

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10108

研究課題名(和文) ダウン症造血異常の責任遺伝子同定を目指した疾患iPS細胞ライブラリーの樹立

研究課題名(英文) Generation of disease-specific iPSC library for the identification of responsible genes in Down syndrome

研究代表者

荒堀 仁美 (Arahoru, Hitomi)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40379186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ダウン症候群では21番染色体上の遺伝子量効果によって多彩な合併症が起こる。そこで本研究では、ヒトiPS細胞とゲノム編集技術、ヒトXIST遺伝子を組み合わせることで、ダウン症候群における病態責任遺伝子同定を可能にする細胞モデル系の樹立を目指した。TET誘導システム制御下にXISTを21番染色体に挿入しDoxycycline依存性にXISTによる遺伝子発現抑制が起きていることを確認した。このXIST-iPS細胞をアストロサイトへと分化誘導することにより、ダウン症ではアストロサイトの増殖速度が異常に更新していることを見出し、さらにその遺伝子としてDYRK1AとPIGPを同定することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダウン症候群は精神発達遅滞をもたらす遺伝性疾患では最多である。その平均寿命は60歳を越えており病態解明が求められている。本研究により病態責任遺伝子の同定が可能となった。また実際にダウン症剖検脳で見られるアストロサイトの増殖の鍵を握る遺伝子を見つけることができた。今後このメカニズムを深く追求することで、治療法の開発に一步近づくことができるだろう。

研究成果の概要(英文)：In Down's syndrome, various complications occur due to the effect of the number of genes on chromosome 21. Therefore, in this study, we aimed to establish a cell model system that enables identification of pathologically responsible genes in Down's syndrome by combining human iPSC cells, genome editing technology, and human XIST genes. XIST was inserted into chromosome 21 under the control of the TET induction system, and it was confirmed that gene expression was suppressed by XIST in a Doxycycline-dependent manner. By inducing the differentiation of these XIST-iPS cells into astrocytes, we found that the proliferation rate of astrocytes was abnormally updated in Down's syndrome, and succeeded in identifying DYRK1A and PIGP as the genes.

研究分野：小児医学

キーワード：iPS細胞 ゲノム編集 ダウン症候群

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ダウン症候群(21トリソミー)は700人に1人という高い頻度で見られ、精神発達障害・先天性心疾患・造血異常などさまざまな合併症を呈する。21番染色体上の遺伝子数が2-3コピーへと増え、発現量が1.5倍に増加することがそれらの症状発現につながると考えられている(遺伝子量効果)。しかし21番染色体上には数百個もの遺伝子があり、そのうちのいくつかの、どの組み合わせの遺伝子量効果によって症状がもたらされるのかを知る方法はない。しかも特定の遺伝子の過剰発現や、ノックアウト/ノックダウンによる方法論では、標的遺伝子の組み合わせに限界があるだけでなく、発現量が0~数百倍と変化が大きく、たった1.5倍のコピー数増加による影響を正確に評価することは不可能である。

申請者の研究室では、これまでダウン症候群の病態解明を目指して研究を行ってきた。とくにダウン症新生児の10%に発症する一過性骨髄異常増殖症(TAM; transient abnormal myelopoiesis)と呼ばれる前白血病状態について、臍帯血から作成した疾患特異的ヒトiPS細胞と、新規の遺伝子改変技術であるゲノム編集技術を組み合わせ、TAMの疾患モデル系を作製し、その病態解明に取り組んできた。そして多様な21番染色体の核型と遺伝子変異を導入した14種類、40株以上のiPS細胞を樹立し、TAMの病態メカニズムを明らかにするとともに、ヒト細胞において初めて4Mbという巨大な領域を人工的に欠失させた“部分21トリソミーiPS細胞”の樹立に成功し、この領域がダウン症候群における造血異常の重要領域(Down syndrome critical region)であることを証明した。本研究ではこの研究をさらに進め、ダウン症の病態発症に関わるより多様な責任遺伝子群の同定を目指し、その遺伝子スクリーニングを可能にする疾患モデルの樹立を目的とした。

### 2. 研究の目的

我々はすでに遺伝子欠失・領域欠失・染色体除去など、さまざまな遺伝子改変を21トリソミーiPS細胞に施し、疾患モデル細胞の樹立に成功している。さらに本研究課題において、21トリソミーiPS細胞とゲノム編集技術、X染色体不活化を引き起こすXIST遺伝子を組み合わせることで、1つの細胞において、21番染色体上の遺伝子発現におけるダイソミー/トリソミーの状態を可逆的に作り出すことのできる疾患モデルを樹立し、病態変化につながる責任遺伝子の同定を目指した。

