

博士論文

ゲノム編集による軟骨無形成症特異的 iPS 細胞を用いた  
軟骨細胞分化の評価

堀江 尚弘

論文のタイトル

ゲノム編集による軟骨無形成症特異的 iPS 細胞を用いた

軟骨細胞分化の評価

所属

大学院 博士課程 医学系研究科 外科学専攻

指導教員名

高戸 毅

申請者名

堀江 尚弘

目次	p3
要旨	p4～5
序文	p6～15
方法	
1. 1. <i>FGFR3</i> ゲノム編集 hiPS 細胞の樹立	p16～17
1. 2. hiPS 細胞培養及び、軟骨分化誘導	p17～19
1. 3. mRNA 採取とリアルタイム PCR	p19～20
1. 4. タンパク質採取と Western blotting	p20～21
1. 5. テラトーマアッセイ	p21～22
結果	
2. 1. ゲノム編集による <i>FGFR3</i> 変異 hiPS 細胞の樹立	p23～24
2. 2. ゲノム編集細胞の特性	p24～25
2. 3. <i>FGFR3</i> と下流シグナルの検討	p25～26
2. 4. 軟骨マーカー遺伝子に関する検討	p26～27
2. 5. ゲノム編集 hiPS 細胞のテラトーマアッセイ	p27～28
考察	p29～36
結論	p37
謝辞	p38～39
引用文献	p40～49
図・表と説明	p50～62

## 要旨

軟骨無形成症 (Achondroplasia; ACH) は骨の低形成に起因する種々の症状を呈する先天疾患である。現在の治療法は主に外科手術による対症療法であり、原因療法として応用可能な治療薬の開発が望まれている。ACH 治療薬となる新たな化合物を探索するには、莫大な量の化合物をハイスループットに評価できるシステムが求められる為、本研究はその様な評価系の指標となり得る、ACH 病態の解明を試みた。

ACH の原因は *FGFR3* の一塩基置換である為、我々は CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を応用し、ヒト iPS 細胞に同変異を挿入して ACH モデル hiPS 細胞を樹立した。更に同細胞の分化誘導実験により、ACH の軟骨細胞における前肥大軟骨細胞の段階に障害が発生する事を示した。

研究全体を通じて、実験群としてゲノム編集にて ACH の原因遺伝子を組み込んだ細胞を、対照群にはゲノム編集を試みたが変異が組み込まれなかった細

胞を設定した。軟骨分化誘導実験では変異の有無に関わらず、両細胞群共に軟骨細胞へ分化するにつれて *COL2A1* 発現は上昇していた一方で、実験群である変異導入細胞では、分化誘導最終日における *IHH* 発現の上昇が抑制されていた。

今回樹立した *FGFR3* ゲノム編集 hiPS 細胞は ACH 治療薬開発に有用なツールとなり得る。

## 序文

軟骨無形成症（ACH）は最も代表的な低身長を示す骨系統疾患であり、1万人～3万人に1人の割合で発症するとされている [1、2]。また、軟骨内骨化の障害による骨の形成不全に起因する四肢短縮型低身長、水頭症、脊髄圧迫、中耳炎、歯列不正などの症候を呈し[1、3]、病態に関しては、*FGFR3* 遺伝子の gain of function が原因で生じる事が知られている。同変異の受容体への影響については諸説あり、受容体の内在化の阻害や、ユビキチン化の阻害によるリソソームでの分解の遅延が、シグナルの異常な活性化を引き起こすこと等が報告されている [2、4、5]。

こうした、異常に活性化されたシグナルが軟骨細胞に与える影響として、*FGFR3* の下流シグナルである、MAPK 経路に存在する ERK や p38 が軟骨細胞の増殖、基質形成、肥大軟骨細胞への分化を抑制し、STAT1 が細胞増殖を抑制することが報告されている [1]。

更に、組織学的特徴については、ヒト胎児、疾患モデルマウスにおいて成長板組織の異常を認めており、ACH 胎児では肥大軟骨細胞層の短縮を [6]、ACH モデルマウスにおいては増殖軟骨細胞層、肥大軟骨細胞層の狭小化を確認している [7]。よって、同疾患のメカニズムとして FGFR3 シグナルの異常な活性化が、組織学的な所見として肥大軟骨細胞層が短縮することが判明しているのだが、こうしたシグナルの異常が、軟骨組織の異常を生じさせるまでの過程において、障害を受ける軟骨細胞の分化段階が特定されていない。

また現在、ACH の治療方針は主に外科手術であり、例えば四肢短縮型低身長に対しては四肢延長術 [8]、重度の水頭症に対しては脳室シャント術 [9]、脊髄圧迫には減圧術を施行している [10, 11]。但し、これらの治療法はどれも対症療法であり、疾患を根本から治癒させることは出来ない上、病態によっては低年齢の患者に高侵襲な治療を選択しなくてはならない。

一方、薬剤を用いた治療法に関しては、低身長に対する治療効果を期待して

成長ホルモンが患者に投与されており、小児患者に 5 年間投与した場合に有効性がある事が示唆されているのだが [12]、その作用は ACH の症状を根本的に改善するまでには至らない。そのため、疾患の原因に直接作用し得る薬剤も開発されており、これまでに C 型ナトリウム利尿ペプチド (CNP) アナログ、メクロジン、スタチンなどに関する研究報告が認められる。

CNP アナログは、標的とする受容体である NPR-B に結合し、ACH 胎児成長板由来の軟骨細胞における ERK1/2 のリン酸化を減少させる効果があるのだが [13]、NPR-B を過剰に活性化させた場合、脊柱側弯や母趾の巨趾症が生じるリスクがある [14]。また、メクロジンは MAPK 経路における MEK1/2 を介した ERK1/2 のリン酸化を抑制あるいは、リン酸化された ERK1/2 のフォスファターゼを活性化させることで、FGFR3 シグナルを減弱させると言われているが [15]、長期投与による副作用の発現に関しては未検証の状態である [16]。スタチンについては ACH モデルマウス由来軟骨細胞の FGFR3 タンパク質量を減



少させる事が報告されており、他の疾患モデル細胞を用いた検討にて、MAPK の異常な活性化を抑制する作用がある事も、確認されている。しかしながら、過剰投与により筋肉あるいは、腎臓への毒性が生じ得ると判明しており、ヒトの ACH に効能を示す、安全な用量が定まっていない [17]。

以上の事から、これまで開発されてきた薬剤は ACH の症状を根本的に改善する可能性を秘めているが、成長板以外の組織への副作用などに対する、安全性の確立には未だ至っていない [18]。故に、新たな治療薬候補となる化合物の探索が望まれるが、今のところ、*FGFR3* の変異によるシグナル異常活性化を是正し得る化合物を、スクリーニングする為の評価系が存在していない。化合物スクリーニングシステムを構築し、ACH の新たな治療薬を開発する為には、その病態に関する更なる知見が求められる。

現在急速に研究が進められている分野として、人工多能性幹細胞 (Induced Pluripotent Stem cell; iPS 細胞) が挙げられる。iPS 細胞は 2006 年に高

橋、山中がマウス線維芽細胞より樹立した、三胚葉系の細胞への分化能を持った細胞で、2007年にはヒト細胞からの樹立報告が報告された [19、20]。iPS 細胞以外の幹細胞としては、間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem Cell; MSC)、胚性幹細胞 (Embryonic Stem cell; ES 細胞) が代表例として挙げられるが、MSC は間葉系以外の細胞には分化できない点、ES 細胞は胚盤胞の内部細胞塊に由来するため、ヒト ES 細胞を樹立する際に倫理的問題が生じてしまう点で、研究への応用に制限が掛かる。一方、iPS 細胞は多能性の細胞であることに加え、皮膚の線維芽細胞などから樹立が可能な為、細胞を作製する上での倫理的問題は少ない。

これらの特長から、再生医療領域での用途に加え、iPS 細胞は疾患病態の解明、創薬研究にも適用されている [17、21]。特定の疾患の患者から疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、同細胞に分化誘導を施す事で、その疾患の性質を反映した組織細胞および、分化途中の細胞を取得することができる。これらの細胞

