

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19177

研究課題名(和文) 患者iPS細胞の遺伝子変異修復と導入による若年性骨髄単球性白血病発症機構の解析

研究課題名(英文) Gene editing of patient-derived iPS cells by Zinc finger nuclease to analyze development of juvenile myelomonocytic leukemia

研究代表者

松田 和之(MATSUDA, Kazuyuki)

信州大学・医学部附属病院・主任臨床検査技師

研究者番号：00647084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：今回、若年性骨髄単球性白血病(JMML)発症に関連するPTPN11遺伝子に特異的なジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)を用いて、JMML患者由来のPTPN11変異陽性iPS細胞について、変異の修復を行った。PCR法およびダイレクトシーケンシング法により、正確な位置で変異塩基から正常塩基への修復ができた。現在、PTPN11変異陰性iPS細胞についても、同様の方法で変異塩基を導入した細胞を樹立している。今後、これらの遺伝子改変iPS細胞からCD34陽性細胞を誘導し、その動態の違いを解析し、JMML発症機構の解析を行いたい。

研究成果の概要(英文)：We performed gene correction using Zinc Finger Nuclease (ZFN) specific for PTPN11 gene in juvenile myelomonocytic leukemia (JMML)-derived iPS cells with mutated PTPN11. PCR and direct sequencing confirmed that the mutated nucleotide was converted into wild-type one precisely. We will introduce mutation into PTPN11 wild-type iPS cells by the same protocol. The two types of gene-edited iPS cells (mutant-to-wild and wild-to-mutant) are useful for analysis of the cell kinetics to reveal the mechanism of development of JMML.

研究分野：遺伝子・染色体解析

キーワード：ZFN JMML PTPN11

## 1. 研究開始当初の背景

小児の代表的な難治性血液腫瘍疾患である若年性骨髄単球性白血病(JMML)の約80%の患者では、RAS/MAPK シグナル経路に関連する5種類の遺伝子変異が排他的に認められる。エクソーム解析の結果、細胞当たりの変異数は平均0.85であったが、一部の症例では上記変異に加えて1~2個の他の変異が共存することが明らかになった。JMMLが単一遺伝子変異によって発症するか否かは未だ不明である。

近年、ジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)を始めとするゲノム改変技術が開発されている。従来の外来性プロモーターによる過剰発現や発現抑制ではなく、本来の遺伝子座位でのゲノム改変が可能となっている。

本研究では、研究代表者らが樹立に成功したJMML患者由来iPS細胞を対象として、ZFNによるJMML関連遺伝子PTPN11の改変(変異導入・修復)を行う。本研究により単一遺伝子変異による細胞動態の違いが明らかになれば、JMMLの発症機構を解明するきっかけになると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、従来の外来性プロモーターによる過剰発現や発現抑制ではなく、本来の遺伝子座位でのゲノム改変が可能であるZFNを利用して、JMML発症原因となるPTPN11遺伝子変異について、①患者の変異陽性iPS細胞の変異を修復する、②患者の変異陰性iPS細胞に変異を導入する。そして、単一遺伝子変異の有無による細胞増殖能の違いを解析することである。

## 3. 研究の方法

### (1) ZFN の設計

ZFN 発現プラスミド構築: CompoZr カスタム ZFN (sigma)を用いて PTPN11 226G>A 変異部位を含む領域に特異的な ZFN を設計した。

### (2) 非特異的オフターゲットの有無

PROGNOS (Predicted Report Of Genome-wide Nuclease Off-target Sites) (<http://bao.rice.edu/Research/BioinformaticTools/prognos.html>) を利用して in silico により今回作製した PTPN11 特異的 ZFN 配列による非特異的オフターゲットの有無を検索した。

### (3) ドナープラスミドの作製

ZFN による遺伝子修復・導入は、ゲノム2本鎖DNAの切断後の生細胞の相同組み換え機構を利用するため、組み換えに利用される切断の影響を受けない相同配列が必要となる。ZFNによる切断部位(本研究では該当遺伝子変異の近傍)を挟んで上流・下流にそれぞれ800bpの領域をホモロジーアームとして、それを含む領域をサブクローニングした。以下2種類のドナープラスミドを作製した。

①変異修復用(変異塩基→正常塩基)では、健常人由来細胞からゲノムDNAを抽出し、該当領域をPCR増幅した後に、TAクローニングベクター(pTA2ベクター:TOYOBO)にサブクローニングした。②変異導入用(正常塩基→変異塩基)では、①で作製したプラスミドを鋳型として、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies)を用いて患者で認められるPTPN11 226G>A変異へ置換を行った。

