

平成30年6月5日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15479

研究課題名(和文) 孤発性タウオパチーに相関するタウ遺伝子多型の生化学的意義のゲノム編集を用いた解明

研究課題名(英文) Elucidation of the significance of MAPT polymorphism associated with sporadic tauopathies by using genome editing method.

研究代表者

小野寺 理 (Onodera, Osamu)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号：20303167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：タウの蓄積を認める疾患では、タウ遺伝子多型との相関が知られている。しかし、これらの多型の意義付けは解析が困難であった。CRISPR-Cas9法を応用したCORRECT法にてタウ疾患関連の遺伝子多型を導入し、タウ遺伝子の発現量、スプライシングへの影響を明らかとする。ゲノム編集導入率は標準的な方法で1%であった物を4.5%まで向上させた。しかし、効率は低く、遺伝子によって著しく異なる可能性があることを明らかとした。作成した細胞を用いてMAPTのスプライシング効率を検討したところ、4R/3Rtau比が増加している事を確認した。この細胞系は、薬剤のスクリーニングに応用可能である。

研究成果の概要(英文)：MAPT gene polymorphism is known in diseases that allow accumulation of tau, but it was difficult to analyze the significance of the polymorphism. By using the CORRECT method applying CRISPR-Cas 9 method, we introduce disease-related MAPT polymorphisms and investigate the expression level of tau gene and its effect on splicing. The introduction rate of genome editing improves 1.0% by standard method up to 4.5%. However, the efficiency was still low, and it was revealed that there is a possibility that it may be markedly different depending on genes. When splicing of MAPT was examined using the edited cells, it was confirmed that the ratio of 4R/3Rtau was increased. This cell line can be applied to drug screening to improve the ratio.

研究分野：神経内科

キーワード：ゲノム編集 タウオパチー

1. 研究開始当初の背景

“ありふれた疾患はありふれた遺伝子多型による”とする仮説のもと、多くの孤発性神経変性疾患にて、一塩基多型 (SNPs) によるゲノムワイド相関解析が行われ、発症と相関のある SNPs が同定されるに至った。神経変性疾患では、見出されたリスク SNPs のオッズ比が比較的高く、さらに興味深い事に、これらの SNPs の関与する遺伝子の変異が類縁疾患を引き起こすことが判明していた。その為、単離された疾患関連 SNPs の発症への直接的な関与が推察されていた。この中ではアルツハイマー病の APOE 多型が有名ではあるが、その他にも、タウオパチー (進行性核上性麻痺 (PSP)、皮質基底核変性症 (CBD) におけるタウ遺伝子 (MAPT) のリスク SNPs は Odds 比が 5 前後と、アルツハイマー病に匹敵する高さを示す。MAPT の SNPs は調節領域、非翻訳領域、イントロンに存在し、タウ遺伝子の発現量やスプライシングへの影響が推察されている。しかし、これらの SNPs が、直接遺伝子の発現量やスプライシングを調節しているのか、もしくは、これらの SNPs と連鎖不平衡にある構造多型やハプロタイプ多型が影響しているのか、明らかではない。さらに、その他にも複数のリスク遺伝子が見出されており、これらの遺伝子の相乗相加効果も判明していない。見出された SNPs の生化学的意義を解明することは、孤発性神経変性疾患の病態解明と、新たな治療薬のターゲットを見出す上で重要である。

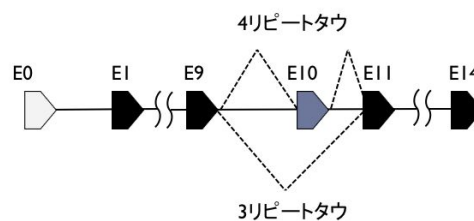
SNPs の影響は、今まで、多型毎の生体試料の比較により解析されてきた。しかし、個体間の背景遺伝子、年齢、環境因子などの個体差による影響があり一定の結論は得られていない。そのため、ミニジーン等が用いられてきたが、ハプロタイプや構造多型を模倣できず、強制発現系での解析となり、その意義は限定的であった。もし、内在性の遺伝子の注目する一塩基のみを変化させ、その効果を比較することができれば、その SNPs の生化学的解析は画期的に進むことが想定される。近年開発された CRISPR-Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated proteins) によるゲノム編集技術は、ゲノムの特定の部位の一塩基レベルでの編集を可能とした。申請者は、本技術を遺伝性神経変性疾患の病態解析に用いるために、導入効率の改良を重ね、培養細胞で 10%、人工多能性幹細胞株で 5% の編集効率を可能とし、十分に実用可能な物とした (Shiga, Onodera et al., 10th Brain Research Conference in Neurological Disease, 2015, Chicago にて発表)。本技術にて同一の背景遺伝子にて、疾患関連 SNPs の当該遺伝子に対する影響を比較し、その生化学的意義を明確にできると考えた。