### 3. 研究の方法

XISTはX染色体上にコードされるnon coding RNA遺伝子である。雌性受精卵におけるX染色体不活化の際に、Xist RNAは2本のX染色体のうち片方からのみ発現してX染色体の一本全体を覆い、その遺伝子発現を不活化する。この不活化は同一染色体上でのみ(cisに)起こり、最終的には染色体全体を不活化させる。このXIST遺伝子を、ゲノム編集技術をもちいて21トリソミーiPS細胞のもつ3本の21番染色体に挿入し、テトラサイクリン誘導システム(Tet-On 3G)によって発現制御を行うことを目指した。この系をもちいることで、21番染色体上の遺伝子発現量は、Dox依存性に3つから2つ分へと減少する。すなわち、“ゲノムレベルでは依然として21トリソミーだが、遺伝子発現レベルではダイソミー”というユニークな系が得られる。このXIST-iPS細胞をさまざまな細胞系列へと分化誘導し、病的表現型と遺伝子発現パターン

ンを比較することにより、責任遺伝子の同定が可能になると考えられる。

#### 4. 研究成果

##### 1. Tet-On 誘導システム下に XIST 発現を制御する 21 トリソミー-iPS 細胞の作成

Tet-On 誘導系は、Tet トランスアクチベーター配列 (Tet-On 3G) と、テトラサイクリン応答因子配列 (PTRE3G) の 2 つの部分から成る (図 1)。Tet トランスアクチベーター (図 1 左) から生成される Tet-On タンパクは、ドキシサイクリン (Dox) 投与時にのみテトラサイクリン応答配列 (図 1 右) に結合し、その下流の遺伝子発現を ON にする。

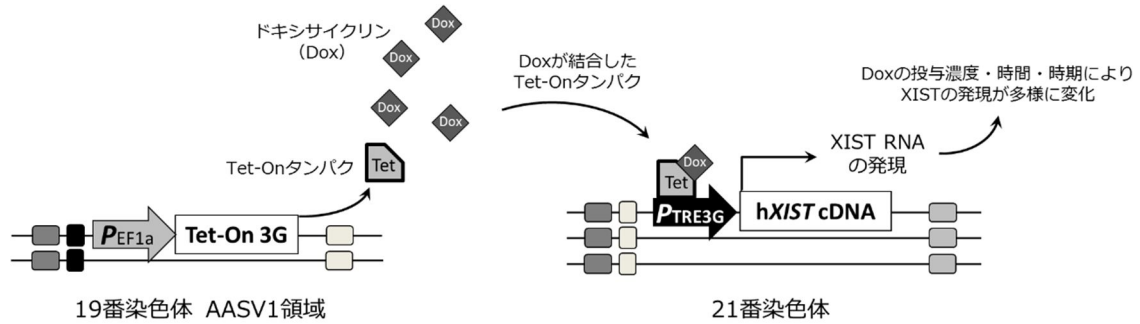
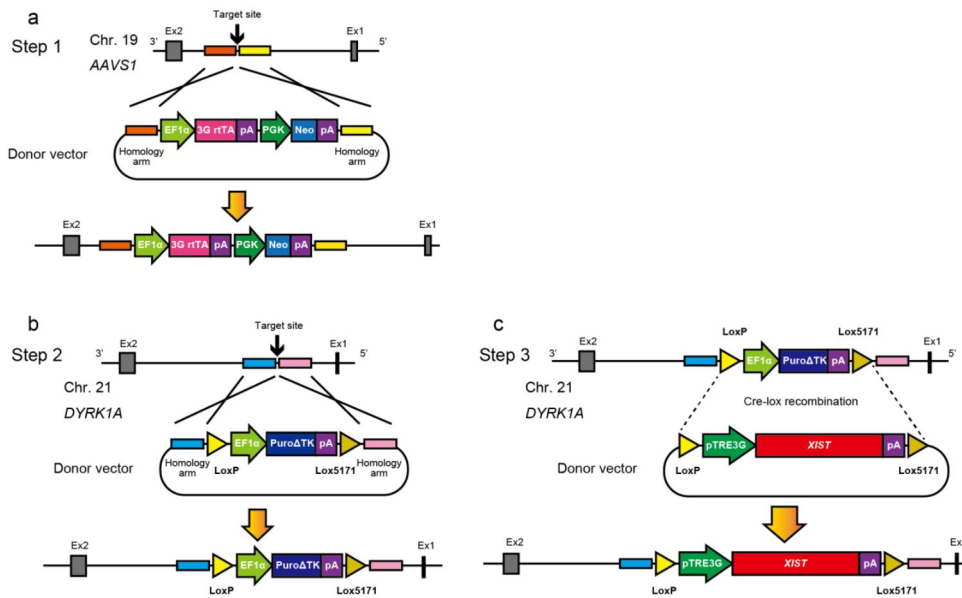


