

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04321

研究課題名(和文) 分裂期チェックポイントを利用した21トリソミー治療法の開発

研究課題名(英文) Rescue of 21 trisomy in Down syndrome cells using spindle assembly checkpoint

研究代表者

松浦 伸也 (Matsuura, Shinya)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：90274133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で、ダウン症細胞に染色体不安定性を誘導して過剰21番染色体を正常化する計画を立てた。ダウン症細胞にBubR1 siRNA導入したところ、多彩異数性モザイクの病態が再現されたが、今のところ過剰21番染色体のみ正常化した細胞クローンは得られなかった。今後は、単離する細胞クローンの数を増やすことで、過剰21番染色体のみ喪失した細胞クローンの樹立する予定である。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to normalize 21 trisomy in Down's syndrome cells by induction of chromosome instability. We transfected BubR1 siRNA into Down's syndrome cells and analyzed their karyotypes. Cellular phenotype of mosaic variegated aneuploidy was observed, but a cell clone in which excessive chromosome 21 was normalized was not yet obtained. We will establish such cell clones that lost only excessive chromosome 21 by increasing the number of isolated cell clones.

研究分野：人類遺伝学

キーワード：染色体 細胞周期チェックポイント

## 1. 研究開始当初の背景

ダウン症は、特異顔貌と乳児期の哺乳力低下、さらに先天性心疾患や白血病など多くの全身性合併症を特徴とする。早期療養と適切な健康管理により予後は大きく改善したが、異常染色体を根本的に治療する方法は未だ知られていない。そうしたなか、培養細胞レベルで過剰21番染色体を正常化する手法が報告されて注目を集めている (Li et al. *Cell Stem Cell* 2012; Jiang et al. *Nature* 2013)。これらは、ダウン症の根治療法に繋がる画期的なアプローチとして評価された。しかし、いずれも外来遺伝子をゲノムに組み込む手法であるため、予期しない遺伝情報の改変を引き起こすリスクが懸念され、より安全な手法の開発が求められている。

申請者らは、染色体数の不安定性を特徴とする PCS (MVA) 症候群について研究を進めてきた。多彩異数性モザイク (MVA) の病態がトリソミー治療法に利用できるとの着想を得て、ダウン症細胞の過剰21番染色体を正常化させる本研究計画を立案した。

## 2. 研究の目的

本研究では、ダウン症の iPS 細胞で *BubR1* siRNA により分裂期チェックポイントを一過性に阻害して、ダウン症細胞に MVA を誘導する。得られた細胞を多数分離して、過剰21番染色体のみ喪失した細胞クローンを選別することを目的としている。

## 3. 研究の方法

ダウン症の皮膚線維芽細胞から iPS 細胞を樹立する。同時に健常者 iPS 細胞を入手して *BubR1* siRNA によるノックダウンを行ってトリソミー治療法のプロトコルを検討する。

## 4. 研究成果

### 1) ダウン症の iPS 細胞の樹立

ダウン症の皮膚線維芽細胞に OCT3/4、SOX2、KLF4、L-Myc、LIN28、p53-shRNA 発現用エピソーマルベクターを電気穿孔法で細胞に導入して、MMC で処理した SNL フィーダー細胞上で培養して、約3週間後に形成する細胞コロニーを単離した。樹立した iPS 細胞4クローンの核型を調べたところ、興味深いことに4クローン中1クローンは21トリソミーが正常核型に変化していた。

### 2) *BubR1* siRNA による過剰染色体の喪失

健常者 iPS 細胞を入手して、*BubR1* siRNA をリポフェクション法で導入してコロニーを形成させた。細胞コロニーを単離して96

穴プレートで培養を継続し、各細胞クローンについて、Gバンド法で染色体核型を調べた。その結果、得られた細胞クローンは、様々な種類のモノソミーやトリソミー、ダブルトリソミーを有しており、PCS (MVA) 症候群の病態が再現された。しかしながら、過剰21番染色体が正常化した細胞クローンは得られたが他の染色体のモノソミーも伴っており、今のところ、過剰21番染色体のみが正常化した細胞クローンは得られていない。

### 3) ライブセルイメージングを用いた21番染色体の解析

21番染色体の特定の遺伝子を標的とする CRISPR/Cas9 を作成して GFP と連結して細胞に導入した。21番染色体認識 dCas9-GFP と *BubR1* siRNA を共導入することにより21番染色体がリアルタイムで追跡できることを確認した。