と、コントロールとなる細胞とを比較することで、異常がどの分化段階で発現するか解析可能であると共に、治療薬候補化合物を細胞に投与し、その反応性を評価することが出来る。

iPS 細胞を用いた ACH の病態に関する先行研究として、京都大学の山下らのグループの報告があり [17]、同報告では患者由来の疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、樹立した細胞の軟骨細胞への分化誘導実験を通じて、スタチンの有用性を示している。ただし、ACH の検討に関しては、in-vitro での分化誘導でプロテオグリカンの蓄積を観察しているのみで、各分化段階における詳細な検討はなされていなかった。

このような iPS 細胞を用いた病態研究を進めるにあたり、疾患特異的 iPS 細胞をどのように入手するかが、最初の課題となる。iPS 細胞は皮膚などの採取が容易な組織から樹立が可能である為、その疾患に罹患した患者より組織を採取する事が第一に考えられるが、希少疾患の場合など検体を採取することが

困難なケースも想定される。

同問題を解決する手段の一つとして、疾患モデル細胞をゲノム編集によって人工的に作成する事が挙げられる。近年発展しているゲノム編集技術には clustered regularly interspaced palindromic repeat (CRISPR)/Cas9 や TAL effector nucleases (TALEN)、zinc finger nuclease (ZFN) システムといった手法があり、同手法はゲノム DNA の任意の遺伝子に、任意の塩基配列を挿入・欠失させる事が出来る。ゲノム編集技術の応用により、希少疾患でサンプルが手に入りづらい場合でも、原因となる遺伝子配列が判明していれば、疾患特異的細胞を樹立可能となった。

患者由来細胞およびゲノム編集にて樹立した細胞にはそれぞれの利点、欠点がある。実際の患者においては、診断されている遺伝子変異以外にも、プロモーターにおける反復配列の繰り返し数や、CpG island のメチル化などが、疾患のフェノタイプに影響を及ぼしている可能性がある [22、23、24]。故に、未

知の因子の影響も含めた病態解明や、そのような影響を及ぼす因子の探索、オーダーメイド医療の確立を目標とした研究には、患者由来の細胞の方が向いていると考えられるが、ある特定の異常の影響についての分子メカニズムを解析したい場合、研究ツールとして不向きである。

一方、ゲノム編集にて樹立した細胞については、同細胞に生じる異常を完全に把握できるため、本研究における「*FGFR3* 遺伝子変異の影響」といった、特定の異常による影響を分子レベルで解析する上で有用と言える。しかし ACH 治療薬候補化合物のスクリーニングにゲノム編集細胞を用いた場合、その化合物が *FGFR3* 遺伝子変異に与える効果は明確になるが、実際の患者における効果は上述のジェノミックあるいはエピジェノミックな要因に左右される可能性がある。

今回採用したゲノム編集は CRISPR/Cas9 システムである。同システムは原核生物の獲得免疫機構を応用したもので、任意の DNA 配列に相補的に結合す

るガイド RNA (gRNA) 及び、gRNA と複合体を形成し protospacer-adjacent motif (PAM) 配列上流で DNA 鎖を切断する Cas9 より構成されている [25]。

更に、切断された DNA が修復される際に鋳型として利用できる Oligo DNA を設計し、gRNA、Cas9 と共に遺伝子導入することで、相同組換えによる任意の塩基配列のノックインが可能となる [26]。TALEN システム、ZFN システム が標的遺伝子配列ごとに基質タンパク質を設計する必要があるのと比較して、CRISPR/Cas9 システムでは gRNA の配列を変更するだけで良いため [27、28]、CRISPR/Cas9 は実験への応用が比較的容易である。

本研究にて我々は、CRISPR/Cas9 システムを用い、ACH において最も高頻度に認められる *FGFR3* 遺伝子の一塩基置換 (1138G→A) を [29、30]、健常なヒト由来の iPS 細胞 (hiPS 細胞) へと導入し、ホモ変異が組み込まれた ACH モデル hiPS 細胞を樹立した。更に、ゲノム編集を施した hiPS 細胞の軟骨細胞への分化誘導実験を通じて、ACH の *FGFR3* シグナルの異常により障害を受

ける軟骨細胞の分化段階の特定を試みた。

## 方法

### 1. 1. *FGFR3* ゲノム編集 hiPS 細胞の樹立

*FGFR3* 遺伝子へ 1138G→A の変異を組み込んだ hiPS 細胞の樹立、ならびに細胞ストックの作製は株式会社リプロセル、タカラバイオ株式会社に外注した。

CRISPR/Cas9 を応用したゲノム編集により、hiPS 細胞 (HPS0002 253G1; RIKEN BRC) [31] の *FGFR3* 遺伝子へ 1138G→A の変異を組み込むため、gRNA プラスミド DNA と Oligo DNA を設計した (図 1)。gRNA プラスミド DNA、および Cas9 タンパク質発現プラスミド DNA をエレクトロポレーター NEPA21 (NEPAGENE) にて導入した細胞において、T7 エンドヌクレアーゼ I (T7E1) アッセイにより、gRNA と Cas9 が DNA を切断する活性を維持している事を確認した (図 2)。活性が確認できた gRNA プラスミド DNA と、Oligo DNA、Cas9 タンパク質発現プラスミド DNA を、hiPS 細胞にエレクトロポレーションで表



1 の条件にて共導入した。遺伝子導入された細胞は培養ディッシュ上に播種され、その後形成されたコロニーごとに、*FGFR3* ダイレクトシーケンスを行い、1138G→A の変異が正確に導入されているかどうか確認した。樹立したゲノム編集 hiPS 細胞を以後の実験のため、拡大培養の後ストックした。

## 1. 2. hiPS 細胞培養及び、軟骨分化誘導

樹立したゲノム編集 hiPS 細胞に、Oldershaw らが報告した論文 [32] を一部改変した方法で軟骨分化誘導を施した。

まず、hiPS 細胞をフィーダー細胞上で増殖培地 [DMEM F12 Gluta Max (GIBCO)、100 UNIT/ml ペニシリン/100  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン (Sigma)、20 % (vol/vol) knockout serum replacement (KSR; GIBCO)、1 % (vol/vol) nonessential amino acids (NEAA; Gibco)、55  $\mu$ M 2-mercaptoethanol (Sigma)、10 ng/ml FGF-2 (KAKEN)] にて培養した。

hiPS 細胞のフィーダー細胞として予め、マウス胚性線維芽細胞 (MEF) を胎

生 12 日の ICR マウス（日本クレア）から採取し、マイトマイシン C（Sigma）にて処理した。継代の際は CTK 溶液とセルスクレーパーにて hiPS 細胞を剥離し、フィーダー細胞上あるいは、フィーダーフリー培養用ディッシュ上に播種した。培地は毎日交換し、継代はおよそ 7 日に 2 回の頻度で行った。CTK 溶液の組成は 0.25 % (wt/vol) トリプシン (BD)、1 mg/ml Collagenase type IV (Gibco)、20 % (vol/vol) KSR (Gibco)、1 mM CaCl<sub>2</sub> (Wako) を PBS に溶解したもので、フィーダーフリー培養用ディッシュはヒト ES 細胞用 Matrigel (Corning) にてコーティングしたものを採用し、フィーダーフリー培地は STEM PRO hESC SFM (Invitrogen) を用いた。hiPS 細胞をフィーダーフリーに馴化させる為、同環境で 3 回以上継代した。ディッシュ上の細胞が 8 割以上コンフルエントになり次第（最終継代日から約 10 日後）、軟骨分化誘導を開始した。軟骨分化誘導は 14 日間の培地交換で達成される。分化誘導培地は以下の基本培地とサイトカインより構成されている。

