

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2013～2017

課題番号：25221308

研究課題名(和文)染色体工学技術を用いたダウン症候群の発がん機構の解明

研究課題名(英文)The elucidation of the carcinogenic mechanism of the Down's syndrome using chromosome engineering technology

研究代表者

押村 光雄 (OSHIMURA, Mitsuo)

鳥取大学・染色体工学研究センター・特任教授

研究者番号：20111619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 165,200,000円

研究成果の概要(和文)：ダウン症候群は21番染色体トリソミーにより引き起こされる先天性疾患である。ダウン症候群に高頻度に見られる急性巨核芽球系白血病の発症メカニズムを解明することを目的として、独自に開発した染色体工学技術を用いて、新規のダウン症候群モデルマウスおよびモデルヒトES細胞を作製した。モデルマウスでは行動異常や血液学的異常が観察され、モデルヒトES細胞ではトリソミー21とGATA1変異の相乗的な影響で血液分化異常が観察された。さらに、断片化ヒト21番染色体をヒトES細胞に導入することで上記分化異常の21番染色体領域を絞りこむことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Down syndrome is a congenital disease caused by trisomy 21. To elucidate the mechanism of the onset of acute megakaryoblastic leukemia which is frequently occurred in Down's syndrome, novel Down's syndrome model mice and the model human ES cell lines were generated by using our original chromosome engineering technology. Behavioral abnormalities and hematologic abnormalities were observed in the model mice, and haematopoiesis abnormalities were observed in the model human ES cells due to the synergistic effect of trisomy 21 and GATA1 mutation. Furthermore, we succeeded in narrowing down the responsible region on chromosome 21 of the haematopoiesis abnormalities by introducing fragmented human chromosome 21 into human ES cells.

研究分野：医歯薬学・内科系臨床医学・小児科学

キーワード：染色体工学 小児血液学

1. 研究開始当初の背景

ダウン症候群は 21 番染色体トリソミーにより引き起こされる先天性疾患であり、白血病、心奇形、精神発達遅滞など多様な表現型を示す。中でも急性巨核芽球性白血病 (acute megakaryoblastic leukemia: AMKL) は非ダウン症児に比べ、ダウン症児に約 500 倍も高頻度に見られる病態である。ダウン症児に見られる AMKL (DS-AMKL) には、X 染色体上の転写因子 GATA1 遺伝子に変異が見られ、GATA1 遺伝子の N 末が欠損した GATA1s タンパク質が発現している。また、非ダウン症児の AMKL では GATA1 変異が見られないことから、トリソミー-21 と GATA1 変異が DS-AMKL 発症の必要条件であると考えられている。現在のところ、「DS-AMKL を引き起こすヒト 21 番染色体上の原因遺伝子(群)は何か?」についてはほとんど明かにされていない。この DS-AMKL の原因解明と有効な治療法・治療薬開発のためにはダウン症候群モデル細胞・モデル動物の作製が必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究の目的は独自に開発した染色体工学技術を用いて、新規のダウン症候群モデルマウスおよびモデルヒト ES 細胞を作製し、ダウン症候群に高頻度に見られる DS-AMKL の発症メカニズムを解明することである。具体的には、1) 染色体工学技術により様々なヒト 21 番染色体領域を持つ染色体断片を作製し、2) マウスやヒト ES 細胞に個別に導入することで、様々な部分トリソミーマウスやヒト ES 細胞を作製し、3) 急性巨核芽球系白血病と遺伝子領域との関係を明らかにし、4) 最終的には原因遺伝子の同定と発症メカニズムの解明を目指す。以上のような解析は DS-AMKL だけでなく成人のがん発症機構の理解を深め、症状改善のための医薬品開発などに貢献するばかりでなく、ダウン症候群で高頻度に見られる除脈性不整脈、早期アルツハイマー病など、罹患者数の多い疾患の創薬開発にも貢献できることが期待される。

3. 研究の方法

マウスモデルおよびヒト ES 細胞を使った以下の 2 つの新たな染色体工学的アプローチで DS-AMKL の原因遺伝子の同定と発症メカニズムの解明を目指した。

(1) マウスモデルによるストラテジー

血液系細胞で高頻度にヒト 21 番染色体を維持することができる新規のモデルマウスを作製し、遺伝子発現解析、保持率解析、行動解析ならびに血液学的表現型解析等を行った。また、既存の GATA1s マウスと交配することで、DS-AMKL 様症状を検索するモデルを作製した。