### 4) 考察

*BubR1* siRNA 導入によりダウン症細胞で、多彩異数性モザイクの病態が再現された。しかしながら、過剰21番染色体のみダイソミーに変化した細胞クローンは今のところ樹立できていない。今後は、単離する細胞クローンの数を増やすことで、過剰21番染色体のみ喪失した細胞クローンの樹立を目指したい。

一方、ダウン症の皮膚線維芽細胞をリプログラミングするだけで、21トリソミーが正常に変化した iPS 細胞クローンが樹立された。最近、ダウン症の線維芽細胞を iPS 細胞にリプログラミングするだけで、核型が正常な細胞が一定の割合で樹立されることが報告された (Hirota et al, *Science* 2017)。すなわち、細胞のリプログラムが染色体異常を正常核型に誘導するメカニズムの存在が示唆された。今後は21トリソミーがダイソミーに変化するメカニズムを、本研究で作製したライブセルイメージング法を活用して明らかにしていきたい。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

1. Miyamoto T, Akutsu SN, Matsuura S. Updated summary of genome editing technology in human cultured cells linked to human genetics studies. *J Hum Genet* 査読有 63(2):133-143, 2018
2. Miyamoto T, Akutsu SN, Tauchi H, Kudo Y, Tashiro S, Yamamoto T, Matsuura S. Exploration of genetic basis underlying

- individual differences in radiosensitivity with human populations using genome editing technology. *J Rad Res* 査読有 59(Suppl\_2):ii75-ii82, 2018
3. Miyamoto T, Akutsu SN, Fukumitsu A, Morino H, Masatsuna Y, Hosoba K, Kawakami H, Yamamoto T, Shimizu K, Ohashi H, Matsuura S. PLK1-mediated phosphorylation of WDR62/MCPH2 ensures proper mitotic spindle orientation. *Hum Mol Genet* 査読有26(22):4429-4440, 2017
  4. Nagashima H, Shiraishi K, Ohkawa S, Sakamoto Y, Komatsu K, Matsuura S, Tachibana A, Tauchi H. Induction of somatic mutations by low-dose X-rays: the challenge in recognizing radiation-induced events. *J Radiat Res* 査読有 19:1-7, 2017
  5. Royba E, Miyamoto T, Natsuko Akutsu S, Hosoba K, Tauchi H, Kudo Y, Tashiro S, Yamamoto T, Matsuura S. Evaluation of ATM heterozygous mutations underlying individual differences in radiosensitivity using genome editing in human cultured cells. *Sci Rep* 査読有 20;7(1):5996, 2017
  6. Shimada K, Yanagisawa R, Kubota N, Hidaka E, Sakashita K, Ishii E, Matsuura S, Ogiso Y. Wilms tumor accompanied by premature chromatid separation. *Pediatr Blood Cancer* 査読有 64, e26255, 2017
  7. Takemoto A, Miyamoto T, Simono F, Kurogi N, Kurabayashi MS, Awazu A, Suzuki KT, Yamamoto T, Sakamoto N. Cilia play a role in breaking left-right symmetry of the sea urchin embryo. *Genes Cells* 査読有 21, 568-578, 2016
  8. Sasaki T, Hanisch FG, Deutzmann R, Sakai LY, Sakuma T, Miyamoto T, Yamamoto T, Hannappel E, Chu ML, Lanig H, von der Mark K. Functional consequence of fibulin-4 missense mutations associated with vascular and skeletal abnormalities and cutis laxa. *Matrix Biol* 査読有 56, 132-149, 2016
  9. Matsuura S, Royba E, Akutsu SN, Yanagihara H, Ochiai H, Kudo Y, Tashiro H, Miyamoto T. Analysis of individual differences in radiosensitivity using genome editing. *Ann ICRP* 査読有 45, 290-296, 2016
  10. Miyamoto T, Matsuura S. Ciliopathy in PCS (MVA) syndrome. *Oncotarget* 査読有 6, 24582-24583, 2015
- [学会発表](計 29 件)
1. Silvia Natsuko Akutsu, Tatsuo Miyamoto, Shinya Matsuura. Unravelling the pathological mechanisms of structure-chromosomal instability post IR in PCS(MVA) syndrome. The 7th International symposium of Phoenix Leader Education Program for Renaissance from Radiation Disaster (Hiroshima) February 27-28, 2018
  2. 宮本達雄 他 分裂期キナーゼ PLK1 による遺伝性小頭症原因遺伝子産物 WDR62 のリン酸化を介した細胞分裂軸安定化機構 第 60 回日本放射線影響学会(千葉)2017 年 10 月 25~28 日
  3. 宮本達雄 他 真性小頭症原因遺伝子産物 WDR62 による星状体微小管重合を介した細胞分裂軸制御 第 40 回日本分子生物学会年会(神戸)2017 年 12 月 6~8 日
  4. Tatsuo Miyamoto 他 PLK1-mediated phosphorylation of WDR62/MCPH2 is required for proper mitotic spindle orientation 第 75 回日本癌学会学術総会(横浜)2017 年 9 月 29~30 日
  5. Tatsuo Miyamoto, et al; Identification of ATM heterozygous mutations underlying individual differences in radiosensitivity using genome editing technology 日本人類遺伝学会第 62 回大会(神戸)2017 年 11 月 16~18 日
  6. Silvia Natsuko Akutsu 他 Trial for correction of trisomy 21 in a Down syndrome patient-derived induced pluripotent stem cells (iPSc) 日本人類遺伝学会第 62 回大会(神戸)2017 年 11 月 16~18 日
  7. Ekaterina Royba, et al; Genome editing technique as a useful tool for analysing individual differences of radiosensitivity. The 6th International symposium of Phoenix Leader Education Program for Renaissance from Radiation Disaster (Hiroshima) February 11-12, 2017
  8. 福満啓博 他 分裂期キナーゼ PLK1 による真性小頭症原因遺伝子産物 WDR62 のリ

