

SHORT COMMUNICATION

De novo WDR45 mutation in a patient showing clinically Rett syndrome with childhood iron deposition in brain

Chihiro Ohba^{1,2,5}, Shin Nabatame^{3,5}, Yoshitaka Iijima⁴, Kiyomi Nishiyama¹, Yoshinori Tsurusaki¹, Mitsuko Nakashima¹, Noriko Miyake¹, Fumiaki Tanaka², Keiichi Ozono³, Hirotomoto Saito¹ and Naomichi Matsumoto¹

Rett syndrome (RTT) is a neurodevelopmental disorder mostly caused by *MECP2* mutations. We identified a *de novo* *WDR45* mutation, which caused a subtype of neurodegeneration with brain iron accumulation, in a patient showing clinically typical RTT. The mutation (c.830 + 1G > A) led to aberrant splicing in lymphoblastoid cells. Sequential brain magnetic resonance imaging demonstrated that iron deposition in the globus pallidus and the substantia nigra was observed as early as at 11 years of age. Because the patient showed four of the main RTT diagnostic criteria, *WDR45* should be investigated in patients with RTT without *MECP2* mutations.

Journal of Human Genetics (2014) 59, 292–295; doi:10.1038/jhg.2014.18; published online 13 March 2014

Keywords: β -propeller protein-associated neurodegeneration (BPAN); neurodegeneration with brain iron accumulation; Rett syndrome; static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood; *WDR45*

INTRODUCTION

Rett syndrome (RTT) is a neurodevelopmental disorder characterized by regression, loss of acquired purposeful hand skill and language, gait abnormalities and stereotypic hand movements.¹ In typical RTT, *MECP2* mutations can be found in 95–97% of cases, and *CDKL5* and *FOXG1* mutations have been found in atypical RTT.¹ Recently, mutations in *WDR45*, which plays an important role in autophagy, have been identified in a novel subtype of neurodegeneration with brain iron accumulation, called β -propeller protein-associated neurodegeneration (BPAN), which is formerly designated as static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood.^{2–4} BPAN shows an unprogressive course during childhood, sudden-onset severe dystonia-parkinsonism and progressive dementia in adulthood. Characteristic brain magnetic resonance imaging findings include iron deposition in the globus pallidus and substantia nigra, and hyperintensity of the substantia nigra with a central band of hypointensity in T1-weighted images.³ Interestingly, 7 of 23 patients with a *WDR45* mutation showed Rett-like features, suggesting a possible involvement of *WDR45* mutations in RTT.⁵ Here we report a patient with typical RTT possessing a *de novo* *WDR45* mutation.

MATERIALS AND METHODS

A 14-year-old Japanese girl was born to non-consanguineous parents as a first child after an uneventful pregnancy. There was no familial history of neurological diseases. Although her initial development was normal as she controlled her head at 4 months of age, developmental milestones were gradually delayed and she learned to walk at 1 year and 7 months. During infancy, she played with toys and started to talk at ~12 months of age. Her walking developed repetitive atonic episodes and an electroencephalogram showed focal irregular polyspikes and waves, and hence she was diagnosed with epilepsy. She was administered antiepileptic agents and carbamazepine was found to be effective. She gradually lost hand function and verbal communications by 4 years of age, and developed stereotypic hand movements such as continuous rubbing and licking, and dystonia. Although she now walks alone with an ataxic gait, her hand skills have regressed and she cannot talk. She shows hyperventilation, abnormally deep breathing, bruxism during waking periods, hypotonia, peripheral vasomotor disturbance, kyphosis, small cold hands and feet, sudden inappropriate laughing, diminished response to pain and intense eye communication. Sleep disturbance and microcephaly were unobserved. Brain magnetic resonance imaging at 3 and 4 years of age showed no remarkable findings (Figures 1a–d). However, T2-weighted images (WI) revealed mild hypointensity in the globus pallidus and the substantia nigra at 11 years of age (Figures 1e and f). At 14 years, this T2 shortening progressed (Figures 1g and h), and this hypointensity was obvious in T2*WI (Figures 2c

¹Department of Human Genetics, Graduate School of Medicine, Yokohama City University, Yokohama, Japan; ²Department of Clinical Neurology and Stroke Medicine, Yokohama City University, Yokohama, Japan; ³Department of Pediatrics, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan and ⁴Division of Pediatrics, Osaka Developmental Rehabilitation Center, Osaka, Japan

Correspondence: Professor N Matsumoto and Dr H Saito, Department of Human Genetics, Yokohama City University Graduate School of Medicine, 3-9 Fukuura, Kanazawa-ku, Yokohama 236-0004, Japan.

E-mail: naomat@yokohama-cu.ac.jp or hsaito@yokohama-cu.ac.jp

⁵These authors contributed equally as first authors.

Received 13 January 2014; revised 10 February 2014; accepted 18 February 2014; published online 13 March 2014

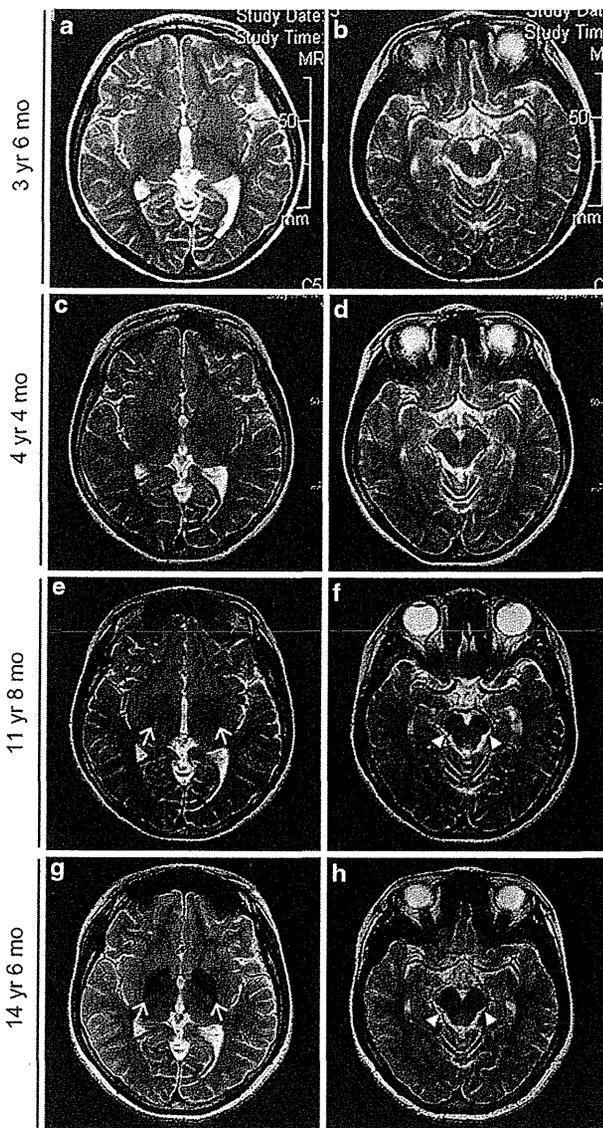


Figure 1 T2-weighted axial images of the patient with a *WDR45* mutation. (a–h) T2-weighted axial images of the patient. ((a, b) at 3 years and 6 months; (c, d) at 4 years and 4 months; (e, f) at 11 years and 8 months; (g, h) at 14 years and 6 months) Brain magnetic resonance imaging (MRI) at 3 and 4 years revealed no remarkable findings in the brain structure, volume and signal intensity (a–d). Mild T2 hypointensity in the globus pallidus (e, arrow) and the substantia nigra (f, arrowhead) was noticed at 11 years of age. At 14 years, T2WI showed strong hypointensity in the globus pallidus (g, arrow) and the substantia nigra (h, arrowhead). mo, months; yr, years.

and d). T1WI showed hyperintensity of the substantia nigra with a weak central band of T1WI hypointensity (Figure 2b). Experimental protocols for genetic analysis were approved by the Institutional Review Board of Yokohama City University School of Medicine. Clinical information and peripheral blood samples were acquired from family members after obtaining written informed consent.

Sanger sequencing

MECP2 mutation was sequenced by Sanger method. Parental samples were also sequenced with respect to identified variants.

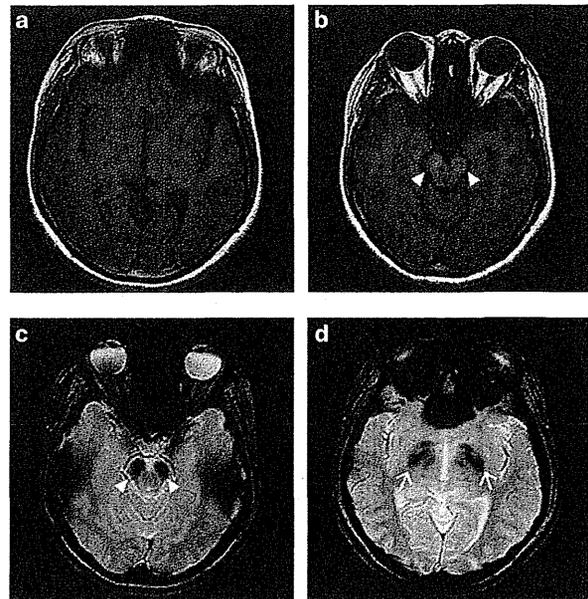


Figure 2 Brain magnetic resonance imaging (MRI) of the patient at 14 years of age. T1-weighted (a, b), and T2*-weighted (c, d) axial images of the patient at 14 years and 6 months of age. T1-weighted images show normal findings in the globus pallidus (a), but hyperintensity of the substantia nigra with a weak central band of T1WI hypointensity (b, arrowhead). T2*-weighted images show strong hypointensity in the substantia nigra (c, arrowhead) and the globus pallidus (d, arrow).

Whole exome sequencing

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes using QuickGene 610L (Wako, Osaka, Japan), captured using the SureSelect Human All Exon v4 Kit (51 Mb; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) and sequenced on an Illumina HiSeq2000 (Illumina, San Diego, CA, USA) with 101 bp paired-end reads. Four samples were run in one lane of the flow cell. Exome data processing, variant calling and variant annotation were performed as previously described.⁴ The *WDR45* mutation was confirmed by Sanger sequencing.

