

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H05063

研究課題名(和文)染色体異常を伴った疾患特異的iPS細胞を修復する「染色体編集法」の開発

研究課題名(英文)Development of chromosome editing

研究代表者

林 洋平 (Hayashi, Yohei)

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・チームリーダー

研究者番号：90780130

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,500,000円

研究成果の概要(和文)：染色体異常は非常に高頻度で見られる遺伝的疾患であるが、染色体異常そのものを修復する根本的な治療法は現在のところ存在しない。本研究においては、全く新しい染色体治療のコンセプトである「染色体編集」法として提唱することを目的として研究を行う。これまで、「染色体編集」されたiPS細胞株に対し、元の染色体異常を持ったiPS細胞株と比較して、染色体異常に起因する表現型と遺伝子発現の異常がそれぞれ修復されているか、染色体編集により再生医療に用いられる質を持ったiPS細胞株が生み出せるか、をそれぞれ検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

染色体異常は非常に高頻度で見られる遺伝的疾患であるが、染色体異常そのものを修復する根本的な治療法は現在のところ存在しない。この研究の完成により、染色体異常を持った患者からiPS細胞を作成し、培養状態にて染色体を修復したのちに、元の患者で機能が損なわれている臓器、細胞種を分化誘導し、移植するという再生医療が可能であることが示唆できる。

研究成果の概要(英文)：Chromosome aberration is a highly prevalent genetic disorder, but there is currently no fundamental treatment to repair the chromosome aberration itself. In this study, we aim to propose a completely new concept of chromosome therapy as a "chromosome editing" method. In this study, we aim to propose a completely new concept of chromosome therapy, "chromosome editing".

研究分野：基礎医学

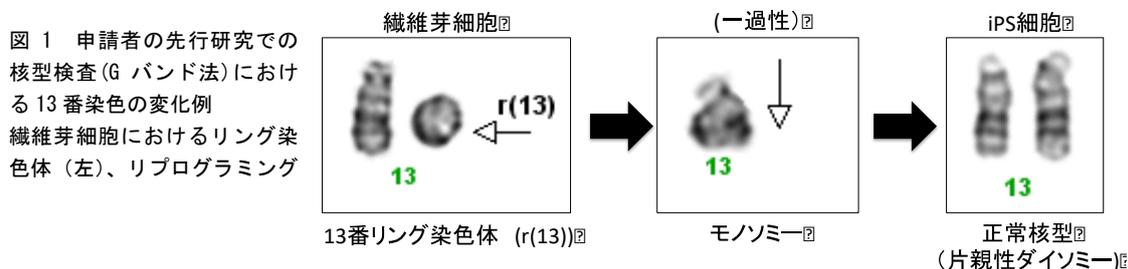
キーワード：iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

染色体異常は先天的には数々の遺伝病、後天的には様々ながんに関与することが知られている。先天的な染色体異常は全妊娠の 40% を占めるとされ、その大部分は流産として淘汰されるが、0.6% の新生児に存在することが知られている。小児期、成人期における染色体異常の症状は千差万別だが、全て対症療法が行われている。がんにおいては、例えば白血病では頻繁に「フィラデルフィア染色体」と呼ばれる様式の染色体異常(この場合は転座)がみられる。この場合、がん細胞のみを死滅させ、骨髄移植など機能を補填する治療が行われている。いずれにせよ、染色体異常に関連する疾患に対して染色体異常そのものを修復する根本的な治療法は現存しない。

染色体全体を操作する先行技術として、1997 年にヒト人工染色体(HAC)が開発されたが(Harrington, J.J., et al. *Nat. Genet.*, 15, 345-355, 1997)、安定的導入の困難さなどの課題点が挙げられており、医学応用の目処は現在も立っていない。近年、ZFN、TALEN、Cas9-CRISPR といった任意のゲノム DNA を局所的に改変できる「ゲノム編集」技術が目覚ましく進展しているが、既存の「ゲノム編集」技術は染色体全体といった大規模なゲノム構造に対しては、原理的に適用できない。従って、染色体全体を操作し、染色体異常を治療する新しい技術が求められている。

