

令和元年5月30日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09964

研究課題名(和文) ダウン症候群の核型正常化による合併症の予防および治療法確立に向けた研究

研究課題名(英文) Proof of concept study of a novel excess chromosome elimination therapy to ameliorate and prevent trisomy 21 associated complications

研究代表者

橋詰 令太郎 (Hashizume, Ryotaro)

三重大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50456662

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Down症候群は、21番染色体の数的過剰により多彩な合併症を発症する。本研究は、体細胞から、過剰染色体を後天的に消去する基盤技術の確立を目指した。核型修正作用が報告されているZSCAN4蛋白質の強制発現は、有意な染色体消去率を示さなかった。他方、単一の21番染色体のみを認識するCRISPR/Cas9システムを構築し、トリソミー21-iPS細胞を対象に染色体の複数箇所切断を行い、標的染色体の消去を試みた。結果、5%以上10%以下の頻度で過剰染色体が消去され、核型を正常化させることに成功した。本技術は、過剰染色体を後天的に消去する基盤技術として将来的な発展が見込めるものと判断される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞内にある複数の相同染色体のうち、単一の染色体をCRISPR/Cas9システムを用いてアレル特異的に切断することにより、標的染色体を細胞内から消去可能であることを示した点は、学術的意義があると判断される。オフターゲット、Cas9蛋白の抗原性、DNAの変異誘導と蓄積、デリバリー法等、臨床応用には複数の解決すべき課題が複数あるも、これまで染色体の消去が困難ないし不可能であった背景に照らし合わせれば、本原理は過剰染色体を後天的に消去する基盤技術として臨床的展開が見込める技術と判断され、人口の0.1%弱の人がDown症候群を有する事実を鑑みれば、十分に社会的意義のある成果といえる。

研究成果の概要(英文)：Down syndrome is a chromosomal condition caused by an excess of chromosome 21, leading to an array of lifelong complications. The elimination of extra chromosome 21 could be directly linked to a primary intervention in this context for a person with Down syndrome. The overexpression of ZSCAN4 protein, a transcription factor previously reported as an aneuploidy correction effector, showed no significant extra chromosome elimination rate compared with no-treatment control trisomy 21 iPS cells in our in vitro setting. In an effort to delete extra chromosome, we next employ CRISPR/Cas9 system for DNA double-strand breaks on a single targeted chromosome 21, and found that 7% of entire chromosome loss rate on average by FISH analysis. The strategy to induce single chromosome cleavages at a multiple site using CRISPR/Cas9 thus may contribute to both basic and clinical science for aneuploidy-associated pathological condition, including Down syndrome and other autosomal trisomies.

研究分野：遺伝学

キーワード：ダウン症候群 トリソミー 染色体工学 iPS細胞 CRISPR/Cas

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

Down 症候群は、21 番染色体の数的過剰により、精神発達遅滞をはじめ多彩な合併症を招来する症候群で、地域・時代・人種・性別を問わず人口の 0.1%弱の人が有する症候群である。日本国内で 5 万、全世界に 800 万の人が DS と推定され、決して稀な症候群ではない。一方で、DS に対する研究報告全体では、より感度・特異度の高い出生前診断法開発に関するものが最も多く、実際の産科臨床においてもその主眼は、妊娠早期の正確な確診と妊娠継続の諦めに著しく傾注しているというより他に適切な表現はない。

Down 症候群の表現型の原因が過剰 21 番染色体 (トリソミー21) であることが判明してから 60 年以上経過した現在においてもなお、臨床応用可能性のある過剰染色体除去方法は報告されていない。安全な過剰染色体除去法がありさえすれば、たとえその効率が低くても、筋ジストロフィーに対するエクソスキップ療法におけるデュシェンヌ型からベッカー型への表現型改善戦略のように、フルトリソミーからモザイク型トリソミーへの表現型改善戦略が成り立ち得る。

### 2. 研究の目的

本研究は、Down 症候群由来細胞を用いて、トリソミックレスキュー、すなわち過剰な 21 番染色体を除去する方法の科学的探索および確立、ならびに知見を統合して最適な新規治療用ベクターの構築を志向するものである。