図 1. Tet-On 誘導システムをもちいた XIST 発現制御

(左)19 番染色体の AAVS1 領域に挿入された Tet-On 3G 配列から Tet-On タンパクが発現するものの、Dox 不在下では Tet 応答配列に結合できない。(右) Dox を投与すると Tet-On タンパクと結合し、21 番染色体上に挿入された Tet 応答配列 (PTRE3G) に結合する。するとその下流にある XIST 遺伝子の発現が ON になる。

Tet-On 誘導システム下に XIST 発現を制御する 21 トリソミー-iPS 細胞を作成するため、まずダウン症 iPS 細胞の AAVS1 領域 (ヒト 19 番染色体上にある安全領域) に、CRISPR/Cas9 をもちいて rtTA (テトラサイクリン活性化配列) を挿入した。PGK プロモーター下に Neo 耐性遺伝子をつないだ配列も入れ、Neo による薬剤選択を行うことで目的のクローンを得た (図 2a)。つぎに 21 番染色体上の *DYRK1A* 配列近傍にヒト XIST 配列を挿入した。ヒト XIST cDNA は 17kb と大きいので 1 ステップで入れるのではなく、まず loxP と lox5171 に挟まれた挿入カセット (EF1 プロモーター + puro tk 配列) を puromycin によるポジティブセレクションによって挿入した (図 2b)。さらにこの挿入カセットが 21 番染色体の一本だけに入ったことを確認した上で、loxP / lox5171 に挟まれた「テトラサイクリン応答配列 (TRE) + XIST cDNA」のコンストラクトを、Cre リコンビナーゼをもちいて挿入カセットとの置換を行った。この 2 回目のステップでは、FIAU によるネガティブセレクションを行った (図 2c)。

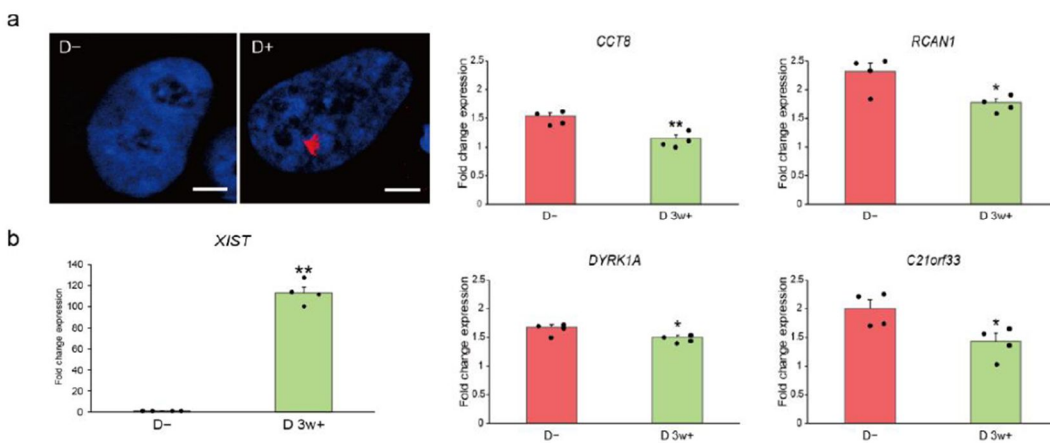


**図 2. Tet-On 誘導システムをもちいた XIST 発現制御**

(a)19 番染色体にある AAVS1 領域にゲノム編集を用いて Tet トランスアクチベーター (Tet-On 3G) を挿入。PGK プロモーター下に Neo 耐性遺伝子をつないだ配列も入れ、Neo による薬剤選択 (ポジティブセレクション) を行った。