申請者はこれまで J David Gladstone Institutes の山中伸弥先生の研究室で博士研究員をしており、多数の iPS 細胞樹立とその病態モデルの解析、iPS 細胞の作製メカニズムの解析の実績を持つ(例、Hayashi et al., *PNAS* in press; Hayashi et al., *PNAS* 2015; Matsumoto*, Hayashi* et al., *Orphanet J Rare Dis* 2013; Hayashi et al., *PLoS One* 2010; *は Equally Contributed を示す。)。そのひとつの先行研究において、末端欠失を伴ったリング(環状)染色体を持つ患者の細胞から iPS 細胞を作製すると、リング染色体が細胞自律的に消失し、一過的にモノソミーを経て、正常な核型を持った片親性ダイソミーの iPS 細胞株を効率良く樹立できることを見出した(Bershteyn*, Hayashi*, et al., *Nature*, 2014; *は Equally Contributed を示す。; 下記の図 1 に核型検査例を表示)。この先行研究はリング染色体という特殊な染色体を用いたものだったが、異常染色体を消去し、正常染色体を増幅することによって、欠失に伴い機能を喪失した遺伝子発現を回復できることを示していた。さらにこの先行研究後、別のグループにより、X 染色体モノソミーであるターナー症候群の患者から iPS 細胞を作製した際に、同様に X 染色体が片親性ダイソミーとなった iPS 細胞株が作製されたことが報告され(U Luo, et al., *Cell Discovery* 1, 15022, 2015)、申請者の先行研究に汎用性があることが示唆された。



2. 研究の目的

以上の研究はそれぞれ特異的な染色体異常を修復した例であるが、私はこの原理を一般的な染色体異常(欠失・転座)に展開し、人為的に染色体を修復できる可能性があるとの仮説を立てている。本研究は、その仮説を検証し、再生医学において応用可能であることを実証(Proof of Concept)することを目的とする。上記の図 2 に本研究計画の概要を示し、以下のことを研究期間に明らかにする。

(1)人為的な染色体改変操作を通じ、欠失・転座といった「傷ついた」染色体を環状化させる。先行研究からの作業仮説として、染色体の環状化に成功すれば、細胞自律的な働きにより、環状染色体が消失し(モノソミー)、正常な染色体を増幅して正常核型である片親性ダイソミーへと修復されると予想される。

(2)正常核型(片親性ダイソミー)に修復された iPS 細胞の分化誘導効率、遺伝子発現、エピジェネティック修飾の変化、を元々の染色体異常を持った iPS 細胞と比較しながら検討する。この解析により、作製された片親性ダイソミー細胞株の性状を明らかにする。

(3)正常核型(片親性ダイソミー)に修復された iPS 細胞を病態モデルマウスに移植し、再生医療への効果を評価する。

本研究では、申請者らが先行研究にて環状染色体という非常に稀な染色体異常で偶発(セレンディピティ)的、かつ独自に見出した成果を一般的な染色体異常の修復法の開発にまで発展させることに学術的な独創性を見出すことができると考えている。環状染色体のみを用いた先行研究の成果でさえ学術的反響は非常に大きく、*Nature Reviews Genetics* 誌に編集者によるレビューで取り上げられ(Burgess DJ. "Chromosome correction through reprogramming" *Nature*

Reviews Genetics 15, 146, 2014)、申請者も数本レビュー記事を書き、複数の国際学会で招待講演を行っている。そのため、先行研究を一般化した本研究が進展したときの学術的インパクトはさらに大きいと期待できる。以下の本研究計画の概要を示す。

