

201324117A

## 厚生労働科学研究費補助金

### 難治性疾患克服研究事業

カムラチー・エンゲルマン病の治療法の確立：  
新規遺伝子探索、モデル構築、分子標的治療薬の探索

平成25年度 総括・分担研究報告書

研究代表者：木下 晃

平成26年（2014年）4月

## 目次

I. 総括研究報告	
カムラチ・エンゲルマン病の治療法の確立： 新規遺伝子の探索、モデル構築、分子治療標的薬の探索	----- 1
木下 晃	
II. 分担研究報告	
1. カムラチ・エンゲルマン病の疫学研究と患者の経過観察	----- 21
藤田 芳男	
(資料) 全国一次調査票	
臨床所見・診断基準	
CED 検査参考所見	
2. カムラチ・エンゲルマン病家系の臨床的分析	----- 27
古庄 知己	
(資料) 家系情報 (図 1)	
成長パラメーター (図 2、3)	
罹患男児のレントゲン画像 (図 4-6)	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 37
IV. 研究成果の刊行物・別刷り	----- 43

# I . 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総括研究報告書

カムラチ・エンゲルマン病の治療法の確立：  
新規遺伝子探索、モデル構築、分子標的治療薬の探索

研究代表者：木下 晃 長崎大学・原爆後障害医療研究所 講師

研究要旨

希少な骨系統疾患 Camurati-Englmann disease (CED) の治療法の確立を目指して本研究を立ち上げた。本研究では(i) CED 患者の経過観察と国内の患者数の推定をおこなった。(分担研究者担当)、(ii) 新規患者 2 名の変異解析を行ったが、*TGFB1* 遺伝子に変異は同定されなかった。今後患者の同意を得た上でエキソーム解析を行う、(iii) PS 細胞研究所（戸口田淳也教授）で R218H 変異をもつ CED 患者の iPS 細胞の樹立を行った。今後、この細胞を用いて TGF シグナル系の解析と将来的な治療法・治療薬の開発を目指した研究を行う。(iv) 新規ゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 法を用いて、マウス受精卵へ CED 患者で最も高頻度に同定される R218C 変異のノックインを試みた。今回の条件では DNA 切断効率が高すぎるため、遺伝子改変されたマウスは出生前に全て死亡した。今後は、条件等を検討し CED モデルマウスを作製し、治療法の開発に向けた研究を行う。

A. 研究目的

を困難にしている。

カムラチ・エンゲルマン病とは

国内の患者数は正確には把握されていないが、希少疾患であり、50 名程度と考えられている。

Camurati-Englmann disease（以下、CED, MIM131300、カムラチ・エンゲルマン病）は、常染色体優性遺伝性の骨系統疾患である。その病態は頭蓋骨や長管骨の過剰な膜性骨化を特徴とし、過剰な骨化による著明な骨皮質肥厚と長管骨骨幹部の紡錘形肥大が観察される。多くは 10 才前後で発症し進行性であり、病変は大腿骨・脛骨から始まり、下肢痛、筋力低下、痩身、難聴の症状を呈す。この疾患の特徴は患者間で表現系、重症度が大きく異なることである。同一家系内の患者でも、その表現系は大きく異なるため、診断

確立した治療法はなく、成人期の骨痛にはステロイド（プレドニン）の経口投与が広く認められているが、頭蓋底などの骨硬化の進展を押さえることはできない。マルファン症候群やその類似疾患 Loyes-Diets syndrome に効果が認められるとされるアンギオテンシン受容体拮抗薬ロサルタンも、成人 CED 患者には薬効がないとされている。

CED の確実な診断と治療法の開発は急務である。

## 責任遺伝子の同定

報告者らは、国内の CED 家系を収集し、マイクロサテライトマーカーを用いた連鎖解析を行った。この結果、CED の原因遺伝子は 19 番染色体長腕 (19q13.1-q13.3) 上に存在することが明らかになった (Ghadami et al, American Journal of Human Genetics, 1999)。

この領域 (約 15 cM) 内には 100 個以上の遺伝子が存在するが、遺伝子の機能に着目し、(i) 骨基質中に大量に蓄積している、(ii) 骨芽細胞の増殖・分化を調節するなどの条件を満たす transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 (*TGFB1*) の変異解析を行った。

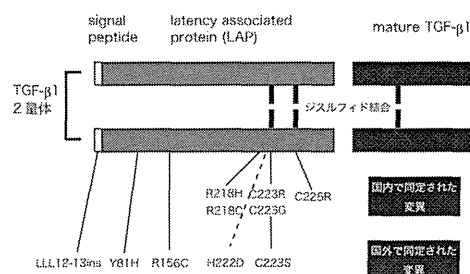
TGF- $\beta$ 1 は 3 対のジスルフィド結合を介して、2 量体を形成している。このうちの 2 対のジスルフィド結合は、成熟型 TGF- $\beta$ 1 の活性を抑制する latency associated protein (LAP) 領域にある (223 番目と 225 番目のシステイン残基が形成している)。

CED 患者ではこのシステイン残基とその周囲にミスセンス変異 (C225R、R218H、R218C) が集中していた (Kinoshita et al, *Nature Genetics*, 2000)。またその後の変異解析により、日本人 CED 患者で C223R と C223G が同定された (Kinoshita et al, American Journal of Medical