(b)XIST 遺伝子は 19kb と大きく、直接ヒト iPS 細胞へ導入するのは難しいため、まず loxP と lox5171 配列で puro TK 配列を挟んだ '挿入カセット' を作成し、CRISPR を用いて 21 番染色体の 1 本に挿入した (puro 耐性遺伝子によるポジティブセレクション) つぎに PTRE3G-XIST cDNA 配列を、おなじく loxP と lox5171 配列で挟んだコンストラクトを、Cre リコンビナーゼを用いて挿入カセットと交換した。その際 TK 配列と FIAU をもちいたネガティブセレクションを行った。

得られたクローンでは Doxycycline の投与によって XIST RNA が発現し、さらに 21 番染色体上の遺伝子発現がダイソミーレベルまで低下していることが確認された (図 3)



**図 3. Dox 投与による XIST の発現と遺伝子発現の不活化**

XIST-21trisomy iPS 細胞に Dox を 3 週間投与する (D+) ことで、XIST-RNA が発現していることが RNA-FISH、および QRT-PCR で確認された。また 21 番染色体上の遺伝子の発現量は、Dox 投与によって低下が見られた。

### 3. iPS 細胞のアストロサイトへの分化誘導と遺伝子発現確認

樹立した XIST-21 trisomy iPS 細胞を分化誘導し、その解析を行うため、ダウン症候群におい

て細胞増殖の亢進が報告されているアストロサイトに分化誘導をすることとした。

iPS 細胞から SB431252 (10 μM)、Dorsomorphin (2 μM) を加えた浮遊培養を行い、つぎに接着培養を行うと、約 2 週間でロゼットが形成される。このロゼットを丁寧に採取し、N2 / B27 サプリメントとともに培養することで神経前駆細胞 (NPC) を単離した。増殖させた NPC をさらに Astrocyte medium をもちいて培養することで非常に純度の高いアストロサイトを樹立することができた (図 4a, b)。この XIST-trisomy21 astrocyte について、EdU をもちいてその増殖率を測定したところ、まず trisomy21 の状態では disomy の状態に比べて有意に増殖率が亢進していた。これに Dox を加えて染色体不活化を誘導することで、増殖率は低下した。さらに Dox を 3 週間除去することで、増殖率は再び trisomy と同じく亢進した状態に戻った。この増殖率の変化は、アストロサイト過剰増殖を引き起こす原因遺伝子の発現が染色体不活化によって抑制され、かつ Dox 除去によって再増加したことを示唆する。

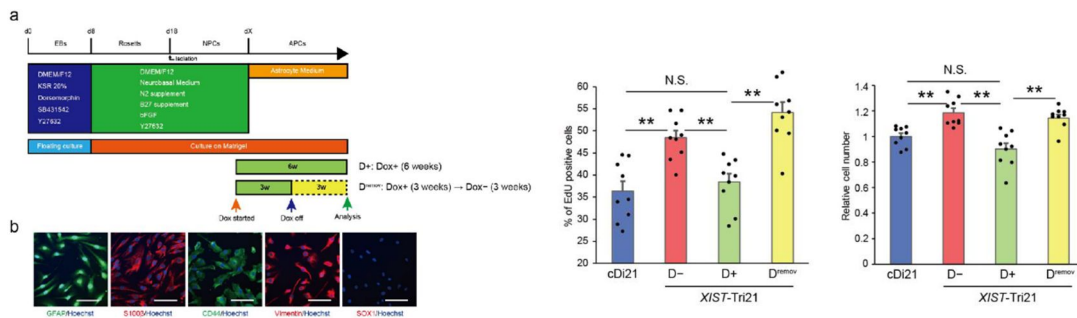


図 4. アストロサイトへの分化誘導と Dox 投与によるアストロサイト増殖率の変化

この Dox 非投与・投与・除去の 3 種類のアストロサイトをもちいて RNA seq を行い、21 番染色体上の遺伝子の遺伝子発現パターンとアストロサイト増殖率変化を比較することで、ダウン症アストロサイトの過剰増殖をもたらす責任遺伝子として DYRK1A および PIGP を同定することに成功した。

今後、これら 2 つの遺伝子がアストロサイトの増殖に与える影響についての機能解析を行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawatani K, Nambara T, Yoshimatsu H, Kusakabe H, Hirata K, Tanave A, Sumiyama K, Banno K, Taniguchi H, Arahori H, Ozono K, Kitabatake Y.	4. 巻 -
2. 論文標題 A human isogenic iPSC-derived cell line panel identifies major regulators of aberrant astrocyte proliferation in Down syndrome	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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0件

〔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
研究分担者	北畠 康司  (Kitabatake Yasuji)  (80506494)	大阪大学・医学部附属病院・准教授    (14401)	

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