Reverse transcriptase-PCR

Lymphoblastoid cell lines were established from the patient. Reverse transcriptase-PCR using total RNA extracted from lymphoblastoid cell lines was performed as previously described.⁶ Briefly, total RNA was extracted using the RNeasy Plus Mini kit (Qiagen, Tokyo, Japan), and 4 µg subjected to reverse transcription. For PCR, 2 µl of complementary DNA was used with primer ex8-9-F spanning exons 8 and 9 (5'-GTGGACCTGGCGAGCACAAAG-3') and primer ex11-12-R spanning exons 11 and 12 (5'-AACTCTGTCATTGCCATCTGCGTAG-3'). The PCR reaction consisted of five cycles of 98 °C for 10 s, 72 °C for 30 s, five cycles of 98 °C for 10 s, 70 °C for 30 s, five cycles of 98 °C for 10 s, 68 °C for 30 s and 30 cycles of 98 °C for 10 s, 66 °C for 30 s. PCR products were electrophoresed on a 10% polyacrylamide gel and sequenced. PCR products were purified using the QIAEXII Gel extraction kit (Qiagen).

RESULTS AND DISCUSSION

We detected c.602C>T (p.S1a201Val) mutation of *MECP2* in the patient by Sanger sequencing. However, we consider this mutation was not pathogenic because the mutation was inherited from her healthy mother. The mutation was also found in 3 males and 8 females of our 574 in-house control exomes (281 males and 293 females). By whole exome sequencing, we

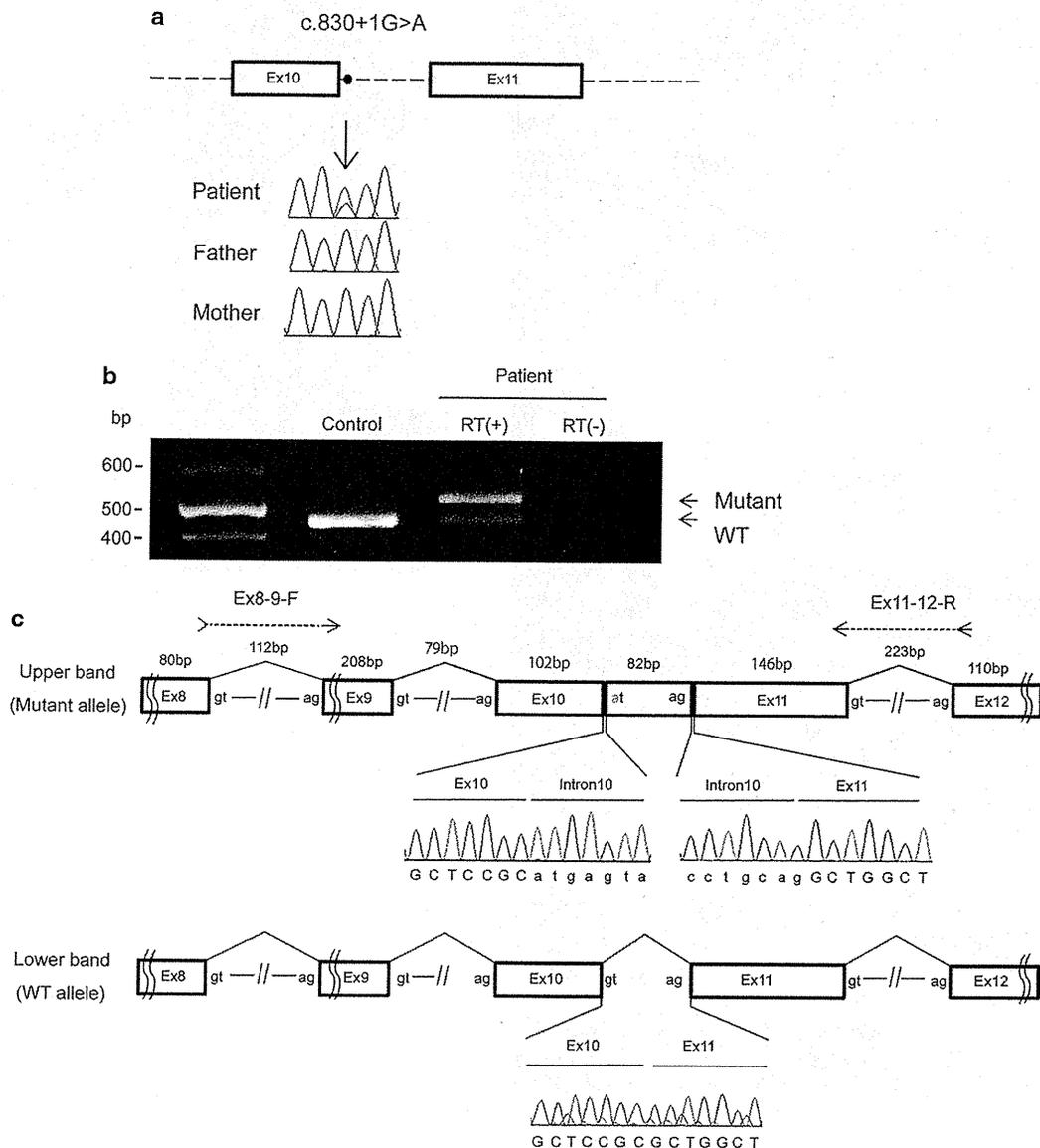


Figure 3 Mutation leading to aberrant splicing in the patient's lymphoblastoid cell lines. (a) Location of the *WDR45* mutation. A splice donor site mutation (c.830+1G>A) in the patient, which was absent from her parents, was confirmed by Sanger sequencing. (b) Reverse transcriptase (RT)-PCR analysis using lymphoblastoid cell lines derived from the patient and a control. A single band (472 bp), corresponding to the wild-type allele, was amplified using a control complementary DNA (cDNA) template. A longer aberrant band was detected from the patient's cDNA. (c) Schematic representation of the wild-type and mutant transcripts determined by sequencing PCR products, and primers used for the analysis. The upper band (551 bp) has a 82-bp insertion of the entire intron 10 sequence, leading to a frameshift. A full color version of this figure is available at the *Journal of Human Genetics* journal online.

identified a splice donor site mutation (c.830+1G>A) in the *WDR45* gene, which is absent from the proband's parents, indicating that the mutation occurred *de novo* (Figure 3a). The mutation was absent in the 6500 exomes sequenced by the National Heart, Lung, and Blood Institute exome project and our 574 in-house control exomes. Reverse transcriptase-PCR and sequencing revealed aberrant splicing in which 82 bp intronic sequences were retained by the use of a cryptic splice donor site within intron 10, generating a premature stop codon (p.Leu278*) (Figures 3b and c).

Although the brain magnetic resonance imaging at 11 years of age showed iron deposition in the globus pallidus and the

substantia nigra, clinical features showed no aggravation at this time. Thus, there is no correlation between iron deposition and clinical phenotype. The fact that iron deposition preceded neurological decline is important information for elucidating BPAN pathogenesis that is caused by autophagy impairment.

The patient showed regression and stabilization, and fulfilled four of the main revised RTT diagnostic criteria,¹ indicating that she clinically showed typical RTT. In autopsied RTT brains, tyrosine hydroxylase activity is reduced in the substantia nigra, and may cause hypofunction of the nigrostriatal dopamine neurons involved in modulating posture and locomotion.⁷ Dystonia and parkinsonism are also seen in older RTT patients as well as BPAN.⁸

Therefore, substantia nigra dysfunction might be involved in both RTT and BPAN, facilitating our understanding of the pathomechanism of RTT caused by *MECP2* mutations. We recommend that *WDR45* should be checked in RTT patients without *MECP2* mutation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the patient's family for their participation in this study. We also thank Nobuko Watanabe for her technical assistance. This work was supported by the Ministry of Health, Labour, and Welfare of Japan; the Japan Society for the Promotion of Science (a Grant-in-Aid for Scientific Research (B) from (25293085, 25293235), a Grant-in-Aid for Scientific Research (A) (13313587)); the Takeda Science Foundation; the fund for Creation of Innovation Centers for Advanced Interdisciplinary Research Areas Program in the Project for Developing Innovation Systems; the Strategic Research Program for Brain Sciences (11105137); and a Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas (Transcription Cycle) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan (12024421).

- 1 Neul, J. L., Kaufmann, W. E., Glaze, D. G., Christodoulou, J., Clarke, A. J., Bahi-Buisson, N. *et al.* Rett syndrome: revised diagnostic criteria and nomenclature. *Ann. Neurol.* **68**, 944–950 (2010).
- 2 Haack, T. B., Hogarth, P., Kruer, M. C., Gregory, A., Wieland, T., Schwarzmayr, T. *et al.* Exome sequencing reveals *de novo* *WDR45* mutations causing a phenotypically distinct, X-linked dominant form of NBIA. *Am. J. Hum. Genet.* **91**, 1144–1149 (2012).
- 3 Kruer, M. C., Boddaert, N., Schneider, S. A., Houlden, H., Bhatia, K. P., Gregory, A. *et al.* Neuroimaging features of neurodegeneration with brain iron accumulation. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **33**, 407–414 (2012).
- 4 Saitsu, H., Nishimura, T., Muramatsu, K., Kodera, H., Kumada, S., Sugai, K. *et al.* *De novo* mutations in the autophagy gene *WDR45* cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood. *Nat. Genet.* **45**, 445–449, 449e441 (2013).
- 5 Hayflick, S. J., Kruer, M. C., Gregory, A., Haack, T. B., Kurian, M. A., Houlden, H. H. *et al.* beta-Propeller protein-associated neurodegeneration: a new X-linked dominant disorder with brain iron accumulation. *Brain* **136**, 1708–1717 (2013).
- 6 Saitsu, H., Kato, M., Mizuguchi, T., Hamada, K., Osaka, H., Tohyama, J. *et al.* *De novo* mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat. Genet.* **40**, 782–788 (2008).
- 7 Segawa, M. Early motor disturbances in Rett syndrome and its pathophysiological importance. *Brain. Dev.* **27** (Suppl 1), S54–S58 (2005).
- 8 FitzGerald, P. M., Jankovic, J., Glaze, D. G., Schultz, R. & Percy, A. K. Extrapyramidal involvement in Rett's syndrome. *Neurology* **40**, 293–295 (1990).