Genetics, 2004)。

これらの結果から、TGF- $\beta$ 1 の LAP ドメイン特異的な変異が CED を引き起こすと結論づけた。

これまでに CED 患者で同定された TGF- $\beta$ 1 の変異



## 生化学的機能解析

TGF- $\beta$ 1 の LAP ドメインの変異が、何故 CED を引き起こすかを明らかにするために、生化学的解析を行った。

CED 患者から単離した線維芽細胞 (R218H) と正常線維芽細胞を用いた結果から、変異 TGF- $\beta$ 1 では LAP ドメインが不安定化しており、正常型と比べて容易に活性化型になりやすいことが明らかになった。

つまり野生型では、LAP ドメインをもつ潜在型 TGF- $\beta$ 1 は、latent TGF- $\beta$  binding protein (LTBP) と結合した large latent form の形で骨基質に存在している。LTBP から切り離された潜在型 TGF- $\beta$ 1 (small latent form) は、さらにペプチダーゼなどによって切断され、成熟型 TGF- $\beta$ 1 として活性を持つ。しかし変異 TGF- $\beta$ 1 では、これらの過程を飛ばして、容易に活性化されている。

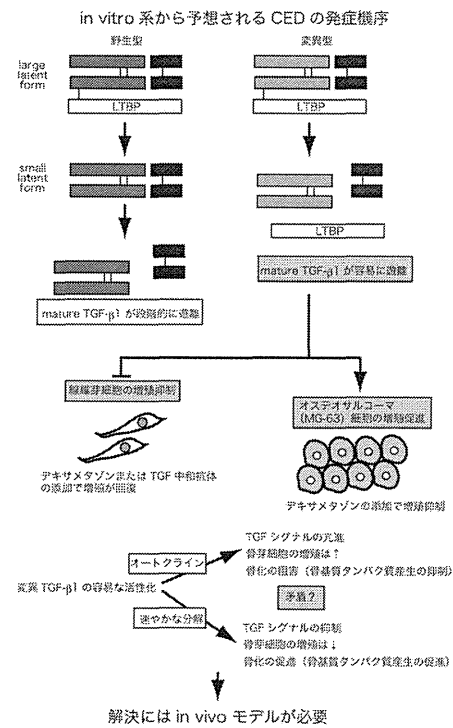
患者線維芽細胞では、細胞の増殖速度が抑制されるが、中和抗体の添加により正常レベルに回復した。またデキサメタゾン（合成副腎皮質ステロイド）の投与でも、*TGFB1* mRNA の発現量が抑制され、細胞増殖が回復した。

変異 TGF-β1 を発現するベクターをトランスフェクションしたオステオサルコーマ細胞株 (MG-63) では、正常細胞に比べて細胞増殖が亢進し、デキサメタゾンの投与で増殖が抑制される (Saito et al, The Journal of Biological Chemistry, 2001)。

変異 TGF-β1 は容易に活性化型になるが、その後は、2つのルートが予想される。

- (i) 骨基質から遊離した活性化型 TGF-β1 が直接オートクラインで骨芽細胞に作用する（刺激促進型）。
- (ii) 活性化型 TGF-β1 は速やかに分解されるとの報告があり、骨基質から遊離した活性化型 TGF-β1 も直ぐに分解され骨芽細胞へ作用できない（刺激消失型）。

現時点ではどちらが正しいかの説明はついていない。

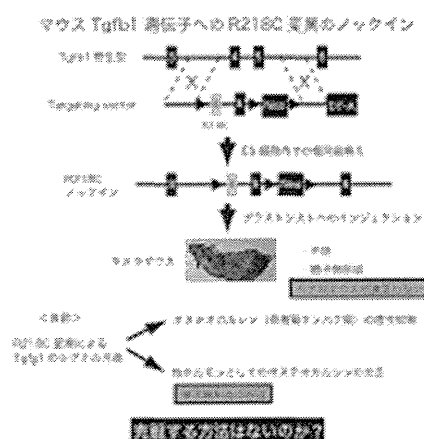


## モデルマウスの開発

*in vitro* の生化学的機能解析から、CED の発症機序の一端が明らかになった。しかし、生体における機能解析、治療法および治療薬の開発のためには *in vivo* モデルが必要である。*in vitro* 解析と平行して、CED 患者で最も高頻度に同定される R218C 変異を導入したノックインマウスの作製に取り込んできた。

ES 細胞内での相同組換えを利用した gene targeting 法で、相同組換え ES クローン単離し、キメラマウスを作製した。しかし、これらのキメラマウスは全て不妊であり、モデルマウスとなる R218C 変異ヘテロマウスは誕生していない。顕微授精のためキメラマウスの精巣を摘出したが、精巣内には精子が全く存在しなかった。キメラ

マウスの体内で何が起きたかは不明だが、骨基質のオステオカルシンがホルモンとして働き、精子の形成に必須であることが近年示唆されている (Oury et al, *Cell*, 2011)。TGF- $\beta$ 1 はオステオカルシンの産生を抑制すると考えられており、変異のノックインが不妊（精子無形成）の原因の1つであると考えている。



### GED のヘテロジェナイティーの存在

2000 年以降、国内外の CED が疑われる患者の *TGFB1* の変異解析を行っている。しかし、これらの患者の中には、*TGFB1* に変異が同定されない患者がいた。

このことから CED にはヘテロジェナイティーが存在し、*TGFB1* に変異が同定されなかった患者を CED type II と名付けた (Nishimura et al, *American Journal of Medical Genetics*, 2002)。