### 3. 研究の方法

#### (1) ダウン症候群 (トリソミー21) の人由来 iPS 細胞株の樹立

ダウン症候群の人から、医療行為としての手術時に副次的に皮膚真皮層を採取し、線維芽細胞を得た (機関内承認番号: 1578)。同時に、両親の口腔粘膜擦過材料を用いて、PentaD 等の 21 番染色体上の縦列型反復配列 (STR) 解析を行い、由来染色体の識別を可能とした。トリソミー21 線維芽細胞から、pCXLE-hOCT3/4-shp53-F、pCXLE-hSK、pCXLE-hUL のエピゾーマルベクターをエレクトロポレーションすることにより、iPS 細胞を得た。iPS 細胞株が、rBC2LCN および TRA-1-60 を発現していることを免疫染色にて確認し、次いで、免疫不全マウス (NOD-Scid マウス) の後肢筋間に細胞注入することによるテラトーマアッセイを行い、iPS 細胞の細胞特性として矛盾しないことを確認した。一方、培養 iPS 細胞を用い、G-banding による核型解析、デジタル PCR を用いた 21 番染色体上遺伝子の 1 細胞あたりのコピー数計測、MPLA 法、および iPS 培養細胞において間期および M 期の各々を対象とした FISH を行い、当該細胞がトリソミー21 のホモ集団であることを多角的に確認した。加えて、本株は、長期間の培養 (>100PDL) にても、トリソミー21 の核型が維持されることを確認した。

#### (2) ZSCAN4 遺伝子の強制発現試験

多能性幹細胞の誘導ならびに増殖維持において、核型を正常に保つゲノム安定性作用があるとされる ZSCAN4 遺伝子の強制発現が、トリソミーからダイソミーへの後天的トリソミックレスキューに資するかを検証するため、上記で樹立したトリソミー iPS 細胞を用い、ZSCAN4 遺伝子の強制発現試験を行った。当初は ZSCAN4 をコードする mRNA を人工的に作製し、培養細胞に導入したが、発現効率が不良であったため、細胞質型ウイルスであるヒトパラインフルエンザ 2 型ウイルスベクター (PIV2 $\Delta$ F, 増殖因子欠損型) を用いた発現系に変更した。EGFP を搭載した PIV2 において、MOI 10-100 では概ねすべての培養 iPS 細胞 (6-well-pate の 1 well) で EGFP の発現を認め、ZSCAN4-Flag タグ搭載 PIV2 においても同等の結果であることを確認した。

#### (3) トリソミー21-iPS 細胞からのダイソミー21-iPS 細胞株の樹立

STR 配列近傍で 21 番染色体特異的な配列であり、かつ 21 番染色体の中でユニークな配列を検索した。5 座位を選定し、puro $\Delta$ TK 遺伝子を内向き loxp 配列で挟んだ配列を含むターゲッティングベクターとその配列を標的とする CRISPER/SpCas9 のプラスミドを同時に、エレクトロポレーション法にて遺伝子導入した。ピューロマイシンにて選択培養し、クローニングの後、ランダムインテグレーション株を排除した。結果、遺伝子導入が確認された細胞 36 株を取得した。これら細胞株に対し、Cre を発現させて染色体除去を試み、染色体未除去細胞を FIAU によるネガティブセレクションにて排除した。

#### (4) トリソミー/ダイソミー iPS 細胞を用いた haplotype phasing

上記トリソミー21 細胞および誘導型ダイソミー21 細胞 3 種、計 4 細胞株に対し、ゲノム解析を行った。NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit にて各々ライブラリーを作製し (PCR-free)、150 bp ペアエンドにて Illumina NovaSeq を用いてシーケンスを行った。リード配列は、BWA Version 0.7.8-r455 アルゴリズムにてヒトゲノム hg19 参照配列上にマップされ、Samtools (version 1.0) および Picard (version 1.111) を用いて SNP/indel のコールを行った。実際には、indel 情報は単塩基ないし数塩基単位の繰り返しの相違であることが多く、ベースコールエラーやアライメント不全の可能性が高く、したがって SNP 情報のみを解析の対象とした。トリソミーの 3 本の 21 番染色体のうち、単一の染色体のみが特異的な塩基を有する SNP 座位を特定した。さらに SpCas9 が必要とする PAM 配列 (NGG ないし CCN) を周囲 $\pm$ 23 塩基に含む、SpCas9 が認識可能な座位を絞り込んだ。

