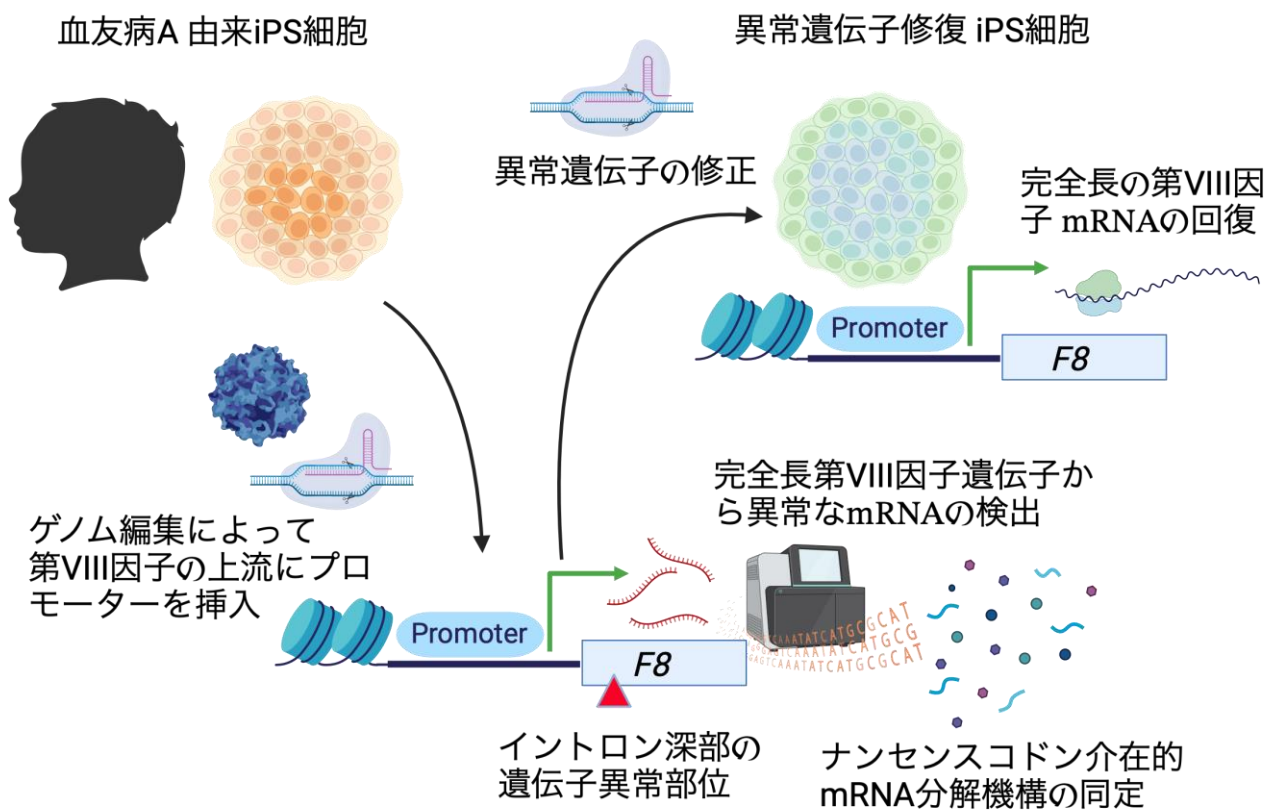
- ◆エクソン内に原因変異を認めない血友病患者の第 VIII 因子遺伝子（*F8*）全長を検索した。
- ◆iPS 細胞の *F8* 上流にプロモーターをゲノム編集で挿入し、未分化 iPS 細胞で *F8* mRNA を発現させた。
- ◆患者由来 iPS 細胞では、イントロン変異によってスプライス異常が生じ、異常な mRNA が発現した。
- ◆スプライス異常を引き起こすイントロン変異のゲノム編集によって *F8* mRNA、及びタンパク質の発現が回復した。