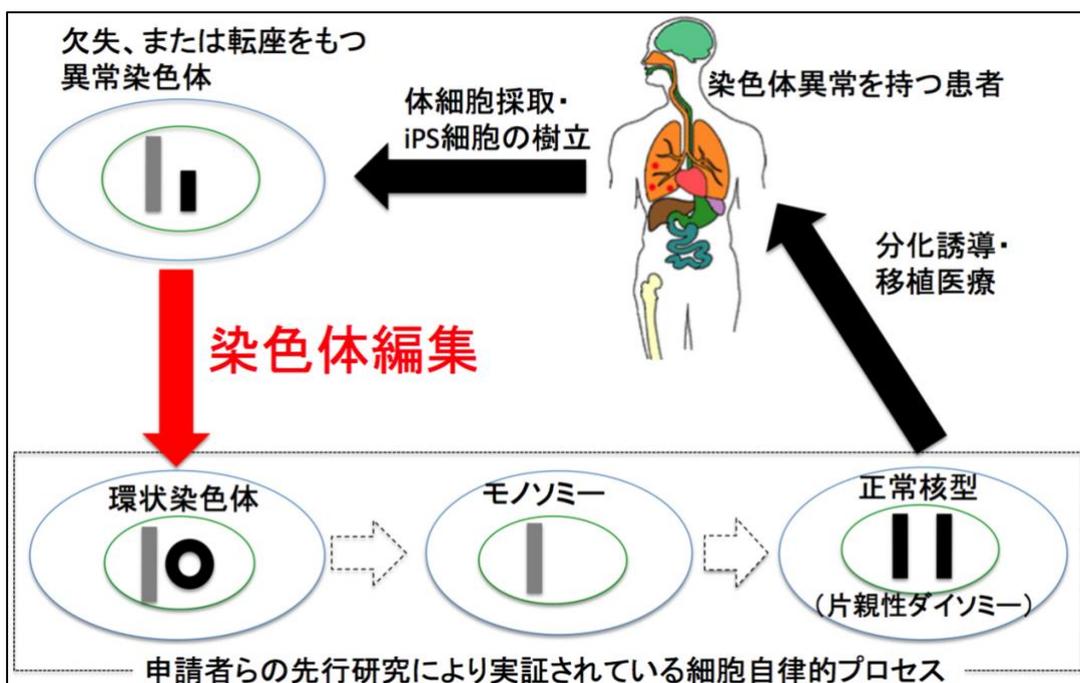


図2 本研究計画の概要

3. 研究の方法

本研究では効果的に研究を進めるための工夫として、適切な疾患ターゲットを選ぶことが重要である。本計画では、iPS細胞を用いた病態モデルの作製がすでに報告されている、17番染色体の短腕末端欠失によって滑脳症が引き起こされる「Miller-Dieker症候群」と7番染色体のq腕の欠失によって骨髄異形性症候群が引き起こされる「7q-症候群」、それぞれの患者由来のiPS細胞を用いた。Miller-Dieker症候群についてはすでに予備検討としてiPS細胞を作製しており、同領域の欠失を伴う環状染色体から効率よく片親性ダイソミーが自律的に生成されることが申請者の先行研究にて見出されている。これらの染色体異常を伴ったヒトiPS細胞中の欠失染色体に対し、以下の操作を施す。

(1) 染色体環状化を起こす遺伝子カセット（コンストラクト）の挿入

Cre/LoxPシステムなどの人工的な部位特異的DNA組換え反応を起こす遺伝子コンストラクトをセントロメアをはさむようにしてCRISPRなどのゲノム編集技術を用いて挿入する。この反応は数Mb(メガベース)離れた塩基配列同士をつなげられることが知られているので、今回の目的に適している。これらの部位特異的の反応を起こす遺伝子とともに puromycin などの抗生物質耐性遺伝子を発現しておき、完全に組換えが起きうる細胞のみを選抜する。上記の組換え反応の頻度は低いことが予想されるため、効率的に「染色体編集」されたiPS細胞株を回収するために、生み出された人工染色体にチミジンキナーゼ(TK)などの自殺遺伝子が発現する遺伝子コンストラクトをゲノム編集で組み込んでおく。

(2) Creリコンビナーゼ処理による環状化染色体作製

上記の遺伝子カセット挿入を行った細胞に対し、CreリコンビナーゼをmRNAの形でトランスフェクションし、loxPサイト間での部位特異的組換え反応を引き起こし、環状染色体を作製する。環状化されずに残った染色体の両端はセントロメアがないために、細胞分裂の際に分配されず、消失する。先行研究の成果からの作業仮説が正しければ、作製された環状染色体はある程度の確率で細胞自律的な作用によりモノソミー、さらには、片親性ダイソミーの細胞が誘導される。

(3) 自殺遺伝子カセットと対応する抗生物質による片親性ダイソミー細胞の選抜

作製された環状染色体には、ガンシクロビル依存的に細胞死を促す「自殺遺伝子」として知られているチミジンキナーゼ(TK)を発現させる。そのため、環状染色体を持つ細胞は、ガンシクロビル処理によって致死性となる。さらにモノソミーは培養条件下で増殖に不利となり、ガンシクロビル処理下で生存している片親性ダイソミー細胞が耐性クローンとして高効率に選抜される。