(2) ヒト ES 細胞を用いたストラテジー

ヒト ES 細胞を用いてコントロール細胞

と同一遺伝的背景を持つ 21 番染色体トリソミーヒト ES 細胞(ダウン症候群モデル ES 細胞 = Ts21-ES)を作製し、染色体解析および多分化能の解析等を行ったのちに、血液学的異常を検索した。一方で、正常ヒト ES 細胞内でゲノム編集技術を用いて GATA1 遺伝子 GATA1s タンパク質が発現するように変異を導入し (=GATA1s-ES) さらにヒト 21 番染色体を導入することで 21 番染色体トリソミー/GATA1s 導入細胞を作製し (=GATA1s/Ts21-ES) DS-AMKL 様の表現型が観察されるかを検索した。また、様々なヒト 21 番染色体領域を持つ染色体断片を作製し、正常ヒト ES あるいは GATA1s 導入ヒト ES 細胞に導入することで、原因遺伝子同定を試みた。

4. 研究成果

(1) マウスモデルによるストラテジー

Cre-loxP システムを用いてヒト 21 番染色体長腕領域(約 30Mb)を独自に開発したマウス人工染色体(MAC)上に転座クロニングすることに成功した(hChr.21q-MAC とよぶ)。さらに、子孫伝達可能な新規の hChr.21q-MAC 保持ダウン症候群モデルマウスの系統化に成功した。これらの系統化したマウスにおいて、ヒト 21 番上の遺伝子はヒトと同様の組織特異的発現パターンで発現しており、各組織における FISH 解析により hChr.21q-MAC の保持率を解析したところ、95%以上の高い保持率であることが確認された。hChr.21q-MAC マウスの行動解析を行ったところ、正常マウスに比べ、hChr.21q-MAC 保持マウスにおいて優位に学習能力の低下が観察された。また、hChr.21q-MAC マウスにおいて、血液学的異常を検索した結果、正常マウスに比べ、優位に血液学的異常が観察された。また、hChr.21q-MAC マウスを用いて放射線感受性試験を行ったところ、正常マウスに比べ優位に放射線感受性が高いことが明らかとなった。さらに、GATA1s マウス系統と hChr21q-MAC マウス系統の交配により GATA1s/hChr21q-MAC マウスの系統化に成功した。なお、hChr.21q-MAC マウスは理研バイオリソースセンターに寄託済みであり(RBRC05796)、広く研究利用が可能となっている。

(2) ヒト ES 細胞を用いたストラテジー

ヒト ES 細胞にゲノム編集技術を用いて X 染色体上の GATA1 遺伝子に GATA1s 変異を導入することに成功した。次に上記で作製した GATA1s-ES 細胞あるいは正常 ES 細胞にヒト 21 番染色体を導入した。得られた各種 ES 細胞を SCID マウス精巢に移植することでテラトーマを作製し、各種 ES 細胞が 3 胚葉に分化能を持つことが確かめられた。また、マイクロアレイ解析により 21 番上の遺伝子がグローバルに 1.5 倍程度過剰発現していることが確かめられた。上記で作製した Ts21-ES、GATA1s-ES、GATA1s/Ts21-ES と正常 ES 細胞の

4種のES細胞を用いて、ES-sac法による分化誘導と赤血球系分化細胞におけるWestern blot解析を行ったところ、21番上のBACH1遺伝子は正常ES、GATA1sESに比べヒト21番導入により高発現しており、GATA1s変異導入によりGATA1発現は消失し、GATA1sが高発現していることが確かめられた。さらにフローサイトメトリー解析を行ったところ、正常ES細胞に比べ、Ts21-ES細胞では赤血球系分化が亢進し、GATA1s-ES細胞では赤血球系分化が抑制され、GATA1s/Ts21-ESにおいて巨核球系分化異常が観察された。すなわち、ヒト21番導入とGATA1s導入の相乗的な影響で巨核球系分化異常を引き起こしていることが示唆された。