発表内容

【背景】血友病 A は血液凝固 VIII 因子（FVIII）が遺伝的に欠損する疾患です。FVIII は X 染色体に存在する 186 kb にも及ぶ *F8* 遺伝子によりコードされています。血友病 A の遺伝子変異は重症例の場合はイントロン 22 の逆位が多く、血友病全体ではミスセンス変異が多いことが知られています。一方で、通常の手法で遺伝子変異が同定できない症例も存在します。本研究では、血友病 A 患者でエクソン内に変異が同定できない症例に遭遇し、この症例の原因遺伝子部位を同定するために疾患由来 iPS 細胞とゲノム編集技術を組み合わせました。

【内容】エクソン内に変異が同定できない血友病 A の家族において、患者間の *F8* 遺伝子全長を次世代シーケンズで評価しました。イントロン内に 23 個の共通した変異を認めました。*In silico* 解析においてイントロン 14 の深部（エクソン 14 より 13.5 kb 離れた部位）の点変異がスプライス異常の原因と推測されました。患者 iPS 細胞を樹立し、未分化 iPS 細胞から *F8* mRNA を発現させるために、*F8* 上流にプロモーターをゲノム編集で挿入しました。これによって iPS 細胞から *F8* mRNA が発現し、患者 iPS 細胞では、スプライス異常に伴う早期終止コドンに伴う異常な mRNA を同定しました。また、患者 iPS 細胞の *F8* mRNA 発現はナンセンスコドン介在的 mRNA 分解機構（注 3）により低下していました。この点変異をゲノム編集で修復することにより異常 mRNA の発現が消失し、*F8* mRNA 全長の発現が回復しました。また、患者変異を有する HEK293 細胞を樹立し、同様に点変異のゲノム編集で修復したところ、上清の FVIII タ

ンパク質の発現が回復しました。これまでは、通常の遺伝子解析で遺伝子異常が同定できない症例に対して、白血球中に存在する微量な mRNA を増幅させて異常な転写物の検出や、標的のイントロンを短縮させた遺伝子の細胞への発現解析などで評価を行っていました。我々の iPS 細胞とゲノム編集技術を組み合わせた方法は全長の *F8* mRNA 発現が可能であり、これまで不可能であったナンセンスコドン介在的 mRNA 分解機構も評価できます。また、将来的に応用が期待される個別化ゲノム編集治療の治療効果も確認できます。本技術は、iPS 細胞から分化が困難な細胞においても mRNA の同定ができるため、通常の手法で病因が明らかにならない他の遺伝性疾患への応用も期待されます。



Created with BioRender.com

論文情報

〈雑誌〉 Blood Advances

〈題名〉 Genome editing of patient-derived iPSCs identifies a deep intronic variant causing aberrant splicing in hemophilia A

〈著者〉 Hiramoto T, Inaba H, Baatartsogt N, Kashiwakura Y, Hayakawa M, Kamoshita N, Nishimasu H, Nureki O, Kinai E, and Ohmori T. * (*責任著者)

〈DOI〉 doi.org/10.1182/bloodadvances.2023010838

研究助成

本研究は、国立研究開発法人日本医療研究開発機構（AMED）エイズ対策実用化研究事業「HIV 関連病態である血友病の豊かな未来を目指した画期的治療法・診断法の創出」（課題番号：JP22fk0410037 研究代表者：大森 司）、先端的バイオ創薬等基盤技術開発事業「安全な遺伝子治療を目指した万能塩基編集ツールの創出」（課題番号 JP22am0401005：研究代表者：濡木 理、研究分担者 大森 司）、JSPS 科研費（課題番号 JP23H02819 研究代表者：大森 司）、等の支援により行われました。

用語解説

(注1) 点変異：A から G、などの DNA の 1 塩基の変化。エクソン内で疾患の原因になるとときにはアミノ酸変異を伴う。

(注2) iPS 細胞：自己の分化細胞に対して転写因子を発現させて得られる多能性幹細胞。京都大学山中教授が開発した。

(注3) ナンセンスコドン介在的 mRNA 分解機構：通常の終止コドンよりも上流にストップコドンが生じた mRNA を分解する機構。

問い合わせ先

〈研究に関する問合せ〉

自治医科大学医学部生化学講座病態生化学部門

教授 大森 司（おおもり つかさ）

Tel：0285-58-7324 E-mail：tohkori@jichi.ac.jp

〈報道に関する問合せ〉

自治医科大学 研究支援課

Tel：0285-58-7550 E-mail：shien@jichi.ac.jp