現在も CED type II の責任遺伝子は

同定されていない。

ちなみに、TGF- $\beta$  の受容体 (*TGFB1* および *TGFB2*) は、マルファン症候群様の病態を示す常染色体優性遺伝病 Loyaes-Dietz syndrome の責任遺伝子 (Mizuguchi et al, *Nature Genetics*, 2004、Loyaes et al, *Nature Genetics*, 2005) であり、TGF ファミリーメンバーである TGF- $\beta$ 2 (*TGFB2*) は家族性胸部大動脈瘤の責任遺伝子である (Boileau et al, *Nature Genetics*, 2012)。

本研究では、希少な骨系統疾患 CED の治療法の確立を目指し、(i) これまでに把握されている患者の経過観察に加えて、本邦における新規 CED 患者数の推定、(ii) CED が疑われる患者の *TGFB1* の変異解析並びにエキソーム解析による新規責任遺伝子の同定、(iii) *in vitro* ならびに *in vivo* のモデル系の開発と解析を目的とする。

### B. 研究方法

本研究では大きく分けて 4 つのカテゴリーの研究を行った。

#### (1) CED 患者の経過観察

信州大学で大家系の臨床的分析に着手した。罹患男性 2 人、罹患女性 2

人、非罹患女性1人の0-2歳の成長データ（身長、体重、頭囲）を入手し、成長曲線を作成した。

旭川医科大学でフォローしている母子例と孤発例の経過観察も行った。

## (2) アンケートに基づく疫学調査

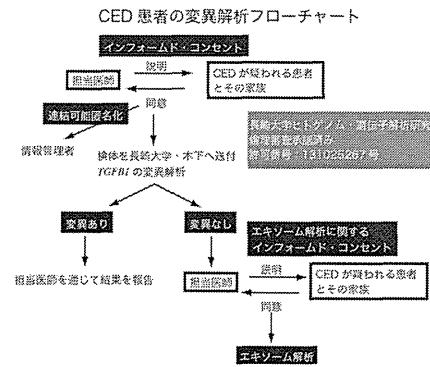
CEDは希少疾患であり、国内の患者数は正確に把握されていない。また、その表現系（重症度）は患者間で大きく異なる。

国内の医療機関（小児科学会認定の522施設と整形外科学会認定の2009施設、計2531施設）を対象にアンケート調査を行い、国内のCED患者数の推定を行う。

## (3) 新規患者の集積とその変異解析

国内の大学や大学病院をはじめとする医療機関からCED疑いの患者を集め、変異解析を行う。

*TGFB1*の変異解析は、*TGFB1*の全7エキソンおよびその前後のイントロンおよび非翻訳領域領域をPCR法で増幅し、このPCR産物をダイレクトシーケンシング法で塩基配列を決定する。*TGFB1*に変異が同定されない患者は、インフォームド・コンセントと文書による同意書を得た後に、エキソーム解析を行う。



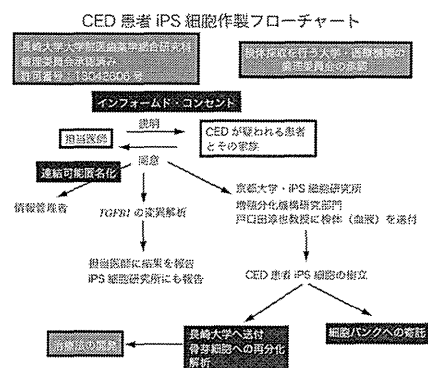
## (4) 治療に向けたモデルの開発

### (i) 患者 iPS 細胞の作製

既に *TGFB1* に変異が同定されている CED 患者から血液を採取し、京都大学 iPS 細胞研究所・増殖分化機構研究部門・戸口田淳也教授に送付し、iPS 細胞を樹立していただく。また、新規に集積する CED が疑われる患者およびその家族を対象に、血液を採取し、同様に iPS 細胞を樹立する。

iPS 細胞の樹立に際しても、インフォームド・コンセントと文書による同意書を得た後に実施する。

作製した iPS 細胞は、細胞バンクに寄託するとともに、長崎大学に輸送し骨芽細胞へと分化させ、機能解析に用いる。





## (ii) 新規ゲノム編集技術によるマウス骨芽細胞への変異のノックイン

これまでは遺伝子のノックアウト・ノックインなどの遺伝子改変技術はES細胞など相同組換え能が高い特殊な細胞のみで可能であった。

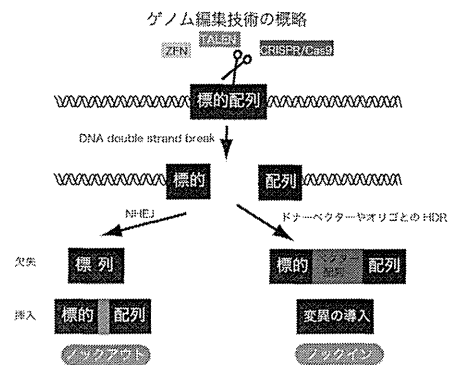
しかし近年、細胞内へトランスフェクションができれば、任意の遺伝子・ゲノム上の部位を自由に改変できるゲノム編集技術が開発されている。Zinc Finger Nuclease (ZFN) 技術、Transcription Activator-Like Effector Nuclease (TALEN) 技術、そして2013年1月に報告されたClustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein (Cas) 技術である。

これらの技術は、任意のDNA配列を認識し、DNA double strand break (DSB) を引き起こす。DSB修復には2つの経路がある。non-homologous end joining (NHEJ) と homology-directed repair (HDR) である。

NHEJは数塩基の欠失・挿入によるノックアウトを引き起こす。一方、HDRはコトランスフェクションするロングオリゴ(150~bp)やコンストラクトとの相同組換えによるノックインを引き起こす。