次にヒト21番染色体を染色体工学技術を用いて改変し、種々のヒト21番染色体領域を持つトリソミーヒトES細胞を作製した。作製したES細胞について、ヒト21番染色体特異的プローブを用いてFISH解析を行うことで、ヒト21番染色体断片のみが過剰に1本保持されたトリソミーES細胞を選別した。さらに、SCIDマウスの精巣に各細胞を移植し、テラトーマを作製することで、3胚葉に分化能を持つES細胞であるかを確認した。上記ES細胞を用いて、血液分化誘導を行うことで血液分化異常とヒト21番染色体領域との関係を検索したところ、ETS2部位での切断ヒト21番染色体導入ヒトES細胞を用いた場合でも、表現型異常に変化はなかったことから、ETS2からテロメア側には原因遺伝子が存在しないことが明らかとなった。

さらに、ゲノム編集技術を用いて、特定の遺伝子を破壊したヒト21番染色体を作製し、その改変ヒト21番染色体を持つトリソミーヒトES細胞を作製した。上記ES細胞を用いて、血液分化誘導を行うことで血液分化異常と原因遺伝子との関係を検索したところ、該当遺伝子により巨核芽球への分化抵抗性を示した。

さらに、GATA1s-ES細胞に種々のヒト21番染色体領域を導入することで、部分トリソミーGATA1s-ES細胞の作製に成功した。また、GATA1s/Ts21-ES細胞にDS-AMKL患者で見られる変異をゲノム編集技術で導入し、異なる3つの遺伝子変異を導入することに成功した。今後、上記の細胞パネルを用いてDS-AMKL様表現型が観察されるかを検討する予定である。

以上のように、本研究で作製することに成功したマウスおよびヒトES細胞資材はDS-AMKLだけでなく成人のがん発症機構の理解を深め、ダウン症の症状改善のための医薬品開発などに貢献するばかりでなく、ダウン症で高頻度に見られる除脈性不整脈、早期アルツハイマー病など、罹患者数の多い疾患の創薬開発にも貢献できるツールとなることが期待される。

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 14件)

Honma K, Abe S, Endo T, Uno N, Oshimura M, Ohbayashi T, Kazuki Y. Development of a multiple-gene-loading method by combining multi-integration system-equipped mouse artificial chromosome vector and CRISPR-Cas9. *PLoS One*. 2018 Mar 5;13(3):e0193642. doi: 10.1371/journal.pone.0193642. eCollection 2018.

Satoh D, Abe S, Kobayashi K, Nakajima Y, Oshimura M, Kazuki Y. Human and mouse artificial chromosome technologies for studies of pharmacokinetics and toxicokinetics. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2018 Feb;33(1):17-30.

doi:10.1016/j.dmpk.2018.01.002.

Epub 2018 Jan 11. Review.

Uno N, Abe S, Oshimura M, Kazuki Y. Combinations of chromosome transfer and genome editing for the development of cell/animal models of human disease and humanized animal models. *J Hum Genet*. 2017 Nov 27. doi:10.1038/s10038-017-0378-7.

Review.

Shinohara T, Kazuki K, Ogonuki N, Morimoto H, Matoba S, Hiramatsu K, Honma K, Suzuki T, Hara T, Ogura A, Oshimura M, Kanatsu-Shinohara M, Kazuki Y. Transfer of a Mouse Artificial Chromosome into Spermatogonial Stem Cells Generates Transchromosomal Mice. *Stem Cell Reports*. 2017 Oct 10;9(4):1180-1191. doi:10.1016/j.stemcr.2017.08.012.

Tomimatsu K, Kokura K, Nishida T, Yoshimura Y, Kazuki Y, Narita M, Oshimura M, Ohbayashi T. Multiple expression cassette exchange via TP901-1, R4, and Bxb1 integrase systems on a mouse artificial chromosome. *FEBS Open Bio*. 2017 Jan 28;7(3):306-317. doi: 10.1002/2211-5463.12169.

Kokura K, Kuromi Y, Endo T, Anzai N, Kazuki Y, Oshimura M, Ohbayashi T. A kidney injury molecule-1 (Kim-1) gene reporter in a mouse artificial chromosome: the responsiveness to cisplatin toxicity in immortalized mouse kidney S3 cells. *J Gene Med*. 2016 Oct;18(10):273-281. doi: 10.1002/jgm.2925.

