

## 審査結果の要旨

報告番号	甲 第 1310 号	氏名	中村 剛之
審査担当者	主査	山本 健	(印)
	副主査	秋篠 純	(印)
	副主査	古賀浩徳	(印)
主論文題目： Successful correction of factor V deficiency of patient-derived iPSCs by CRISPR/Cas9-mediated gene editing (CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集による先天性第 V 因子欠乏症患者由来 iPSC 細胞の遺伝子修復)			

### 審査結果の要旨 (意見)

本研究では、まず第 V 因子欠乏症患者末梢血単核球細胞から iPSC 細胞が樹立され、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により、第 V 因子遺伝子変異の修復に成功している。さらに、患者由来 iPSC 細胞および遺伝子修復 iPSC 細胞を *in vitro* で肝細胞様細胞 (iPS-HLCs) に分化誘導し、培地上清中に第 V 因子抗原ならびに活性を確認した。第 V 因子欠乏症の遺伝子治療の一つとして、ウイルスベクターによる正常遺伝子の導入が考えられるが、技術的な制約がある。本研究が、遺伝子編集によって病的変異部位のみを修復し、活性のある第 V 因子の産生に至ったことは、ゲノム編集技術を応用した、第 V 因子欠乏症に対する革新的治療法を提示することに繋がり、本学の学位論文として適格であると判断した。

### 論文要旨

先天性第 V 因子欠乏症は単一遺伝子疾患で、遺伝子治療の有効性が期待される。ゲノム編集技術の治療応用の可能性を検討する目的で、我々は第 V 因子欠乏症患者から iPSC 細胞を樹立し、CRISPR/Cas9 を用い、第 V 因子遺伝子変異を修復した。患者の末梢血単核球細胞に山中因子を導入することでリプログラミングさせ、樹立した iPSC 細胞に Cas9、guide RNA および修復配列を含むベクターを電気穿孔法により共導入し、遺伝子修復 iPSC 細胞を獲得した。患者由来 iPSC 細胞および遺伝子修復 iPSC 細胞を *in vitro* で肝細胞様細胞 (iPS-HLCs) に分化誘導し、濃縮した培地上清中の第 V 因子抗原、活性を測定したところ、患者由来 iPS-HLCs ではいずれも検出感度以下であったが、遺伝子修復 iPS-HLCs における第 V 因子抗原は  $67.0 \pm 13.1$  ng/ml、第 V 因子比活性は  $173.2 \pm 41.1$  U/mg であった。我々は CRISPR/Cas9 により第 V 因子遺伝子変異の修復に成功し、遺伝子修復 iPS-HLCs を用い第 V 因子活性の回復を確認した。遺伝子修復 iPSC 細胞は病態生理の解明や遺伝子治療にとって有望である。