

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16520

研究課題名(和文) iPSゲノム編集を用いた高効率な染色体異数性レスキュー法の確立

研究課題名(英文) Establishment of high efficient chromosomal aneuploidy rescue method by genome editing in iPS cells

研究代表者

阿久津 シルビア夏子 (Akutsu Silvia Natsuko) (Akutsu, Silvia Natsuko)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：10822299

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの主要なトリソミー症候群(21、18、13、9トリソミー症候群)患者8人の皮膚線維芽細胞を入手して、iPS細胞を190クローンについてゲノムDNAのコピー数を網羅的に調べました。各トリソミー症候群の少なくとも1つの細胞株において、トリソミーレスキュー現象が確認されました。染色体の喪失は、親の由来に関係なく起こっていました。こうした結果から、iPS細胞リプログラミングによって多能性が誘導されると、1)トリソミー染色体のうち1本がランダムに細胞から喪失する、2)ダイソミーに正常化した細胞が選別されて単一iPS細胞コロニーを形成することが考えられました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トリソミーレスキューは、着床前の初期胚でも観察されており、染色体数を正確に保つ生体のメカニズムの一つと考えられます。iPS細胞のトリソミーレスキューは、初期胚のトリソミーレスキューとメカニズムを共有する可能性があることから、本研究成果は生殖補助医療への貢献が期待されます。また、iPS細胞リプログラミングによるトリソミーレスキューは、ゲノム操作を伴わない染色体を修正する新たな治療法として、不妊症やがん治療などの再生・移植医療への応用が期待されます。

研究成果の概要(英文)：I obtained dermal fibroblasts from eight patients with major human trisomy syndromes (trisomy 21, 18, 13, and 9 syndromes), established 190 clones of iPS cells, and comprehensively examined the copy number of genomic DNA in all clones. The number of copies of genomic DNA in all clones was detailed examined by karyotype, FISH, SNP and Sanger sequencing. As a result, the trisomy rescue phenomenon was confirmed in at least one cell line of each trisomy syndrome. Chromosome loss occurred regardless of parental origin. These results suggest that when pluripotency is induced by iPS cell reprogramming, 1) one of the trisomy chromosomes is randomly lost from the cells, and 2) cells normalized to disomy are sorted to form single iPS cell colonies. Furthermore, late lagging was postulated as the mechanism of chromosome loss.

研究分野：genetics

キーワード：Trisomy rescue iPSC chromosome cytogenetics

1. 研究開始当初の背景

晩婚化による高齢出産は劇的に染色体異数性疾患のリスクを高めることが知られており (Plona, *et al.* Am J Med Genet 2016)、現代日本の社会問題として位置づけられる。

ダウン症候群(トリソミー21)は最も患者数の多い染色体異数性疾患であり、臨床的に特異顔貌と乳児期の哺乳力低下、先天性心疾患や白血病の発症を特徴とする。申請者は、ダウン症候群患者の初代線維芽細胞に山中4因子を導入して、独立した4クローンのiPS細胞を作製した。各クローンの核型解析を行ったところ、驚くべきことに、1クローンは正常核型を示し、異数性レスキューが生じることを確認した。また、Hirota 博士ら (Science 2017) は、ヒトとマウスで同様の現象を実証して報告している。

2. 研究の目的

そこで、本研究では高効率な染色体異数性レスキュー実験系の確立を研究目的として、独自に開発したiPS細胞ゲノムのセーフハーバーサイトへの遺伝子導入法を用いて、染色体異数性レスキュー遺伝子の誘導発現系と正常核型への転換が高頻度に生じる2細胞期様細胞レポーター細胞の樹立を行う。染色体異数性レスキューの背後には、細胞が正常な染色体数をカウントする未知の分子機構の存在があり、本研究で開発する技術は、人類遺伝学、細胞生物学分野の新たな分野の開拓に貢献できる。しかし、ゲノム編集を行わずとも、当初から非常に良い結果を得ることができました。

