

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 30 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15242

研究課題名(和文) ゲノム編集技術を利用したアレル特異的染色体切断によるトリソミックレスキュー誘導

研究課題名(英文) Trisomic rescue induction by allele-specific chromosome breakage using genome editing technique

研究代表者

原 万里 (Hara, Mari)

三重大学・医学部・教務職員

研究者番号：30176383

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)：ダウン症候群の人由来iPS細胞から、ゲノム編集技術を用いて任意の21番染色体1本を消去し、21番染色体の組み合わせの異なる誘導型disomy 21細胞を複数株樹立した。これら誘導型disomy 21細胞における、消去された21番染色体の特定がSTR解析によりなされ、結果、3本の21番染色体のうちの2本から構成される、3通りの組み合わせの細胞株に分類された。これらの細胞株の配列情報の比較から、最終的に3本の21番染色体を染色体全長にわたり区別するフェイジングに成功した。以上の解析情報から、21番染色体をアレル特異的に複数部位で切断するCRISPR/Cas9システムの構築に成功した。

研究成果の概要(英文)：We have successfully established three induced disomy 21 iPS cell lines by genome editing technology from the original trisomy 21 iPS cells derived from a single individual with Down's syndrome. These induced three types of cells have different combinations of 21 chromosomes. The karyotypes of the induced disomy cells have been confirmed by means of chromosome spreading G-banding, short tandem repeat analysis, multiplex ligation-dependent probe amplification, and fluorescent in situ hybridization. Furthermore, we also classified them based upon the origin of deleted chromosome 21 by STR analysis. Following chromosome phasing by comparison of sequencing data with the 3 cell lines, we have subsequently succeeded in constructing a CRISPR/Cas 9 system for allele specific cleavage in multiple sites.

研究分野：病理学・発生学

キーワード：トリソミックレスキュー ハプロタイプフェイジング 核型正常化 CRISPR/Cas9 ゲノム編集 Cre-loxP

### 1. 研究開始当初の背景

ダウン症候群 (DS) は、21 番染色体の数的異常 (異数性) が本質であり、この過剰染色体により知的障害をはじめ多彩な合併症を生涯にわたり生じる。したがって、核型正常化のみが複雑な合併症を防ぐ唯一の根本的な解決法といえる。

近年、ゲノム改変技術の発展により医療とゲノム編集技術は応用可能な技術となりつつある。一方、効率よくアレル特異的に過剰染色体の消去を行う方法は存在せず、この点、ダウン症候群に対する臨床的介入法は開発されていない。

一方で、21 番染色体のトリソミー細胞における過剰染色体を後天的に排除し、正倍数性の細胞 (21 番染色体が 2 本の正常核型細胞) を誘導することを目的とした研究は、これまでも行われてきた。しかし染色体消失の①効率の低さ②染色体アレル選択性の欠如が大きな障壁となり、いずれの研究も未だ途上の域を出ていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、最も頻度の高い常染色体数的異常である DS を対象モデルとし、研究代表者らグループが開発を目指す新規染色体識別技術とゲノム編集技術による配列特異的切断技術を組み合わせ、高精度の過剰染色体消去技術の開発を目的としている (図 1)。特定のアレルを特異的に切断するためには、ハプロタイプフェイジングが必要不可欠であるが、21 番染色体全長にわたるフェイジングは現在困難である。ゆえに、21 番染色体 3 本の全長にわたるフェイジングが本研究の中間目的である。

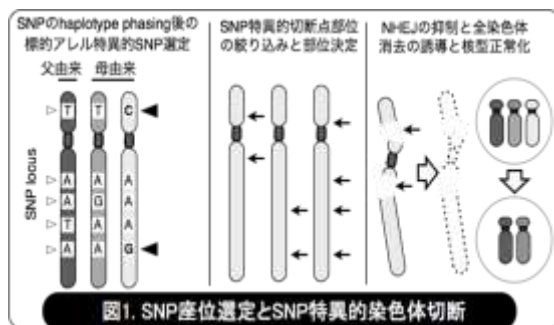


図 1. SNP 座位選定と SNP 特異的染色体切断

### 3. 研究の方法

#### (1) iPS 細胞の作製

DS 由来ヒト皮膚線維芽細胞に山中 4 因子を一過性に発現させることで iPS 細胞を作製した。

#### (2) Cre-loxP システムの導入と染色体消去

21 番染色体上で、染色体の識別が可能な Short Tandem Repeat (STR) locus を選定した。その近傍にある特異的な配列を標的とし、

puro $\Delta$ TK を loxP で内向きに挟んだトランスジーンと標的前後の相同配列から構成される targeting vector (図 2) と、標的を切断する CRISPR/Cas9 のプラスミドを同時に DS 由来 iPS 細胞にエレクトロポレーションにて遺伝子導入した。Puromycin で選択培養した細胞の DNA を抽出・精製し、PCR にてトランスジーンがゲノム上の目的の部位に導入されていることを確認した。数日間培養後、Cre を発現させることで lox-P 配列組換えを誘導し、トランスジーンが挿入された 21 番染色