ゲノムワイド相関解析の結果が具体的な創薬や医療に直結していないのは、見つかった一塩基多型 (SNPs) が、調節領域、非翻訳領域、イントロンに存在し、生化学的意義付けが不明な点に一因がある。一般にこれらの多型は、エンハンサーの近傍に存在するとされ、遺伝子発現に影響を与えるとされる。しかし、その証明は困難であった。今までは、その解析のために、SNPs の異なる個体毎の生体試料が比較されてきた。しかし、背景遺伝子、年齢、環境因子などの個体差があり、一定の見解を得ていない。これらを凌駕するために、ミニジーンやプラスミドを用いた解析が行われてきたが、構造多型やクロマチン構造を模倣することはできなかった。この為、見出された SNPs の分子病態学的な面からの解析は取り残されていた。本申請は、近年開発されたゲノム編集技術である CRISPR-Cas9 を用い、これらの問題を解決し、非翻訳領域、もしくはイントロンの疾患感受性 SNPs の生化学的意義付けを行おうとする挑戦的な申請である。

CRISPR-Cas9 技術は開発されたばかりであり、黎明期である。さらに、本技術を用いた一塩基編集による病態解析は未だ数少ない。大変有用な技術であるが、実用可能なレベルとするためには、その編集効率や、効果的なスクリーニング方法など様々な問題が存在する。しかし、本手法による病態解析が可能となれば、背景遺伝子情報が全く同一な細胞でイントロンや、非翻訳領域、調節領域の SNPs の効果を明確に比較することが出来、単離されてきた多くのリスク SNPs の生化学的意義を解明しうる。また iPS 細胞にて同様の編集を行うことにより、その細胞をグリア、神経細胞に分化させ、分化時の各 SNPs の影響を検証する事も可能である。

本申請は、その proof of concept の実験として、リスク SNPs の中で、高い Odds 比を示している、タウオパチーにおけるタウ遺伝子 (MAPT 遺伝子) の SNPs の解析に焦点を当てている。タウオパチーはタウ蛋白の蓄積する疾患の総称である。タウ蛋白はスプライシング多型に富み、代表的なアイソフォームは 6 種類存在する。その内、エクソン 10 を含むか含まないかで、リピート構造の数が変わ

タウ蛋白のアイソフォームはエクソン10で決まる



タウ蛋白は6種類のスプライシングアイソフォームを持つが、特にエクソン10の有り、無しで決定される。4リピートタウ、3リピートタウが疾患と大きく関わりとされる

り 4 リピートと 3 リピートタウに大別される(図)。

タウオパチーである PSP/CBD では、4 リピートタウの蓄積を認める。本症では、MAPT 遺伝子多型と強い連関が指摘されている。その遺伝子多型の生化学的意義に関しては、感受性多型を持つ個体では、4 リピートタウ mRNA の発現が増加していることが示唆されている(Myers, et al. *Neurobiology of Disease*, 2007;25:561-70)。しかし、一定の見解を得ていない。MAPT 遺伝子は、極めて多彩な構造多型(大別して H1,H2 に分けられ、重複領域の有無でさらに分けられる)を持つ領域に含まれている(次項図 1 参照)。疾患と連鎖の強い SNPs は、構造多型とも強い連鎖不平衡がある。このことから、タウ mRNA の変化に対して、この SNPs が直接関与しているのか、連鎖する構造多型が重要なのかも不明であった。本研究提案は、構造多型と SNPs との連鎖不平衡を、遺伝子編集によって崩すことが可能であり、各々の重要性を個別に評価し、その重要性の議論に決着をつけることが出来る。もし構造多型にかかわらず、SNPs がタウ mRNA に影響を与えるのであれば、ここが治療の分子標的となる。本研究により、今まで、単なるマーカーとされてきた SNPs に対し生化学的意義付けが出来れば、孤発性神経変性疾患発症のメカニズムの解明になるだけでなく、その配列、もしくはその配列に対して影響をもつ諸因子を分子標的とした、新たな治療法の開発に繋がる。さらに、本研究提案は、今まで見つかった他の多くの疾患関連 SNPs の生化学的意義を明らかにする、基本的な方法の開発という点で、応用性も広く、成功した場合に卓越した成果が予想できる。

