

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19575

研究課題名(和文)染色体大領域欠失と骨髄異形成を結びつける新規評価システムの構築

研究課題名(英文) Characterizing the large chromosomal deletion in 7q- myelodysplastic syndrome using human iPS cells and the genome editing system

研究代表者

長町 安希子(Nagamachi, Akiko)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：20585153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPR/Cas9システムを用いて7番染色体上の広範囲の領域を欠損させたヒトiPS細胞(7q-iPS)を樹立し、造血細胞へ分化させてin vitroモデルで骨髄異形成症候群を再現する、造血細胞異形成評価システムの確立を目的に検討を進めた。その結果、HL60細胞株とマウス受精卵、iPS細胞を用いた変異導入実験の最適化を経て、7q-iPSの樹立に成功し、現在造血細胞への分化実験を進めている。

研究成果の概要(英文)：Monosomy 7 and interstitial deletion of 7q is a well-recognized nonrandom chromosomal abnormality frequently found among patients with myelodysplastic syndromes and myeloid leukemias. To understand the effects of lacking large deletion on chromosome 7 in hematopoietic cell differentiation, I constructed in vitro model systems using human induced pluripotent stem (iPS) cells and the genome editing system. I succeeded in generating iPS cells carrying 7q that lacks various large regions using the CRISPR/Cas9 genome editing system, and plan to induce these cells to differentiate into multiple hematopoietic cells via the method of the formation of embryoid bodies to examine the hematopoietic function.

研究分野：血液内科学

キーワード：骨髄異形成症候群

1. 研究開始当初の背景

骨髄異形成症候群 (MDS) は造血幹細胞レベルでの異常細胞がクローン性に増殖する難治性の腫瘍性疾患で、症例の約 60% に 5 番染色体や 7 番染色体のモノソミー、長腕の部分欠失 (-5/5q-, -7/7q-) などの多様な染色体異常が検出され、発症や予後に深く関与することが知られている。欠失した染色体領域内に発症起因や予後に関与する責任遺伝子が存在すると考えられ、これまで複数のグループで共通欠失領域をモチーフにした責任遺伝子の単離解析が進められてきた。7q- においても、発症に深く関与する責任遺伝子が複数報告されており、例えばエピジェネティック制御遺伝子である *Ezh2* や細胞周期や分化に関係する *Cux*、RNA splicing 因子の *LUC7L2* など、その遺伝子機能は多彩で、また遺伝子座位も広範囲に点在している。我々のグループも集中欠失領域である 7q21.3 領域から 4 つの責任遺伝子 (*Miki*, *CG-NAP*, *Samd9*, *Samd9L*) を単離し解析を進め、その結果 *Miki* と *CG-NAP* はハプロ不全で MDS に特有の核形態の異常や染色体不安定性の原因となること、また老齢の *Samd9L* 遺伝子ヘテロ・ホモ欠失マウスの約 60% が MDS を発症することを明らかにした。これらことから、7q- は単一責任遺伝子の片アレル欠損だけで発症する疾患ではなく、染色体欠失領域の複数の遺伝子の片アレル欠失に伴うハプロ不全が病態促進に関与するという発症メカニズムの可能性が考えられた。そこでこの仮説を検証するため、7q- に関与する 7q 上の複数のハプロ不全遺伝子を同時に欠落させた状態を *in vitro* モデルで再現し、欠失領域と MDS 発症や形態変化 (細胞異形成) とを直接的に結びつける実験系の構築を着想した。

2. 研究の目的

本申請は、ヒト iPS 細胞に人工ヌクレアーゼ CRISPR/Cas9 システムを用いて 7 番染色体上に任意の領域を欠失させた 7 番染色体領域欠失 iPS 細胞株 (7q- iPS) を樹立し、これを造血細胞へ分化させて、*in vitro* で MDS を再現することにより欠失領域と造血細胞異形成との関連を直接的に評価する、新規の造血細胞異形成システムの構築を目的とする。本研究では手技の確立と、染色体大領域欠失の影響を個体で解析することを視野に入れた、以下の検討を進めた。

3. 研究の方法

(1) 導入方法の最適化の検討：基盤技術を確立するため、CRISPR/Cas9 の切断効率と変異導入効率を白血病細胞株 (HL60 細胞) とマウス受精卵で検証する。数種類の切断標的配列を導入した CRISPR/Cas9 ベクター (pX330, Addgene) を作製し、切断活性の高い配列を選抜したのち細胞にエレクトロポレーション法 (Neon) で導入する。HL60 細胞はシングルセルソーティングによりクローン化し、目

