

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24241064

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞を基盤とした疾患遺伝子の同定

研究課題名(英文) Identification of genes responsible for disease in human iPS cells

研究代表者

竹田 潤二 (Takeda, Junji)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50163407

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,100,000円

研究成果の概要(和文)：交配を介さずに片アレル遺伝子変異体から両アレル遺伝子変異体への変換を効率よく行うシステムをヒトiPS細胞に応用し、ヒトゲノムに潜む疾患関連遺伝子を交配することなしに両アレル変異体に変換することを目標とした。

まず、相同組換え頻度を上昇させるブルーム遺伝子欠損状態をドキシサイクリン添加時に達成できるシステムを構築し、そのブルーム遺伝子欠損状態とCRISPR/Cas9システムを利用してアレル特異的にDNA2重鎖切断を同時に導入すると両アレル変異体への変換効率が上昇することが判明した。

これらの結果は、ヒトiPS細胞ゲノムに内蔵する片アレル変異体を両アレル変異体へ効率よく変換できることを示した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project is establishment of efficient system for conversion of mono-allelic mutation to bi-allelic mutations in human iPS cell lines. The system is able to identify hidden mutations in human genome without mating.

At first, we made a human iPS cell line in which expression of Bloom syndrome gene (BLM) is suppressed with an addition of doxycycline. Deficiency of BLM results in enhancement of chromosomal crossing over. Combination of BLM deficiency and CRISPR/Cas9-mediated DNA double strand break facilitate site-specific chromosomal crossing over. These results indicate that heterozygous hidden mutations in human genome can be converted to homozygous mutations and identified by mapping of homozygosity.

研究分野：分子生物学、発生工学

キーワード：疾患関連遺伝子 ヒトiPS細胞

1. 研究開始当初の背景

本申請者は、哺乳動物細胞であるマウス ES 細胞あるいはマウス個体を標的として、遺伝子機能を網羅的に解明する順遺伝学的手法の開発を目指して、2つの目標を定めて、過去10年間実験を推し進めて来た。

(1)内在性遺伝子のランダムノックアウト(片アレル変異導入)

(2)ノックアウトされた遺伝子の両アレル変異への効率の良い変換

(1)の実績として、Sleeping Beauty(SB)トランスポゾンを変異原としてマウスあるいはラット個体でランダムノックアウトを達成したものとそれに関連するものは、以下の通りである。(Horie et al. *PNAS* 2001, Horie et al. *MCB* 2003, Yusa et al. *MCB* 2004, Keng et al. *Nat. Methods* 2005, Yae et al. *MCB* 2006, Ikeda et al. *MCB* 2007, Kitada et al. *Nat. Methods* 2007, Takeda et al. *Genome Biol.* 2007, Kokubu et al. *Nat. Genetics* 2009)

(2)の過去7年間の実績は、ブルーム遺伝子(BLM)の発現抑制による両アレル変異導入法(Yusa K. et al. *Nature*, 2004, Hayakawa et al. *Gene*, 2006, Horie et al. *Nat. Methods*, 2011)を開発して来た。

これら二つのプロジェクトに関しては、本申請者は世界のトップランナーに位置していると考えられる(論文業績参照)。そのことは、最近開かれた哺乳動物遺伝子改変に関する国際的なカンファレンスに invited speaker として参加していることから、明らかであると思われる。

本申請課題では、これまでマウス ES 細胞で培ってきた遺伝子変異導入技術をヒト iPS 細胞に応用し、ヒトゲノムに潜む疾患遺伝子を同定する。我々人類はゲノム上に疾患に直結するような多数の変異を内蔵している。それは、DNA 2重らせん構造を発見した J.D.Watson 博士のゲノムシーケンス解析の

結果を見ても明らかである(D.A.Wheeler et al. *Nature* 452; 872-876, 2008)。幸いなことにこれらの多くは劣性変異であり、ゲノム上でヘテロ接合体(片アレル変異)で存在していることにより表現型(疾患)が表に現れてこない。本申請課題は、ヒト iPS 細胞を基盤にして、内蔵する疾患関連遺伝子をホモ接合体(両アレル変異)に変換する。その後、表現型を解析することにより、疾患と遺伝子の関係を直接比較できる、これまでにない画期的な手法である。

2. 研究の目的

様々な個体あるいは細胞で表現型を解析しようとすると、遺伝子が通常一対(2コピー)存在することがネックになる。マウスを使った解析例では、標的遺伝子を ES 細胞において破壊し、交配によりホモマウスを作製して表現型を解析する。本申請者は、マウス ES 細胞を基盤として交配を介さずに片アレル遺伝子変異から両アレル遺伝子変異(一対ある2コピー両方とも変異導入)への変換を効率よく行うシステムを構築した(K. Horie et al., *Nat. Methods*, doi:10.1038/nmeth.1739, 2011)。この原理をヒト iPS 細胞に応用し、**ヒトゲノムに潜んでいる疾患関連遺伝子(ほとんど片アレル変異で存在していると考えられる)を交配を介することなしに両アレル変異に変換する、そしてその表現型を解析することにより、未知の疾患関連遺伝子を同定することを目的とする。**

3. 研究の方法

- (1) ヒト iPS 細胞のブルーム遺伝子改変による両アレル変異導入可能細胞への変換
両アレル変異を導入、効率を上昇させるために tet カセットをヒトブルーム遺伝子に挿入しドキシサイクリンで制御可能にする。
- (2) ゲノムに内蔵する劣性変異のホモ接合体化