3. 研究の方法

ダウン症候群は、トリソミー21を原因とする最も患者数の多い染色体異数性病であるが、その根治的な治療法は未だに確立されていない。最近、iPS細胞への初期化やマウス2細胞期発現遺伝子の導入によって、トリソミー21がレスキューされる「染色体異数性治療法」の可能性が報告された。本申請予備実験では、これらのアプローチの再現性を確認したが、異数性レスキュー効率は極めて低く、今後の異数性レスキューの基礎研究および臨床応用にとって大きな障壁である。本研究成果は、ダウン症候群の根治療法に向けた画期的な基盤技術となる。

4. 研究成果

染色体異数性疾患の初代線維芽細胞の初期化による正常核型誘導: iPSリプログラミングによる染色体異数性レスキューの普遍性を検証するために、トリソミー13(パタウ症候群)、トリソミー18(エドワーズ症候群)、またトリソミー9患者由来の初代線維芽細胞の初期化を行い、各iPS細胞の核型解析を行いました。そこで、ヒトの主要なトリソミー症候群患者8人の皮膚線維芽細胞を入手して、iPS細胞を190クローン樹立し、全てのクローンについてゲノムDNAのコピー数を網羅的に調べました。

正常核型細胞クローン iPSリプログラミングによる染色体異数性レスキューの効率を評価しました。その結果、各トリソミー症候群の少なくとも1つの細胞株において、トリソミーレスキュー現象が確認されました(図1)。

その結果、21、18、13、9の各トリソミー症候群の少なくとも1つの細胞株で、細胞初期化によりトリソミー救済が起こることがわかったが、トリソミー救済効率は解析した個々の患者の細胞で大きく異なることが判明した。トリソミー21症候群の細胞は、GM02967で4.2%、GM04616で0%と、最も低いトリソミー救出の効率を示した。トリソミー18の細胞では、GM03538で12.5%、GM00734で5.0%であった。トリソミー13の細胞では、GM02948が81.5%、GM03330が40.9%、GM00526が23.8%であった。トリソミー9の細胞では、存在する多倍体細胞を除くと、GM09286の効率が57.7%であった。これらの違いが、トリソミー染色体の大きさの違いによるものか、トリソミー染色体上に存在する特定の遺伝子の関与によるものか、あるいは単に細胞の個体差の反映なのかは、現在のところ不明である。

染色体の喪失は、親の由来に関係なく起こっていました。SNPアレイおよびシーケンス解析により、いくつかのトリソミー分離iPSCクローンでは、染色体の組み合わせが複数あることが判明し、染色体ペアの選択がランダムに行われていることが示唆された。また、SNPアレイ解析の結果、いくつかのトリソミー分離iPSCクローンではセグメントUPiDが検出され、トリソミー染色体の由来が親にあることが示唆された。GM03330(T13)とGM03538(T18)は両親のいずれかが減数第二分裂で不分離となり、GM09286(T9)は減数第一分裂で不分離となった。救助され

た iPSC クローンでは UPiD またはヘテロダイソミーが検出されたため、UPiD がトリソミー救助効率に大きく影響するとは思われなかった。しかし、細胞株 GM02948 (T13) では、トリソミー救助が偏った形で行われ、その理由はまだ不明である。

常染色体トリソミー症候群の患 細 から iPS 細 を樹立すると、過剰染色体が喪失して染色体数が正常化することを明らかにしました。こうした結果から、iPS 細胞リプログラミングによって多能性が誘導されると、1) トリソミー染色体のうち 1 本がランダムに細胞から喪失する、2) ダイソミーに正常化した細胞が選別されて単一 iPS 細胞コロニーを形成することが考えられました。さらに、染色体が喪失するメカニズムとして、後期ラギングが推定されました(図 2)。

図 1 染色体解析。左：13 トリソミー症候群患者の皮膚線維芽細胞、右：樹立した iPS 細胞クローン。iPS 細胞クローンは調べた 20 個のメタフェースすべてが正常核型を示しました。