基本培地の組成は DMEM F12 Gluta Max (Gibco)、1 % (vol/vol) ITS (Sigma)、10 % (vol/vol) B27 supplement (Gibco)、1 % (vol/vol) NEAA (Gibco)、50 UNIT/ml ペニシリン/50  $\mu$ g/ml ストレプトマイシン (Sigma)、89  $\mu$ M 2-Mercaptoethanol (Gibco) であり、サイトカインは WNT-3A (Peprro Tech)、Activin-A (Peprro Tech)、bFGF (Peprro Tech)、BMP-4 (Peprro Tech)、Follistatin (Peprro Tech)、GDF5 (PRO SPEC)、NT4 (Peprro Tech) を用い、表 2 で示した組み合わせで基本培地に添加した。先行論文に倣い、分化誘導開始日を Day 1 として、Day 4 の細胞を Stage 1 原条/中内胚葉、Day 9 を Stage 2 中胚葉、Day 14 を Stage 3 軟骨細胞と見なした [32]。

### 1. 3. mRNA 採取とリアルタイム PCR

未分化状態の hiPS 細胞 と分化誘導 Stage 1 の終了した Day 4、Stage 2 の終了した Day 9、そして Stage 3 の終了した Day 14 に、mRNA を Isogen (NIPPON GENE) で回収し、リアルタイム PCR にて *FGFR3*、*COL2A1*、*IHH*、*GAPDH*

の発現を検出した。

mRNA を PrimeScript RT-PCR kit (Perfect Real Time) にてコーディング DNA (cDNA) へと逆転写し、生成された cDNA に PCR を施すことでリアルタイム PCR 用のスタンダードを作製した。その後 cDNA を用い、Fast SYBR Green Maser Mix (Applied Biosystems) にてリアルタイム PCR を行った。遺伝子発現は *GAPDH* との相対比を算出して評価した。各遺伝子のプライマーの配列を表 3 にまとめた。

#### 1. 4. タンパク質採取と Western blotting

分化誘導 Stage 3 の Day 14 に、説明書通りの手順で、細胞溶解液 (m-PER, Thermo Fisher) にてタンパク質を回収した。

回収したタンパク質を 56.25  $\mu$ g/lane でゲルにロードした。SDS-PAGE により、タンパク質を展開し、PVDF メンブレン上に転写した後、一次抗体として抗 FGFR3 抗体 (abcam; ab137084、濃度 1:1000)、抗 p-ERK 抗体 (Cell

Signaling; #4370、濃度 1:2000)、抗 ERK 抗体 (Cell Signaling; #4695、濃度 1:1000)、抗 ACTIN 抗体 (Sigma; A2066、濃度 1:2000) と、二次抗体として HRP 標識抗ウサギ抗体 (Dako; P0448、濃度 1:2000) を反応させ、各タンパク質の発現あるいはリン酸化を検知した。また、ImageJ (National Institutes of Health) にて各バンドパターンを解析し、定量化した。FGFR3 と p-ERK のタンパク質濃度は、それぞれ ACTIN と ERK のタンパク質濃度で割ることで標準化した。

#### 1. 5. テラトーマアッセイ

8 週齢の雄の C.B-17/Icr-*scid/scid*Jcl マウス (SCID マウス) にゲノム編集 hiPS 細胞を移植した。SCID マウス 1 匹につき  $4.0 \times 10^5$  細胞をヒト ES 細胞用 Matrigel (Corning) に混和し、背部皮下に注入した。腫瘍の長径が 2 cm 程度まで増大した時点で移植したマウスを安楽死させ、腫瘍を摘出した。組織は 4 % (wt/vol) パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液 (Wako) にて固定し、

5  $\mu\text{m}$  の厚さでパラフィン切片を作製した。切片はヘマトキシリン・エオジン

(H. E.)、トルイジンブルー (T. B.) にて染色し、光学顕微鏡にて観察した。

## 結果

### 2. 1. ゲノム編集による *FGFR3* 変異 hiPS 細胞の樹立

ヒト *FGFR3* 遺伝子 (NM\_000142) に、ACH の原因となる G380R (1138G→A)

の一塩基置換が生じるように、gRNA、Oligo DNA を設計した。

次に gRNA、Cas9 を導入した際、実際に遺伝子が切断されるかどうかを確認する手法として、T7 エンドヌクレアーゼ I (T7E1) アッセイを行った。今回設計した gRNA と Cas9 を、hiPS 細胞にエレクトロポレーションにて遺伝子導入したところ DNA が切断され、同配列の修復過程で挿入・欠失といった変異に起因する、ミスマッチ塩基対が発生した事が分かった。

ACH 原因遺伝子を導入した hiPS 細胞を樹立する為、gRNA、Oligo DNA、Cas9 を hiPS 細胞に共導入して、95 個の細胞クローンを得た。得られたクローン 95 個それぞれに、*FGFR3* のダイレクトシーケンシングを行ったところ、#52 と #68 の 2 種類のクローンに 1138G→A のホモ変異が導入されたことが確認

された (図 3)。

## 2. 2. ゲノム編集細胞の特性

データを分析する上で、ゲノム編集処理が細胞特性に与える影響を除外する為、ゲノム編集を試みたが変異が組み込まれなかった細胞 [Mutation (-); ロット #60] をコントロール細胞として用いた。位相差顕微鏡所見より、コントロール細胞 (ロット #60) と Mutation (+) 細胞 (ロット #68 及び #52) (図 4 あるいは未記載データ) には明らかな形態学的な違いを認めなかった。

それぞれの細胞株はシングルコロニーに由来するものではあるが、必ずしもシングルクローンであることを意味するものではない。従って、培養を継続するにつれ、変異の無いクローンが優勢となっている可能性が危惧された。故に、ロット #52、#68 細胞 [Mutation (+)] をフィーダーフリーに馴化させた際に再度シーケンス解析をおこない、増殖した細胞は目的の変異を組み込んだ細胞に相当するかどうか、確認した (図 5; タカラバイオ株式会社へ外注)。



フィーダーフリー環境でのロット #52、#68 細胞においても ACH の原因となる *FGFR3* の一塩基置換が検出された。

## 2. 3. FGFR3 と下流シグナルの検討

*FGFR3* 遺伝子の変異が FGFR3 タンパク質の蓄積を引き起こす事が、先行研究にて報告されている [5]。

同学説を確認する為、我々が樹立したゲノム編集 hiPS 細胞に軟骨分化誘導を施し、検討を行った。分化誘導 Stage 3 の最終日 (Day 14; 軟骨細胞) に、タンパク質を採取し、Western blotting にて FGFR3、ACTIN、p-ERK、ERK のタンパク質濃度を検知・定量化し、比較検討した (図 6a)。Mutation (+) 細胞において FGFR3 タンパク質量と、ERK のリン酸化は Mutation (-) 細胞と比較して上昇しており、同所見は先行報告とも一致する [5、17]。

また、mRNA を未分化状態の hiPS 細胞 (P) および、分化誘導 Stage 1 (1) の終了した Day 4、Stage 2 (2) の終了した Day 9、そして Stage 3 (3) の

終了した Day 14 に採取し、リアルタイム RT-PCR にて *FGFR3* 遺伝子発現レベルを解析した (図 6b)。Mutation (-) 細胞において、軟骨成熟が進むにつれて *FGFR3* 発現が上昇するのに対し、Mutation (+) 細胞では Stage 3 での *FGFR3* 発現は減少していた。同様の現象がタナトフォリック骨異形成症 I 型 (TD1) でも報告されており [17]、同文献は、変異した *FGFR3* タンパク質の蓄積に起因するネガティブフィードバック機構が作用することで、*FGFR3* 遺伝子発現の抑制が生じる可能性を示唆している [17]。

#### 2. 4. 軟骨マーカー遺伝子に関する検討

ヒト *FGFR3* 遺伝子における 1138G→A の変異の軟骨分化に対する影響を検討するため、図 6b と同じ mRNA における早期軟骨マーカー遺伝子である *COL2A1* と後期軟骨マーカー遺伝子である *IHH* の発現レベルをリアルタイム RT-PCR にて解析した (図 7)。

*COL2A1* は Mutation (-)、Mutation (+) 細胞共に発現が上昇していた。一

方、Mutation (-) 細胞に認められた、Stage 3 での *IHH* 発現の上昇は、Mutation (+) 細胞においては抑制されていた。よって、Mutation (+) 細胞の前肥大軟骨細胞分化が障害されている事が示唆された。