的配列の切断効率をダイレクトシーケンシング法により評価する。さらに、最終的に染色体の広範囲の領域を欠失させる必要があることから、約 3-4 kb のホモロジーマームに蛍光タンパクをコードしたレポーター遺伝子と loxP 配列で挟んだ薬剤耐性遺伝子を組み込んだ組換えベクターを作製し、HL60 細胞に pX330 ベクターと組換えベクターの共導入を行う。薬剤選択の後 100 クローンを単離し、蛍光レポーター遺伝子の挿入と相同組換え効率について検討する。マウス受精卵では、同様に作製した環状 pX330 単独、さらに切断部位近辺に約 70 base のホモロジーマームで loxP 配列を挟んだ組換え ssDNA と pX330 を混ぜてマウス受精卵前核にマイクロインジェクションし、偽妊娠マウスに移植したのち、得られた産仔マウスの尻尾 DNA を用いて、同様に切断効率と相同組み換え効率を評価する。

(2) 7q- iPS 細胞株の樹立と造血細胞異形成評価システムの構築：(1) で得られた結果をもとに、理研から入手した健常人の上皮細胞から樹立された SB201 細胞に、欠失させたい領域の両端を標的とする 2 種類の pX330 プラスミドと、約 1 kb ずつのホモロジーマームの間に loxP 配列で薬剤耐性遺伝子を挟んだ組換えベクターの計 3 種類を Neon を用いて細胞に導入し、薬剤セレクションののちクローン化する。樹立した 7q- iPS 細胞は Embryoid body 形成法により各種造血細胞に分化させ、細胞形態異常 (異形成) の確認、FACS による細胞表面マーカー解析、コロニーアッセイを行い、分化・増殖能・アポトーシス頻度を野生型 iPS 細胞と比較検討する。

4. 研究成果

(1) HL60 細胞に標的配列を組み込んだ pX330 ベクターを導入し、切断効率を評価したところ、単離した約 50% のクローン株で標的配列に 1~数 10 bp の微小欠失が認められ、このシステムで高効率に標的配列が切断できることを確認した。続いて、pX330 ベクターと蛍光タンパク配列を含むターゲットベクターを HL60 細胞に共導入し、薬剤選択を行ったのち 100 クローンを単離し、蛍光レポーター遺伝子の挿入と相同組換え効率について検討した。その結果、約 60% の細胞で組換えが認められ、さらに両アレル/片アレルに蛍光配列が挿入されていた割合は 49/12 と両アレル挿入が半数以上を占め、変異導入細胞を効率的に単離することができた。マウス受精卵を用いた検討では、前核に環状 pX330 (5 ng/ul) をマイクロインジェクションし、得られた産仔マウスの尻尾 DNA で切断効率を検討したところ、受精卵の生存率は 86.5% で、2 細胞期胚移植で 3% の割合で産仔が得られた。しかし、半数の産仔マウスは微小欠失 (1~15 bp) が両アレルに挿入されたホモ欠失マウスで、残り半数はヘテロ欠失マウスと、受精卵への毒性影響は強烈だが変異マウス

の産出率は高いことが分かった。毒性を軽減させる目的で、合成 crRNA/tracrRNA と Cas9 タンパク質をインジェクションする手法に切り替え同様に検討したところ、産仔数が劇的に増加し、なかでも 9 割以上の産仔に変異が認められ、pX330 環状 DNA をインジェクションする手法と比較してより効率良く変異を導入することができた。そこで、受精卵全核に crRNA/tracrRNA と Cas9 タンパク質に加え、約 70 base のホモロジーマームで loxP 配列を挟んだ ssDNA を同時にマイクロインジェクションしたところ、目的配列の 1~数 10 bp の微小欠失は 8 割以上のマウスに認められるものの、loxP 配列が完全な形で導入されたマウスは得られず、ssDNA ではなく、アームの長さを伸ばした組換えベクターの作製が必要であると考えられた。

