

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15420

研究課題名(和文) revertant mosaicismに着目した遺伝性皮膚疾患治療システムの開発

研究課題名(英文) Establishments of the new forward genetic method using homologues recombination in human iPS cells

研究代表者

吉村 康秀 (Yoshimura, Yasuhide)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60263307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はヒト iPS細胞で、CRISPR/Cas9により染色体相同組換えを起こす系を、研究期間中に確立することができた。19番染色体に選択カセットを導入し、ブルーム遺伝子の発現を制御できるようにしたiPS細胞を樹立。その細胞株を用いてCRISPR/Cas9により染色体を切断したところ、切断点の近傍で相同組換えが生じてテロメアまでの領域においてLOHが起きていることをSNPを検定することにより確認した。さらに19番染色体で用いた選択カセットを導入したトランスポゾンベクターを作製、他の染色体でも機能することを確認した。今後、皮膚疾患に関連するiPS細胞株を得て、表記システムの樹立を達成したい。

研究成果の概要(英文)：In order to establish a forward genetic system in human iPS cells to identify the unknown mutation related skin disease, we introduced loss of heterogeneity (LOH) by inducing chromosomal crossing over, under Bloom syndrome gene (BLM) deficient condition. The Tet-off system was introduced into the BLM gene Under the control of BLM gene expression, we successfully identified clones with occurring chromosomal crossing over. By checking the SNP, we confirmed homogeneity. This indicated that this clone have occurred homologous recombination on these region. Using this system, we are trying to identify the unknown mutation in some iPS cell lines related skin disease.

研究分野：幹細胞生物学、遺伝学

キーワード：iPS細胞 revertant mosaicism 遺伝性皮膚疾患 CRISPR/Cas9 相同組換え

1. 研究開始当初の背景

表皮水疱症などで見られる revertant mosaicism では、変異のなくなった細胞の存在が確認されている。しかし、その発生のメカニズムは不明である。revertant 細胞を意図的に作る事ができれば、治療には最適であることは言うまでもない。我々は、以前にマウス ES 細胞において相同組換えを誘発する系を確立していた。我々は皮膚幹細胞における相同組換えによる revertant 細胞の生成の可能性を考えており、マウス ES の系をヒト iPS 細胞に応用し、さらにゲノム編集技術を用いて、“染色体上の狙った位置”で相同組換えを起し、意図的に revertant 細胞を作出する実験系の確立を考えた。この系は、同時に未知の病因因子の特定を可能とするため(図1参照)有用であると考えられる。

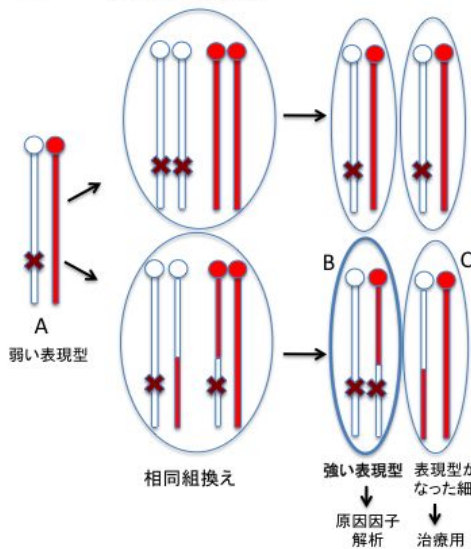
2. 研究の目的

このシステムを確立し、両アレルに変異を持っている細胞によって新規の病因因子を特定すると共に、治療に用いることのできる revertant 細胞を作出する新規システムの確立を本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) システムの概要

図1 通常の体細胞分裂



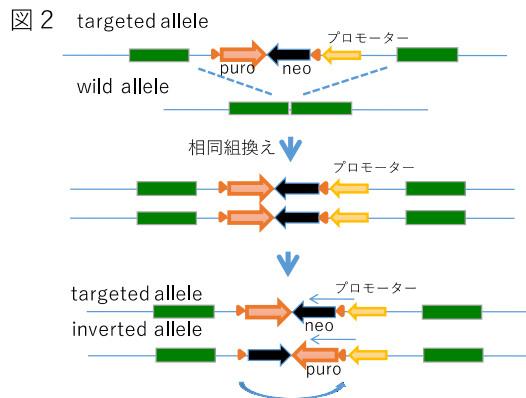
相同組換えで、変異をホモに持った細胞では、その表現型が強くなる事が期待され、元のヘテロの細胞との比較から表現型解析ができると考えられる(図1参照)。

また、同時に変異がなくなった細胞が生じており、これが意図的に作られた revertant 細胞であり、治療に使える可能性がある。

(2) 方法

【ターゲティングによるモデルシステム】ブルーム遺伝子の発現を Tet-off システムの導入で制御できるようにした iPS 細胞を

樹立。その細胞株において、19 番染色体の AAVS1 領域に G418/puromycin double selection cassette 選択カセットを導入し、相同組換えを起こした細胞のみを選択できるようにした(図2)。