本研究ではTALENとCRISPR技術を

用いて、マウス骨芽細胞株(MC3T3-E1)にR218C変異をノックインし、CEDの骨芽細胞モデルとする。



## (iii) 新規ゲノム編集技術によるCEDモデルマウスの作製

新規ゲノム編集技術は、培養細胞だけでなくマウスやゼブラフィッシュなどの受精卵内でも、ノックアウト・ノックインを引き起こすことも可能である。

本研究では、*Tgfb1*を認識するguide RNA (gRNA)、DSBを引き起こすCas9 mRNA、変異を導入するR218C変異を含むロングオリゴ(200 bp)を受精卵の細胞質にインジェクションし、受精卵内での相同組換えを利用して、R218C変異をノックインしたCEDモデルマウスを作製する。

新規ゲノム編集技術の利点は、従来のES細胞を利用したgene targeting技術よりも短期間で作成可能であることである。

前述の通りキメラマウスは不妊であり、研究解析にヘテロマウスを供す

ることができなかつた。しかし、受精卵と新規ゲノム編集技術を用いることで、誕生したノックインマウスが不妊であっても、継続的にモデルマウスを研究に供することができる。

#### (倫理面への配慮)

本研究では、患者の変異解析(*TGFB1*の変異解析およびエキソーム解析)、iPS細胞の作製・解析、CEDモデル作製および疫学研究に関して倫理的な配慮が必要とされる。

患者の変異解析に関して、長崎大学のヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を受けている(許可番号:131025267号)。また患者が通院・入院している医療機関でも、倫理委員会の許可を受ける。研究に関する説明書と同意書を、医療機関へ送付し、CEDが疑われる患者およびその家族へのインフォームド・コンセントを行い、書面による同意書を得る。

患者に関する情報は連結可能匿名化し、情報は情報管理者が管理し、検査者(報告者)は知ることができない。

iPS細胞の作製・解析に関しても長崎大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会の承認(承認番号:13042606号)と信州大学医学部・遺伝子解析倫理委員会の承認(承認番号436)を受けている。また、患者iPS細胞作製に

際し、患者が通院／入院している医療機関の倫理委員会の承認を得た上で実施する。患者へのインフォームド・コンセントは文書で行い、文面による同意を得る。患者に関する情報は、連結可能匿名化し、情報管理者のみが管理する。iPS細胞の作製者、解析者(報告者)および細胞バンク関係者が知ることにはできない。

加えて、新規ゲノム編集技術によるモデル作製にあたり、長崎大学の組換えDNA実験に関する承認(承認番号:1312191253号)と動物実験計画の承認(承認番号131214-1)を受けている。

疫学調査においても、旭川医科大学倫理委員会の承認を受けた後に行った。

## C. 研究結果

### (1) CED患者の経過観察

信州大学でフォローしている罹患男性2人、罹患女性2人、非罹患女性1人の0-2歳の成長データ(身長、体重、頭囲)を入手し、成長曲線を作成した。0-2歳において、罹患男性の身長は-2~-1SD程度で推移、体重は-2.5~-1SDで推移した。罹患女性の身長は-1~0.5SDで推移し、体重は-0.5~0SDで推移したが、非罹患女性も身

長・体重ともに-1SD 程度で推移したので、軽度成長障害が疾患特異的とは言えなかった。

旭川医科大学でフォローしている母子例では、母親はプレドニンを不定期に服用しているが、感音性難聴が進行している。これまでの報告通り、ステロイドの服用では、CED の症状の進行を止めることはできない。

その男児(11 歳)はプレドニンの少量療法 (0.1mg/kg/day で10日間連続、続いて隔日投与5回を1クール)を、6歳時より開始しており、年間で5クール程使用している。この療法により改善し、水泳も可能で体育の授業にも参加できる状態に回復している。

弧発例男児(7歳)は筋力低下が著しく、車いすを併用している。痛みも強く活動性に制限が大きいため、プレドニンの少量療法(上記と同じ量)を開始した。十分な効果が見られており、活動性が維持されている。

## (2) アンケートに基づく疫学調査

国内の2531の医療機関(小児科学会認定の522施設と整形外科科認定の2009施設)に調査票ならびに診断の参考資料としてCEDの臨床所見、診断基準および典型例・軽症例のレントゲン所見を同封し発送した。

このうち1410施設から回答があった(回答率55.7%)。『症例あり』との回答があった14施設のみであったが、このうち2施設では各2症例が通院しており、CEDが疑われる患者は計6症例であった。このうち3症例は既に把握している症例で、新規のCED患者は13名であった。この結果、国内の新規CED患者は28.7名、約30名程度であると推測できた。

## (3) CEDが疑われる患者の変異解析

本研究ではこれまでに、新たな2名のCEDが疑われる患者を集積した。

### <患者1>

女性・38歳

神経内科でのミオパチー精査の際、大腿骨遠位の骨幹部に骨透瞭像を認め、骨代謝異常の精査のため内分泌内科を受診。

中学より脆弱性骨折を認め、レントゲン所見上、長管骨の皮質骨肥厚、筋萎縮を認めた。放射線科医と相談し、CEDが疑われるとの結論に至り、長崎大学へ遺伝子検査依頼があった。

### <患者2>

男性・48歳

発症は10歳代前半、経過中に骨痛なし、現在入院中。

主症状は、頸椎脊柱管狭窄で手術後、

頭蓋骨肥厚に伴う視神経／聴神経の狭窄で盲／高度難聴あり。脳槽の狭窄に伴う2次性の三叉神経への血管圧迫（術後）、萎縮精巣／テストステロン低値、全身筋の軽度の脱力（筋は柔らかく萎縮し、皮下脂肪は正常）。高次機能は有為な障害なし。