(2) iPS 細胞に巨大欠失を導入するためのゲノム編集ベクターと組換えベクターを作製した。導入する欠失領域は、我々が単離した責任遺伝子群を含む 7q21 バンド近辺、Ezh2 遺伝子が座位する 7q36 バンド近辺、他ヒトの MDS 症例で高頻度に欠失が見られる領域を標的に、約 100 kb の領域を 7 番染色体上に 4 箇所設計した。ゲノム編集ベクターは HL60 細胞で高い変異導入株を得た pX330 ベクターを使用し、欠失させたい領域の両端を標的に 2 種類ずつ作製した。組換えベクターは約 1 kb の相同領域の間に loxP 配列で薬剤耐性遺伝子を挟んだものを作製した。SB201 細胞に 2 種類の px330 プラスミドと組換えベクターを Neon で導入し、薬剤セレクション後に相同組換えが生じたクローンの単離解析を複数回行ったが、目的領域が完全に欠失したクローンを得ることができなかった。そこで、マウス受精卵で高頻度に変異が導入された crRNA と tracrRNA、Cas9 タンパク質を用いる手法に変更した。また、組換えベクターは欠失させたい領域の両端 2 箇所を標的に、約 3 kb の相同配列で loxP 配列と薬剤マーカーを挟む 2 種類のベクターを作製し、SB201 細胞に 2 段階で導入したのち、Cre 誘導により領域を欠損させる方法に変更し、検討を進めた。その結果、各段階で低頻度の導入効率ではあったが、両アレルに 2 箇所の loxP 配列を導入した 7q-iPS 細胞を数クローン得ることができた。現在、7q-iPS 細胞 Cre 誘導を進めるとともに、野生株の iPS 細胞を用いて Embryoid body 形成法で造血細胞に分化させる系の安定化と、最適な評価方法についての検討を進めている。

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 6 件)

1. Meng X, Zhang F, Yan B, Si C, Honda H, Nagamachi A, Sun LZ, Xiang Y. A paralogous pair of mammalian host

restriction factors form a critical host barrier against poxvirus infection. *PLoS Pathog.* 14(2):e1006884, 2018 (査読あり)

2. Nakata Y, Ueda T, Nagamachi A, Yamasaki N, Ikeda KI, Sera Y, Takubo K, Kanai A, Oda H, Sanada M, Ogawa S, Tsuji K, Ebihara Y, Wolff L, Honda ZI, Suda T, Inaba T, Honda H. Acquired expression of CblQ367P in mice induces dysplastic myelopoiesis mimicking chronic myelomonocytic leukemia. *Blood.* 129(15):2148-2160, 2017 (査読あり)
3. Ueda T, Nakata Y, Nagamachi A, Yamasaki N, Kanai A, Sera Y, Sasaki M, Matsui H, Honda Z, Oda H, Wolff L, Inaba T, Honda H. Propagation of trimethylated H3K27 regulated by polycomb protein EED is required for embryogenesis, hematopoietic maintenance, and tumor suppression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 113(37):10370-5, 2016 (査読あり)
4. Ikeda K, Ueda T, Yamasaki N, Nakata Y, Sera Y, Nagamachi A, Miyama T, Kobayashi H, Takubo K, Kanai A, Oda H, Wolff L, Honda Z, Ichinohe T, Matsubara A, Suda T, Inaba T, Honda H. Maintenance of the functional integrity of mouse hematopoiesis by EED and promotion of leukemogenesis by EED haploinsufficiency. *Sci Rep.* 6:29454, 2016 (査読あり)
5. Kadono M, Kanai A, Nagamachi A, Shinriki S, Kawata J, Iwato K, Kyo T, Oshima K, Yokoyama A, Kawamura T, Nagase R, Inoue D, Kitamura T, Inaba T, Ichinohe T, Matsui H. Biological implications of somatic DDX41 p.R525H mutation in acute myeloid leukemia. *Exp Hematol.* 44(8):745-754.e4, 2016 (査読あり)
6. Sera Y, Yamasaki N, Oda H, Nagamachi A, Wolff L, Inukai T, Inaba T, Honda H. Identification of cooperative genes for E2A-PBX1 to develop acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Sci.* 107(7):890-8, 2016 (査読あり)

[学会発表](計 4 件)

1. Nagamachi A, Matsui H, Kanai A, Honda H, Inaba T. The role of Samd9 and Samd9L in the early endocytotic

pathway 第 79 回日本血液学会学術集会
2017 年 10 月 21 日 東京都

2. Nagamachi A, Matsui H, Kanai A, Honda H, Inaba T. The role of Samd9 and Samd9L in the early endocytotic pathway. 第 76 回日本癌学会学術総会 2017 年 9 月 29 日 横浜市
3. Nagamachi A, Ozaki Y, Matsui H, Kanai A, Inaba T. Low Miki expression in myelodysplastic syndromes enhance the formation of polynuclear cell. 第 78 回日本血液学会学術総会 2016 年 10 月 14 日 横浜市
4. Nagamachi A, Matsui H, Kanai A, Inaba T. eEF1A2 is a target gene of DNA demethylating agents for improving anemia of MDS. 第 75 回日本癌学会学術総会 2016 年 10 月 7 日 横浜市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

長町 安希子 (NAGAMACHI Akiko)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：20585153