### (4) ドナープラスミドへのブロッキング変異の導入

ドナープラスミド自体が相同組み換えの前にZFNによって切断されてしまう反応や一度ZFNによって細胞染色体内に挿入された配列部位が再び切り離されてしまう反応を抑制する目的で、上記で作製した2種類の各ドナープラスミドに組み込んだ両側のホモロジーアーム内に、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies)を用いて2か所ずつ塩基置換を行った。

### (5) ドナープラスミドへのピューロマイシン耐性遺伝子配列の挿入

ドナーベクターの挿入確認のスクリーニングのために、ピューロマイシン耐性遺伝子配列を挿入し、ピューロマイシン耐性ドナープラスミドとした。

### (6) iPS細胞へのZFN発現プラスミド・ドナープラスミドの導入

iPS細胞を用いる前に、今回設計したZFNの特異性を確認するため、遺伝子導入効率が良い接着細胞株(A549細胞株)を用いて検討を行った。ヌクレオフェクション法(LONZA条件X-001)でZFN発現プラスミドと遺伝子変異導入用ドナープラスミドを同時に核内導入し、一日培養後に、ピューロマイシンを添加し培養した。2週間後にコロニー形成を確認した。

マウス胎児線維芽細胞(MEF)上で維持・培養したJMML患者由来PTPN11変異陽性iPS細胞について、MEFを使用せず、ReproFF2培地(ReproCELL)を用いて、培養を行った。iPSコロニー形成後、回収し、TrypLE Select (Thermo Fisher Scientific)を用いてシングルセル化処理を行った後に、ヌクレオフェクション法(条件A-023)でZFN発現プラスミドと遺伝子修復用ドナープラスミドを同時に核内導入し、一日培養後に、ピューロマイシンを添加し培養した。2週間後にコロニー形成を確認した。

### (7) 遺伝子改変の確認

ピューロマイシン添加培養液中で増殖したA549細胞のコロニーあるいはiPS細胞のコロニーをピックアップし、ゲノムDNAを抽出した。それぞれドナープラスミド上の配列への置換を確認するプライマーセット(F1,

R1) と正確な遺伝子座位での置換を確認するプライマーセット (F2, R2) (図 1) を用いて PCR を行った。PCR 後にゲル電気泳動を行い、ドナープラスミド配列への置換 (遺伝子改変) の有無を確認した。さらに、ダイレクトシーケンス法により、PTPN11 変異部位の塩基配列の確認を行った。

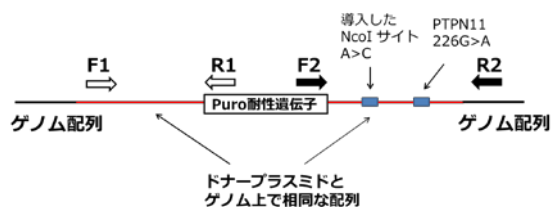


図 1 改変確認用のプライマーセット

ドナープラスミドとゲノム配列に相同な配列上に設計したプライマー (F1) とドナープラスミド上にのみ存在するピューロマイシン耐性遺伝子配列上に設計したプライマー (R1) を用いることで、改変の有無を確認する。また、同様にドナープラスミド上にのみ存在するピューロマイシン耐性遺伝子配列上に設計したプライマー (F2) とゲノム配列上に設計したプライマー (R2) を用いることで、改変が正確な遺伝子座位で行われていることを確認する。

#### (8) 遺伝子改変タイプの確認

ZFN によるゲノム改変が可能であった細胞では、ホモタイプあるいはヘテロタイプで改変がなされる。QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) を用いてゲノム DNA 上にはない NcoI 認識配列をドナープラスミド上に導入した。A>C 塩基置換をダイレクトシーケンス法によって確認し、遺伝子改変タイプの識別を行った。

## 4. 研究成果

### (1) *in silico* 解析による PTPN11 特異的 ZFN の非特異的オフターゲットの有無

今回作製した PTPN11 遺伝子特異的 ZFN について、PROGNOS サイトを利用して解析を行った。Right arm, left arm 内の 3 塩基ミスマッチまでを許容条件としても非特異的結合サイトはなく、*in silico* 解析では非特異的オフターゲット効果は認められなかった。