頭蓋骨、頸椎・椎骨の高度肥厚あり、上肢長管骨の肥厚／増生あり、骨シンチで核種取り込み増加なし、末梢血分画は正常。

両患者のDNAを抽出し、*TGFB1*の変異解析を行った。*TGFB1*の全エクソンとその前後のイントロンおよび非翻訳領域のダイレクトシーケンシングの結果、両患者では、*TGFB1*には変異が同定されなかった。

エクソーム解析を行うにあたり、長崎大学のヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を受けた。文面による説明書と同意書を作成し、担当医に送付しているが、現在、両患者が通院・入院する大学病院での倫理委員会の審査中である。

審査終了後、報告者の所属する長崎大学・人類遺伝学教室で次世代型シーケンサー（HiSeq2500）とAgilent社のSureSelect target enrichment systemを用いたエクソーム解析を行う。

#### (4) 治療法の開発に向けたモデル開発

##### (i) 患者 iPS 細胞の作製

2007年のヒト iPS 細胞の作製技術の確立によって、再生医療ばかりでなく、治療薬の開発、薬効や副作用のテストへの応用も期待されている。

本研究でも、GEDの発症機序の解明と将来的な治療薬の開発を目指して、患者の iPS 細胞の作製に取り組んだ。

作製にあたり長崎大学大学院医歯薬学総合研究科倫理委員会の承認を受けている。

ゲノム解析と同様に、文面による説明書と同意書を作成し、研究分担者（信州大学医学部付属病院・古庄知己准教授）に送付した。信州大学でも倫理委員会の了承を受けた後に、*TGFB1*にR218H変異をもつGED患者から血液を採取し、京都大学 iPS 細胞研究所・増殖分化機構研究部門・戸口田淳也教授のもとへ輸送し、iPS 細胞の作製を行った。これまでに12クローンが樹立され、マーカー遺伝子の発現も確認されている。

先述の *TGFB1* 遺伝子に変異が同定されなかった2名の患者でも iPS 細胞の作製を行う予定である。現在、両患者の通院・入院している大学病院での倫理委員会の了承を待っている。

作製した iPS 細胞は、細胞バンクに寄託するとともに、間葉系幹細胞、骨芽細胞に分化させ研究に用いる。

正常骨芽細胞と比較して、以下の研究を行い、CED の発症機序を明らかにする。

- a. 骨芽細胞の増殖・分化に関わる転写因子、骨基質タンパク質の定量（定量PCRとウエスタンブロットイング）
- b. マイクロアレイによる網羅的な発現解析とパスウェイ解析

#### (ii) マウス骨芽細胞への R218C 変異の導入

新規ゲノム編集技術により、ゲノム上の任意の位置を標的に、ヌクレオチドの挿入・欠失・タグ配列の挿入が可能となった。任意の遺伝子のノックアウトや変異のノックインも可能である。本研究では、この新規技術を用いてマウス骨芽細胞株 (MC3T3-E1) の *Tgfb1* 遺伝子に CED 患者で最も高頻度に同定される R218C 変異を導入した。

新規ゲノム編集技術として、先行して一般化している TALEN 法をまず採用した。

Addgene 社より購入した TALEN モジュール作製キットを用いて、認識配列に結合／切断するモジュールの作製を試みたが、モジュールの作製が上手

くいかなかった。

次に 2013 年に論文が掲載された CRISPR/Cas 法を試みた。標的配列を含む guide RNA (gRNA) と Cas9 タンパク質を同時に発現する PrecisionX Cas9 SmartNuclease system (System Biosciences 社) を購入し、5 つの標的配列に相当する duplex oligo をクローニングした。

#### <標的 1>

sense:

tgtatgagaccacCTCCCTTCTCTCCGCGAGA

antisense:

aaacACTGCGGGAGAGGAAGGGAGgtggtctca

#### <標的 2>

sense:

tgtatgagaccacTCTCCGCGAGACGGAATACA

antisense:

aaacTGTATTCCGTCTGCGGGAGgtggtctca

#### <標的 3>

sense:

tgtatgagaccacCAAAGATAACAACTCCACG

antisense:

aaacCGTGGAGTTTGTATCTTTGgtggtctca

#### <標的 4>

sense:

tgtatgagaccacGGGATCAGCCCCAAACGTCCG

antisense:

aaacCGACGTTTGGGGCTGATCCCgtggtctca

#### <標的 5>

sense:

tgtatgagaccacGCTCACCGTTGATTTCCAGG  
antisense:

aaacCGTGGAAATCAACGGTGAGCgtggtctca  
(大文字はマウス *Tgfb1* 遺伝子のエキソン配列)

MC3T3-E1 をはじめとするマウス細胞株はトランスフェクション効率が極めて悪いので、各セットを MC3T3-E1 細胞にエレクトロポレーションで打ち込み、CRISPR/Cas9 システムが働いているかを Cel-I アッセイでチェックした。