④ 新しいゲノム編集技術(TALEN および CRISPR/Cas9 システム)とその可能性

□—はじめに

神経細胞の発生過程と回路網の形成メカニズム、さらには損傷時の修復過程を知ることは、基礎生物学の発展のみならず再生医療・臨床応用へとつながる重要な課題である。しかしながら脳は生体内で最も複雑な臓器であり、その詳細を明らかにするには優れた技術が必要となる。ノックアウトマウスをはじめとする遺伝子改変技術はこれまで脳神経科学に大きな発展をもたらしてきたが、マウス以外の生物種においては必ずしも容易ではなかった。特に新たな実験モデルとして、ヒト人工多能性幹細胞(induced pluripotent stem cell: iPS細胞)あるいはマームセットなどの中・大型動物種が登場するに至り、これらのターゲティングを可能にする何らかの技術革新が求められていた。

近年、多様な生物/細胞種における標的遺伝子の改変を可能にする技術として、zinc finger nuclease(ZFN) および TALE nuclease(TALEN)、さらには CRISPR/Cas9 システムが次々と開発され、これらは総称して「ゲノム編集技術」とよばれている。この技術は Nature Methods 誌「Method of the Year 2011」、Science 誌「Top 10 Breakthroughs of 2012/2013」と、革新的技術の一つとして毎年のように選ばれ、大きな注目を集めている。なによりもこの技術が評価されるべき点は、その高い効率性に加えて、「だれでもはじめることができる」という簡便さにある。

本稿では、この新しいツールでありながら急速に進歩し続けているゲノム編集技術について概説し、その応用と注意点について紹介したい。

1 ゲノム編集の基本原則

従来の遺伝子ターゲティングは、ES細胞において自然に、ランダムに起こる DNA の相同組換えを利用している。そのため生殖系列に寄与できるような ES細胞が樹立されていない、あるいは相同組換え頻度が極端に低い細胞/動物種では、この技術を用いることができず、またその効率も極めて低い。これに対しゲノム編集技術では「ゲノム上の特定の領域を狙って DNA 二本鎖切断(double strand break: DSB)を引き起こし、その位置で特異的に起こる DNA 修復メカニズムを利用して遺伝子改変を行う」ことを基本原則としている(図1)。DSBはゲノム不安定性や発がん、細胞死などにつながる重篤な損傷であるため、その部位に非相同末端結合(non-homologous end joining: NHEJ)あるいは相同組換え修復(homology-directed repair: HDR)とよばれる修復機構が活発に引き起こされる。非相同末端結合とは、切断されたゲノムの末端同士が配列欠失を伴ったまま結合する反応であり、この反応を利用することによって目的の遺伝子配列内に数~数十塩基対の欠失や挿入を誘導することができる。一方、相同組換え修復とは、姉妹染色体の相同領域を鋳型として組換えを起こすことで切断部位を元どおりに修復しようとする反応であり、相同配列をもつターゲティングベクターを導入しておくことで標的部位への外来遺伝子の挿入が可能となる。惹起されるこれらの作用は強く、以下に述べる ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9 のいずれであれ切断効率の高いものさえ合成できれば、これまで困難であった細胞種において単一遺伝子改変はもち

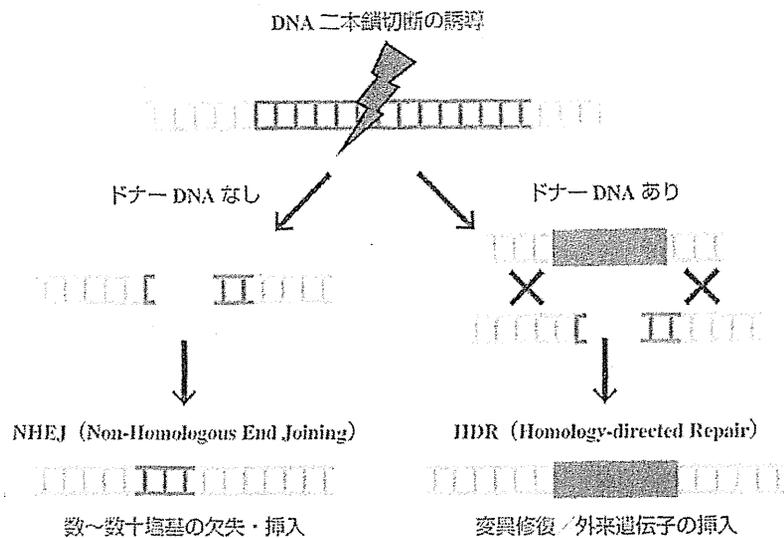


図2 ゲノム編集技術のメカニズム

ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9を細胞内に導入すると、DNA結合部位がゲノム上の標的部を認識し、その部位でDSBを起こす。ドナーDNAが存在しなければNHEJによる塩基欠失・挿入が起こり、相同領域をもったドナーDNAの存在下ではHDRによる変異修復あるいは外来遺伝子の挿入が可能となる。

ろん、複数の遺伝子あるいは同一遺伝子の両方のアレルへの改変が、いずれもワンステップで行えるなどすばらしい効果が期待できる。

2 三つのゲノム編集技術

配列特異的なDSBを効率よく引き起こす試みとして最初に開発され、大きなインパクトを与えたのがZFNである¹⁾。しかし作製に多大な労力と経験が必要であったこと、市販のZFNが高額であったことなどから大きな広がりは見られず、ごく一部の研究者に使われるにとどまった。代わって開発されたTALENは、基本的なキットさえ手に入ればだれにでも簡便に合成可能な系が確立され、またたく間に広まった。このTALENの登場によってゲノム編集技術ははじめて市民権を得るに至ったといえよう。

ZFNとTALENはいずれも、配列特異的に結合する「DNA結合ドメイン」と、タイプIIs制限酵素FokI由来の非特異的「DNA切断ドメイン」をつなぎ合わせたキメラ蛋白からなり、「人工ヌクレアーゼ」とよばれる。ゲノム上の近接する二つの標的配列を認識する人工ヌクレアーゼ1組を導入すると、近づいたFokIが二量体を形成することによって切断活性をもち、ゲノム上にDSBを引き起こす。ZFNとTALENのDNA切断ドメインは共通であり、両者の違いはDNA結合ドメインにある。

1) Zinc Finger Nuclease (ZFN)

ZFNのDNA結合ドメインは、C₂H₂型 zinc finger モジュールが3〜6個つなぎ合わされたものである(図2)。Zinc finger モジュール1個がDNA配列の3塩基対を認識するが、並べた zinc finger モジュールは相互に強く影響し合うため、標的配列から想定されるモジュールを単純に並べるだけでは十分な活性は得られない。3個の zinc finger をランダムにつなぎ合わせた zinc finger アレイ・ライブラリーの中から最適な組み合わせをバクテリア・ツーハイブリッド法によってセレクションする方法(OPEN法)なども開発されたが、要した時間と労力(そして研究費)に見合うような十分な効果はみられなかった。

2) TALE Nuclease (TALEN)

大きな期待と注目を集めながら、ZFNが一部のコアユーザーによる利用にとどまるなか、新しいタイプの人工ヌクレアーゼとしてTALENが発表された²⁾。植物病原細菌であるキサントモナス属細菌は自身の転写活性因子様蛋白質(Transcription Activator-like Effector: TALEs)を植物細胞内へ注入し、これが宿主のDNAに結合してその遺伝子制御を変えることによって攻撃する。このTALEsのDNA結合ドメインを利用し、ZFNと同様にFokIの非特異的切断ドメインをつなぎ合わせたものがTALENである(図3)。

TALENの利点の一つは、標的配列に対応する

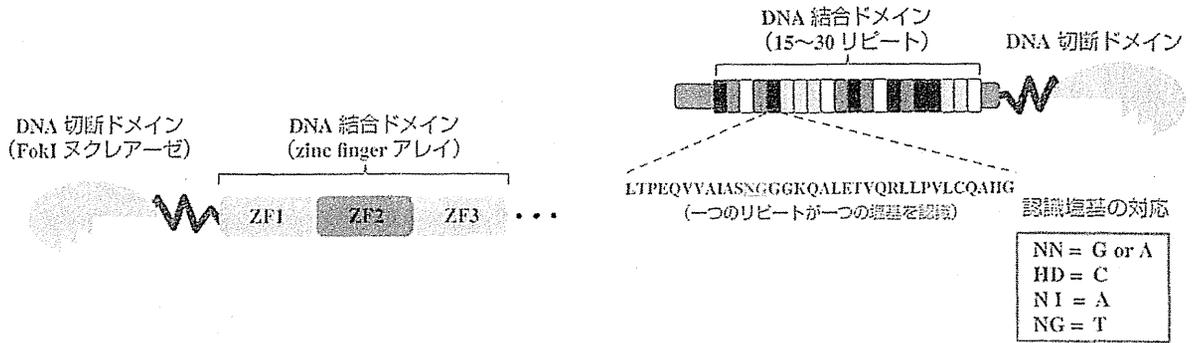


図2 Zinc finger nuclease (ZFN)

ZFNは制限酵素FokIの非特異的切断部位にリンカーを介してzinc finger3~6個(図中では3個)つながったもので構成される。DNA切断ドメインがDSBを起こすには二量体を形成しなくてはならず、そのため標的部位において左右一組のZFNを導入する必要がある。

TALE配列をほぼ1対1で決めることができ、デザインが容易であることである。またこの技術が大きく広まった最大の理由は、初心者でも自作可能なTALEN作製用の基本キットが開発され、Addgene(<http://www.addgene.org/>)から安価に入手できる点にある。現在すでに開発されているTALEN作製キットは複数あるが、そのなかでも特筆すべきは'Golden Gate TALEN and TALE Effector Kit 2.0'であろう。わずかな時間と労力で、ほんの数日のうちに目的のTALENを作製できるという優れたキットである³¹。使用する細胞とベクターとの組み合わせによっては切断効率/特異性などが大きく変化するため、バックボーンベクターの選択に注意が必要である。すでに様々な付属プラスミドがAddgeneから提供されており、自分の細胞系や用いたいFokIのタイプに応じて最適なセットを選ぶことができる。

