

STAT1機能獲得型変異による自己免疫疾患に対する、CRISPRシステムを用いた新規治療の開発



京都大学医学部附属病院検査部 助教 新井 康之

目 的

STAT1遺伝子における機能獲得型変異は、自己免疫性甲状腺炎などの自己免疫症状に加え、難治性のカンジダ症を皮膚、粘膜、爪などに併発することが知られている。これは、慢性粘膜皮膚カンジダ症（CMC）と呼ばれ、これまでに20種類程度のSTAT1領域における変異が報告され、先天性免疫不全の一つとして広く知られている。STAT1の機能獲得型変異により、STAT1の過剰なリン酸化が起こり、サイトカインのバランスが崩れ、結果として未熟T細胞からヘルパー T細胞の一つであるTh-17への分化が抑制されることが、患者検体の解析によって報告されている。

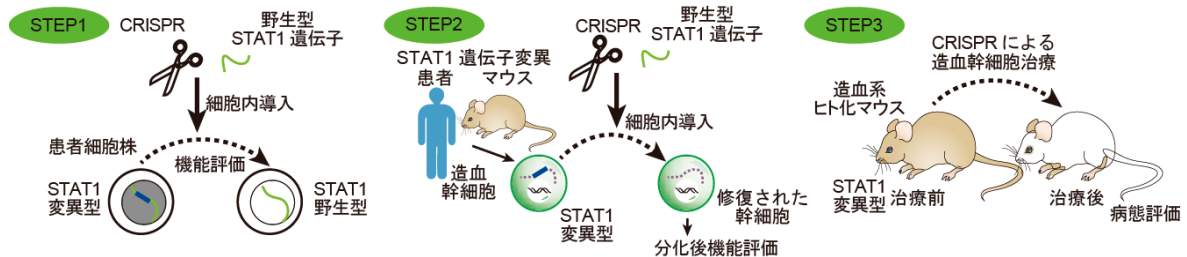
本疾患は、繰り返す感染症により、生命予後が不良であるとともに、生活の質も低下する傾向が認められる。治療方針としては、造血幹細胞移植により、免疫担当細胞の正常化を目指すことが一般的である。しかし、優性遺伝疾患であるが故に、健常な血縁ドナーが得られる可能性が低く、非血縁者からの移植に頼らざるを得ず、移植片対宿主病（GVHD）の発症が危惧される。

そこで、申請者は新規のゲノム編集技術であるCRISPRシステムを用いて、機能亢進型変異を特異的に除去することで、自己の造血幹細胞を用いた遺伝子治療を開発する研究計画を進めている。遺伝子治療は様々な酵素欠損を伴う疾患に対して臨床応用されているが、機能獲得型変異に起因する疾患に対しては、まだ開発されていない。今回、STAT1機能獲得型変異に対して遺伝子治療が確立できれば、本疾患のみならず、他の同様な機序で起こる免疫不全疾患にも応用できる可能性が高く、本研究の意義は大きいと考える。

方 法

1. 変異特異的なCRISPRシステムの作成

米国国立衛生研究所で加療を受ける10人の慢性粘膜皮膚カンジダ症患者（10種類のSTAT1機能獲得型変異）から、末梢血B細胞を採取し、EBウイルス感染にて不死化した細胞株を樹立する。CRISPRシステムとして、STAT1遺伝子変異部位を含むようなガイドRNAを設計し、DNA切断酵素であるCas9蛋白とともに細胞株に注入し、変異部位のDNAを特異的に切断する。この際、野生型塩基配列をもつDNAを同時に投与し、相同組換えによる変異塩基の修復を行う（下図）。CRISPR投与後、遺伝子修復効率を確認する。



2. 遺伝子修復した造血幹細胞を用いたSTAT1機能解析

STAT1機能獲得型変異を全血液・免疫細胞において修復するには、造血幹細胞レベルでの修復が必要となる。そこで、上記患者末梢血から幹細胞マーカーであるCD34陽性細胞を採取し、レンチウイルスベクターを用いて、前述のCRISPRシステムと野生型一本鎖DNAを細胞内に導入する。遺伝子修復効率を確認した上で、各種サイトカインを含む培地内で幹細胞をT細胞・B細胞・単球に分化させ、各血球でのインターフェロン刺激に対するSTAT1リン酸化を評価し、遺伝子修復によるSTAT1機能正常化を確認する。