これらのセットのうち、標的セット4が最も効率が高く、ノックイン実験に用いることにした。

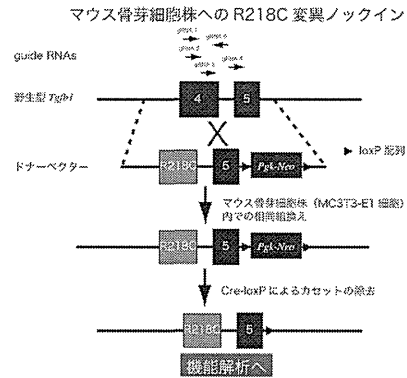
マウスジェノミック DNA を鋳型に、PCR 法で増幅した相同配列を floxed P<sub>gk</sub>-Neo cassette の 5'、3' の両端にクローニングした targeting vector を作製した。制限酵素で直鎖化したベクターと標的セット4をエレクトロポレーションし、300 ng/mL の G418 でセレクションし、34 クロオンを単離した。

これらのクローンは、PCR 法とサザン法により相同組換え体を選択した結果、クローン#9 と#26 が相同組換え体と判断された。

floxed P<sub>gk</sub>-Neo cassette は *Tgfb1* の発現に影響を与える可能性が高いので、Cre 発現ベクターを更にトランスフェクションし、除去している。

今後はこのノックイン細胞を用い

て、機能解析を行う。



### (iii) 新規ゲノム編集技術による GED モデルマウスの作製

これまで報告者は、ES 細胞を用いた gene targeting 法で R218C 変異を持つノックインマウスの作製に取り組んできたが、相同組換え ES 細胞で作製したキメラマウスは全て不妊であった。本研究では、CRISPR/Cas9 system を用いて、マウス受精卵内で相同組換えによる R218C 変異のノックインを行った。

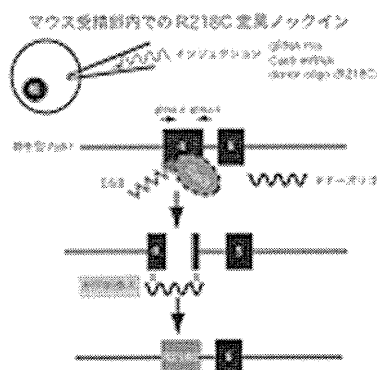
CRISPR/Cas9 system は、2 つのモジュールで挟み込む ZFN や TALEN よりも、gRNA を 1 種類しか使用しないため、特異性が低く off-target が生じやすいといわれている。これを克服し特異性を高めるために、2 種類の gRNA を混ぜて挟み込む形で 2 カ所の DSB を引き起こす方法を採用した。また、マウス受精卵にインジェクションする際には、培養細胞と異なりベクターではなく gRNA と Cas9 mRNA をインジェクションしなければならない。

そこで標的 2 と 5 の *Tgfb1* 特異的配列 (BLAT 検索ではマウスゲノム上に相補的な配列は同定されなかった) を gRNA にするために、System Biosyences 社から購入した T7 gRNA SmartNuclease vector に改めてクローニングし、T7 promoter の制御下で *in vitro* 転写し、実験に用いた。加えて Cas9 cDNA を発現ベクター pcDNA3.1(-) (invitrogen 社) にクローニングし、*in vitro* 転写した。

Agilent 社の Bioanalyzer2100 を用いて、gRNA と Cas9 mRNA のサイズ、濃度および degradation の程度を確認し、インジェクションに用いた。

また、変異を導入した 200 bp のドナーオリゴを Integrated DNA Technologies 社で合成した。

gRNA ミックス 150ng/ $\mu$ L、Cas9 mRNA 300 ng/ $\mu$ L、ドナーオリゴ 300 ng/ $\mu$ L の濃度に調整し、マウス受精卵 360 個に対してインジェクションを行い、仮親に戻した。



インジェクションされた 360 個の受精卵のうち、272 個が 2 cell stage まで進んだ (生存率 75.6%)。生存した胚は、12 匹の仮親に移植した。妊娠・発生は確認されたが、胎生 13 日から次々と流産し、最終的に出産まで至った仮親マウスは 1 匹で、誕生したファウンダーマウスはわずか 1 匹であった。ジェノタイピングの結果、この個体は野生型だった。

#### D. 考察

##### (1) CED 患者の経過観察

R218H 変異をもつ男児と女児の生後の 0-2 歳の成長データ (身長、体重、頭囲) を入手、成長曲線を作成した。その結果、軽度の成長障害が認められたが、CED 特異的なものとはいえなかった。これまでに、発症前の成長データはなく、貴重な知見であると考えられる。今後も経過観察とあわせて、骨代謝の計測も行っていく。

旭川医科大学の症例では、小児に対するプレドニン少量投与は有効であり、日常生活・活動性の向上が確認できた。

ただし、母親の感音性難聴の進行は

止めることができないなど、ステロイドの服用はこれまでに論じられてきたように対症療法である。進行を抑える治療法・治療薬の開発が急務である。

## (2) アンケートに基づく疫学調査

国内の 2531 施設を対象にした調査で、1410 施設から回答があり、新規の CED 患者の報告が 13 症例あった。この結果、国内には 30 症例程度の患者がいると推測される。これまでに把握されている CED 患者 30 症例に加えて、国内には 60 名程度の CED 患者がいると考えられる。

本研究計画の立ち上げ時に、国内の CED 患者は 50 名程度と予測していたが、この予想と非常に近い結果が得られた

## (3) 新規患者の集積とその変異解析

平成 25 年度の本研究の開始以来、国内の 2 大学病院から CED 疑いの患者を集めることができた。

患者 1 (女性・38 歳)

中学より脆弱性骨折を認められたことから、一般的な CED の発症期と一致する。送られてきた X 線画像でも長管骨の顕著な皮質骨肥厚が確認できた。CED が疑われるため、*TGFB1* の変異解析を行ったが、変異は確認されなかった。おそらく CED type II に属す