## 2. 5. ゲノム編集 hiPS 細胞のテラトーマアッセイ

hiPS 細胞にゲノム編集を施して樹立した Mutation (-)、Mutation (+) 細胞を未分化の状態にマウスに移植し、テラトーマアッセイを行うことで、これらの細胞が iPS 細胞としての特性を維持している事を確認した。更に、テラトーマに形成された軟骨様組織を両群間で比較し、*FGFR3* 変異の軟骨組織への影響を分析した。

Mutation (-) あるいは、Mutation (+) 細胞を移植したマウスの両群共に、テラトーマが形成され (図 8 あるいは未記載データ)、今回ゲノム編集を施した細胞が三胚葉系の組織への分化能を有している事を、in-vivo にて確認できた。軟骨様組織については、Mutation (-) の組織と比較して、Mutation

(+) では小腔を有する細胞の密度が高く、前肥大軟骨細胞分化の障害を反映している事が示唆された (図 9)。

## 考察

今回我々は CRISPR/Cas9 システムにて *FGFR3* 遺伝子の 1138G→A のホモ変異が挿入された hiPS 細胞を樹立した。

ACH 患者において最も高頻度に見受けられるのが、*FGFR3* のヘテロ変異である事に対して [18、29]、ヒトにホモの同変異が挿入されると、実際には致死的な状態に陥るため [1]、ゲノム編集にて樹立した *FGFR3* ホモ変異導入細胞は、ヘテロ変異をもつ ACH 患者にみられる病態よりも、フェノタイプが強く発現している可能性がある事に留意しなくてはならない。ただ、より特徴が捉え易い点においては、本研究の軟骨分化誘導実験の様な in-vitro の解析に適した細胞だと言える。

また、CRISPR/Cas9 システムはオフターゲット領域への誤ったゲノム編集が行われるリスクが高いと言われているのだが [33]、一方で hiPS 細胞に対して CRISPR/Cas9 あるいは TALEN でゲノム編集を行った場合、両群の編集精度

は同等だったとの報告も存在している [34]。

本研究の実験データ（タンパク質解析データ）から推測された、ゲノム編集 hiPS 細胞のフェノタイプは、ACH モデル細胞を用いた先行研究の結果と、傾向が一致していた [5、17]。また、図 4 の *FGFR3* ゲノム編集細胞の顕微鏡所見から分かるように、コントロール細胞と変異が導入された細胞共に、形態学的には hiPS 細胞に類似していた為、樹立した *FGFR3* ゲノム編集細胞のオフターゲット領域に重大な変異は存在しないと判断した。更に、同細胞は三胚葉系への分化能を有していたことから（図 8）、iPS 細胞としての特性を持った細胞であると見なした。

ただ、本研究に更なる信頼性を増加させる手法としては、Whole-genome あるいは Whole-exome シークエンスによる、*FGFR3* 遺伝子領域以外の変異導入部位の確認が考慮される。

次に、本研究で参考にした Oldershaw らの報告した軟骨分化誘導法におい

て、同手法は Day 2～分化誘導終了まで、bFGF を培地に添加し続けている。

bFGF は細胞の生存率を上昇させるために用いられているのだが [32]、FGFR3 のリガンドの一つに相当する事や [2]、ACH の FGFR3 シグナルの異常はリガンド依存的であると言われていたことから [4]、分化誘導中の細胞に bFGF が影響を及ぼしている可能性は否めない。また、実験群、対照群の細胞共に、分化誘導中の全ての段階の細胞に FGFR3 タンパク質の発現は認められ、Stage 3 において実験群の方が対照群よりもタンパク質量は上昇していた (図 6a あるいは未記載データ)。今回の場合、bFGF が多く作用している事が考慮されるため、実験群である *FGFR3* 変異導入細胞において、特に Stage 3 の段階で、変異した受容体の影響が強くなり、ERK シグナルの異常な活性化が更に亢進されることで、変異のフェノタイプがより強調されている事が想定される。

続いて、FGFR3 と下流シグナルの検討の結果に関して、図 6 で示した通り、FGFR3 タンパク質量は分化誘導 Stage 3 の *FGFR3* 変異導入細胞にて増加した

一方で、同じ細胞における *FGFR3* 遺伝子の発現は低下していた。同データと類似した所見が、TD1 の病態研究に関する先行文献で報告されている [17]。

TD1 は ACH と同様に、*FGFR3* の機能獲得型変異を原因とし、より重篤な症状を呈する疾患である。先行報告 [17] と同じく、今回の結果からも *FGFR3* 遺伝子発現はネガティブフィードバック機構によって調節されている可能性が示唆された。

本研究の実験群と対照群の細胞は、CRISPR/Cas9 システムにより *FGFR3* ゲノム編集 hiPS 細胞を樹立し、*FGFR3* に 1138G→A の変異が正しく組み込まれた細胞； Mutation (+) cells と、*FGFR3* に変異が組み込まれなかった細胞； Mutation (-) cells (コントロール細胞) とした。よって、実験群と対照群の細胞における元となる細胞は同一の細胞となり、且つ両細胞群共に同一の処理が施されることから、細胞間の違いを比較することで、*FGFR3* 遺伝子変異の影響を高精度に分析する事が可能となる。



更に図 7 軟骨マーカー遺伝子に関する検討の分化誘導 Stage 3 において、*COL2A1* 遺伝子発現は両群ともに高発現であったが、*IHH* 遺伝子は同分化段階の *FGFR3* 変異導入群においてコントロール群と比較して低発現だった。*IHH* は前肥大軟骨期より発現する遺伝子である事から [35、36]、本所見より、変異導入細胞において前肥大軟骨細胞分化が障害されていると考えた。

ここで先行研究として、本結果とは反対の状態にあたる *Ihh* 遺伝子発現の亢進が、*Fgfr3* ノックアウトマウスの顎関節で生じ、同部位の軟骨のホメオスタシスが障害される事で、変形性関節症が惹起されたとの報告がある [37]。

他の論文では、*Fgfr3* ノックアウトマウスの成長板において ERK のリン酸化が減弱している事が示されており、加えて MAPK 阻害剤を用いた in-vitro で  
の検討にて、ERK シグナルの低下が *Ihh* 遺伝子発現を上昇させる事が示唆されている [38]。これら先行文献の内容をまとめると、*Fgfr3* タンパク質の蓄積が無い場合、ERK シグナルが低下し、*Ihh* 遺伝子発現は上昇することが分か

る。このように、*FGFR3* 遺伝子発現制御の乱れは *IHH* 発現の異常につながり、成長板軟骨の分化が障害される。故に、生理的な条件において、ネガティブフィードバック機構による *FGFR3* 遺伝子発現の制御が、*IHH* 遺伝子の発現量を適切に調節し、成長板軟骨の正常な分化に寄与している可能性がある。

テラトーマ軟骨様組織所見については、Mutation (+) の軟骨様組織は Mutation (-) と比較して細胞密度が高く、基質が少なくなっており、先行報告 [6] の ACH 胎児における、肥大軟骨層が短く、前肥大軟骨細胞層の形成が不良である所見と類似していた。

以上の結果より、*FGFR3* 変異導入細胞において、*IHH* 発現の上昇が抑制されていることから、前肥大軟骨細胞分化が障害されていると想定された事と、先行研究の、ACH 胎児の成長板において、肥大軟骨細胞層が短縮している所見との [6]、つながりを考察すると、*FGFR3* 遺伝子における 1138G→A の変異により前肥大軟骨細胞分化が障害されるため、ACH で見られる肥大軟骨細胞層の短縮

が発現すると想定された。

本研究で樹立した *FGFR3* ゲノム編集 hiPS 細胞に関する将来的な展望として、前肥大軟骨細胞をターゲットとする創薬研究への応用が考えられる。具体的には、軟骨分化誘導 Stage 3 の *FGFR3* 変異導入細胞に対し、抑制されている *IHH* 遺伝子発現を上昇させ、最終的に ACH の前肥大軟骨細胞分化を促進することが期待される、化合物のハイスループットスクリーニングシステムの構築を目指す。スクリーニングシステムが完成し治療薬候補化合物を選出できれば、それぞれの化合物について in-vitro での詳細な解析を行い、更に動物実験にて効能の評価及び、用量・用法の検討を経て臨床研究、臨床試験あるいは治験へと研究を進めていく道筋が考えられる。また、このような過程を経て開発する治療薬のうち、前肥大軟骨細胞の段階に選択的に作用し、他の分化段階の軟骨細胞には影響を及ぼさないものを選択することは重要である。本研究より、ACH においては前肥大軟骨細胞の段階に障害が発生すると示された事か