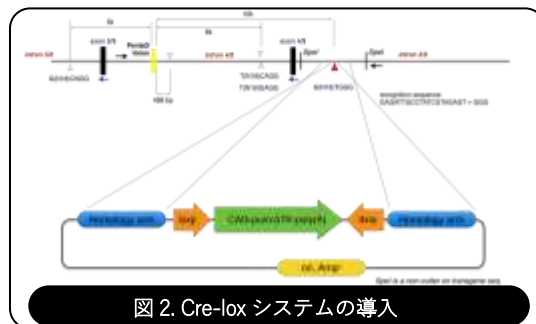


図 2. Cre-lox システムの導入

体を消去した。

#### (3) クローニング

FIAU によるネガティブセレクションにて puro $\Delta$ TK が残存する細胞を排除した後に、限界希釈法によるシングルセルクローニングを行い、クローンを複数取得した。

#### (4) クローンの評価

得られたクローンにおいて染色体数を確認するために 21 番染色体 2 カ所を標識する FISH を用いてスクリーニングを行った。ダイソミーとして選択された細胞の DNA を抽出・精製し、STR 解析により消去された染色体の由来を決定した。21 番染色体の copy number の評価のためにデジタル PCR 及び MLPA 法を実施した。更に染色体の構造異常を確認するために染色体核型分析 (ギムザ染色及び G-band 解析) を行った。

#### (5) ハプロタイプフェイジング

得られた、21 番染色体の由来が異なる 3 通りの組み合わせの disomy 21 細胞を用いて 21 番染色体上における SNP locus を複数選定し、サンガーシーケンシスによりフェイジングを行った。なお、CRISPR/Cas9 が認識可能な配列中にある SNP 座位を選択した。

### 4. 研究成果

#### (1) iPS 細胞株の樹立

DS 由来ヒト皮膚線維芽細胞に山中 4 因子を発現させることで 5 種類の DS 由来 iPS 細胞株を樹立した。各種免疫染色にて iPS 細胞に特異的な染色態度であることを確認した (図 3)。その中でも最も未分化マーカーの発現が良い 1 株を選択し、以降の研究に供した。

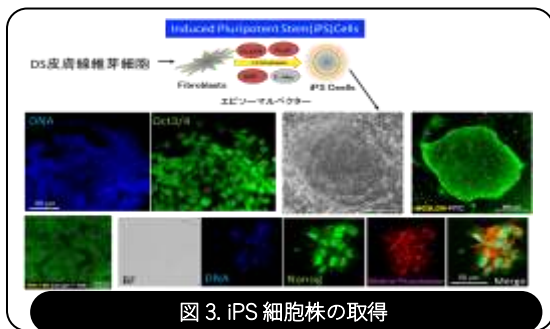


図 3. iPS 細胞株の取得

(2) Cre-loxP システムの導入と染色体消去

相同組み換えによるトランスジーン導入・Puromycin による positive selection 後、Cre を発現させることで lox-P 配列組換えを誘導し、トランスジーンが挿入された 21 番染色体が消去された 22 株の細胞を取得した。

(3) クローニング

22 株の細胞に FIAU セレクションを行い、クローニングを実施した。得られたクローンの 21 番染色体数を FISH にて評価し、disomy 21 細胞のクローンのみ選抜した。STR 解析をすることで 21 番染色体の由来が異なるペアを有する 3 通りの disomy 21 細胞が取得できたことを確認した。細胞株により disomy 細胞の取得効率は異なるが、本研究では約 22.2% の効率で trisomy 21 細胞から disomy 21 細胞へ染色体消去を誘導出来た (計 21 クローン取得)。

(4) 染色体数の評価

得られたクローンが disomy 21 細胞であることを多角的に確認するために以下の評価を実施した。

<FISH>

disomy であることの確認のため FISH を用いて評価した (図 4-図 6)。21 番染色体 2 重標識 FISH の結果、間期及び M 期両方でシグナルが 2 つずつ確認でき、21 番染色体が 1 本消去されたことが確認された。