広島大学の佐久間・山本らは、TALENのDNA結合モジュール内に改変を加えることでさらに改変効率の高いTALEN作製キット(Platinum Gate TALEN Kit: Addgene #1000000043)を開発した³²。作製の容易さはこれまでどおり、しかしその活性は数倍以上という優れたもので、従来のTALENではうまくいかなかったようなゲノム編集がこの系を用いると見事に成功した、という事例をすでに多く経験している。これからTALENを導入しようと考えてい

図3 TALE nuclease (TALEN)

TALENは、FokI非特異的切断部位とTALE effectorsのDNA結合ドメイン(15~30リピート)を連結したものである。各リピートは通常34個のアミノ酸配列からなり、12, 13位の残基配列の組み合わせにより、各リピートにつき一つの塩基が認識される(例として図中のリピートはTを認識する)。

る方には特におすすめである。

3) CRISPR/Cas9 システム

TALENが注目を集めるなかで、さらに次世代の技術として開発されたものがCRISPR/Cas9システムである。細菌や古細菌の一部にみられる獲得免疫機構の一つを応用したもので、TALENよりもさらに迅速かつ簡便にゲノム編集が可能となった^{5, 7}。これらの細菌はCRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)とよばれる24~48 bpの短い反復クラスターと、その近傍にCas(CRISPR-associated) genesという遺伝子群をもっている。まず外部から侵入したウイルスなどの外来性DNAは、Cas蛋白の一つによって断片化され、CRISPR座位に挿入される。これらの挿入配列は免疫的な記憶となり、再感染時には挿入配列を含んだcrRNA(CRISPR RNA)とtracrRNA(trans-activating crRNA)という二つの小分子RNAが生成される。このcrRNA/tracrRNAは侵入してきた外来DNAを配列特異的に認識するガイド役となり、Cas9ヌクレアーゼを誘導することで標的配列を切断・除去する。

ゲノム編集に用いられるCRISPR/Cas9システムでは、crRNAとtracrRNAをキメラとしたsgRNA(single guide RNA)が標的を認識し、Cas9ヌクレアーゼがDSBを行うことになる(図

4). TALEN と同様、すでに多くの発現ベクターが Addgene に寄託されているが、特に多く使用されているのは pX330(pX330-U6-Chimeric-BB-CBh-hSpCas9; Addgene #42230)であろう。このベクターには sgRNA と Cas9 の両方の発現カセットが搭載されているため、「標的配列 20塩基を含む合成オリゴヌクレオチドをオーダーし、それを pX330 ベクターに挿入する」。ただそれだけで目的の CRISPR/Cas9 ができあがってしまうことになる。標的配列の設定から目的のクローンを得るのに 3 日しかかからない、しかも準備に必要なマテリアルはベクタープラスミド一つだけ、という驚くべき簡便さである⁸⁾。わずかに制限があるとすれば、Cas9 が標的配列を切断するには PAM(proto-spacer adjacent motif)配列とよばれる特定の短い配列が必要であるため、標的配列を選択する際に留意しなくてはならないという点であろうか。たとえば現在広く用いられている化膿連鎖球菌由来の Cas9 を用いる場合には、5'-NGG-3' という配列のすぐ上流の 20bp を選ぶ必要がある。しかしこの技術の圧倒的な利点の前にはそれほど大きな制約ともいえないし、今後の改変によってはこのような制限もなくなるかもしれない。

3 ゲノム編集技術の留意点

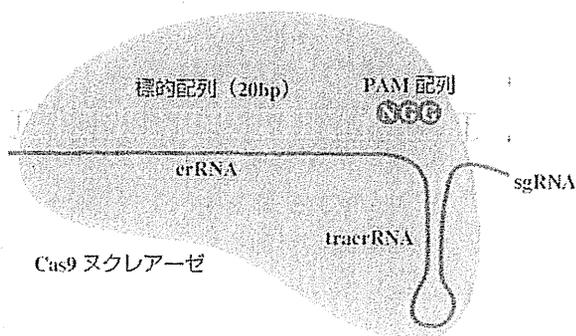


図4 CRISPR/Cas9 システム

CRISPR/Cas9 システムは、sgRNA(crRNA と tracrRNA のキメラ)と Cas9 スクレアーゼとからなる。PAM 配列直前の 20bp を認識する sgRNA が Cas9 タンパクと複合体を形成し、DSB を起こす。

1) オフターゲット作用

ゲノム編集を用いるときに大きな注意が必要なのは、非特異的切断の可能性についてであり、これをオフターゲット作用とよぶ。このような想定外のゲノム切断は遺伝子機能解析を困難にするばかりか、細胞あるいは個体の死を引き起こす場合すらある。マウスならば戻し交配を繰り返すことによって修復可能であるが、培養細胞系では重大な問題となろう。したがってオフターゲット作用を回避するために、あらかじめゲノム内に類似した部位がない特異性の高い配列をターゲットとして選ぶことが大切である。そのほかには、異なる FokI ドメインによってのみ二量体が形成される‘ヘテロダイマー型ヌクレアーゼ’を TALEN に用いたり⁹⁾、標的部位に DSB でなく一本鎖だけの切断(ニック)を引き起こす‘double nickase’を用いる方法も報告されている^{10,11)}。

2) ツールの選択；TALEN か CRISPR/Cas9 か？

では実際にはじめて使用する場合、どのゲノム編集ツールを選ぶべきだろうか。ZFN は多くの実績があり、市販されているもののなかには確かな活性が保証されているものもある。したがって費用の点で問題なければ、このような市販品を購入するのもよいだろう。しかし今後研究室で自作する予定であれば、いま ZFN を選択するメリットは見出しがたい。

自作の簡便さを第一とするならば、CRISPR/Cas9 システムにまさるものはない。また複数の部位を同時に改変したい場合も、やはり CRISPR/Cas9 に一日の長があるように思われる。ただしこのシステムでは(double nickase を用いない限り)ゲノム認識配列が 20bp と短いため、ペア一組で使用する TALEN と比較するとオフターゲット作用が起こる危険性が高い。

切断効率については ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9 のあいだに大きな差はない。ただし Platinum Gate TALEN は別格で、これらの数倍の効率を期待できるであろう。こちらもたかだか 5 日間で合成可能な優れたキットであり、その高い効率を考えると CRISPR/Cas9 システムにま

さるとも劣らない。

もし複数遺伝子の同時ノックアウトが必要であったり、オフターゲットが発生しても戻し交配などで修正可能な場合などは、とりあえず CRISPR/Cas9 の系を立ち上げればよいだろう。しかし CRISPR/Cas9 で改変がうまくいかない遺伝子の場合や、将来的にゲノム編集技術を本格的に使っていきたいと考えているならば、Platinum Gate TALEN を alternative な方法としてっておくと非常に心強いし、オフターゲットについて考慮しても安心感がある。CRISPR/Cas9 と Platinum TALEN はどちらか片方を選ぶべきものではなく、その両方を備えておいて用途に応じて使い分けるべきであろう。

4 ゲノム編集技術の応用

1) ノックアウトマウス作製への応用

ゲノム編集技術は、テクノロジーとしてはすでに十分確立していたはずのノックアウトマウスの作製にも大きな影響を及ぼしつつある。従来の作製法では、ターゲティングコンストラクトの作製(数か月)、ES 細胞でのスクリーニング(1か月)、胚盤胞への注入とキメラ作製(1か月)、野生型との交配による生殖系列への寄与の確認(6か月)、兄妹交配によるホモ化(6か月)、さらに C57BL/6 系統への戻し交配(2年)、と最低でも数年の年月が必要であった。挙げ句の果てに表現型がみられず、最終学年になって途方に暮れる大学院生もみられたものである。

しかし現在では、マウス受精卵の細胞質へ TALEN あるいは CRISPR/Cas9 プラスミドをそのまま注入すれば、3週間後には F0 世代が生まれ、非常に高い確率で変異マウスが得られる。しかもある一定の確率で両アレルでの変異導入が認められ、驚くべきことに F0 世代で早くもホモ欠損マウスを得ることができてしまうのである。CRISPR/Cas9 システムと C57BL/6 マウス受精卵の組み合わせで行ったとすれば、合成オリゴヌクレオチドをオーダーしてから最短で1か月以内に、'C57BL/6 系統のホモ欠損マウス' が得られてしまうのである。同時に二か所・三か所の遺伝

子破壊すら可能であり¹²⁾、'夢のような'という形容詞こそふさわしい。

2) ヒト iPS 細胞への応用

ヒト ES/iPS 細胞においてもゲノム編集は威力を発揮する。Puromycin / neomycin などの薬剤選択マーカーを用いた場合、ピックアップしたコロニーの8割以上で標的部位への正確な遺伝子挿入が認められ、しかも2~3割で両アレルへの挿入がみられる。また Platinum Gate TALEN のように活性の高いものを利用すれば、薬剤選択を経ずに NHEJ による数塩基欠失株を得ることも可能である。われわれの研究室では遺伝子ノックアウトはもちろん、数塩基欠失モデルの作製、20kb の外来遺伝子の挿入、染色体そのものの欠失、同一染色体上での5Mbの領域欠失など、多彩なゲノム/染色体改変に成功しており、このツールを用いることでヒト疾患の病態解析が大きく進むであろうということを強く感じている。

5 今後の展望

ゲノム編集技術は短期間に大幅な技術開発がなされ、多くの動物種でノックアウトモデルが樹立された。なかでも行動実験や薬理・生理学実験におけるデータが豊富に蓄積されているラットでの遺伝子改変が可能になったことや^{13,14)}、マーマセツトなど非ヒト霊長類でのノックアウト作製が進みつつあることなどから、今後ヒト神経疾患の病態解析・再生医療、高次脳機能解析、創薬研究などへと広く利用されていくだろう。またスクリーニングとしての機能にとどまらず、異なる生理活性ドメインや蛍光分子などをつなぐ技術も報告され^{10,15,16)}、さらに革新的な応用法が出現すると期待されており、注目に値する。