### (2) PTPN11 遺伝子特異的 ZFN の検証

予備検討として、A549 細胞株を用いて、ZFN による PTPN11 遺伝子変異導入の検討を行った。ピューロマイシン添加培養液で培養開始後、2 週間程度で A549 細胞のコロニーが形成された。各コロニー細胞から抽出したゲノム DNA を用いた PCR 法を行った結果、A549 細胞の適切な遺伝子座位で PTPN11226G>A の変異塩基置換を含む変異導入用ドナープラスミ

ド配列への置換が確認された。

### (3) iPS 細胞を用いた遺伝子改変

A549 細胞を用いた予備検討から、今回 ZFN 発現プラスミドとドナープラスミドが適切に機能することが確認できた。iPS 細胞をシングルセル化させた後に、PTPN11 226 部位の正常塩基置換を含む変異修復用プラスミドを用いて、ヌクレオフェクションにより遺伝子変異修復を行った。A549 細胞と同様に、ピューロマイシン添加培養液で培養開始後、2 週間程度で、iPS 細胞のコロニーが確認された。各コロニー細胞から抽出したゲノム DNA を用いて PCR 法を行った結果、正確な遺伝子座位で変異修復用ドナープラスミド配列への改変が確認された (図 2B, C)。一方、コントロールである改変操作を行っていない変異 iPS 細胞では、いずれの増幅産物も認められなかった (図 2A)。改変が確認できた 2 種類の iPS 細胞 (図 2B, C) について、さらに、ダイレクトシーケンス法を用いて該当変異部位 PTPN11 226G>A の塩基配列を確認した。その結果、1 種類の iPS 細胞で変異塩基 (A) が正常塩基 (G) に置換していることが確認できた (図 3B 左)。残りの 1 個の iPS 細胞では、変異塩基 (A) のままであった (図 3C 左)。

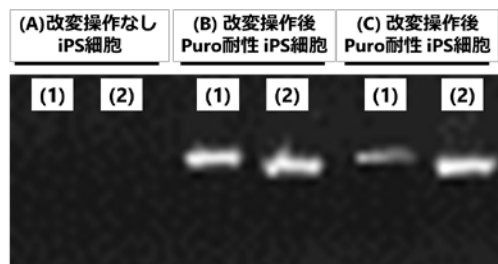


図 2 遺伝子改変の有無・改変部位の確認

ZFN 発現プラスミドとドナープラスミドをヌクレオフェクションし、ピューロマイシン抵抗性に発育したコロニーを用いて遺伝子改変の有無と改変部位の確認を行った。(1), F1 と R1 プライマーセット、(2), F2 と R2 プライマーセット。

### (4) 遺伝子改変タイプ (ホモタイプ or ヘテロタイプ) の解析

次に、遺伝子改変がホモタイプかヘテロタイプかについて、ドナープラスミド上に導入した NcoI 切断部位 (塩基置換 A>C) について、ダイレクトシーケンス法によって確認した結果、変異塩基側を正確に修復できた iPS 細胞および正常塩基側を修復した iPS 細胞について、いずれもヘテロタイプで ZFN により改変されていた (図 3B 右, C 右)。一方、コントロールである改変操作を行っていない変異 iPS 細胞では、NcoI 切断配列がないため、もとの塩基 (アデニン) であった (図 3A 右)。