【トランスポゾンベクターによるシステムのゲノムワイド化】

19 番染色体で用いた選択カセットを導入したトランスポゾンベクターを作製。1 細胞あたり 1 コピーのみが導入されたことを、ベクター上に設置したバーコードにより確認できるシステムを構築した。この際、父方・母方で同じ染色体にセレクションカセットが入った元株を用いて組わりクローンを得て比較解析を行う。これにより、片アレル欠失など検出が困難であった変異についても同定でき、その領域の変異が致死であるかどうかの判定も可能になると考えられる。尚、セレクションカセットが入ったトランスポゾンベクターは、ゲノムから痕跡なく抜くことが可能であり、変異のなくなった細胞は治療に使える可能性がある。

【CRISPR/Cas9 の応用】

マウス ES 細胞の系では、ブルーム遺伝子の発現制御だけで、染色体上にランダムに相同組換えを起こすことができた。しかし、我々のデータでは、ヒト iPS 細胞においてはマウス ES 細胞よりも組換え頻度は低い。また、樹立を目指している本システムにおいては染色体の“狙った位置”で組換えを起したいため、CRISPR/Cas9 の応用を行った。つまり、狙った位置近傍に作成した CRISPR/Cas9 による DNA 二重切断の修復に伴い、相同組換えが起きることを期待した。

1.ブルーム遺伝子のプロモーター領域に挿入した Tet-off システムにより、ブルーム遺伝子の発現を調節する。

2.近傍に欠失など変異の可能性のある領域に作製した、CRISPR/Cas9 の切断で相同組換えを起し、Cre-recombinase を導入する。

3.相同組換えを起し両アレルにカセットを

持つクローンのみを neomycin(neo)/puromycin(puro)を作用させることにより選択する。

4. 研究成果

モデルとして用いた 19 番染色体、及びトランスポゾンベクター 1 コピー挿入により得られた 4 番染色体に選択カセットを持つ細胞株を用いて、ブルーム遺伝子の発現制御下において、CRISPR/Cas9 により染色体を切断した。この際、我々は CRISPR/Cas9 の設計に関して工夫を行い、組換え率の向上を見た。具体的には、PAM 配列の NGG の GG の所を G/A の SNP が存在する箇所を選んで CRISPR/Cas9 を設計し、片方のアレルのみを切断するようにした。これにより、両アレルを切断するように設計した CRISPR/Cas9 よりも、数倍の組換えクローンを 1 回の実験で得られるようになった (1~2 クローン/ 1×10^6 3~10 クローン/ 1×10^6) (図 3)。

図3 PAM配列にG/AのSNPを選ぶ

~ NNN NGG ← こちらのアレルのみ切断される
~ NNN NCC
~ NNN NGA
~ NNN NCT

これは、両アレルが同時に切断されている状態では、片方のアレルを鋳型として修復する相同組換え機構が機能しないためだと考えられた。

その結果、それぞれの染色体において切断点の近傍で相同組換えが生じ、そこからテロメアまでの領域において LOH が起きていることを SNP を検定することにより確認した。染色体の切断箇所から、実際に組換えが起きているのは 10kb 程度の距離であり、切断箇所からセントロメア側で組換わっているクローンのほうが多く得られる傾向にあった。これにより病因因子の存在が疑われる染色体上の場所において、その近傍で CRISPR/Cas9 を設計することにより、図 1 で示したような特定の場所で LOH を起こした株が得られ、表現型解析及び revertant 細胞が得られる可能性が拓けた。

=今後の課題=

現時点では、CRISPR/Cas9 の切断部位からテロメアまで全ての部位が組換わったクローンしか得られない。この手法で表現型を示すクローンが取れた場合、組換わりポイントからテロメアまでのどこかに変異領域があることになる。この場合、複数の CRISPR/Cas9 を染色体上で、ずらして設計してゆき、それぞれで得られたクローンの比較で変異領域が絞られる。今後、複数の CRISPR/Cas9 及び Cas9 と

違う PAM 配列を認識する Cpf1 を用いることで切断可能部位を増やし、1 つの染色体で複数の相同組換えを起こす実験系の開発を開始している。

これらの手法を用いて現在、病因因子の特定されていない疾患について、細胞株を入手し、iPS 細胞を樹立後に、本システムを適用することを計画している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 2 件)

1. 発表代表者: 吉村 康秀、発表演題: Establishment of a forward genetic system with chromosomal crossing over in human iPS cells、「トランスポゾン転移とゲノム編集技術に関する国際会議 2015」(Conference on Transposition and Genome Engineering 2015, TGE2015)、2015 年 11 月 17 日~20 日、奈良新公会堂

2. 発表代表者: 吉村 康秀、発表演題: ヒト iPS 細胞における相同組換えを利用した新規ゲノム解析方法の確立、日本ゲノム編集学会、2016 年 9 月 6~7 日、広島国際会議場

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:

種類：

番号：

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/mr-envi/www/japanese/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

(吉村 康秀(Yoshimura, Yasuhide), 大阪大学・医学系研究科・助教)

研究者番号：60263307

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

(井川 健 (Igawa, Ken), 東京医科歯科大学・医歯学総合病院 ・准教授)

研究者番号： 00372441

(4)研究協力者

()