(北島康司)

◎文献

- 1) Le Provost F. et al. : Trends Biotechnol 28 : 134-141, 2010
- 2) Christian M. et al. : Genetics 186 : 757-761, 2010
- 3) Cermak T. et al. : Nucleic Acids Res 39 : e82, 2011
- 4) Sakuma T. et al. : Sci. Rep 3 : 3379, 2013
- 5) Cong L. et al. : Science 339 : 819-823, 2013

- 6) Mali P, et al. : *Science* 339 : 823-826, 2013
- 7) Jinek M, et al. : *Science* 337 : 816-821, 2012
- 8) Ran FA, et al. : *Nat. Protoc* 8 : 2281-2308, 2013
- 9) Doyon Y, et al. : *Nature methods* 8 : 74-79, 2011
- 10) Mali P, et al. : *Nat. Biotechnol* 31 : 833-838, 2013
- 11) Ran FA, et al. : *Cell* 154 : 1380-1389, 2013
- 12) Wang H, et al. : *Cell* 153 : 910-918, 2013
- 13) Geurts AM, et al. : *Science* 325 : 433, 2009
- 14) Mashimo T, et al. : *Sci. Rep* 3 : 1253, 2013
- 15) Chen B, et al. : *Cell* 155 : 1479-1491, 2013
- 16) Miyanari Y, et al. : *Nat. Struct. Mol. Biol* 20 : 1321-1324, 2013

日本遺伝カウンセリング学会誌
第35巻3号 2014年10月

いまさら聞けない iPS 細胞 なにができてなにが問題なのか

北島康司

いまさら聞けない iPS 細胞 なにができてなにが問題なのか

北畠康司

What is an induced pluripotent stem cell? What to expect and what not to, yet

Yasuji Kitabatake

【要旨】

臨床的に遺伝を扱う者にとって、遺伝子が生物に果たす重要性は十分心得ている事柄であったが、たった数個の遺伝子が体細胞を受精卵のごとき初期状態にまで戻してしまうとは、まさかだれも想像していなかったろう。

人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の発明により、患者とまったく同じ遺伝子構成をもつ幹細胞を容易に作り出すことができるようになった。この iPS 細胞から神経や心筋細胞、網膜組織などさまざまな体細胞・臓器を作り出すことが可能であり、まだ原因の分かっていない難病の病態研究や再生医療への応用が期待されている。疾患特異的 iPS 細胞のバンク事業に加え、9 月にはすでに最初の臨床応用が行われるなど一般社会の関心も高い。今後、難治性疾患患者からの検体の提供、iPS 細胞をもちいた再生医療に関する問い合わせも出てくると予想され、その基礎的知識と臨床応用に関する最新の動向を知っておくことが必要になるとと思われる。

キーワード：幹細胞研究 stem cell research, 人工多能性幹細胞 induced pluripotent stem cells: iPS cells, ダウン症候群 Down syndrome, 染色体異常 chromosomal abnormality, 再生医療 regenerative medicine

はじめに

人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells: iPS 細胞) の発明は、幹細胞研究のみならず生物学全体

大阪大学大学院医学系研究科小児科学教室
Department of Pediatrics, Osaka University Graduate School of Medicine
科学技術振興機構さきがけ 'iPS 細胞と生命機能' 領域
Precursory Research for Embryonic Science and Technology (PRESTO), Japan Science and Technology Agency

平成 26 年 8 月 15 日受付
平成 26 年 9 月 29 日受理

に大きな衝撃をもたらした¹⁾²⁾。純粋な基礎生物学的興味もさることながら、簡便な技術によって患者個人とまったく同じ遺伝子構成をもつ幹細胞を得ることができ、またその分化誘導によってこれまで生体からの採取が不可能であった神経・心臓・膵臓など各臓器の細胞を得ることができるという特性は、この技術が新しい医療の重要なツールとなりえるという期待をもたせるのに十分であった。

2007 年に初めてヒトでの樹立が発表されて以降、iPS 細胞研究はめざましい勢いで進められている。初期化メカニズムの解明と樹立効率の改善に加え、生体への移植を想定した安全性の向上についても大きな進捗が見られ

る。難治性疾患の病態解明はむしろのこと、細胞移植による再生医療やiPS細胞をもちいた輸血製剤の作製、iPS細胞バンク事業の開始など、いずれも臨床応用を見据えたオールジャパン体制での取り組みが行われている。

iPS細胞の最初の臨床応用がここ数年のうちに進むようとしており、これまで基礎研究とは無関係であった臨床関係者にとっても他人事は言えなくなりつつある一方で、その進捗があまりに早いためにiPS細胞のなにが期待され、具体的にどのようなことが行われようとしているのか、またどのような問題点が残っているのかなど、実際に研究に携わっていないと分かりにくい点も多い。そこで本稿では、まずiPS細胞とはなにかについて概説し、その研究の現状と今後の展望、とくに臨床応用の可能性について、ふだん基礎生物研究になじみのない方を念頭に置いて分かりやすく記してみたい。

1. iPS細胞とは

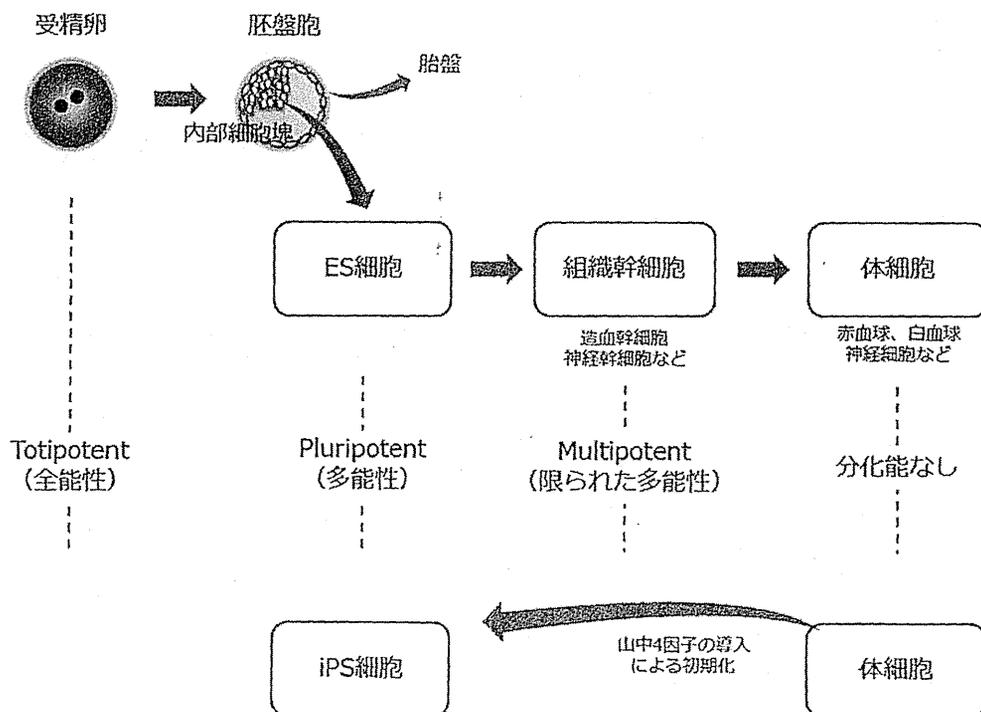
「人工多能性幹細胞, induced pluripotent stem cell」という言葉にはさまざまな意味が包含されている。まず‘幹細胞’の定義は、「分裂して自分と同じ細胞を作る能力(自

己複製能)」と、「別の種類の細胞に分化する能力(分化能)」の2つの能力を有する細胞を指す。たとえば皮膚の表皮の細胞は血球細胞に変化しないし、 β 細胞が心筋細胞となって拍動することはない。また成熟した神経細胞や心筋細胞はそれ以上増殖することもない。

では‘多能性’とはなにを意味するのだろうか。「iPS細胞はES細胞のようなもの」という言葉を聞いたことがあるかもしれない。受精卵から発生段階がやや進んで形成された胚盤胞の中には、内部細胞塊と呼ばれる細胞群が見られる。この内部細胞塊が将来的に胎児となるのだが、この細胞塊を取り出して培養細胞として樹立したものが‘胚性幹細胞, すなわちES細胞(embryonic stem cell)’である。このES細胞は胎児の身体を構成するすべての種類の細胞となりえるため、きわめて高い分化能をもつと言える。この特性を多能性(pluripotency)と言う。iPS細胞は、このES細胞と同じ多能性をもっており、両者とも適切な分化誘導法を行うことによって、(理論上)身体の中の細胞にもなることが可能である(図1)。

ではES細胞とiPS細胞の違いはなんだろうか。ES細胞

図1 ES細胞とiPS細胞, 組織幹細胞の分化能について



受精卵の発生が進むと胚盤胞と呼ばれる段階になり、そのうちの内部細胞塊が将来的に胎児を形成し、それを取り巻く細胞(栄養膜細胞)は着床後、胎盤を形成する。この内部細胞塊を取り出して培養した細胞がES細胞である。発生が進むと組織幹細胞と呼ばれる限られた分化能(multipotent)をもつ細胞が生まれるが、これを組織幹細胞という。そして最終的に体細胞は分化能を失う。iPS細胞はこの体細胞から人工的に作り出した多能性幹細胞であり、その分化能はES細胞にほぼ近い。ただしES細胞もiPS細胞も胎盤になる能力は失っているため全能性(totipotent)であるとはいえない。