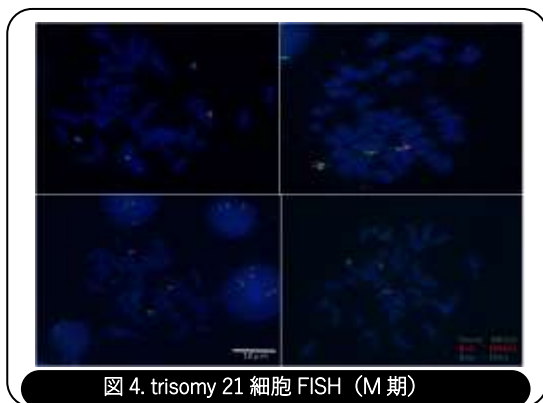


図 4. trisomy 21 細胞 FISH (M 期)

<STR 解析>

本研究で使用した DS 由来細胞は、事前の Penta D STR 解析により、各々の 21 番染色体の父母由来が判明している。そこで、得られた細胞に対し Penta D STR 解析を行った。父親由来 (F)、母親由来 (M1) (M2) の判別を行い、M1&M2 ( $\Delta F$ )、F&M1 ( $\Delta M2$ )、F&M2 ( $\Delta M1$ ) の 3 通りの組み合わせになるクローンを

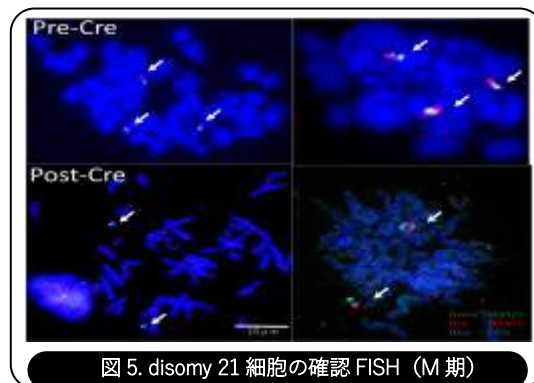


図 5. disomy 21 細胞の確認 FISH (M 期)

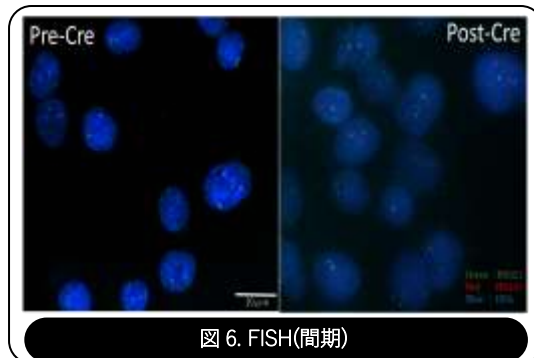


図 6. FISH (間期)

取得した (図 7)。父親由来 21 番染色体が消去されたクローン数は 13、母親由来の 21 番染色体いずれかが消去したクローン数は各々 5 及び 3 であった。

<ギムザ染色>

細胞をコルセミド処理し、染色体展開標本作製した後、ギムザ染色にて染色体数を計測した。Pre-Cre では染色体数は 47 本であったが、Post-Cre では 46 本になり、核型が正常化していることを認めた (図 8)。

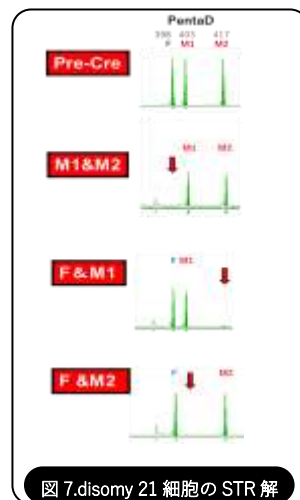


図 7. disomy 21 細胞の STR 解

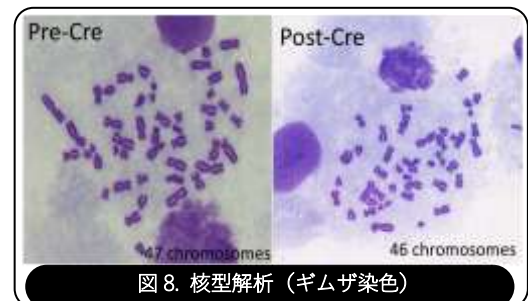


図 8. 核型解析 (ギムザ染色)