Suzuki T, Kazuki Y, Oshimura M, Hara

T. Highly Efficient Transfer of Chromosomes to a Broad Range of Target Cells Using Chinese Hamster Ovary Cells Expressing Murine Leukemia Virus-Derived Envelope Proteins. *PLoS One*. 2016 Jun 7;11(6):e0157187. doi: 10.1371/journal.pone.0157187. eCollection 2016.

Kugoh H, Ohira T, Oshimura M. Studies of Tumor Suppressor Genes via Chromosome Engineering. *Cancers (Basel)*. 2015 Dec 30;8(1). pii: E4. doi: 10.3390/cancers8010004. Review.

Yoshimura Y, Nakamura K, Endo T, Kajitani N, Kazuki K, Kazuki Y, Kugoh H, Oshimura M, Ohbayashi T. Mouse embryonic stem cells with a multi-integrase mouse artificial chromosome for transchromosomal mouse generation. *Transgenic Res*. 2015 Aug;24(4):717-27. doi: 10.1007/s11248-015-9884-6.

Hiratsuka M, Ueda K, Uno N, Uno K, Fukuhara S, Kurosaki H, Takehara S, Osaki M, Kazuki Y, Kurosawa Y, Nakamura T, Katoh M, Oshimura M. Retargeting of microcell fusion towards recipient cell-oriented transfer of human artificial chromosome. *BMC Biotechnol*. 2015 Jun 19;15:58. doi: 10.1186/s12896-015-0142-z.

Oshimura M, Uno N, Kazuki Y, Katoh M, Inoue T. A pathway from chromosome transfer to engineering resulting in human and mouse artificial chromosomes for a variety of applications to bio-medical challenges. *Chromosome Res*. 2015 Feb;23(1):111-33. doi: 10.1007/s10577-014-9459-z.

Suzuki T, Kazuki Y, Oshimura M, Hara T. A novel system for simultaneous or sequential integration of multiple gene-loading vectors into a defined site of a human artificial chromosome. *PLoS One*. 2014 Oct 10;9(10):e110404. doi: 10.1371/journal.pone.0110404. eCollection 2014.

Kazuki Y, Yakura Y, Abe S, Osaki M, Kajitani N, Kazuki K, Takehara S, Honma K, Suemori H, Yamazaki S, Sakuma T, Toki T, Shimizu R, Nakauchi H, Yamamoto T and Oshimura M. Down

syndrome-associated haematopoiesis abnormalities created by chromosome transfer and genome editing technologies, *Sci. Rep*. 2014 Aug 27;4:6136. doi: 10.1038/srep06136.

Kazuki K, Takehara S, Uno N, Imaoka N, Abe S, Takiguchi M, Hiramatsu K, Oshimura M, Kazuki Y. Highly stable maintenance of a mouse artificial chromosome in human cells and mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Dec 6; 442(1-2):44-50. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.171.

〔学会発表〕(計 14件)

Nishinaka-Arai Y, Niwa A, Matsuo S, Kazuki Y, Yakura Y, Oshimura M, Nakahata T and Saito MK (2017年12月9-12日, Atlanta, GA, USA) Identification of candidate progenitor populations which causes transient abnormal myelopoiesis. 59th American Society of Hematology

久郷裕之, 宇野愛海, 大平崇人, 平塚正治, 香月康宏, 押村光雄 (2017年12月6日-9日, 神戸ポートアイランド, 神戸), 染色体医工学技術を用いた疾患の原因究明, 治療法の開発(口頭, ワークショップ/ポスター), 第40回日本分子生物学会年会

Yakura Y, Akagi T, Abe S, Uno N, Kazuki K, Oshimura M, and Kazuki Y (2017年11月15-17日, 神戸国際会議場, 神戸市), ダウン症候群における白血病の病態解明に向けた病態モデル細胞の作製(ポスター), 日本人類遺伝学会第62回大会

押村光雄 (2017年9月21日, 韓国) 鳥取大学発・世界最先端の染色体医工学技術を主軸とした新産業創出構想, 第7回北東アジア産業技術フォーラム

押村光雄 (2017年5月19日) ヒト・マウス人工染色体導入マウス及び細胞の構築と限らない応用の可能性, かずさDNA 千葉県バイオ・ライフサイエンス・ネットワーク会議(招待講演)