- ン酸化を介した細胞分裂軸制御機構 第 39 回日本分子生物学会年会 (横浜) 2016 年 11 月 30~12 月 2 日
9. 宮本達雄 他 ゲノム編集技術を用いた放射線発がんリスクの個人差を規定する遺伝素因としての ATM ヘテロ遺伝子変異の同定 第 39 回日本分子生物学会年会 (横浜) 2016 年 11 月 30~12 月 2 日
  10. Kosuke Hosoba, et al; Generation of PCS(MVA) syndrome-mutation knock-in mice using CRISPR/Cas9 system and ssODN mediated genome editing technology 第 39 回日本分子生物学会年会 (横浜) 2016 年 11 月 30~12 月 2 日
  11. 宮本達雄 他 ATM ヘテロ遺伝子変異は放射線感受性個人差に寄与する 第 59 回日本放射線影響学会 (広島) 2016 年 10 月 26~28 日
  12. 柳原啓見 他 ゲノム編集法を用いた NBS1 SNP 導入細胞の作製と放射線感受性の評価 第 59 回日本放射線影響学会 (広島) 2016 年 10 月 26~28 日
  13. 福満啓博 他 遺伝性小頭症の原因遺伝子 WDR62 による細胞分裂軸制御機構 第 59 回日本放射線影響学会 (広島) 2016 年 10 月 26~28 日
  14. Shinya Matsuura, et al; *ATM* heterozygous mutations underlying individual differences in radiosensitivity in human populations. ASHG2016 (Vancouver) October 18-22, 2016
  15. Kosuke Hosoba, et al; Generation of PCS (MVA) syndrome mutation knock-in mice using CRISPR/Cas9-mediated genome editing technology. ASHG2016 (Vancouver)カナダ October 18-22, 2016
  16. Tatsuo Miyamoto, et al; A combined approach of exome sequencing and genome editing identified *WDR62/MCPH2* mutations in patients with primary microcephaly. ASHG2016 (Vancouver)カナダ October 18-22, 2016
  17. Tatsuo Miyamoto, et al; Effect of *ATM* heterozygous mutations on individual differences of radiosensitivity in human populations 第 75 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2016 年 10 月 6~8 日
  18. Shinya Matsuura, et al; Molecular basis of human BUBR1 deficiency, a central protein of the spindle assembly checkpoint 第 75 回日本癌学会学術総会 (横浜) 2016 年 10 月 6~8 日
  19. 宮本達雄 他 CRISPR/Cas9 システムと ssODN を用いた遺伝性小頭症モデル細胞の樹立 第 1 回日本ゲノム編集学会 (広島) 2016 年 9 月 6~7 日
  20. Shinya Matsuura; Current research of low dose radiation effects in Hiroshima. GAP related meeting between Hiroshima University and the University of Texas DM Anderson Cancer Center (Hiroshima) July 22-23, 2016
  21. Yoshinori Masatsuna, et al; *WDR62/MCPH2* mutations identified in patients with primary microcephaly by a combined approach of exome sequencing and genome editing technology. ICHG2016 (Kyoto) April 3-7, 2016
  22. Silvia Natsuko Akutsu, et al; Insufficiency of *BubR1* gene increases structure-chromosomal instability post ionizing radiation. The 5th International symposium of Phoenix Leader Education Program for Renaissance from Radiation Disaster (広島) 2016 年 2 月 13~14 日
  23. Ekaterina Royba, et al. Application of genome editing technology into radiation biology for understanding individual difference of radiosensitivity. The 5th International symposium of Phoenix Leader Education Program for Renaissance from Radiation Disaster (広島) 2016 年 2 月 13~14 日
  24. 政綱宜規 他 真性小頭症で同定された *WDR62/MCPH2* 遺伝子変異による細胞分裂軸制御不全 第 38 回日本分子生物学会年会 (神戸) 2015 年 12 月 1~3 日
  25. Shinya Matsuura, et al. Analysis of individual difference of radiosensitivity using genome-editing technique. The 3rd International Symposium on the System of Radiological Protection (ICRP 2015) (Korea) 2015 年 10 月 20~22 日
  26. Ekaterina Royba, et al. Custom-made system for estimation of individual difference of radiosensitivity 第 74 回日本癌学会学術総会 (名古屋) 2015 年 10 月 8~10 日
  27. 宮本達雄 他 真性小頭症で同定された *WDR62/MCPH2* 遺伝子変異とゲノム編集技