る病態と考えている。エキソームによる変異解析を予定しているが、患者および家族が同意に躊躇しており、未だに同意が得られていない。今後も説得を続け、解析を行う予定である。

患者 2 (男性・48 歳)

10 歳代前半に発症し、上肢長管骨の肥厚も認められるが、頭蓋骨や頸椎・椎骨の肥厚が、特に顕著である。このため神経の狭窄による難聴・盲が確認された。難聴は CED 患者で観察される症状である。

この患者の特徴は、萎縮精巣／テストステロン低値である。報告者は CED 患者において、このような症例を知らない。このため、別のカテゴリーの疾患である可能性も否定できない。

ただし、報告者が作製してきた R218C 変異をもつキメラマウスは全て不妊で、精子の無形成が起きた。*TGF-β1* は骨芽細胞の増殖を正に調節し、オステオカルシンに代表される骨基質タンパク質の発現を抑制する。オステオカルシンはホルモンとしての機能があり、オステオカルシンノックアウトマウスの雄では、精子の形成が抑制されているとの報告がある。

本患者もエキソーム解析を予定しているが、入院中の大学病院内での倫理委員会の承認をまだ得られていな



い。

#### (4) 治療法の開発に向けたモデル開発

##### (i) 患者 iPS 細胞の作製

GED の責任遺伝子 *TGFB1* の同定から 13 年以上が過ぎたが、その発症機序はまだ不明な点が多い。この原因として患者から採取できる検体は、血液（不死化 B 細胞）と線維芽細胞であり、GED の発症機序に関わる骨芽細胞を入手できないことが挙げられる。2007 年に多能性をもつヒト iPS 細胞が作製可能になったことは、GED の発症機序の解明や治療法の開発の大きな転機になった。本研究でも、GED 患者から血液を採取し、iPS 細胞を樹立させた。

*TGFB1* に R218H 変異をもつ GED 患者の血液を採取した。この患者血液を京都大学 iPS 細胞研究所・増殖分化機構研究部門・戸口田淳也教授のもとで iPS 細胞を樹立した。この患者 iPS 細胞を、骨芽細胞に再分化させ機能解析を行う予定である。

また、先述の新しく集めた GED 疑いの患者からも iPS 細胞を樹立させる予定である。両大学病院の倫理委員会での承認を待っている。

##### (ii) 新規ゲノム改変システムによる実験モデルの開発

TALEN、CRISPR などの新規ゲノム改変技術が一般のラボでも安価に、容易に利用できるようになった。本研究では、まず先行技術である TALEN に取り組んだ。Addgene 社から購入した Golden Gate TALEN and TAL Effector kit 2.0 を用いたが、18 塩基を認識するモジュールの作製はできなかった。原因として、クローニングに使用する制限酵素 *BsaI* が失活しやすいことが挙げられる。

CRISPR は 2013 年に報告された新規技術であり、本年度の夏以降に各社から関連製品の販売が始まった。センス鎖／アンチセンス鎖に対応する合成オリゴを変性・アニーリングさせたものをクローニングするだけで、TALEN に比べて非常に簡便に準備ができる。今後、CRISPR/Cas9 システムを用いたモデル開発とその機能解析を進めていく。

本年度、CRISPR/Cas9 システムを用いたマウス骨芽細胞とマウス受精卵内で、GED 患者で最も高頻度に同定される R218C 変異の導入する遺伝子改変を行った。

マウス骨芽細胞 (MC3T3-E1) には、guide RNA (gRNA) と Cas9 を同時に発現するベクターをトランスフェクションした。一般的にマウス由来細胞はトランスフェクション効率が低いが、マ

ウス骨芽細胞でも、トランスフェクションの効率が低く、変異の導入は難航した。今後は、トランスフェクションの効率を高める方法を再考し、研究を継続する。

マウス受精卵には、T7 プロモーター下で *in vitro* transcription した 2 種類の gRNA と Cas9 mRNA、そして人工合成した 200 bp のロングオリゴを同時にインジェクションした。2 cell stage までは 75%以上の卵が進んだが、仮親に移植後、胎生 13 日目から次々に流産し、最終的には野生型のマウス 1 匹のみが誕生した。

これまでの報告では、*Tgfb1* のノックアウトアレルをホモ接合で持つマウス (-/-) の多くは子宮内で死亡し、誕生した -/- マウスは母乳経路で Tgf- $\beta$ 1 を摂取しながら生存し、離乳後に炎症やネクロシスを伴う wasting syndrome で、死亡することが知られている。

CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子改変で、前述のような劇的な表現系が現れた理由として、

(i) CRISPR/Cas9 システムによるゲノム改変の効率が高すぎる。おそらくは NHEJ による欠失・挿入が高頻度（おそらくは変異ホモ接合で）に起きている。

(ii) (i) の過程で NHEJ が優先さ

れ、ロングオリゴを介した HDR が起りにくく、R218C 変異がノックインされない。

今後は、Caspase の変異体 (Nickase) やロングオリゴではなく PCR 産物などの 2 本鎖 DNA の使用により、R218C ノックインマウスの作製に取り組む。

## E. 結論

希少骨系統疾患 CED の治療法の確立を目指して、本研究を開始した。

1. これまで行われてこなかった出生後からの患者の観察を開始した。生後から 2 歳にかけて CED 特異的な成長障害は認められなかった。また、小児に対するプレドニンの少量投与の有効性も確認できた。