<G-band 解析>

ギムザ染色と同様に作成した染色体展開標本において G-band 解析を行った。その結果、欠失、重複、逆位及び転座のないことを確認した (図 9)。

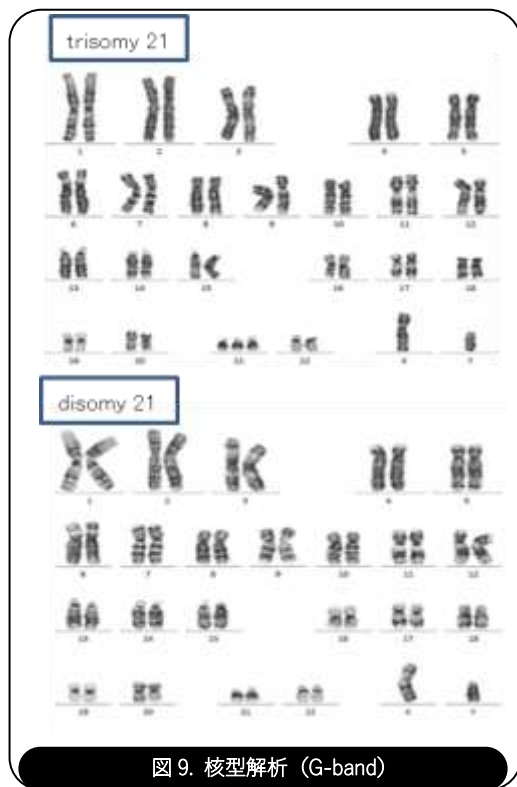


図9. 核型解析 (G-band)

<デジタル PCR>

得られた誘導型 disomy 21 細胞の DNA において 14 番染色体上の遺伝子 RNaseP をリファレンスとして 21 番染色体上の遺伝子 NCAM2 とのシグナル比を求めた。trisomy 21 細胞では NCAM2/RNaseP の比が約 1.4 であるのに対し、得られた誘導型 disomy 21 細胞では約 1.0 と、14 番染色体数と 21 番染色体数が等しいことが確認された(表 1)。

表 1. デジタル PCR

DigitalPCR	RNaseP copy/μL	NCAM2 copy/μL	NCAM2/RNaseP
trisomy	18.13	25.34	1.40
	15.63	23.15	1.48
	16.80	22.85	1.36
	16.67	22.65	1.36
MEAN	16.81	23.50	1.40
S.E.	0.51	0.62	0.03
disomy	15.81	18.73	1.18
	17.99	18.87	1.05
	20.64	18.76	0.91
	21.47	19.62	0.91
MEAN	19.56	19.36	1.00
S.E.	1.16	0.40	0.05

<MLPA 法>誘導型 disomy 21 細胞を MLPA 法にて解析した。trisomy 21 細胞では、21 番染色体上の遺伝子の final ratio が平均  $1.40 \pm 0.02$  (SE) であるのに対し、disomy 21 細胞では平均  $0.98 \pm 0.01$  であった。21 番染色体上の複数の遺伝子の copy number 測定からも、21 番染色体が 1 本のみ消去された細胞が取得できたことが確認された(図 10)。

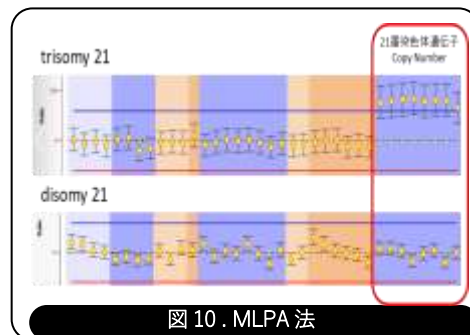


図 10. MLPA 法

<ハプロタイプフェイジング>

まず trisomy 21 細胞の 21 番染色体上でアレル特異的かつ、CRISPR/Cas9 の設計可能な (NGG 配列を有する) SNP を選定した。21 番染色体の由来が異なる 3 通りの組み合わせの disomy 21 細胞を用いてサンガーシーケンス解析し、選定した SNP locus を含む範囲の配列情報を比較することでフェイジングを行った(図 11)。

その結果、21 番染色体の短腕に 3 か所、長腕に 7 か所アレル特異的な SNP locus を特定した(図 12)。かように 21 番染色体の全長にわたり区別するフェイジングに成功した。