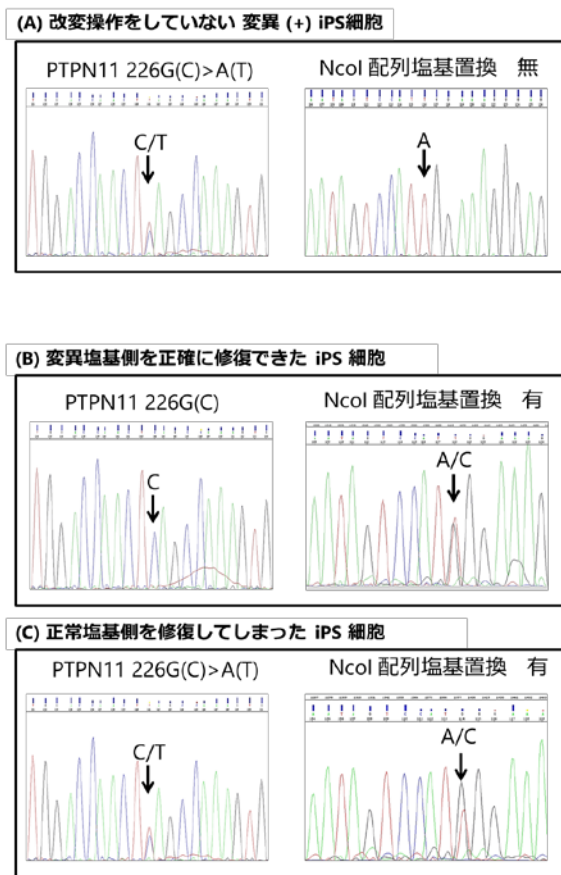


図3 変異塩基の修復と改変パターン

PCR によってドナーベクターへの置換が確認できた2種類のiPS細胞について、PTPN11遺伝子(226G>A)の塩基配列の確認と、人為的に導入したNcoI切断部位の塩基置換(A>C)の確認をした。1種類のiPS細胞では、PTPN11変異が修復され、NcoI切断部位の塩基置換がヘテロで確認された(B)。PTPN11変異の修復がされず、NcoI切断部位の塩基置換がヘテロで確認されたiPS細胞もあった(C)。

(5) 今後の展望

本研究によりZFNを用いてJMML由来のPTPN11変異陽性iPS細胞の変異塩基を正常塩基に修復することに成功した。変異塩基側のアレルで改変され、結果として変異の修復ができたiPS細胞(図4B)の他に、正常塩基側のアレルで改変が生じたiPS細胞(図4C)も得られた。この正常塩基側のアレルで改変が生じたiPS細胞については、今後の実験において、ZFNの作用そのものの影響を確認するコントロールとして使用できる。iPS細胞のシングルセル化や遺伝子導入法の検討に時間を要したため、最終的な血液細胞分化実験まで行うことが出来なかった。現在、同様の方法で、PTPN11遺伝子変異陰性iPS細胞に変異を導入している。ZFNによる遺伝子改変は、従来の外来性プロモーターによる過剰発現や発現抑制ではなく、本来の遺伝子座位でのゲノム改変であるため、本来のプロモーター下流での遺伝子発現調節を再現できる。今

後、これらの遺伝子改変iPS細胞から分化させた血液細胞の動態(GM-CSFに対する感受性)やメチル化の変化を解析することで単一遺伝子変異の有無による違いを明らかにし、JMML発症機構の解明を行いたい。

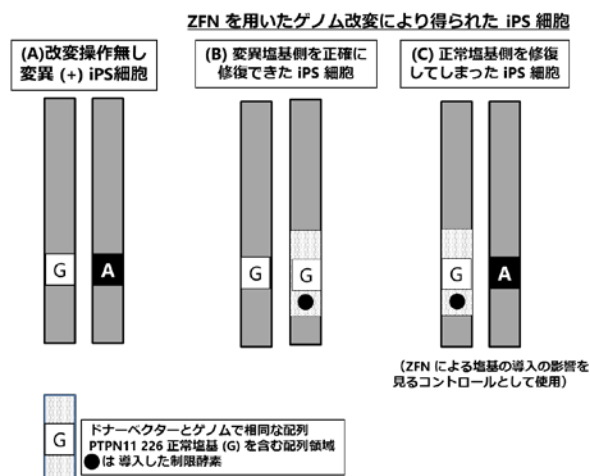


図4 本実験で得られたJMML患者由来iPS細胞を用いたZFNによるゲノム改変概略図

PTPN11 226G>Aヘテロ変異を有する患者由来iPS細胞(A)を用いて、ZFNによるゲノム改変(変異塩基(A)の正常塩基(G)への修復)を行った。正確に変異塩基を修復できたiPS細胞(B)と正常塩基側を修復してしまったiPS細胞(C)が得られた。Gは正常塩基、Aは変異塩基、●はドナーベクター上に導入した制限酵素(NcoI)切断部位塩基置換を示す。

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2件)

① Nakazawa Y, Matsuda K, Kurata T, Sueki A, Tanaka M, Sakashita K, Imai C, Wilson MH, Koike K. Anti-proliferative effects of T cells expressing a ligand-based chimeric antigen receptor against CD116 on CD34(+) cells of juvenile myelomonocytic leukemia. J Hematol Oncol. 2016 Mar 16;9:27. doi: 10.1186/s13045-016-0256-3. 査読有

② Sakashita K, Matsuda K, Koike K. Diagnosis and treatment of juvenile myelomonocytic leukemia. Pediatr Int. 2016 Aug;58(8):681-90. doi: 10.1111/ped.13068. 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 和之 (MATSUDA, Kazuyuki)  
 信州大学・医学部附属病院・主任臨床検査技師  
 研究者番号: 00647084