Uno N, Uno K, Komoto S, Kazuki Y, and Oshimura M. (2016年4月3-7日, Kyoto international conference center) CHO-intermediated Chromosome Engineering (CHOiCE) technique using CRISPR/Cas9. (ポスター) The 13th International Congress of Human Genetics (ICHG)

宇野愛海, 宇野勝洋, 古本真也, 末松拓郎, 香月康宏, 押村光雄 (2016年9月6-7日, 広島, 広島国際会議場), CHO細胞中におけるCRISPR/Cas9を用いた

染色体改変技術の開発 (ポスター)、日本ゲノム編集学会第一回大会
押村光雄 (平成 28 年 3 月 26-28 日、横浜)人工染色体技術による創薬研究への応用、日本薬学会第 136 年会
鈴木輝彦、押村光雄、原孝彦 (平成 27 年 12 月 1 日-4 日、神戸)新規高効率染色体導入法 retro-MMCT 法の開発、第 38 回日本分子生物学会
香月康宏、平松敬、阿部智志、梶谷尚世、香月加奈子、高原昇子、滝口正人、長谷川敦史、清水律子、若菜茂晴、古瀬民生、山田郁子、越後貫成美、小倉淳郎、押村光雄 (平成 27 年 10 月 14-17 日、東京)染色体工学技術を用いた新規ダウン症候群モデルマウスの作製、第 60 回日本人類遺伝学会大会 (最優秀ポスター賞受賞)
香月康宏、押村光雄 (平成 26 年 10 月 6-7 日、広島)染色体工学技術とゲノム編集技術の融合によるダウン症候群モデル細胞・動物の作製、第 4 回ゲノム編集研究会
香月康宏、小林カオル、平林真澄、佐久間哲史、久世治朗、阿部智志、滝口正人、平松敬、本間和久、梶谷尚世、高原昇子、香月加奈子、千葉寛、山本卓、押村光雄 (平成 26 年 5 月 16 日、札幌コンベンションセンター)染色体工学技術とゲノム編集技術によるヒト化薬物代謝モデル動物の作製、第 61 回日本実験動物学会総会
宇野愛海、香月加奈子、高原昇子、今岡奈津子、阿部智志、滝口正人、平松敬、香月康宏、押村光雄 (平成 26 年 5 月 16 日、札幌コンベンションセンター)ヒト細胞とマウス個体において極めて安定に維持されるマウス人工染色体、第 61 回日本実験動物学会総会
香月康宏、佐久間哲史、小林カオル、阿部智志、平林真澄、千葉寛、山本卓、押村光雄 (平成 25 年 10 月 26-27 日、広島)染色体工学技術とゲノム編集技術によるヒト化モデル動物の作製、第 3 回ゲノム編集研究会

〔図書〕(計 4 件)

香月康宏、押村光雄：「進化するゲノム編集技術」(株)NTS 第 1 編-第 1 章「第 5 節 人工染色体技術とゲノム編集技術の融合による遺伝子改変技術」p.49-58 (2015)
香月康宏、押村光雄：染色体工学技術とゲノム編集技術の融合による医学・薬学研究への応用---今すぐ始めるゲノム編集、山本卓 編集、実験医学別冊(羊土社) p81-82 (2014)
香月康宏、押村光雄：遺伝子改変法 HAC/MAC---ES・iPS 細胞実験スタンダー

ド、中辻憲夫 監修・末盛博文 編集、実験医学別冊(羊土社) p300-315(2014)
香月康宏、押村光雄：安全遺伝子導入のためのヒトおよびマウス人工染色体ベクター---In vitro 毒性・動態評価の最前線、小島肇夫 監修、シーエムシー出版、p174-182 (2013)

〔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

<http://www.med.tottori-u.ac.jp/chromosome/532/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

押村 光雄 (OSHIMURA MITSUO)

鳥取大学・染色体工学研究センター・特任教授

研究者番号：20111619

(2) 研究分担者

尾崎 充彦 (OSAKI MITSUHIKO)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：40325006