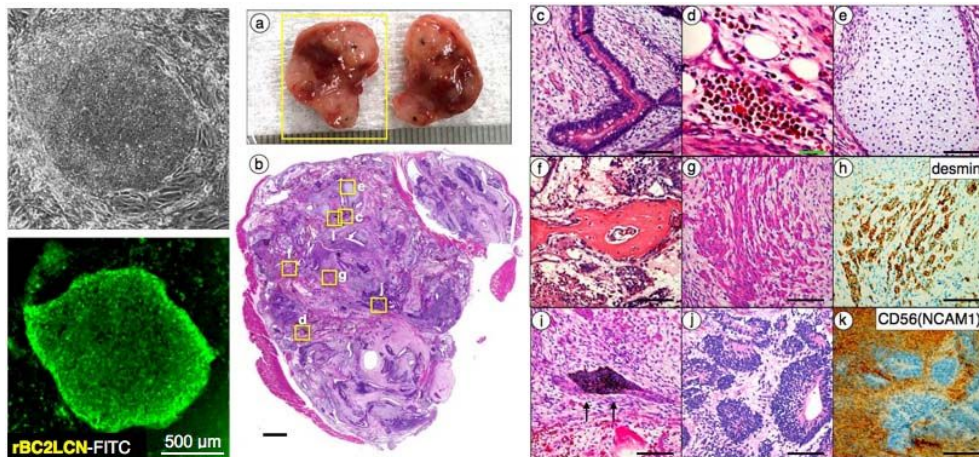
(5) 21 番染色体切断による染色体消去の誘導

まず、21 番特異的であるが相同染色体非特異的に DNA 切断を行うプラスミド発現ベクターにて、染色体消去の誘導効率を評価した。一方、後天性トリソミックレスキューを意図する場合、インプリンティング病や片親性ダイソミーを回避する観点から、P, M1, M2 染色体のうち、M1 ないしは M2 のいずれかの消去が望ましい。短腕に染色体特異的 SNP が多いため、M2 を標的とし染色体切断を行う CRISPR/Cas9 システムを構築した。M2 特異的な 2,853 の SNP 座位から、in silico で off-target を持たない座位を抽出し、さらに、PCR 法と Sanger 法によるダイレクトシーケンスが NGS によるシーケンスと矛盾しないことを確認した。Px330 (Addgene #71814) を各々の座位にて構築し、pCAG-EGFP プラスミド (Addgene #50716) と HEK293 細胞を用いた評価系を使用して、DNA 切断活性の有無を確認した。U6 プロモーターと gRNA 配列の単位モジュールをタンデムに挿入した、複数座位を同時に切断する px330 オールインワンベクターをトリソミー-iPS に導入し、核型を評価した。

4. 研究成果

(1) ヒトトリソミー-21-iPS 細胞株の樹立

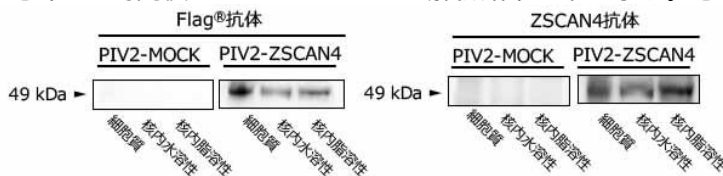
トリオ STR 解析を通じて各 21 番染色体の由来が把握されている、トリソミー-21 のヒト由来 iPS 細胞株を樹立した。幹細胞マーカーの発現や、



