

(別紙1)

総括研究報告書

課題番号	2023C-12	
研究開発課題名	フェニルケトン尿症疾患モデルマウス由来 iPS 細胞の次世代標的ゲノム編集による遺伝子治療と肝細胞分化誘導技術の開発	
分類*	<input type="checkbox"/> ① <input checked="" type="checkbox"/> ② <input type="checkbox"/> ③ <input type="checkbox"/> ④ <input type="checkbox"/> ⑤ <input type="checkbox"/> ⑥ <input type="checkbox"/> ⑦	
区分	<input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> B <input checked="" type="checkbox"/> C <input type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> S	
主任研究者	所属	システム発生・再生医学研究部
	役職	研究員
	氏名	辻 敦美
実施期間	2023年 4月 1日 ~ 2024年 3月 31日	

※分類は下記①～⑦より選択

- ① 日本の成育分野の疾患の研究の基盤となる研究
- ② 診断、治療及び予防法の開発に関する研究
- ③ 発症機序や病態の解明等を行う研究
- ④ 診断や治療のための基準の開発等に関する研究
- ⑤ 患児・者の QOL 向上に結びつく研究
- ⑥ 研究的視点や技術をもつ医療従事者を育てるための研究
(プロトコル作成のフェージビリティ研究)
- ⑦ 政策提言に結びつく研究

成果の概要

先天性代謝異常症に対し、近年ヒト ES 細胞から分化誘導した肝細胞様細胞移植が移植待機中の bridging として報告された。患者 iPS 細胞を用いた肝細胞移植を見据え、フェニルケトン尿症 (PKU)モデルマウスを用いた(1)疾患モデルマウスからの iPS 細胞樹立、(2)マウス iPS 細胞における病的バリエーションのゲノム修復、(3)ゲノム修復後 iPS 細胞の肝細胞様細胞への分化を目指し実験を計画した。

本実験では、ヒト配列へのゲノム編集を見据え、PKU の原因遺伝子 *Pah* において日本人患者で比較的頻度が高い病的バリエーション p.R111X とその周辺 120bp をゲノムヒト化したマウス (*Pah^{hR111X}*)を使用した。*Pah^{hR111X}* マウスを交配し、胎生 13.5 胚を得た。摘出した胎仔 1 個体ずつより胎仔線維芽細胞(MEF)の単離を行った。各胎仔の遺伝子型を確認し、*Pah^{hR111X}* アリルをホモ接合性に有する MEF を獲得・凍結保存した。

またマウス iPS 細胞誘導の最適化実験を行った。*Pah^{hR111X}* 系統が C57BL/6 を背景としており、C57BL/6 系統の胎生 13.5 日胚から単離した MEF に対し、KLF4, OCT4, SOX2, C-MYC センダイウイルスベクターを感染させ、フィーダー細胞上で培養したところ、感染後 1 継代目で複数のコロニーが得られた。しかしその後の継代で十分なコロニーの発育が認められなかった。129X1/SvJ 系統由来の MEF を用いる、培養培地を ES 細胞用培地に変更するなど初期化

に際してさらなる条件検討が必要であることが明らかとなった。

iPS 細胞樹立に時間を要したため、野生型マウス ES 細胞を用いて、対象領域のゲノム修復を検討した。*Pah* の対象部位(c.331)付近の野生型配列を標的とする sgRNA 発現ベクター、Cas9 発現ベクターを electroporation でマウス ES 細胞に導入した。抽出した DNA を用いて遺伝子型解析・T7 endonuclease 解析を行なったところ、*Pah*c.331 付近で、低頻度ながら indel を確認した。

以上の実験により、先天性代謝異常症疾患モデルマウスからの iPS 細胞樹立、対象領域の多能性幹細胞ゲノム修復に関する重要な知見を得ることができた。本結果を踏まえ、競争的資金を獲得し、今後のさらなる研究発展を目指す。

※ 今年度の研究実績及び成果に関して、500~1000 字、文字の大きさ 11 ポイント程度で作成ください。

※ 計画書に記載された計画に対応して、どのような結果が得られたか記載してください。

※なお、総括研究報告書は、国立成育医療センターホームページに掲載致しますのでご承知おきください。知財等の都合により、総括研究報告書のホームページへの掲載に不都合がある場合は事前に事務局にご相談ください。