胞は身体のすべての細胞になりえるため、再生医療のリソースとして大きな期待を集めたが、2つの大きな問題があった。内部細胞塊はヒトの受精卵から作られたものであり、将来的には胎児になるはずの組織である。ES細胞を採取するにはこの受精卵を破壊する必要があるため倫理的に大きな批判が生じる。また患者個体と同じゲノムをもつES細胞は存在しないため、その細胞の移植にはつねに拒絶の危険性が生じる。この2つの問題を解決するために、すでに分化した組織細胞を未分化な状態にリセットしようという試みが行われてきた。以前より、細胞の核を移してしまうという‘体細胞核移植’が注目を集めていたが、より簡便な方法として見つかったのが体細胞に4つの遺伝子を入れることによってできあがるiPS細胞なのである。すなわち生体内で作られた細胞を取り出して培養維持したものがES細胞、体細胞から遺伝子導入によってES細胞同様の能力をもたせたものがiPS細胞と言える(図1)。

ところでES細胞以外に、体組織にはある限られた分化能と自己複製能をもつ組織幹細胞という細胞がある。その代表である造血幹細胞は、赤血球や白血球、リンパ球など血球系の各系列へ分化する能力と増殖能をもち、また神経幹細胞も神経細胞・グリア細胞などになる能力をもつ。しかし各組織幹細胞は、血球系/神経系の枠を超えることはなく、その分化能は限られている。この限られた分化能を multipotency と呼ぶ(ちなみにES細胞

は胎児のすべての細胞になりえるとはいえ、胎盤や臍帯など胎児外組織にはなれない。受精卵だけが胎児個体と胎盤の両方に分化する能力をもっており、これを‘全能性: totipotency’ という)。

まとめるとiPS細胞とは、「すでに分化した細胞へ遺伝子を入れることで人工的に作られた」、「ES細胞同様の多能性をもつ」、「幹細胞」のことである。multipotentでも totipotent でもない、 pluripotent であることに注意が必要であり、iPS細胞を万能細胞と呼ばないのはそのためである。

2. iPS細胞における技術革新

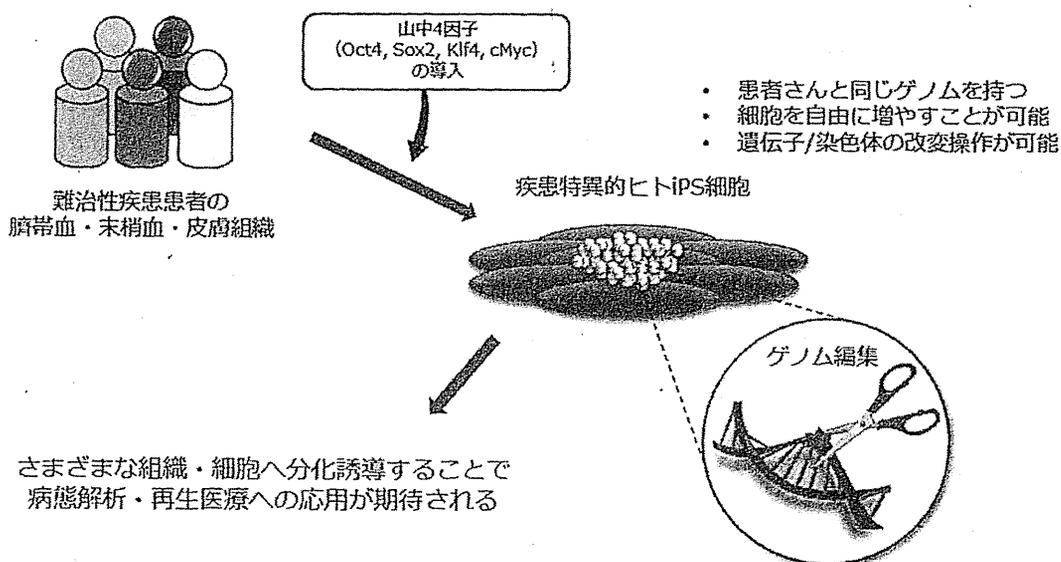
iPS細胞における技術の進歩はめざましい。当初は樹立するだけでも至難の業であったが、その後さまざまな改変と新規のテクノロジーが開発された。そこで樹立・分化誘導・遺伝子操作に関する以下の3つについて説明する(図2)。

(1) iPS細胞の樹立

iPS細胞は、皮膚や血液から採取された細胞にたった4つの遺伝子(山中4因子: *OCT4*, *KLF4*, *SOX2*, *c-Myc*)を導入することによって樹立される。その樹立効率は「もちいる細胞の種類と状態」そして「山中4因子の導入効率」によって大きく左右される。

まず細胞としては、基本的には増殖率が高くて‘活きのいい’ものほどiPS化は容易である。すでにさまざま

図2 iPS細胞の樹立, 分化, 遺伝子改変



たとえば難治性疾患患者がいる場合、その皮膚組織・血液組織をもとに山中4因子の遺伝子導入を行うだけでiPS細胞を樹立することができる。iPS細胞を使うことで、患者個人と同じゲノムをもつ細胞を自由に増やし、さまざまな細胞系列へと分化誘導することが可能になる。さらにゲノム編集技術をもちいることで、遺伝子に変異を入れて病態解明を行ったり、遺伝子を修復したのちに再生医療にもちいることが可能となる。

な細胞からの樹立が報告されており、皮膚生検によって得られた皮膚線維芽細胞が最も多くもちいられている。我々は臍帯血から分離した単核球を多くもちいているが、臍帯血は通常破棄されるため、検体採取に伴う児への侵襲がない。しかも新生児と同じゲノムを持ち、樹立効率も高いため、iPS細胞のよいリソースといえる。胎内診断のついた先天性疾患であれば、分娩に先立ってあらかじめ採取の準備と同意書の取得を行うことも可能である。一方、末梢血からの樹立も可能であるが、通常とは少し異なるプロトコルが必要となる。

OCT4, KLF4, SOX2, c-Myc の4つの遺伝子(山中4因子)は、体細胞を未分化な状態へとリセットする重要な初期化因子である。これらの遺伝子を細胞内に十分導入することができるかどうかは、iPS細胞樹立効率に関わるもうひとつの重要なファクターとなっている。以前は各因子を搭載したレトロウイルスを感染させることで遺伝子導入が行われていたが、安全性の問題と効率の低さが指摘されてきた(後述)。現在ではこれらの問題点を解決したセンダイウイルス³⁾およびプラスミド⁴⁾をもちいた導入法が開発され、主流となっている。

(2) 各細胞系列への分化誘導法

iPS細胞は受精卵に近い未分化な細胞である。この細胞をそのまま生体内に移植してもがん化してしまい、役に立たないばかりか新たな病態を引き起こしてしまう。したがって再生医療などの臨床応用を行うためには、体を構成する組織細胞へと変化させる必要があり、これを分化誘導という。

本来どの細胞にも分化可能なiPS細胞を目的のある種類の細胞だけに分化させるのは容易ではないが、生体での分化過程で起こるメカニズムを1つずつ丁寧に調べ、*in vitro*でも同様のシグナルが入るような操作を加えることで、様々な細胞分化が可能となってきた。すでに心筋細胞や膵臓β細胞、血球細胞系などの分化誘導に関しては多くの報告があり、その検証とプロトコルの改善が行われている。それらの中でとくにめざましいのは神経系への分化誘導である。理化学研究所(理研CDB)の笹井らはドーパミン作動性神経細胞⁵⁾や網膜細胞⁶⁾などに分化誘導する技術を確立し、それは後述するiPS細胞の臨床応用を可能にする重要な技術基盤となっている。さらに視床下部や小脳細胞への分化に成功したのみならず、iPS細胞を凝集させさまざまな阻害剤を加えるだけで、第2トリメスターの胎児脳にあたる6層の立体構造を持つ大脳皮質を作り出すという驚くべき手法を確立することに成功している⁷⁾。今後、これらの方法をもちいた中枢神経系疾患の病態解明や、再生医療の応用が進んでいくものと思われる。

(3) ゲノム編集技術の開発

患者個人の細胞から樹立されたiPS細胞を移植医療にもちいる利点は、拒絶反応がないことにある。しかしながら遺伝性疾患の場合、患者検体に入っている遺伝子異常は樹立後のiPS細胞にもそのまま残るため、変異を修復する必要がある。しかしながらヒトES/iPS細胞での遺伝子改変は、マウスと異なり極めて困難であった。

近年、多様な細胞・生物種における遺伝子組み換えを可能にする技術が開発され、大きな注目を集めている⁸⁾。Zinc Finger Nuclease, TALE Nuclease, CRISPR/Cas9システムなど「ゲノム編集技術」と呼ばれるこれらのテクノロジーの進歩は著しく、たとえばHIV-1ウイルスがT細胞に感染する際に必要な受容体を、このゲノム編集技術をもちいて変異させたT細胞をHIV感染患者に投与することによって、ウイルス抵抗性を向上するという第1相臨床試験がすでに始まっている⁹⁾。この技術をヒトiPS細胞にもちいて遺伝子修復を行う研究がいままさしく始まっており、今後このゲノム編集技術をもちいて、遺伝性疾患特異的iPS細胞のもつ原因遺伝子を修復した上で、患者へ移植するというような再生医療も盛んになると期待される。我々の研究室では単一遺伝子の改変のみならず数Mbレベルでの領域欠失や染色体そのものの除去といった染色体工学との組み合わせにも成功している。これらをもちいることでダウン症候群をはじめとする染色体異常症候群の病態解明および病態責任遺伝子の同定に成功しつつある。

3. 臨床応用への期待

iPS細胞樹立の最初の発表から8年経ち、いよいよiPS細胞をもちいた臨床応用が行われようとしている。既に基本的な技術開発が完了し、実際の臨床応用へ向かっているプロジェクトから、まだ実用化の目処は立たないものの大きな期待とともに技術開発が進められているプロジェクトまで、さまざまな研究が行われている。

(1) 5年以内の臨床応用を目指す研究

iPS細胞をもちいた再生医療のうち早期の実現が期待されるものとして、4つの研究拠点が設定されている。そのトップバッターが理研CDBの高橋らによる「iPS細胞由来網膜色素上皮細胞移植による加齢黄斑変性治療法の開発」である。滲出性加齢黄斑変性症と呼ばれる眼科疾患に対し、患者検体からヒトiPS細胞を樹立、その安全性を十分に確認した上で網膜細胞へと分化誘導を行い、作製した網膜色素上皮シートを患者へ移植する、とステップを踏んでいる。9月にはついに第一例目の移植術が行われ、将来的に視神経移植による網膜再生医療へとつながる第一歩として期待されている。