ら、同治療薬は ACH における障害を受けた軟骨細胞に対して特異的に作用することが予想され、高い効力を持ち、安全な用量で投与できると期待される。

## 結論

我々はゲノム編集により ACH モデル hiPS 細胞を樹立し、同細胞の軟骨細胞への分化誘導・解析を通じて、ACH の軟骨細胞における前肥大軟骨細胞の段階に、障害が発生することを示した。本研究で樹立した *FGFR3* ゲノム編集 hiPS 細胞は、ACH の分子的機構の分析及び、特定の分化段階の軟骨細胞に選択的に作用する薬剤開発に有用なツールとなり得る。

## 謝辞

まずは日々ご指導頂きました、指導教官である東京大学医学系研究科 外科学専攻 感覚・運動機能医学分野口腔外科学講座 教授 高戸 毅 先生、准教授 星 和人 先生、東京大学大学院医学系研究科 軟骨・骨再生医療寄附講座 特任准教授 足田 温彦 先生に心より御礼申し上げます。また、貴重なご意見・ご助言を頂きました、東京大学医学部附属病院 整形外科・脊椎外科 専任講師 斎藤 琢 先生、東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻 特任准教授 大庭 伸介 先生、軟骨・骨再生医療寄附講座、口腔外科学講座の皆様そして、本研究に携わっていただいた全ての皆様に感謝の意を表します。

HPS0002 253G1 は再生医療の実現化プロジェクトと文部科学省ナショナルバイオリソースプロジェクトを介して理研 BRC よりご提供頂きました [31]。また、ゲノム編集 hiPS 細胞を用いた動物実験は東京大学遺伝子組換え生物等委

員会にて承認されております（部局承認番号；38-4）。本研究は文部科学省科

学研究費補助金（MEXT, 15K15733）にご支援頂きました。

## 引用文献

[1] Horton WA, Hall JG, Hecht JT. Achondroplasia. *Lancet*. 370: 162-72. (2007).

[2] Laederich MB, Horton WA. FGFR3 targeting strategies for achondroplasia. *Expert Rev. Mol. Med.* 14: e11. (2012).

[3] Al-Saleem A, Al-Jobair A. Achondroplasia: Craniofacial manifestations and considerations in dental management. *Saudi Dent J.* 22: 195-9. (2010).

[4] Monsonigo-Ornan E, Adar R, Feferman T, Segev O, Yayon A. The transmembrane mutation G380R in fibroblast growth factor receptor 3 uncouples ligand-mediated receptor activation from down-regulation. *Mol Cell Biol.* 20: 516-22. (2000).

[5] Cho JY, Guo C, Torello M, Lunstrum GP, Iwata T, Deng C, Horton WA. Defective lysosomal targeting of activated fibroblast growth factor receptor 3 in achondroplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 609-14. (2004).

[6] Legeai-Mallet L, Benoist-Lasselin C, Munnich A, Bonaventure J. Overexpression of



FGFR3, Stat1, Stat5 and p21Cip1 correlates with phenotypic severity and defective chondrocyte differentiation in FGFR3-related chondrodysplasias. *Bone*. 34: 26-36.

(2004).

[7] Wang Y, Spatz MK, Kannan K, Hayk H, Avivi A, Gorivodsky M, Pines M, Yayon

A, Lonai P, Givol D. A mouse model for achondroplasia produced by targeting

fibroblast growth factor receptor 3. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96: 4455-60. (1999).

[8] Chilbule SK, Dutt V, Madhuri V. Limb lengthening in achondroplasia. *Indian J*

*Orthop*. 50: 397-405. (2016).

[9] Bosemani T, Orman G, Hergan B, Carson KA, Huisman TA, Poretti A.

Achondroplasia in children: correlation of ventriculomegaly, size of foramen magnum

and jugular foramina, and emissary vein enlargement. *Childs Nerv Syst*. 31(1): 129-33.

(2015).

[10] Keiper GL Jr, Koch B, Crone KR. Achondroplasia and cervicomedullary

compression: prospective evaluation and surgical treatment. *Pediatr Neurosurg.* 31: 78-83. (1999).

[11] Vleggeert-Lankamp C, Peul W. Surgical decompression of thoracic spinal stenosis in achondroplasia: indication and outcome. *J Neurosurg Spine.* 17: 164-72. (2012).

[12] Miccoli M, Bertelloni S, Massart F. Height Outcome of Recombinant Human Growth Hormone Treatment in Achondroplasia Children: A Meta-Analysis. *Horm Res Paediatr.* 86: 27-34. (2016).

[13] Lorget F, Kaci N, Peng J, Benoist-Lasselin C, Mugniery E, Oppeneer T, Wendt DJ, Bell SM, Bullens S, Bunting S, Tsuruda LS, O'Neill CA, Di Rocco F, Munnich A, Legeai-Mallet L. Evaluation of the therapeutic potential of a CNP analog in aFgfr3 mouse model recapitulating achondroplasia. *Am J Hum Genet.* 91: 1108-14. (2012).

[14] Wendt DJ, Dvorak-Ewell M, Bullens S, Lorget F, Bell SM, Peng J, Castillo S,

Aoyagi-Scharber M, O'Neill CA, Krejci P, Wilcox WR, Rimoin DL, Bunting S. Neutral endopeptidase-resistant C-type natriuretic peptide variant represents a new therapeutic approach for treatment of fibroblast growth factor receptor 3-related dwarfism. *J Pharmacol Exp Ther.* 353: 132-49. (2015).

[15] Matsushita M, Kitoh H, Ohkawara B, Mishima K, Kaneko H, Ito M, Masuda A, Ishiguro N, Ohno K. Meclozine facilitates proliferation and differentiation of chondrocytes by attenuating abnormally activated FGFR3 signaling in achondroplasia. *PLoS One.* 8: e81569. (2013).

[16] Matsushita M, Hasegawa S, Kitoh H, Mori K, Ohkawara B, Yasoda A, Masuda A, Ishiguro N, Ohno K. Meclozine promotes longitudinal skeletal growth in transgenic mice with achondroplasia carrying a gain-of-function mutation in the FGFR3 gene. *Endocrinology.* 156: 548-54. (2015).

[17] Yamashita A, Morioka M, Kishi H, Kimura T, Yahara Y, Okada M, Fujita K,

Sawai H, Ikegawa S, Tsumaki N. Statin treatment rescues FGFR3 skeletal dysplasia phenotypes. *Nature*. 513: 507-11. (2014).

[18] Klag KA, Horton WA. Advances in treatment of achondroplasia and osteoarthritis. *Hum Mol Genet*. 25: R2-8. (2016).

[19] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 126: 663-76. (2006).

[20] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 131: 861-72. (2007).

[21] Kondo T, Asai M, Tsukita K, Kutoku Y, Ohsawa Y, Sunada Y, Imamura K, Egawa N, Yahata N, Okita K, Takahashi K, Asaka I, Aoi T, Watanabe A, Watanabe K, Kadoya C, Nakano R, Watanabe D, Maruyama K, Hori O, Hibino S, Choshi T, Nakahata T, Hioki H, Kaneko T, Naitoh M, Yoshikawa K, Yamawaki S, Suzuki S, Hata R, Ueno S,

Seki T, Kobayashi K, Toda T, Murakami K, Irie K, Klein WL, Mori H, Asada T, Takahashi R, Iwata N, Yamanaka S, Inoue H. Modeling Alzheimer's disease with iPSCs reveals stress phenotypes associated with intracellular A $\beta$  and differential drug responsiveness. *Cell Stem Cell*. 12: 487-96. (2013).