2. 研究の目的

ゲノムワイド相関解析にて多くのリスク塩基多型(SNPs)が同定された。しかし、それらの SNPs の多くは、調節領域、非翻訳領域、イントロンに存在し、生化学的意義が不明である。タウの蓄積を認める進行性核上性麻痺(PSP)、皮質基底核変性症(CBD)でも、タウ遺伝子多型との相関が知られている。しかし、これらの多型の生化学的意義付けは、個体間の背景遺伝子、年齢、環境因子の影響があり解析が困難であった。近年開発された CRISPR-Cas9 法によるゲノム編集は、内在性の遺伝子の塩基レベルでの編集を可能とした。本申請は、本技術にてタウ遺伝子関連の PSP/CBD リスク SNPs を変化させ、タウ遺伝子の発現量、スプライシングへの影響を明らかとする。これにより疾患関連 SNPs の生化学的意義を解明し、新規治療のターゲットを創出する。

3. 研究の方法

ゲノム編集には CRISPR-Cas9 法を用いる。

CRISPR 法による塩基変異導入には、通常、電気穿孔法を用いるが、効率が悪く iPS 細胞での成功率は 1% 以下である。実際、我々の iPS 細胞での変異導入効率は、電気穿孔法では 0.3% である。変異導入効率が低い場合、目的の変異を持った細胞のクローニングに時間と労力が必要とされる。これを解決するため Cas9 をドキシサイクリン下で発現する安定発現系を作成する方法が発表された(Gonzalez et al. *Cell Stem Cell* 2014;15:215-26)。我々は、すでに本方法により iPS 細胞における変異導入効率を 5% 程度までに増加させることに成功している(Shiga, Onodera ら, 10th Brain Research Conference in Neurological Disease, 2015, Chicago にて発表)。構造多型を決定した各細胞に対して、ドキシサイクリン誘導性 Cas9 安定発現株を作成する。本方法にて迅速に目的の細胞をクローニングすることが可能となる。Cas9 の安定発現に必要な Transgene は、他の遺伝子の発現や機能に影響を与えない Safe harbor 部位である AAVS1 領域に、TALEN 法を用いて挿入する。これにより、Transgene のランダムな挿入による影響を排除する。

変異導入の至適条件の検討は、クローニングの効率化・成功に大きくかわるため、重要である。我々は、Cas9 を導入した iPS 細胞を保有しており、初年度はこれらを用いて、変異導入条件の検討、至適挿入 ssDNA オリゴヌクレオチド配列、ガイド RNA 配列の検討を効率的に行う。変異導入効率の検討には、droplet digital PCR 法と TaqMan probe 法を組み合わせた方法を用いる。通常、変異導入効率の評価には、TA クローニング法や RFLP 法が用いられるが、前者は大腸菌への形質転換や大量のシークエンスを必要とするなど作業が煩雑であること、後者は感度の低さや定性的な評価しか出来ない、というデメリットがある。Droplet digital PCR 法を用いることにより、簡便に定量的に高感度で導入効率を検討することが可能であり、短時間で条件検討が行える。決定したゲノム編集条件で構造多型を決定した Cas9 安定発現細胞に対し変異導入を行う。

4. 研究成果

MAPT 遺伝子の選択的スプライシングを改変する点変異を CORRECT を用いて MAPT 遺伝子に導入し、突然変異誘発事象を、対立遺伝子特異的 TaqMan プロブを有する ddPCR システムまたは HiDi DNA ポリメラーゼを用いる PCR システムを用いて評価した。その結果、HiDi DNA ポリメラーゼを用いて ddPCR または PCR を用いて MAPT の遺伝子編集の効率を推定することを可能とした。ゲノム編集導入率は標準的な方法で 1.0% であった物を 4.5% まで向上させた。しかし、効率は既報と比較して低く、効率は遺伝子によって著しく異なる

可能性があることを明らかとした。作成した遺伝子変異を導入した HEK293T を用いて MAPT のスプライシングを検討したところ、4Rtau/3Rtau 比が増加している事を確認した。この結果から、本遺伝子変異が、異なる細胞系であっても、スプライシング効率を変化させることを明らかとした。この細胞系により、薬剤のスクリーニングが可能であることを示した。

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)

Yuka Koike, Akihide Koyama, Atsushi Shiga, Akio Yokoseki, Osamu Onodera Applying "CORRECT" for introducing a mutation in the MAPT gene. 4th Symposium on RNA Metabolism in Neurological Disease. (国際学会) 2016年11月10日~2016年11月11日 San Diego. (アメリカ合衆国)

Yuka Koike, Akihide Koyama, Atsushi Shiga, Akio Yokoseki, Osamu Onodera. "CORRECT" for introducing nucleotide substitution with CRISPR/Cas9 system in MAPT 第40回日本神経科学大会 2017年

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

小野寺理 (ONODERA, Osamu)

新潟大学・脳研究所・教授

研究者番号: 20303167