

□文献紹介□

嚢胞性線維症患者の腸管幹細胞オルガノイドにおける CRISPR/Cas9 による CFTR の機能的修復

嚢胞性線維症(cystic fibrosis:CF)はCl-チャネルをコードする *CFTR* の変異による常染色体劣性遺伝疾患で、白人に多い。症状は腭線維化、消化吸収障害、呼吸器感染症などであり、根本的な治療法はいまだない。

本研究チームはこれまでに、成人の腸管由来の幹細胞から腸管上皮オルガノイドを作り出すことに成功している。腸管上皮オルガノイドは上皮細胞シートによって作られた中空の球状構造で、自己複製する Lgr5 陽性幹細胞と分化した各種細胞が絨毛様構造を取る、いわば「ミニ腸管」である。本研究では、CRISPR/Cas9 システムを用いた遺伝子編集により CF 患者由来の腸管幹細胞において遺伝子変異を修復し、CFTR チャネルが機能回復した腸管上皮オルガノイドの作成に成功した。

CF 患者は、3 塩基欠失により 508 番目のフェニルアラニンの 1 アミノ酸欠失を起こす変異 *CFTR* のホモ接合体である。CF 患者の腸管組織より腸管上皮オルガノイドを作成し、野生型 *CFTR* のエクソン 11 (508 番目のフェニルアラニンを含む配列)とピューロマイシン耐性遺伝子(イントロン部に挿入)を含むベクター、および CRISPR/Cas9 システムにより *CFTR* 遺伝子の特異的に切断するための Cas9 プラスミドとガイド RNA を導入した。すると一部の細胞で、相同

組換えにより変異 *CFTR* 遺伝子座が野生型と置き代わって遺伝子変異が修復され、同時にイントロン部にピューロマイシン耐性遺伝子が組み込まれるため、オルガノイドをトリプシン処理してバラバラにした後、ピューロマイシン存在下で培養すると、変異が修復された幹細胞のみが生き残って再びオルガノイドを形成した。形成されたオルガノイドでは遺伝子変異が修復されていることが確認され、CFTR チャネルの機能回復も起こっていることが証明され、CRISPR/Cas9 システムにより高効率に遺伝子変異修復が可能なが示された。

将来的には、CF 患者の肺・腸管・膵管組織を採取し CRISPR/Cas9 システムにより遺伝子変異を修復した上皮オルガノイドを作成し、そのオルガノイドを患者に戻すことにより CF の遺伝子治療が可能となることが期待される。

Schwank G, et al: Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell* 13:653-658, 2013

(慶應義塾大学 深田 彩子)