[22] Faulkner GJ, Kimura Y, Daub CO, Wani S, Plessy C, Irvine KM, Schroder K, Cloonan N, Steptoe AL, Lassmann T, Waki K, Hornig N, Arakawa T, Takahashi H, Kawai J, Forrest AR, Suzuki H, Hayashizaki Y, Hume DA, Orlando V, Grimmond SM, Carninci P. The regulated retrotransposon transcriptome of mammalian cells. *Nat Genet*. 41: 563-71. (2009).

[23] Usami S, Kishimoto I, Saito Y, Harada M, Kuwahara K, Nakagawa Y, Nakanishi M, Yasuno S, Kangawa K, Nakao K. Association of CT dinucleotide repeat polymorphism in the 5'-flanking region of the guanylyl cyclase (GC)-A gene with essential hypertension in the Japanese. *Hypertens Res*. 31: 89-96. (2008).

[24] Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16: 6-21.

(2002).

[25] Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM.

RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* 339: 823-6. (2013).

[26] Yoshimi K, Kaneko T, Voigt B, Mashimo T. Allele-specific genome editing and

correction of disease-associated phenotypes in rats using the CRISPR-Cas platform. *Nat*

*Commun.* 5: 4240. (2014).

[27] Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome

engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* 346: 1258096. (2014).

[28] Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based

methods for genome engineering. *Trends Biotechnol.* 31: 397-405. (2013).

[29] Foldynova-Trantirkova S, Wilcox WR, Krejci P. Sixteen years and counting: the

current understanding of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) signaling in

skeletal dysplasias. *Hum Mutat.* 33: 29-41. (2012).

[30] Passos-Bueno MR, Wilcox WR, Jabs EW, Sertié AL, Alonso LG, Kitch H.

Clinical spectrum of fibroblast growth factor receptor mutations. *Hum Mutat.* 14: 115-25. (1999).

[31] Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K,

Mochizuki Y, Takizawa N, Yamanaka S. Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts. *Nat Biotechnol.* 26: 101-6. (2008).

[32] Oldershaw RA, Baxter MA, Lowe ET, Bates N, Grady LM, Soncin F, Brison DR,

Hardingham TE, Kimber SJ. Directed differentiation of human embryonic stem cells toward chondrocytes. *Nat Biotechnol.* 28: 1187-94. (2010).

[33] Sakuma T, Masaki K, Abe-Chayama H, Mochida K, Yamamoto T, Chayama K.

Highly multiplexed CRISPR-Cas9-nuclease and Cas9-nickase vectors for inactivation of hepatitis B virus. *Genes Cells.* 21: 1253-1262. (2016).

[34] Smith C, Gore A, Yan W, Abalde-Atristain L, Li Z, He C, Wang Y, Brodsky RA, Zhang K, Cheng L, Ye Z. Whole-genome sequencing analysis reveals high specificity of CRISPR/Cas9 and TALEN-based genome editing in human iPSCs. *Cell Stem Cell*. 15: 12-3. (2014).

[35] Kozhemyakina E, Lassar AB, Zelzer E. A pathway to bone: signaling molecules and transcription factors involved in chondrocyte development and maturation. *Development*. 142: 817-31. (2015).

[36] de Frutos CA, Vega S, Manzanares M, Flores JM, Huertas H, Martínez-Frías ML, Nieto MA. Snail1 is a transcriptional effector of FGFR3 signaling during chondrogenesis and achondroplasias. *Dev Cell*. 13: 872-83. (2007).

[37] Zhou S, Xie Y, Li W, Huang J, Wang Z, Tang J, Xu W, Sun X, Tan Q, Huang S, Luo F, Xu M, Wang J, Wu T, Chen L, Chen H, Su N, Du X, Shen Y, Chen L. Conditional Deletion of Fgfr3 in Chondrocytes leads to Osteoarthritis-like Defects in



Temporomandibular Joint of Adult Mice. *Sci Rep.* 6: 24039. (2016).

[38] Zhou S, Xie Y, Tang J, Huang J, Huang Q, Xu W, Wang Z, Luo F, Wang Q, Chen

H, Du X, Shen Y, Chen D, Chen L. FGFR3 Deficiency Causes Multiple Chondroma-

like Lesions by Upregulating Hedgehog Signaling. *PLoS Genet.* 11: e1005214. (2015).

## 図・表と説明

Homo sapiens fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3),  
transcript variant 1, mRNA.  
NM\_000142

1261 GGAGTACACC TGCCTGGCGG GCAATTCTAT TGGGTTTTCT CATCACTCTG CGTGGCTGGT  
1321 GGTGCTGCCA GCCGAGGAGG AGCTGGTGA GGCTGACGAG GCGGGCAGTG TGTATGCAGG  
1381 CATCCTCAGC TAGGGGTGGG CTTCTTCTCT GTTCATCCTG GTGGTGGCGG CTGTGACGCT  
1441 CTGCCGCCTG CGCACCCCC CCAAGAAAGG CCTGGGCTCC CCCACCGTGC ACAAGATCTC  
1501 CCGCTTCCCG CTCAAGCGAC AGGTGTCCCT GGAGTCCAAC GCGTCCATGA GCTCCAACAC

Gly (GGG) → Arg (AGG); Achondroplasia-causing mutation

Oligo DNA  
5'- CCGCCACCACCAGGATGAACAGGAAGAAGCCCCACCTGTAGCTGAGGATGCCTGCATACACACTGCCCGCCT -3'

### 図1 gRNA と Oligo DNA の設計

gRNA の標的領域(黄色マーカー)、ACH の原因となる点変異(赤点線四角)、  
Oligo DNA と相補的な RNA 鎖 (青下線) を示した。

T7 endonuclease I assay (T7E1 assay)