テラトーマアッセイにて多能性幹細胞としての細胞特性を確認した (上図)。

(2) ZSCAN4 遺伝子の強制発現試験

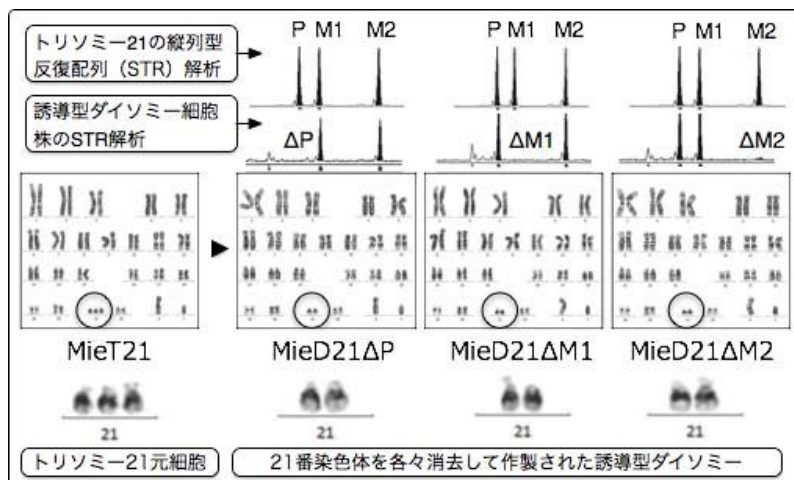
ZSCAN4 に Flag タグを融合した遺伝子を発現する PIV2 ベクターおよび ZSCAN4 のみを発現する PIV2 ベクターを用い、各々 0~100 MOI にて、トリソミー-21-iPS に強制発現させた。MOI 10 で感染 48 時間後の Western プロット解析結果を下に示す。感染 1~2 週間後に、21 番染色体特異的プロンプにて核型を評価した。一条件あたり複数回の検証を行ったが、我々の実験系では有意なダイソミー細胞の出現は確認できず、核型正常化現象は確認されなかった。



(3) トリソミー-21-iPS 細胞からのダイソミー-21-iPS 細胞株の樹立

Cre-loxp システムおよびポジティブ・ネガティブ選択マーカーを組み合わせた loxp-puroΔTK カセットの 21 番染色体への挿入により、トリソミー細胞が有する 3 種類の 21 番染色体 (父親由来の 1 本および母親由来の 2 本で、P, M1, および M2) の 1 本が消去された誘導型ダイソミー細胞 3 株を得た (右図)。

もともとのトリソミー細胞株を MieT21、誘導型ダイソミー細胞株を MieD21ΔP、MieD21ΔM1、



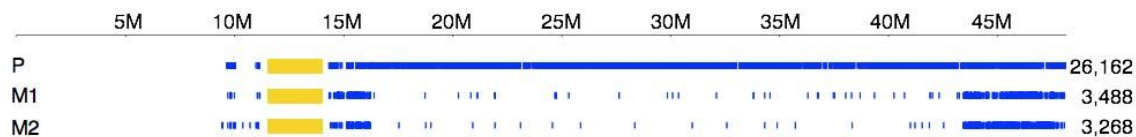
および MieD21ΔM2 と名付け、理研 BRC に細胞寄託手続きを開始した。これら全ての細胞株について、G-band による核型解析、MPLA 法による遺伝子コピー数計測、デジタル PCR による遺

伝子コピー数計測、21 番染色体特異的プローブを用いた FISH 法にてダイソミーであることを確認した。

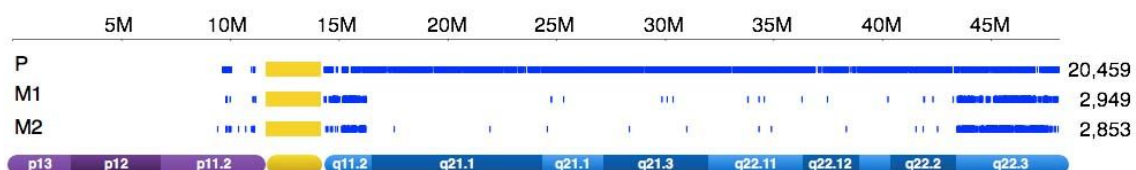
#### (4)トリソミー/ダイソミー-iPS 細胞を用いた haplotype phasing