術を利用した疾患モデル細胞の作製 第  
60 回日本人類遺伝学会 (東京) 2015 年 10  
月 15~17 日

28. Tatsuo Miyamoto, et al. Inducible Cas9/CRISPR system as a tool to study DNA damage response. The 15th International Congress of Radiation Research (ICRR 2015) (京都) 2015 年 5 月 25~29 日
29. Hiromi Yanagihara, et al. Generation of SNP-knock-in cells using CRISPR/Cas9 system for elucidation of the effect on radiation sensitivity. The 15th International Congress of Radiation Research (ICRR 2015) (京都) 2015 年 5 月 25~29 日

〔図書〕(計 16 件)

1. 宮本達雄: 医学分野でのゲノム編集の利用 "ゲノム編集入門 山本卓 編" 裳華房 2016, pp184-203
2. 松浦伸也: Nijmegen染色体不安定症候群. 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ 2016, 36, 197-199
3. 松浦伸也: Fanconi貧血. 新先天奇形症候群アトラス 南江堂 2015, pp42-43
4. 松浦伸也: Roberts症候群. 新先天奇形症候群アトラス 南江堂 2015, pp44-45
5. 松浦伸也: Bloom症候群. 新先天奇形症候群アトラス 南江堂 2015, pp46-47
6. 松浦伸也: PCS症候群 / MVA症候群. 新先天奇形症候群アトラス 南江堂 2015, pp48-49
7. 松浦伸也: Rothmund-Thomson症候群. 新先天奇形症候群アトラス 南江堂 2015, pp51-52
8. 松浦伸也: 毛細血管拡張性運動失調症. 新先天奇形症候群アトラス 南江堂 2015, pp53-54
9. 松浦伸也: Hutchinson-Gilford症候群. 新先天奇形症候群アトラス 南江堂 2015, pp58-59
10. 松浦伸也: Cockayne症候群. 新先天奇形症候群アトラス 南江堂 2015, pp62-63
11. 松浦伸也: Werner症候群. 新先天奇形症候群アトラス 南江堂 2015, pp64-65
12. 松浦伸也: Neu-Laxova症候群. 新先天奇形症候群アトラス 南江堂 2015, pp128-129
13. 松浦伸也: COFS症候群. 新先天奇形症候群アトラス 南江堂 2015, pp214-215

14. 松浦伸也: 正常者の身長・体重・成長曲線. 新先天奇形症候群アトラス 南江堂 2015, pp470-473
15. 松浦伸也: 正常者の頭囲・眼間距離. 新先天奇形症候群アトラス 南江堂 2015, pp474-474
16. 松浦伸也: 中手骨・指節骨の長さ. 新先天奇形症候群アトラス 南江堂 2015, pp475-475

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

松浦 伸也 (MATSUURA SHINYA)  
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授  
研究者番号: 9 0 2 7 4 1 3 3

### (2)研究分担者

宮本 達雄 (MIYAMOTO TATSUO)  
広島大学・原爆放射線医科学研究所・講師  
研究者番号: 4 0 4 5 2 6 2 7

柳原 啓見 (YANAGIHARA HIROMI)  
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教  
研究者番号: 5 0 7 1 9 4 9 7  
(H28 年度まで)