

学位論文内容の要旨

論文提出者	小足 周平
論文審査委員	(主 査) 朝日大学歯学部 教授 近藤 信夫 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 柏俣 正典 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 永山 元彦 (外部審査) 岐阜大学大学院医学系研究科 准教授 手塚 建一
論文題目	Zinc-Finger Nucleases を用いたヒト歯髄細胞における HLA ゲノム選択的遺伝子改変
論文内容の要旨	<p>【目的】 ヒト白血球抗原 (HLA) は自己と非自己を区別する役割を果たしている。HLA-A, B, DRB1 がハプロタイプホモである場合、レシピエント側の HLA ハプロタイプの少なくとも一方と合致した場合には、理論上免疫拒絶を回避できる。現在、HLA-A, B, DRB1 の 3 つのローカスがホモである歯髄細胞を収集し iPS 細胞にすることで移植用細胞ストックの構築が進められている。歯髄細胞は増殖能が高く、iPS 細胞への誘導率も高い。また、完全埋伏智歯から採取した歯髄細胞は骨や歯といった硬組織に保護されているため紫外線などによるダメージが少ない。そのため、新たな移植用細胞ツールとして注目されている。しかし、HLA ハプロタイプホモの歯髄細胞を収集し、移植用の細胞バンクを構築するには膨大な費用と時間を必要とする。そこで、Zinc-Finger Nucleases (ZFN) を用い、特定の HLA ローカスに遺伝子変異を誘導することで、擬似的 HLA ハプロタイプホモ細胞の作製を試みた。</p> <p>【方法】 (HLA-A*02, 33: B*44, -: C*14, -: DRB1*13, -) の HLA 型を持つ歯髄細胞 (DP144) のゲノム編集を実施した。具体的には、HLA-A*02 領域に遺伝子変異を誘導し、発現を阻害することで擬似的に日本人出現頻度第 2 位の HLA ハプロタイプホモ (HLA-A*33, N: B*44, -: C*14, -: DRB1*13, -) の細胞作製を試みた。プラスミドの導入には NEPA21 (ネッパジーン、千葉) によるエレクトロポレーション法を採用した。GFP プラスミド (pGFP) で導入率を確認し、HLA-A*02 領域を特異的に DNA2 本鎖切断 (DSB) するよう設計した ZFN プラスミド (ZFN3-5, ZFN3-6) を、歯髄細胞に導入した。抗 HLA-A*02-FITC 抗体で細胞を蛍光標識したのち、FACS を用いて HLA-02 陰性分画の細胞を分取し拡大培養を行った。DNA の HLA-A*02 領域と、HLA-A*33 領域を PCR で増幅し遺伝子配列の解析を実施した。</p> <p>【結果】 FACS による解析の結果、エレクトロポレーションによるプラスミドの導入率は 30.8% だった。ZFN 処理群にて HLA-A*02 分子の発現が低下しており、1.4%から 2.5%の割合で HLA-A*02 陰性細胞を認めた。HLA-A*02 陰性画分から分取した細胞を拡大培養し、遺伝子配列を解析した結果、HLA-A*33 アリルと比較して、HLA-A*02 アリルに選択的な塩基の欠失や挿入、置換の他、HLA-H 領域との相同組み換え変異を認めた。HLA-A*33 アリルに対するオフターゲット変異は認められなかった。</p>

【考 察】 ZFN を歯髄細胞へ導入し DSB を誘導した結果, HLA-A*02 領域には塩基の欠失や挿入, 置換といった, さまざまな変異が誘導されていることを確認した. 遺伝子配列が変化することで正常な HLA-A*02 のアミノ酸が転写および翻訳ができず, HLA-A*02 の発現が低下したと考えられる. 以上より, ZFN は HLA-A*02 へ特異的に遺伝子変異を導入し, 遺伝子発現を阻害したと言える. しかし, 今回検出された欠失変異の多くには, HLA-A*02 のターゲット領域下流にて HLA-H 領域との相同組み換え修復変異を多数認めた. この現象が頻発した理由として, HLA 領域の遺伝子同士との相似性が関与していると考えられる. HLA 遺伝子の周囲には偽遺伝子となった HLA 領域が多数存在する. 今回, HLA-A*02 との相同組み換えを認めた HLA-H は, HLA-A の遺伝子重複または HLA-A との共通の祖先遺伝子から発生したと考えられており, exon4 に 1 塩基の欠失およびフレームシフト変異が発生し, 未成熟終始コドンが出現したことで偽遺伝子化した HLA である. 近年報告された論文では, ハツカネズミ (BL6) とクリイロハツカネズミ (CAST) 由来の染色体を有する ES 細胞に対し, 第 6 染色体にコードされている Cd9 の第 2 イントロンを CRISPR/Cas9 で切断したところ, exon2 を含む大規模な欠失に加えて, BL6 由来の染色体と CAST 由来の染色体間で相同組み換え修復が組み合わさった複雑な修復変異が生じたと報告している. このため, DSB を応用したゲノム編集では, 従来考えられていた様な小規模ではなく, より大規模かつ複雑な修復変異が生じていたと考えられる. 特に, HLA 領域では酷似した塩基配列を有する偽遺伝子が多数存在するため, 欠失と相同組み換え修復が組み合わさる複雑な修復変異が生じやすい可能性が高い. この現象が生じた仮説として以下が考えられる. 最初に, ZFN が標的部位に結合して DNA 2 本鎖切断 (DSB) を誘導した結果, HLA-A*02 と HLA-H*02 間で相同組み換え修復 (HDR) が生じたと考えられる. しかし, HLA-H*02 には ZFN3-6 が結合できる遺伝子配列が含まれているため, 再び ZFN3-5 と ZFN3-6 が標的部位に結合して DNA 2 本鎖切断を誘導したと考えた. 将来的に臨床応用を前提にするならば, 局所的な遺伝子配列の解析だけでなく他のさまざまな遺伝子領域における変異の有無や染色体の構造異常などを, 全ゲノムシーケンス解析を用いて厳密に評価していく必要がある.

【結 論】 HLA-A*02 特異的に切断するよう設計した ZFN は HLA-A*02 領域を選択的に切断し, 欠失や挿入, 置換, 相同組み換え変異を誘導できた. その結果, 日本人出現頻度第 2 位の HLA 型を有する疑似的 HLA ハプロタイプホモ細胞が誘導できた. 今回の実験で得られた知見は, 移植用細胞バンクの構築に貢献し, 再生医療の産業化の発展へ繋がると考える.