2. アンケートによる疫学調査の結果、新規の CED が疑われる患者 13 名の把握ができ、国内の新規患者が 30 名程度であると推測できた。

3. CED が疑われる国内の 2 患者の *TGFB1* の変異解析を行ったが、変異は同定されなかった。今後は次世代型シーケンサーによる新規遺伝子探索を行う。

4. 治療法の開発に向けたモデルとし

て、(i)患者 iPS 細胞を樹立した。(ii)ゲノム編集技術によるマウス骨芽細胞とノックインマウスの作製を行った。遺伝子改変マウスは全て死亡した。条件を検討し再度取り組む。

今後も本年度から開始した研究を継続・発展させたいと考えている。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Abe S, Miura K, Kinoshita A, Mishima H, Miura S, Yamasaki K, Hasegawa Y, Higashijima A, Jo O, Yoshida A, Kaneuchi M, Yoshiura KI, Masuzaki H. Single human papillomavirus 16 or 52 infection and later cytological findings in Japanese women with NILM or ASC-US. *J. Hum. Genet.* Epub ahead of print.
2. Tsukamoto O, Miura K, Mishima H, Abe S, Kaneuchi M, Higashijima A, Miura S, Kinoshita A, Yoshiura K, Masuzaki H. Identification of endometrioid endometrial carcinoma-associated microRNAs in tissue and plasma. *Gynecol Oncol.* PubMed - in process
3. Miura K, Higashijima A, Miura S, Mishima H, Yamasaki K, Abe S,

Hasegawa Y, Kaneuchi M, Yoshida A, Kinoshita A, Yoshiura KI, Masuzaki H. Predominantly placenta-expressed mRNAs in maternal plasma as predictive markers for twin-twin transfusion syndrome. *Prenat Diagn.* (Epub ahead of print).

4. Hamaguchi D, Miura K, Abe S, Kinoshita A, Miura S, Yamasaki K, Yoshiura K, Masuzaki H. Initial viral load in cases of single human papillomavirus 16 or 52 persistent infection is associated with progression of later cytopathological findings in the uterine cervix. *J Med Virol*, 85: 2093-2100, 2013
5. Abe S, Miura K, Kinoshita A, Mishima H, Miura S, Yamasaki K, Hasegawa Y, Higashijima A, Jo O, Sasaki K, Yoshida A, Yoshiura K, Masuzaki H. Copy number variation of the antimicrobial-gene, defensin beta 4, is associated with susceptibility to cervical cancer. *J Hum Genet.* 58: 250-253, 2013
6. Higashijima A, Miura K, Mishima H, Kinoshita A, Jo O, Abe S, Hasegawa Y, Miura S, Yamasaki K, Yoshida A, Yoshiura K, Masuzaki H. Characterization of placenta-specific microRNAs in fetal growth restriction pregnancy. *Prenat Diagn.* 33: 214-222, 2013
7. Shimizu K, Wakui K, Kosho T

- (corresponding author)**, Okamoto N, Mizuno S, Itomi K, Hattori S, Nishio K, Samura O, Kobayashi Y, Kako Y, Arai T, Oishi T, Kawame H, Narumi Y, Ohashi H, Fukushima Y. Microarray and FISH-based genotype-phenotype analysis of 22 Japanese patients with Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet Part A* (in press).
8. Nishi E, Takamizawa S, Iio K, Yamada Y, Yoshizawa K, Hatata T, Hiroma T, Mizuno S, Kawame H, Fukushima Y, Nakamura T, **Kosho T (corresponding author)**. Surgical intervention for esophageal atresia in patients with trisomy 18. *Am J Med Genet Part A* (Epub ahead of print).
9. **Kosho T (corresponding author)**, Kuniba H, Tanikawa Y, Hashimoto Y, Sakurai H. Natural history and parental experience of children with trisomy 18 based on a questionnaire given to a Japanese trisomy 18 parental support group. *Am J Med Genet Part A* 161A(7): 1531-1542, 2013.
10. **Kosho T (corresponding author)**, Okamoto N, Ohashi H, Tsurusaki Y, Imai Y, Hibi-Ko Y, Kawame H, Homma T, Tanabe S, Kato M, Hiraki Y, Yamagata T, Yano S, Sakazume S, Ishii T, Nagai T, Ohta T, Niikawa N, Mizuno S, Kaname T, Naritomi K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Miyatake S, Mizuguchi T, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. Clinical correlations of mutations affecting six components of the SWI/SNF complex: detailed description of 21 patients and a review of the literature. *Am J Med Genet Part A* 161A(6): 1221-1237, 2013.
11. Tsurusaki Y, **Kosho T (equal contribution, corresponding author)**, Hatasaki K, Narumi Y, Wakui K, Fukushima Y, Doi H, Saitsu H, Miyake N, Matsumoto N. Exome sequencing in a family with an X-linked lethal malformation syndrome: clinical consequences of hemizygous truncating OFD1 mutations in male patients. *Clin Genet* 83(2): 135-144, 2013.
12. Higashimoto K, Jozaki K, **Kosho T**, Matsubara K, Fuke T, Yamada D, Yatsuki H, Maeda T, Ohtsuka Y, Nishioka K, Joh K, Koseki H, Ogata T, Soejima H. A novel de novo point mutation of the OCT-binding site in the IGF2/H19-imprinting control region in a Beckwith-Wiedemann syndrome patient. *Clin Genet* (Epub ahead of print)
13. Sugiura K, Takeichi T, Tanahashi K, Ito Y, **Kosho T**, Saida K, Uhara H, Okuyama R, Akiyama M. Lamellar ichthyosis in a