以上の方法により「染色体編集」され、片親性ダイソミーとなった iPS 細胞株に対し、元の染色体異常を持った iPS 細胞株と比較して、①染色体異常に起因する表現型と遺伝子発現の異常がそれぞれ修復されているか、②染色体編集により再生医療に用いられる質を持った iPS 細胞株が生み出せるか、③片親性ダイソミーを伴った細胞で懸念される劣性有害変異の蓄積の影響がないか、④インプリティング遺伝子の発現挙動がどうなっているか、をそれぞれ検討した。

具体的な方法としては、

- (1) 遺伝子発現について、RNA-Seq 法を用いてゲノム全域で網羅的に解析する。
- (2) エピジェネティック修飾について、DNA のメチル化に関しては MeDIP-Seq 法、各種ヒストン修飾に関しては ChIP-Seq 法を用いてゲノム全域で網羅的に解析する。
- (3) 培養条件下 (in vitro) での疾患表現型の有無について、「Miller-Dieker 症候群」に関しては、神経細胞へ分化誘導させ、遊走能を評価する (方法は、Bamba et al., Mol Brain 9:70, 2016 を参照する)。7q-症候群に関しては、骨髄異形性症候群モデルとして各種血液系細胞への分化能を評価する (方法は、Kotini et al., Nat Biotechnology 33:645-55, 2015 を参照する)。
- (4) ヒト化マウスへの移植モデルについて、7q-症候群特異的 iPS 細胞株ならびにその染色体編集した iPS 細胞株をそれぞれ造血幹細胞へと分化誘導し、ヒト化モデルマウスに移植して、マウス体内 (in vivo) での分化能や生着度合いなどの機能評価を行い、疾患モデルや再生医療への検討を図る (方法は、Rongvaux et al., Nat Biotechnol 32:364-72, 2014 を参照する)。

4. 研究成果

この研究の完成により、染色体異常を持った患者から iPS 細胞を作成し、培養状態にて染色体を修復したのちに、元の患者で機能が損なわれている臓器、細胞種を分化誘導し、移植するという再生医療が可能であることが示唆できる。申請者はこの技術を「染色体編集」法 (Chromosome Editing) と名付け、国際的に提唱することを企図している。さらに将来的には、患者体内で「染色体編集」(In Vivo Chromosome Editing) できる方法を開発し、医学全体における染色体異常に関連する疾患の革新的治療法を生み出すことを究極的な目標としている。その基盤として、本研究を遂行することは将来的な学術的発展と医療応用において非常に意義深い。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Arai Yutaka, Takami Miho, An Yuri, Matsuo-Takasaki Mami, Hemmi Yasuko, Wakabayashi Tamami, Inoue Jun, Noguchi Michiya, Nakamura Yukio, Sugimoto Keisuke, Takemura Tsukasa, Okita Keisuke, Osafune Kenji, Takasato Minoru, Hayata Tadayoshi, Hayashi Yohei	4. 巻 45
2. 論文標題 Generation of two human induced pluripotent stem cell lines derived from two juvenile nephronophthisis patients with NPHP1 deletion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 101815 ~ 101815
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2020.101815	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukuda Aya, Honda Shiho, Fujioka Norie, Sekiguchi Yuya, Mizuno Seiya, Miwa Yoshihiro, Sugiyama Fumihiro, Hayashi Yohei, Nishimura Ken, Hisatake Koji	4. 巻 14
2. 論文標題 Non-invasive in vivo imaging of UCP1 expression in live mice via near-infrared fluorescent protein iRFP720	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0225213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0225213	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Bui Phuong Linh, Nishimura Ken, Seminario Mondejar Gonzalo, Kumar Arun, Aizawa Shiho, Murano Kensaku, Nagata Kyosuke, Hayashi Yohei, Fukuda Aya, Onuma Yasuko, Ito Yuzuru, Nakanishi Mahito, Hisatake Koji	4. 巻 29
2. 論文標題 Template Activating Factor-1 Regulates Retroviral Silencing during Reprogramming	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1909 ~ 1922.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.10.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林 洋平
2. 発表標題 非公表
3. 学会等名 日本腎臓学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 洋平
2. 発表標題 非公表
3. 学会等名 日本動物実験代替法学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 洋平
2. 発表標題 非公表
3. 学会等名 日本レーザー学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関