その次に実現可能と考えられているのが「iPS細胞由

来ドーパミン作動性神経細胞移植によるパーキンソン病の治療」(京都大学)、「iPS細胞由来神経前駆細胞をもちいた脊髄損傷の治療」(慶応大学)、「iPS細胞由来心筋シート移植による心筋再生治療」(大阪大学)の3つであり、いずれも世界で最初の臨床治験を目指している。

(2) 臓器作製

上記の再生医療はいずれもiPS細胞から作製した細胞群を移植するという‘細胞治療’であるが、再生医療の究極の目標は「臓器そのものを作製し移植する」ことであろう。しかしながら、多種多様な細胞群が3次元構造をもって構成する臓器を*in vitro*で再現するのは極めて困難である。

東京大学の中内らは多能性幹細胞のもつキメラ形成能を利用した‘胚盤胞補完法’と呼ばれる技術に注目した。この胚盤胞補完法とは、特定の細胞系譜を欠損したマウスの胚盤胞に正常な多能性幹細胞を注入すると、欠損した細胞が正常な多能性幹細胞に由来するものに置き換えられるというものである(図3)。

まず膵臓が欠損するマウス(Pdx1ノックアウトマウス)の胚盤胞に、正常なマウスiPS細胞を注入してみたところ、マウス体内で膵臓を再生することに成功し、しかもその膵臓は正常iPS細胞由来であった。この結果をもとに次は膵臓欠損マウスの胚盤胞へラットiPS細胞を注入

したところ、異種間であるにもかかわらず、マウスの生体内に機能的なラットの膵臓を作製できたのである¹⁰⁾。さらには大型動物での応用を目的として、まず膵臓欠損ブタを作製し、その胚盤胞に健全なブタから作り出したクローン胚を注入するという操作を行ったところ、正常ブタ由来の膵臓を再生することができたという報告もなされた¹¹⁾。この手法を利用して、もし膵臓欠損ブタの胚盤胞にヒトiPS細胞を注入すれば、ヒト膵臓を再生することができるのではないだろうか。

現在のところヒトの多能性幹細胞を異種動物胚盤胞へ移植することは、日本では倫理的問題上禁止されているが、海外では可能な国も多い。今後研究目的に限って承認される可能性もあり、その動向を注視する必要があるだろう。

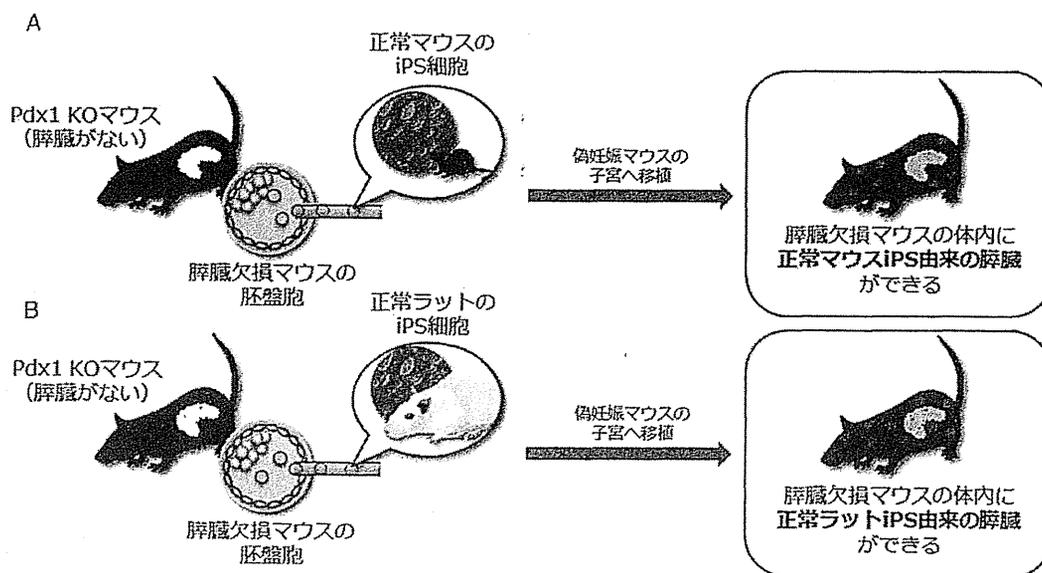
4. iPS細胞の持つ課題

さまざまな期待とともに進められているiPS細胞研究であるが、多くの課題と問題点ははらんでいる。その最も大きな点が「安全性」と「倫理的問題」であろう。

(1) 安全性 - がん化について -

iPS細胞のもつ問題点と言えば、おそらく「がん化」の問題が真っ先に想起されるであろう。iPS細胞の移植時にがん化の危険性があることは発表当時から指摘され

図3 胚盤胞補完法



Pdx1ノックアウトマウスは膵臓を欠損しているマウスである。

A. この膵臓欠損マウスの胚盤胞に正常マウスのiPS細胞を注入し、偽妊娠マウスの子宮に移植すると、膵臓が再生し、しかもその膵臓は正常iPS細胞に由来している。

B. 膵臓欠損マウスの胚盤胞に正常ラットのiPS細胞を注入して偽妊娠マウスの子宮に移植すると、正常ラットiPS細胞由来の膵臓がマウスの体内に形成される。

すでに膵臓欠損ブタの胚盤胞に正常ブタiPS細胞を注入して膵臓を再生することが成功している。もしも膵臓欠損ブタの胚盤胞に、あなたのヒトiPS細胞を注入したら…?

ていたが、じつはその原因には「iPS細胞固有の原因」と「ES/iPS細胞共通の原因」の2通りがある。

まず「iPS細胞固有の原因」とは、その樹立過程にある。上述したように初期のiPS細胞樹立には、レトロウイルスによる遺伝子導入法をもちいていた。しかし、このレトロウイルスは宿主ゲノムの任意の場所に4因子を挿入してしまうという特徴があり、ゲノム上の重要な遺伝子に変異を入れてしまう可能性がある。さらに山中4因子にはc-Mycというがん遺伝子が含まれており、これを永続的に挿入することでがん化の危険性が高まってしまふと考えられる。この危険性については、センダイウイルスやプラスミドベクターといった、宿主ゲノムへの遺伝子挿入を必要としない遺伝子導入法が開発されるにいたって解消された。またc-Mycを除いた3因子での樹立、あるいはc-Mycと同等の働きを持ちながらかん化を起こさないL-Mycをもちいた樹立などの方法が開発されており、これについてもほぼ解決されつつある。

つぎに「ES/iPS細胞共通の原因」についてであるが、幹細胞の定義について上述したとおり、そもそも幹細胞は無限に自己増殖する性質を持っている。したがってES細胞であれiPS細胞であれ、そのまま移植すると増殖して奇形腫となってしまうのである。たとえば想定されるのは、神経系へと分化誘導したつむりの移植細胞の中に未分化なiPS細胞が混入していた場合であり、移植後にそれらが腫瘍化する危険性がある。これについては、より高い分化効率と終末分化した細胞のみを選び出す技術の開発が進められており、近いうちに解決法が提示されると思われる。

(2) 倫理的問題

安全性に関するハードルを乗り越えつつあるいま、今後さらなる議論が必要となるのは「生命・生殖に関する、倫理的問題」であろう。

胚盤胞補完法の説明で述べたとおり、異種動物の胚盤胞へヒトiPS細胞を注入することでヒト臓器の再生が期待できるようになった。たとえば遺伝性の膵臓疾患をもつヒトの皮膚からiPS細胞を作り、ゲノム編集技術をもちいて遺伝子変異を修復した上で、膵臓欠損ブタの胚盤胞へ注入すれば、拒絶を起こさない正常な膵臓を作製することができる。この臓器再生が現実となれば医学的に大きな進歩と言え、また商業的に大きな動きが起きるだろう。しかしヒト胚あるいは動物胚へのヒトiPS細胞の注入は、ヒトクローンを含むあらたな命の誕生という重大な倫理的問題を生じるため、慎重な議論が必要である。

さらに2011年、京都大学の林・齋藤らによってマウスiPS細胞からの精子・卵子の作製が報告された^{12) 13)}。ヒトiPS細胞での分化誘導についても今後なんらかの方法が見つけれられると思われ、不妊症の病態解明や治療

法の開発が進むだろう。一方、我々の研究成果からも分かるように、染色体そのものを導入・除去することも可能となりつつあり、これらの技術を組み合わせることで性染色体を入れ替えたiPS細胞から精子/卵子の作製が可能となろう。すなわち男性の検体から卵子、女性の検体から精子を作ることでもでき、たとえば同性カップル内での妊娠・出産すら（理論的には）可能となるのである。

異種動物およびヒト胚盤胞へのヒトiPS細胞の注入は、現在のところ日本では禁止されているが、海外では可能としている国もある。日本国内ではこのような動きを一律禁止としても、将来的には海外へ皮膚検体を送って臓器を作製したり、樹立したiPS細胞を海外で子宮内へ移植してもらう、といったような事例が出てくるかもしれない。それはあたかも、脳死問題と海外での移植事例に関して過去にたどった経緯と似ているように思われる。

異種動物胚へのヒトiPS細胞の移植、ヒトクローンの作製、もとの個体の性別を超えた生殖細胞の作製といった倫理的課題をどのように超えていくのか、研究者や倫理学者だけでなく、社会全体で議論を深める必要があるだろう。

おわりに

iPS細胞は2006年のマウスでの樹立発表後、2007年のヒトiPS細胞の樹立と特許問題、2012年ノーベル医学生理学賞の受賞と、世間の注目を集め続けている。だれもが簡単に作製でき、しかもさまざまな応用が可能であることから潜在的なニーズは巨大であり、それゆえに日進月歩の勢いで技術革新が進んでいる。最先端の知見をフォローし続けるのは幹細胞研究者ですらたいへんで、ましてや一般の医療従事者には至難の業だろう。しかしながら次世代シーケンサーの登場とともに突如として現れたNIPTの問題同様に、思いも寄らない倫理的問題が青天の霹靂のように出現する可能性は十分にある。いまずでに予想されるポイントから議論を重ね、さまざまな意見を集約しておくことはたいへん重要であると思われる。

文献

- 1) Takahashi K, Yamanaka S : Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126: 663-676, 2006.
- 2) Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al : Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, 131: 861-872, 2007.
- 3) Nishimura K, Sano M, Ohtaka M, et al : Development of defective and persistent Sendai virus vector: a unique gene delivery/expression system ideal for cell reprogramming. *J Biol Chem*, 286: 4760-4771, 2011.