トリソミー細胞および3種の誘導型ダイソミー細胞のゲノム解析の比較から、P 染色体特異的な SNP 座位 26,162、M1 染色体 3,488、M2 染色体 3,268 座位が検出された。これらのうち、周囲に PAM 配列を有する座位は各々、20,459、2,949、および 2,853 であり、我々が使用した細胞株 (MieT21) では、P と比し M1 と M2 間で遺伝学的に多様性が少なく、また、検出 SNP 座位の 78~87% は SpCas9 が認識可能な座位であった (下図)。

##### ▼アレル特異的塩基

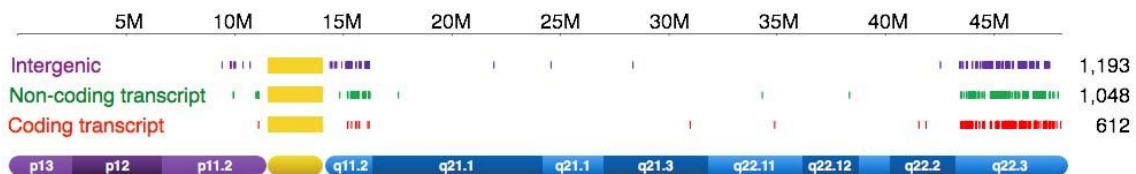


##### ▼PAM配列 (NGG) を周囲に持つアレル特異的塩基



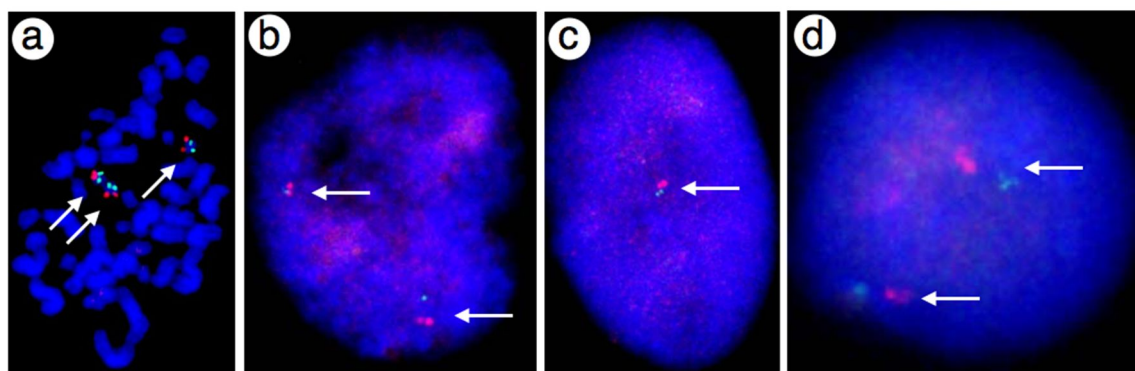
M1 と M2 染色体では、染色体特異的座位の偏在がみられ、q11.2 および q22.3 で高密度であった。SNP 座位の機能的部位としては、M2 アレルを例にとると、遺伝子間 (intergenic) が 1,193 (41.8%)、非翻訳転写領域 (non-coding transcript) が 1,048 (36.7%)、翻訳領域 (coding transcript) が 612 (21.5%)座位であった (下図)。

##### ▼M2アレル特異的塩基



#### (5)21 番染色体切断による染色体消去の誘導

相同染色体非特異的に 21 番染色体を複数箇所 (101 座位) 切断する CRISPR/Cas9 システムでは、トリソミー-iPS 細胞および線維芽細胞ともに比較的高いトリソミックスケジュールが誘導された (3.2-40.0%、FISH にて評価。下図 a.遺伝子導入前のトリソミー-21 細胞、b.誘導された 2 signal 細胞)。しかしながら、看過できない確率で、モノソミー-21 を示唆する FISH での 2 signal 細胞が検出された (下図 c)。特定の 21 番染色体 (M2 染色体) のみを標的・切断する CRISPR/Cas9 システム (2-6 座位) では、7.1% (7/98) で 2 signal 細胞を認め、FISH 法での我々のエラー率が約 2% であることを考慮すると、約 5% の頻度でトリソミックスケジュールが惹起されたと推計された (下図 d)。相同染色体非特異的切断と比し、アレル特異的染色体切断による核型正常化効率は低いが、切断箇所数の相違を考慮に入れるとむしろ効率が良いとも解される。今後は、切断座位数の増加、シングルセルクローニングを経た詳細な核型判定と消去されなかった場合の標的染色体の構造解析、オートファジーシグナル関連分子の付加等による染色体消去の効率化、DNA 切断を用いない方法での染色体消去法の開拓、と研究を展開する予定である。



## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 16 件)(全件査読あり)

- (1) Miyagawa Y, et al. ( 14 人中 4 番目 ) Highly Efficient Ultracentrifugation-free Chromatographic Purification of Recombinant AAV Serotype 9. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2018 Nov 1;11:180-190. doi: 10.1016/j.omtm.2018.10.015. eCollection 2018 Dec 14.
- (2) Yamawaki-Ogata A, et al. ( 9 人中 3 番目 ) The oral administration of clarithromycin prevents the progression and rupture of aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 2018 Dec;68(6S):82S-92S.e2. doi: 10.1016/j.jvs.2017.12.047. Epub 2018 Mar 14.
- (3) Hashizume R, et al. ( 6 人中 4 番目 ) Possibility of venoarterial extracorporeal membranous oxygenator being a bridging therapy for hemodynamic deterioration of pulmonary tumor thrombotic microangiopathy prior to initiating chemotherapy: A case report. *Medicine (Baltimore)*.2018 Sep;97(37):e12169. doi: 10.1097/MD.0000000000012169.
- (4) Miyagawa Y, et al. ( 5 人中 2 番目 ) Herpes Simplex Virus Vectors for Gene Transfer to the Central Nervous System. *Diseases*. 2018 Aug 14;6(3). pii: E74. doi: 10.3390/diseases6030074.
- (5) Miyagawa Y, et al. ( 8 人中 2 番目 ) Cellular Antisilencing Elements Support Transgene Expression from Herpes Simplex Virus Vectors in the Absence of Immediate Early Gene Expression. *J Virol*. 2018 Aug 16;92(17). pii: e00536-18. doi: 10.1128/JVI.00536-18. Print 2018 Sep 1.
- (6) Yamawaki-Ogata A, et al. ( 9 人中 6 番目 ) Evaluation of the Bactericidal and Fungicidal Activities of Poly([2-(methacryloyloxy)ethyl]trimethyl Ammonium Chloride)(Poly (METAC))-Based Materials. *Polymers (Basel)*. 2018 Aug 26;10(9). pii: E947. doi: 10.3390/polym10090947.
- (7) Hashizume R, et al. ( 15 人中 3 番目 ) Renal papillary tip extract stimulates BNP production and excretion from cardiomyocytes. *PLoS One*. 2018 May 7;13(5):e0197078. doi: 10.1371/journal.pone.0197078. eCollection 2018.
- (8) Miyagawa Y, et al. ( 10 人中 1 番目 ) Deletion of the Virion Host Shut-off Gene Enhances Neuronal-Selective Transgene Expression from an HSV Vector Lacking Functional IE Genes. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2017 Jun 16;6:79-90. doi: 10.1016/j.omtm.2017.06.001. eCollection 2017 Sep 15.
- (9) Yamawaki-Ogata A, et al. ( 4 人中 1 番目 ) Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells regress aortic aneurysm via the NF-kB, Smad3 and Akt signaling pathways. *Cytotherapy*. 2017 Oct;19(10):1167-1175. doi: 10.1016/j.jcyt.2017.07.010. Epub 2017 Aug 31.
- (10) Hashizume R, et al. ( 10 人中 5 番目 ) Cytological features of adenocarcinoma admixed with small cell neuroendocrine carcinoma of the uterine cervix. *Cytojournal*. 2017 May 26;14:12. doi: 10.4103/1742-6413.207139. eCollection 2017.
- (11) Miyagawa Y, et al. ( 6 人中 2 番目 ) Engineered HSV vector achieves safe long-term transgene expression in the central nervous system. *Sci Rep*. 2017 May 4;7(1):1507. doi: 10.1038/s41598-017-01635-1.
- (12) Hashizume R, et al. ( 6 人中 3 番目 ) Use of a pedicled omental flap to reduce inflammation and vascularize an abdominal wall patch. *J Surg Res*. 2017 May 15;212:77-85. doi: 10.1016/j.jss.2016.11.052. Epub 2016 Dec 6.
- (13) Miyagawa Y, et al. ( 12 人中 5 番目 ) Wnt signaling regulates hepatobiliary repair following cholestatic liver injury in mice. *Hepatology*. 2016 Nov;64(5):1652-1666. doi: 10.1002/hep.28774. Epub 2016 Sep 26.
- (14) Hashizume R, et al. ( 11 人中 2 番目 ) Skeletal muscle derived stem cells microintegrated into a biodegradable elastomer for reconstruction of the abdominal wall. *Biomaterials*. 2017 Jan;113:31-41. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.10.029. Epub 2016 Oct 18.
- (15) Yamawaki-Ogata A, et al. ( 5 人中 2 番目 ) Isolation and characterisation of peripheral blood-derived feline mesenchymal stem cells. *Vet J*. 2016 Oct;216:183-8. doi: 10.1016/j.tvjl.2016.08.009. Epub 2016 Aug 20.
- (16) Hashizume R, et al. ( 8 人中 3 番目 ) Abdominal wall reconstruction by a regionally distinct biocomposite of extracellular matrix digest and a biodegradable elastomer. *J Tissue Eng Regen Med*. 2016 Sep;10(9):748-61. doi: 10.1002/term.1834. Epub 2013 Dec 27.