ヒト iPS 細胞のどの領域がホモ接合体化しているかを検出できるベクターを利用する。

(3) ホモ接合体化したヒト iPS 細胞の表現型解析

肝臓の疾患であれば肝臓に分化させ、皮膚の疾患であれば表皮に分化させそれぞれ表現型を解析する。

(4) 表現型を引き起こすゲノム領域の同定と疾患原因遺伝子の探索と特定

4. 研究成果

交配を介さずに片アレル遺伝子変異から両アレル遺伝子変異への変換を効率よく行うシステムをマウス ES 細胞で樹立したので、この原理をヒト iPS 細胞に応用し、ヒトゲノムに潜んでいる疾患関連遺伝子を交配することなしに、両アレル変異体に変換することを目標に実験を行った。

(1) ヒト iPS 細胞のブルーム遺伝子改変による両アレル変異導入可能細胞への変換

TALEN を用いて tet カセットをヒト iPS 細胞ゲノムのブルーム遺伝子の両アレルに同時に挿入することに成功した。テトラサイクリンの類似体であるドキシサイクリンを 5 日間添加し、ブルーム遺伝子の発現を解析したところ、正常に比べ約 10-20%まで低下していることが判明した。

(2) ゲノムに内蔵する劣性変異のホモ接合体化

片アレルの AAV 遺伝子座に Neo と Puro 遺伝子がプロモーターに対して逆向きに配置されたレポーターを挿入した。Neo と Puro 遺伝子の外側は逆向きの loxP 配列が配置されている。ブルーム遺伝子をドキシサイクリンでオフにした状態で交差反応を検討した。さらに CRISPR/Cas9 システムを利用してアレル特異的に DNA2 重鎖切断を導入し同時に CRE も導入したところ、ブルーム遺伝子オフ状態で CRISPR/Cas9 で DNA2 重鎖切断を導入した時だけホモ接合体化が促進された。ゲノム領域を探索したところ、CRISPR/Cas9 システムで DNA2 重鎖切断を導入した近傍に交差が起きていることが判

明した。これらの結果は、ヒト iPS 細胞ゲノムに内蔵する片アレル変異を両アレル変異体に変換できることを示しているので、AAV 遺伝子座以外でも同様の現象が起きるか検討中である。今後、レポーターがホモ接合体化される時に、ヒトゲノムに潜んでいる疾患関連遺伝子も同時にホモ接合体化される可能性があり、その表現型を解析することにより未知の疾患関連遺伝子が同定されることが期待される。

(3) ホモ接合体化したヒト iPS 細胞の表現型解析

予備実験でヒト iPS 細胞を表皮に分化できる系の樹立に成功している (Igawa et al., STEM CELLS Transl Med vol 3, No.9 992-1001, Sept 2014)。今後はこの系を用いて表現型解析を行う。

(4) 表現型を引き起こすゲノム領域の同定と疾患原因遺伝子の探索と特定

今後の課題事項である。

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 11 件)

- (1) Tokunaga M, Kokubu C, Maeda Y, Sese J, Horie K, Sugimoto N, Kinoshita T, Yusa K, Takeda J., Simulation and estimation of gene number in a biological pathway using almost complete saturation mutagenesis screening of haploid mouse cells., BMC Genomics. 2014;15(1):1016, doi: 10.1186/1471-2164-15-1016. 査読有
- (2) Igawa K, C Kokubu, K Yusa, K Horie, Y Yoshimura, K Yamauchi, H Suemori, H Yokozeki, M Toyoda, N Kiyokawa, H Okita, Y Miyagawa, H Akutsu, A Umezawa, I Katayama, J Takeda, Removal of Reprogramming Transgenes Improves the Tissue Reconstitution Potential of Keratinocytes Generated From Human Induced Pluripotent Stem Cells, STEM CELLS Transl Med 3(9), 992-1001, 2014, doi: 10.5966/sctm.2013-0179. 査読有
- (3) Yamanishi A., Yusa K., Horie K., Tokunaga M., Kusano K., Kokubu C. and Takeda J., Enhancement of microhomology-mediated genomic

rearrangements by transient loss of mouse Bloom syndrome helicase. Genome Research. 23(9):1462-1473, 2013, doi: 10.1101/gr.152744.112. 査読有

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

〔学会発表〕(計 25 件)

- (1) Yasuhide Yoshimura, Tomo Kamitani, **Junji Takeda**, Establishment of a forward genetic system with chromosomal crossing over in human iPS cells., Conference on Transposon and Genome Engineering 2015, 2015.11.19., 奈良春日野国際フォーラム 薨~I・RA・KA~(奈良県奈良市)
- (2) **Junji Takeda**, Tomo Kamitani, Ayako Yamanishi, Yasuhide Yoshimura, Chikara Kokubu, A combination of Bloom gene inactivation and CRISPR/Cas9-mediated DNA cleavage facilitates construction of a loss-of-heterozygosity library of the mammalian genome., Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Genome Engineering: The Crispr/Cas Revolution, 2015.9.26, Cold Spring Harbor (USA).
- (3) 吉村康秀、神谷智、**竹田潤二**、ヒト iPS 細胞での相同組換え誘発による新規ゲノム解析方法の確立、第 37 回日本分子生物学会年会、2014.11.25、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹田 潤二 (TAKEDA, Junji)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50163407

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：