3. ヒト化マウスを用いた遺伝子治療効果の検討

高度免疫不全マウスに患者由来の造血幹細胞を投与し、造血・免疫系を構築する。健常人造血系を構築したマウスと比べ、自己抗体の産生や易感染性などSTAT1遺伝子変異に伴う形質が再現されているか評価する。続いて、CRISPRによる遺伝子修復した造血幹細胞を投与したマウスでは、これらの異常形質がどのように変化しているかを検討し、CRISPRによる遺伝子治療効果を評価する。

結 果

上記計画の1.に関しては、施設内コアファシリティーの協力も得て、現時点までに20変異に関して不死化細胞株を樹立し、それぞれの変異に対して特異的CRISPRを作成した。各細胞株に関して、変異を含むDNAの切断効率を算出したところ、おおむね60-80%と良好であった。一本鎖DNAによる遺伝子修復は約50%で確認された。これ以上の効率は得られなかったが、STAT1に関しては、1アリル欠損（ヘテロ機能不全）では、特に臨床症状が出ないことが知られており、機能獲得型変異の除去が出来れば、必ずしも野生型配列による置換が起こっていなくても問題はないものと考えている。

上記計画2.に関しては、条件検討のために米国における10患者より造血幹細胞の採取、CRISPRシステムによる機能獲得型変異の除去と、野生型配列の挿入を行った。不死化細胞株に比べて、造血幹細胞は遺伝子挿入効率が悪かったが、条件の最適化（レンチウイルス感染のタイミング、ウイルス量、方法）により、許容できるレベルの効率を得ている。これらの造血幹細胞を用いて、分化実験を行った。その際は、各種サイトカインを加えて、幹細胞をリンパ球や単球に分化させ、各血球でインターフェロン刺激に対するSTAT1リン酸化を評価し、これにより、遺伝子修復によるSTAT1機能正常化が確認した。同時に、全ゲノムシーケンスを行い、修復時に別の変異挿入が起こっていないことを、確認した。

また、同様の検討をマウスでも行うため、CRE-loxPシステムを用いて、患者と同じSTAT1変異を持つマウスを作成した。このマウスでは、血球のリン酸化が亢進するとともに、さらには、生存期間短縮も認めており、ヒト患者とよく似た表現型であった。このマウス造血幹細胞においても、CRISPRによる遺伝子修復を試みたところ、野生型と遜色ない生存率を得ている。現在、このマウスを詳細に解析し、データの解析を行っている。

考 察

日本国内では、数施設で慢性粘膜皮膚カンジダ症（STAT1機能獲得型変異）に関する研究が行われているが、少数の患者検体を用いた検討が主で、新規治療開発まで視野に入れている施設は、申請者の知る限り存在しない。

一方、日本国外では、欧州と米国において、それぞれ数施設が同研究を行っており、マウスモデルも樹立されつつある。しかし、遺伝子変異そのものをターゲットとしたCRISPRを用いた研究は、他施設では行われておらず、申請者のグループが先陣を切っている。

今後の展望

様々なリウマチ性自己免疫疾患を併発するSTAT1機能獲得型変異は、最近注目されるようになった難治性疾患である。本疾患を含め、先天性リウマチ性難病に対する遺伝子治療は、世界的に初めてである。

このような疾患は、極めて希少であるため、日本国内の患者検体を用いた研究はほぼ困難である。そのため、全世界から希少疾患患者を集積している米国NIHで本研究を開始した。現時点で進捗は順調で、NIH以外の米国および欧州の複数施設から、検体・技術提供契約を締結できた。申請者は平成30年春から日本（京都大学 血液・腫瘍内科）に帰国しており、米国での予備実験結果を基に、我が国主導の国際共同研究の形で本研究を進行するべく奮闘している。本研究は、「ゲノム編集技術を用いた、先天性遺伝免疫疾患全般の治療法開発」を長期的目標に見据えている。本研究で確立した技術を元に、遺伝性免疫疾患に普遍的な治療法を開発することで、多くの患者に希望を与えると共に、日本の科学技術の発展に貢献したい。本研究はこの大きな目標への第一歩である。多大なる支援を与えていただいた、難病医学研究財団には大いに感謝したい。