〔学会発表〕(計 4 件)

- (1) 橋詰令太郎、脇田幸子、原万里、柴山道登、宮川世志幸、染色体消去による trisomy 21 の haplotype phasing 方法構築、第 18 回日本再生医療学会(神戸) 2019.3.21-23。
- (2) 脇田幸子、原万里、吉田利通、橋詰令太郎、ゲノム編集技術を用いた染色体再編成による染色体排除は、トリソミー細胞の染色体に対する高精度 phasing を可能とする、日本人類遺伝学会第 63 回大会(横浜) 2018.10.10-13。
- (3) 脇田幸子、原万里、橋詰令太郎、染色体消去による 21 番染色体の chromosome phasing の試み-Haplotype phasing of trisomy 21 by chromosome elimination-、遺伝子診療学会(25)(伊勢) 2018.7.12-14。
- (4) 望木郁代、橋詰令太郎、今井裕、池尻誠、中村麻姫、笠井智佳、奥川喜永、北野裕子、宮崎綾子、紀平力、花木良、竹内万彦、中谷中、三重大学病院におけるがん遺伝子パネル検査の体制づくりと現状、第 24 回家族性腫瘍学会(神戸) 2018.6.8-9。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

[https://www.medic.mie-u.ac.jp/organization/course/pathol\\_matrix/](https://www.medic.mie-u.ac.jp/organization/course/pathol_matrix/)

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：宮川 世志幸

ローマ字氏名：(Miyagawa, Yoshitaka)

所属研究機関名：日本医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁)：90415604

研究分担者氏名：緒方 藍歌

ローマ字氏名：(Ogata, Aika)

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学系研究科

職名：特任助教

研究者番号(8桁)：70718311

研究分担者氏名：高成 広起

ローマ字氏名：(Takanari, Hiroki)

所属研究機関名：徳島大学

部局名：病院

職名：特任講師

研究者番号(8桁)：70723253

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：脇田 幸子

ローマ字氏名：(Wakita, Sachiko)

研究協力者氏名：小久保 康昌

ローマ字氏名：(Kokubo, Yasumasa)

研究協力者氏名：岡本 貴行

ローマ字氏名：(Okamoto, Takayuki)

研究協力者氏名：原 万里

ローマ字氏名：(Hara, Mari)

研究協力者氏名：一志 真子

ローマ字氏名：(Ichishi, Masako)

研究協力者氏名：河野 光雄

ローマ字氏名：(Kawano, Mitsuo)