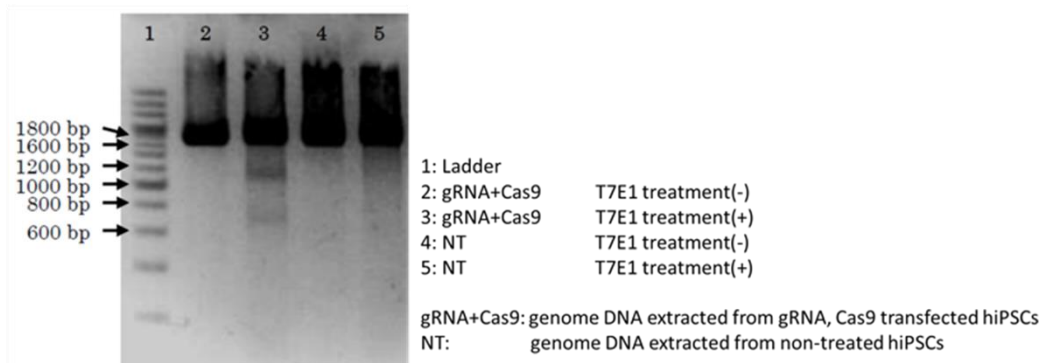


図2 T7 エンドヌクレアーゼ I アッセイ (T7E1 アッセイ) の結果

エレクトロポレーションによって細胞内に導入した gRNA と Cas9 が、DNA を切断する活性を維持している事を確認した。



図3 ロット #52、#68 細胞の *FGFR3* ダイレクトシーケンス結果

グアニンからアデニンへのホモ変異が組み込まれた 2 種類の細胞株のシーケンスデータ。

点変異挿入部位（網掛け部分）周辺領域の塩基配列及び、その拡大像（赤四角）を示す。

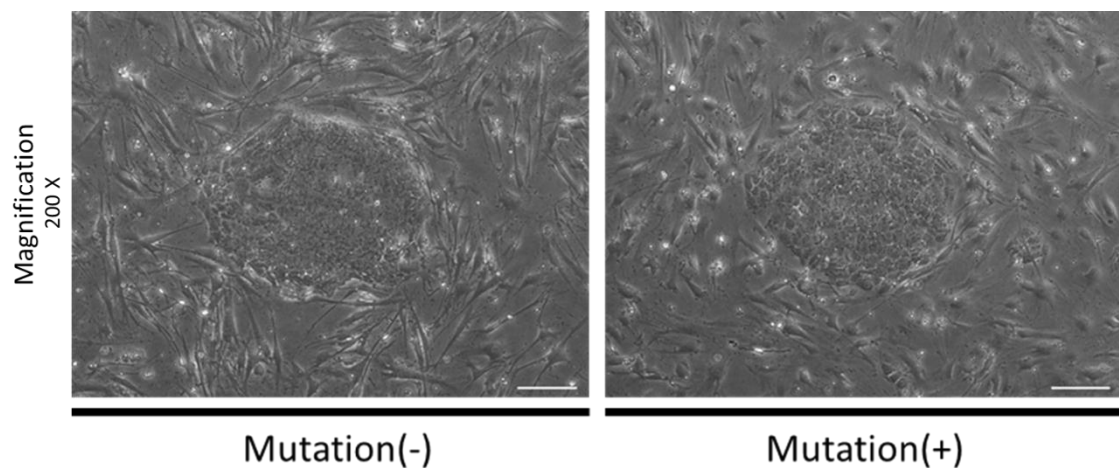


図4 ゲノム編集 hiPS 細胞の位相差顕微鏡像; *FGFR3* 変異の有無で細胞の形態に明瞭な違いは生じない。

ゲノム編集により *FGFR3* 遺伝子に目的の変異が正しく組み込まれた hiPS 細胞 [Mutation (+)]; ロット #68 細胞及び、ゲノム編集を施したが目的の変異が組み込まれなかった hiPS 細胞 [*FGFR3* の塩基配列は正常; Mutation (-)]; ロット #60 細胞 を撮影した。写真のロット #60、#68 細胞は形態的な評価で未分化状態であり、フィーダー細胞 (MEF) 上で培養中のもの。Scale bars = 200  $\mu$ m.

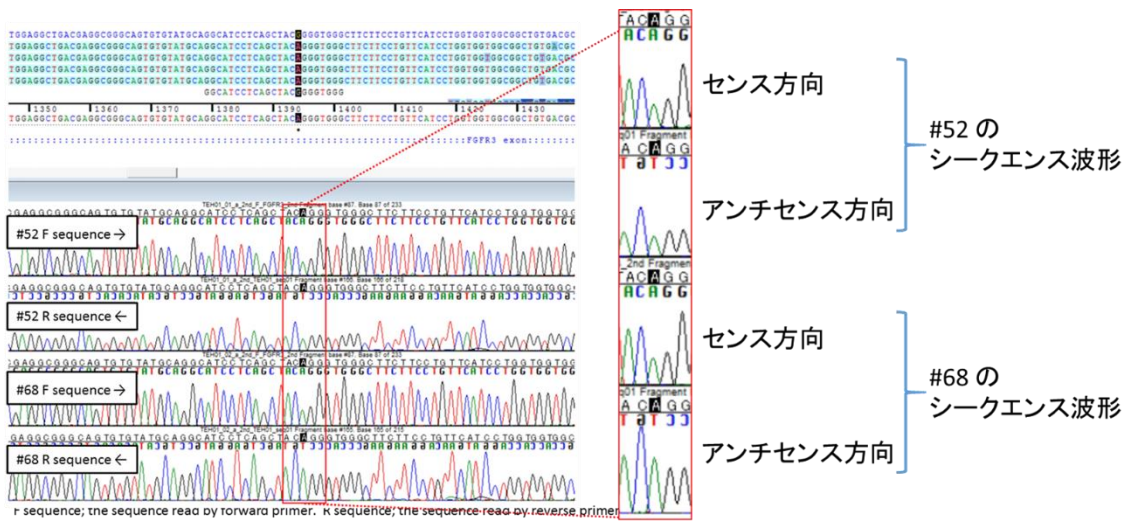


図5 フィーダーフリーに馴化した変異導入細胞のシーケンス解析結果

フィーダーフリー環境に馴化したロット #52、#68 細胞にも、1138 位のグアニンからアデニンへのホモ変異の存在が確認された。

点変異挿入部位（網掛け部分）周辺領域の塩基配列・シーケンス波形及び、それらの拡大像（赤四角）を示す。

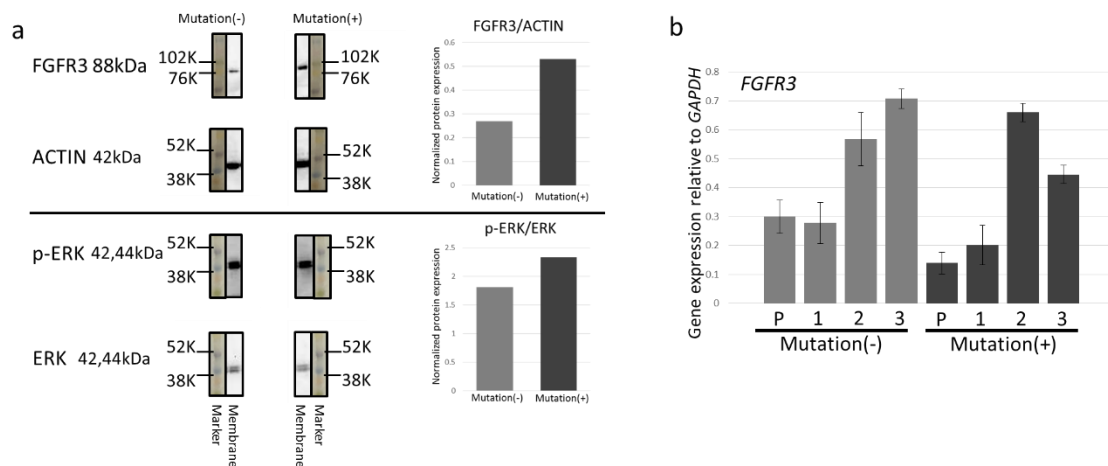


図 6 FGFR3 と下流シグナルの検討; Stage 3 変異導入細胞で FGFR3 タンパク質量が上昇した一方、*FGFR3* 遺伝子発現は低下した。

(a) Western blotting にて FGFR3、ACTIN、p-ERK、ERK のタンパク質量を検知した。ゲノム編集により *FGFR3* 遺伝子に目的の変異が正しく組み込まれた hiPS 細胞 [Mutation (+)]; ロット #68 細胞と、ゲノム編集を施したが目的の変異が組み込まれなかった hiPS 細胞 [*FGFR3* の塩基配列は正常; Mutation (-)]; ロット #60 細胞において、分化誘導 Stage 3 の Day 14 にタンパク質を採取し、56.25  $\mu$ g/lane でゲルにロードした。バンドパターンは Image J にて解析し、定量化した。FGFR3 と p-ERK のタンパク質濃度はそれぞれ ACTIN と ERK のタンパク質濃度で割ることで算出した。

(b) リアルタイム RT-PCR にて *FGFR3* 遺伝子発現レベルを解析した。Mutation (+); ロット #68 細胞と Mutation (-); ロット #60 細胞を使用し、未分化状態の hiPS 細胞 (P) および、分化誘導 Stage 1 (1) の終了した

Day 4、Stage 2 (2) の終了した Day 9、そして Stage 3 (3) の終了した Day 14 に mRNA を回収した。遺伝子発現量はコピーナンバーにて算出し、*GAPDH* の発現値で補正した。代表所見を提示。Error bars; mean  $\pm$  S.D. (同一プレート上、3 well のデータより算出)