- 4) Okita K, Hong H, Takahashi K, et al : Generation of mouse-induced pluripotent stem cells with plasmid vectors. *Nat Protoc*, 5: 418-428, 2010.
- 5) Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, et al : Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron*, 28: 31-40, 2000.
- 6) Eiraku M, Takata N, Ishibashi H, et al : Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture. *Nature*, 472: 51-56, 2011.
- 7) Kadoshima T, Sakaguchi H, Nakano T, et al : Self-organization of axial polarity, inside-out layer pattern, and species-specific progenitor dynamics in human ES cell-derived neocortex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110: 20284-20289, 2013.
- 8) Kim H, Kim JS : A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet*, 15: 321-334, 2014.
- 9) Holt N, Wang J, Kim K, et al : Human hematopoietic stem/progenitor cells modified by zinc-finger nucleases targeted to CCR5 control HIV-1 in vivo. *Nat Biotechnol*, 28: 839-847, 2010.
- 10) Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, et al : Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. *Cell*, 142: 787-799, 2010.
- 11) Matsunari H, Nagashima H, Watanabe M, et al : Blastocyst complementation generates exogenic pancreas in vivo in apancreatic cloned pigs. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110: 4557-4562, 2013.
- 12) Hayashi K, Ohta H, Kurimoto K, et al : Reconstitution of the mouse germ cell specification pathway in culture by pluripotent stem cells. *Cell*, 146: 519-532, 2011.
- 13) Hayashi K, Ogushi S, Kurimoto K, et al : Offspring from oocytes derived from in vitro primordial germ cell-like cells in mice. *Science*, 338: 971-975, 2012.

Gene Section

Review

IL17A (interleukin 17A)

Norimitsu Inoue, Takashi Akazawa

Department of Molecular Genetics, Osaka Medical Center for Cancer and Cardiovascular Diseases, Osaka, Osaka 537-8511, Japan (NI, TA)

Published in Atlas Database: April 2014

Online updated version : <http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/IL17AID40945ch6p12.html>
DOI: 10.4267/2042/55373

This article is an update of :

Inoue N, Akazawa T. IL17A (interleukin 17A). Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol 2011;15(8):662-666.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Noncommercial-No Derivative Works 2.0 France Licence.
© 2015 Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Haematology

Abstract

Interleukin-17A (IL17A), a characteristic cytokine produced by the T helper 17 cells (Th17 cells), can form either a homodimer or a heterodimer with IL17F.

It is produced not only by Th17 cells, but also by cytotoxic CD8⁺ T cells (Tc17 cells), $\gamma\delta$ T cells, invariant natural killer T cells (iNKT cells), lymphoid tissue inducer cells (LTi cells), and other hematopoietic and non-hematopoietic cells. During development, these cells exhibit flexible or plastic features distinct from those of Th1 and Th2 cells. IL17A plays important roles in the pathogenesis of autoimmune diseases and in the host defenses against bacterial and fungal infections.

Expression of IL17A and its related factors, as well as the infiltration of IL17A-producing cells into the tumor microenvironment, has been implicated in anti-tumor or pro-tumor effects in various cancers.

Keywords: Th17 cells, ROR γ t, STAT3, IL23, TGF β , inflammation

Identity

Other names: CTLA8, IL-17, IL-17A, IL17

HGNC (Hugo): IL17A

Location: 6p12.2

Local order: pter - PKHD1 (polycystic kidney and

hepatic diseases 1) - MIR206 (microRNA 206) - MIR133B (microRNA 133b) - **IL17A** - IL17F (interleukin 17F) - SLC25A20P1 (solute carrier family 25, member 20 pseudogene 1) - MCM3 (minichromosome maintenance complex component 3) - centromere.

DNA/RNA

Note

IL17A was initially identified in a subtractive hybridization screen of a rodent T cell library as mouse cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 8 (mCTLA8) (Rouvier et al., 1993), but is now recognized as a characteristic cytokine of the Th17 cell subset, which has effector functions distinct from those of Th1 and Th2 cells (Korn et al., 2009; Kurebayashi et al., 2013).

Description

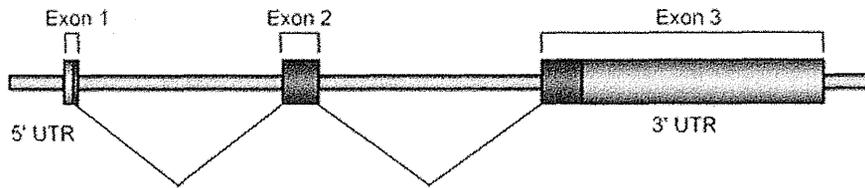
The IL17A gene spans a region of 4252 bp, consisting of three exons.

Transcription

The transcript is 1859 bp and has a 45 bp 5' UTR, a 468 bp coding sequence, and a 1346 bp 3' UTR.

Pseudogene

No pseudogenes homologous to this gene exist elsewhere in the genome.

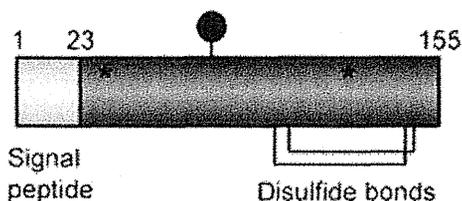


IL17A gene. The IL17A gene spans a region of 4252 bp, consisting of three exons (untranslated region (UTR), light blue; coding region, blue) and two introns (brown). Exons 1, 2, and 3 are 72 bp (45 bp 5' UTR plus 27 bp coding region), 203 bp (all coding regions), and 1584 bp (238 bp coding region plus 1346 bp 3' UTR) in length, respectively. The two introns are 1144 bp and 1249 bp in length.

Protein

Note

The IL17A protein is a glycoprotein that can form either a disulfide-linked homodimer or a heterodimer with the IL17F protein. Members of the IL17 protein family (IL17A-F) contain four highly conserved cysteine residues on each monomer (Kolls and Lindén, 2004; Iwakura et al., 2011). Structural analysis of the IL17F protein has revealed that these four cysteines participate in the characteristic cystine-knot formation observed in other growth factors such as nerve growth factor (NGF), transforming growth factor β 2 (TGF β 2) and platelet-derived growth factor (PDGF)-BB (McDonald and Hendrickson, 1993), although one of the canonical disulfides of the cystine-knot is absent from the IL17 protein family (Hymowitz et al., 2001). Two additional cysteine residues participate in homodimer formation via inter-chain disulfide bonds. Crystal structures are now available for IL17A in complex with an antibody (Gerhardt et al., 2009), an IL17F/IL17 receptor A complex (Ely et al., 2009) and an IL17A/IL17 receptor A complex (Liu et al., 2013).



IL17A protein. The IL17A protein (155 amino acids) consists of a signal peptide (light green, 23 amino acids) and a mature peptide (green, 132 amino acids). Four conserved cysteines (Cys) form the intra-chain disulfide bonds indicated by black lines (Cys94/Cys144 and Cys99/Cys146) (Hymowitz et al., 2001). The two cysteines indicated by asterisks (Cys33 and Cys129) participate in homodimer formation via inter-chain disulfide bonds. Asparagine 68 (Asn68, black circle) is predicted to be glycosylated.

Description

The IL17A monomer is a peptide consisting of 155 amino acids. The IL17A peptide comprises a 23 amino acid signal peptide and a 132 amino acid

mature peptide. The IL17A homodimer has a molecular weight of 35 kD (Kolls and Lindén, 2004).

Expression

IL17A is secreted not only by CD4⁺ T cells (Th17 cells), which also produce IL17F, IL21, and IL22 (Korn et al., 2009; Kurebayashi et al., 2013), but also by CD8⁺ T cells (Tc17 cells), $\gamma\delta$ T cells, invariant natural killer T cells (iNKT cells), innate lymphoid cells (ILCs) including lymphoid tissue inducer cells (LTi cells), B cells, neutrophils, and other non-hematopoietic cells (Cua and Tato, 2010). These lymphocytes all express the retinoic acid receptor-related orphan nuclear receptor C (RORC, the human analogue of mouse ROR γ t, a splice variant of the Rorc gene). ROR γ t is essential for IL17A production and the development of IL17A-producing cells, at least in lymphocytes, and is thus considered a master regulator of IL17A-producing cells.

Th17 cells

Th17 cells are a subset of helper T cells that have effector functions distinct from those of Th1 and Th2 cells. Early reports showed that stimulation with transforming growth factor β 1 (TGF β 1) and IL6 is required to induce differentiation of IL17-producing CD4⁺ T cells (Th17 cells) from naïve CD4⁺ T cells (Korn et al., 2009). More recent reports have shown that Th17 cells can be categorized into two distinct subsets: conventional Th17 cells (Th17(β) cells, also called non-pathogenic Th17 cells), which differentiate in the presence of IL6 and TGF β 1, and Th17(23) cells (also called pathogenic Th17 cells), which differentiate in the presence of IL6, IL23 and IL1 β without exogenous TGF β 1 (Ghoreschi et al., 2010; Basu et al., 2013; Kurebayashi et al., 2013). IL6 and IL1 β can induce the expression of IL23 receptor in naïve CD4⁺ T cells in the absence of TGF β 1. Th17(β) cells express IL9, IL10, CCL20, and CXCR6 as well as IL17A and IL17F, whereas Th17(23) cells express IL22, CCL9 and CXCR3; relative to Th17(β) cells, Th17(23) cells make a greater contribution to pathogenesis in autoimmune diseases (Ghoreschi et al., 2010). Th17 cells stimulated with IL23, which is secreted by dendritic