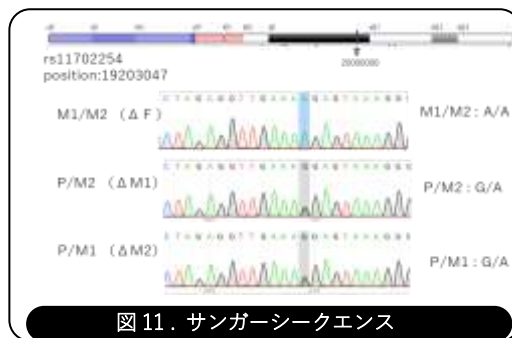


図 11. サンガーシーケンス

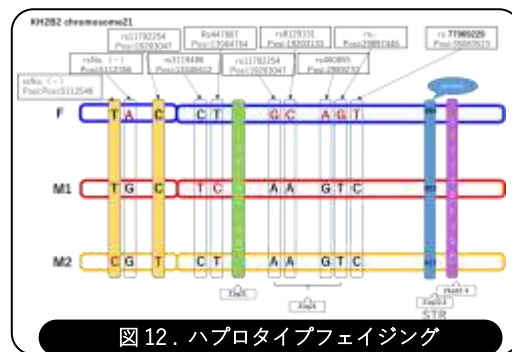


図 12. ハプロタイプフェイジング

<アレル特異的染色体切断> (現在進行中)

フェイジングにより特定した SNP locus を標的として、21 番染色体をアレル特異的に複数部位で切断する CRISPR/Cas9 システムを構築した。現在、過剰染色体消去実験を実施中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

① Hashizume R, et.al. (15 人中 3 番目) Renal papillary tip extract stimulates BNP production and excretion from cardiomyocytes. PLoS ONE. 査読有、2018 May 7; 13(5):e0197078. DOI:10.1371/journal.pone.0197078

② Inui M, et.al. (6 人中 1 番目) Dissecting the roles of miR-140 and its host gene. Nat Cell Biol. 査読有、2018 May;20(5):516-518. DOI: 10.1038/s41556-018-0077-4.

③ 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. 査読有、2017 Jun 16;6:79-90. DOI:10.1016/j.omtm.2017.06.001. eCollection 2017 Sep 15.

④ 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. 査読有、2017 May 4;7(1):1507. DOI: 10.1038/s41598-017-01635-1.

⑤ Inui M, et.al. (4 人中 1 番目) CRISPR/Cas9-mediated simultaneous knockout of Dmrt1 and Dmrt3 does not recapitulate the 46,XY gonadal dysgenesis observed in 9p24.3 deletion patients. Biochem Biophys Rep. 査読有、2017 Jan 9;9:238-244. DOI:10.1016/j.bbrep.2017.01.001. eCollection 2017 Mar.

⑥ Miyagawa Y, et.al. (12 人中 5 番目) Wnt signaling regulates hepatobiliary repair following cholestatic liver injury in mice. Hepatology 査読有、2016 Nov;64(5):1652-1666 DOI: 10.1002/hep.28774

⑦ Inui M, et.al. (13 人中 2 番目) The p.R92W variant of NR5A1/Nr5a1 induces testicular development of 46,XX gonads in humans, but not in mice: phenotypic comparison of human patients and mutation-induced mice. Biol Sex Differ. 査読有、2016 Nov 8;7:56. eCollection 2016. DOI: 10.1186/s13293-016-0114-6

⑧ Inui M, et.al. (15 人中 3 番目) Mohawk promotes the maintenance and regeneration

of the outer annulus fibrosus of intervertebral discs. Nat Commun. 査読有、2016 Aug 16;7:12503. DOI: 10.1038/ncomms12503.

[学会発表] (計 1 件)

① 脇田幸子、染色体消去による 21 番染色体の chromosome phasing の試み/Chromosome phasing of trisomy 21 by chromosome elimination、第 25 回日本遺伝子診療学会大会、2018 年 7 月 12-14 日、シンフォニアテクノロジー響ホール伊勢 (三重県・伊勢市)

[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 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]

三重大学医学部医学系研究科ホームページ掲載

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

原 万里 (Hara, Mari)  
三重大学・医学部・教務職員  
研究者番号 : 30176383

### (2) 研究分担者

脇田 幸子 (Wakita, Sachiko)  
三重大学・医学部・技術員  
研究者番号 : 20782981

### (3) 連携研究者

橋詰 令太郎 (Hashizume, Ryotaro)  
三重大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号 : 50456662

一志 真子 (Ichishi, Masako)  
三重大学・医学部・技術専門員

研究者番号：80632372

宮川 世志幸 (Miyagawa, yoshitaka)  
日本医科大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号：90415604

乾 雅史 (Inui, masafumi)  
国立研究開発法人国立成育医療センター・システム発生/再生医学研究部・室長  
研究者番号：20643498