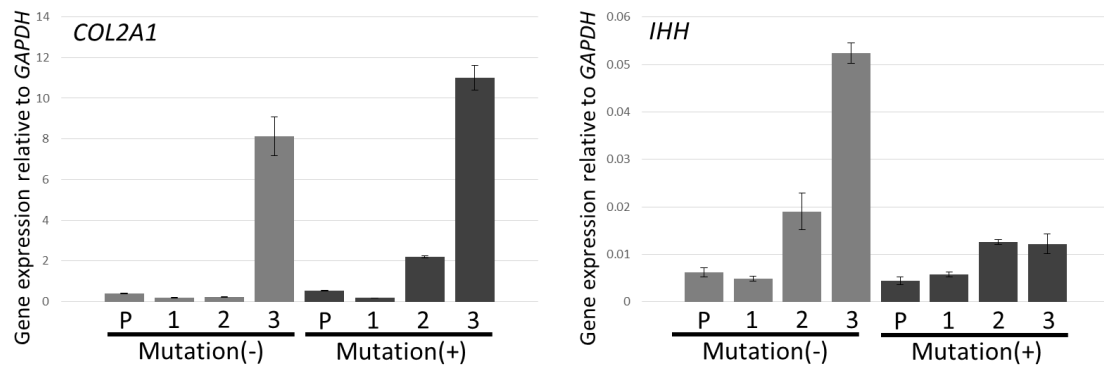


図7 軟骨マーカー遺伝子に関する検討; 変異導入細胞では Stage 3 における *IHH* 発現の上昇が抑制されていた。

リアルタイム RT-PCR にて *COL2A1*、*IHH* 遺伝子の発現レベルを解析した。ゲノム編集により *FGFR3* 遺伝子に目的の変異が正しく組み込まれた hiPS 細胞 [Mutation (+)]; ロット #68 細胞と、ゲノム編集を施したが目的の変異が組み込まれなかった hiPS 細胞 [*FGFR3* の塩基配列は正常; Mutation (-)]; ロット #60 細胞を使用し、未分化状態の hiPS 細胞 (P) および、分化誘導 Stage 1 (1) の終了した Day 4、Stage 2 (2) の終了した Day 9、そして Stage 3 (3) の終了した Day 14 に mRNA を回収した。遺伝子発現量はコピーナンバーにて算出し、*GAPDH* の発現値で補正した。代表所見を提示。Error bars; mean  $\pm$  S.D. (同一プレート上、3 well のデータより算出)

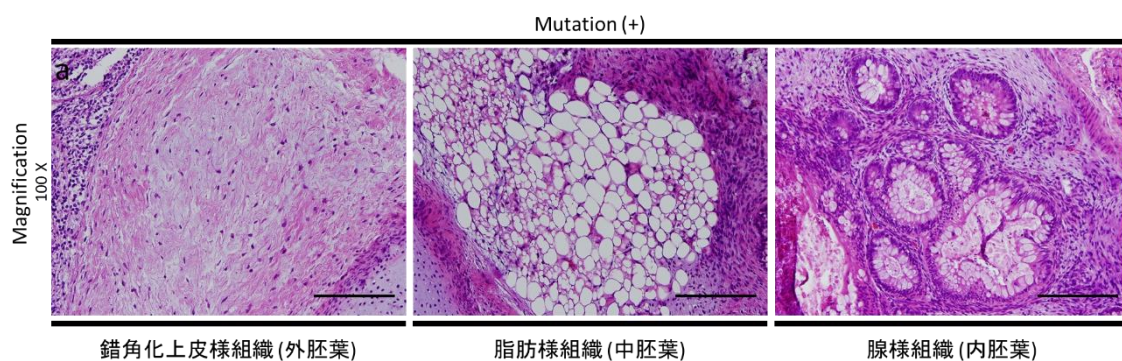


図 8 ゲノム編集 hiPS 細胞由来テラトーマにおける三胚葉系の組織像

マウスの背部皮下に形成されたテラトーマに含まれる、三胚葉系の組織の H.E. 染色像を示す。本所見は、ゲノム編集により *FGFR3* 遺伝子に目的の変異が正しく組み込まれた hiPS 細胞；ロット #52 細胞由来のテラトーマで、移植後 31 週 6 日で摘出したもの [Mutation (+)]。Scale bars = 200  $\mu$ m.

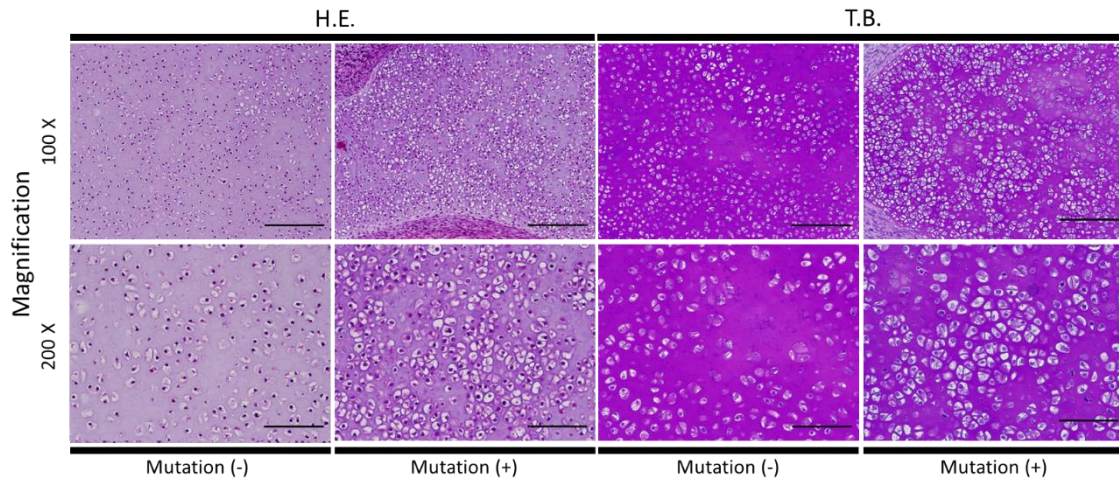


図9 ゲノム編集 hiPS 細胞由来テラトーマに形成された軟骨様組織の比較； Mutation (+) では小腔を有する細胞の密度が高く、前肥大軟骨細胞分化の障害を反映している事が示唆された。

ゲノム編集 hiPS 細胞由来テラトーマに含まれる、軟骨様組織の H.E. 染色、T.B. 染色像を示す。ゲノム編集により *FGFR3* 遺伝子に目的の変異が正しく組み込まれた hiPS 細胞；ロット #68 細胞由来のテラトーマで、移植後 23 週 2 日で摘出したもの [Mutation (+)] と、ゲノム編集を施したが目的の変異が組み込まれなかった hiPS 細胞；ロット #60 細胞由来のテラトーマで、移植後 24 週 2 日で摘出したもの [*FGFR3* の塩基配列は正常；Mutation (-)] とを比較した。Scale bars = 200  $\mu$ m in 100 X figures, 100  $\mu$ m in 200 X figures.

設定値											
Poring pulse						Transfer pulse					
電圧 (V)	パルス幅 (ms)	パルス間隔 (ms)	回数	減衰率 (%)	極性	電圧 (V)	パルス幅 (ms)	パルス間隔 (ms)	回数	減衰率 (%)	極性
125	5	50	2	10	+	20	50	50	5	40	+/-

表 1 hiPS 細胞へのエレクトロポレーション (NEPA21) の設定

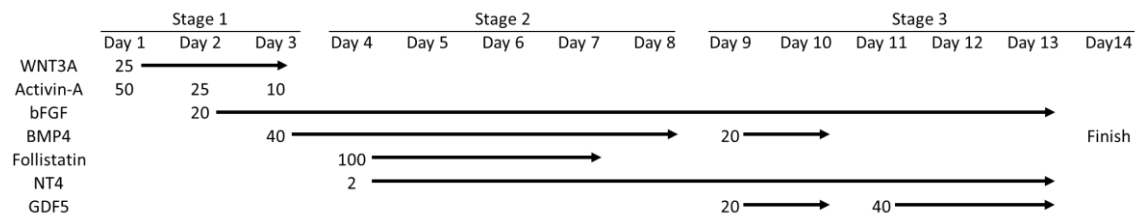


表 2 軟骨分化誘導培地のサイトカイン組成 Unit: ng/ml

Target		Sequence (5'→3')	Product Size (bp)
<i>FGFR3</i>	F	GCACACCCTACGTTACCGTG	202
	R	GCCTCGTCAGCCTCCACCAG	
<i>COL2A1</i>	F	GGCAATAGCAGGTTACGTACA	79
	R	CGATAACAGTCTTGCCCCACTT	
<i>IHH</i>	F	TCAGCGATGTGCTCATTTC	298
	R	ACCAGTGTCCCATGCTTTGT	
<i>GAPDH</i>	F	ATGGGGAAGGTGAAGGTCG	70
	R	TAAAAGCAGCCCTGGTGACC	

表 3 プライマーの設計; *FGFR3*, *COL2A1*, *IHH*, *GAPDH*