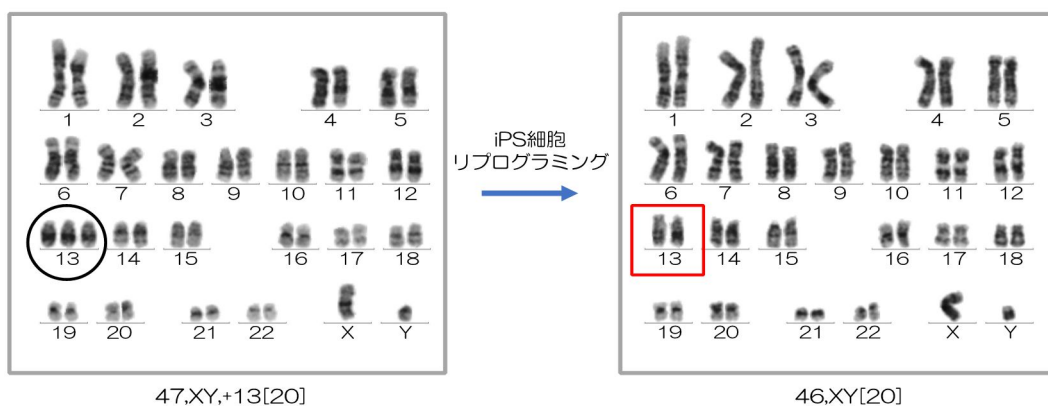
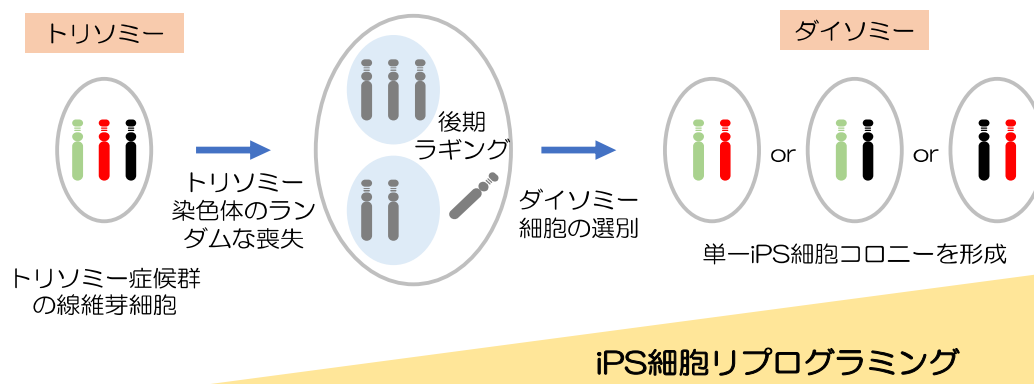


図 2 iPS 細胞リプログラミングによるトリソミーレスキューのモデル



トリソミー染色体の自然脱落はいつ起こるのか？我々は、核型 その結果、モザイクはほとんど見られないことがわかりました。このことから、トリソミー染色体の消失は、リプログラミングのごく初期に起こることが示唆されました。このことから、トリソミー染色体の消失は、リプログラミングのごく初期に起こることが示唆されました。

トリソミーレスキューは、着床前の初期胚でも観察されており、染色体数を正確に保つ生体のメカニズムの一つと考えられます。初期でも同様な現象が知られており、共 のメカニズムが示唆されました。iPS 細胞のトリソミーレスキューは、初期胚のトリソミーレスキューとメカニズムを共有する可能性があることから、本研究成果は生殖補助医療への貢献が期待されます。また、iPS 細胞リプログラミングによるトリソミーレスキューは、ゲノム操作を伴わない染色体を修正する新たな治療法として、不妊症やがん治療などの再生・移植医療への応用が期待されます。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Fujita Harumi, Sasaki Takashi, Miyamoto Tatsuo, Akutsu Silvia Natsuko, Sato Showbu, Mori Takehiko, Nakabayashi Kazuhiko, Hata Kenichiro, Suzuki Hisato, Kosaki Kenjiro, Matsuura Shinya, Matsubara Yoichi, Amagai Masayuki, Kubo Akiharu	4. 巻 19
2. 論文標題 Premature aging syndrome showing random chromosome number instabilities with CDC20 mutation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aging Cell	6. 最初と最後の頁 e13251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/accel.13251	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 該当する

1. 著者名 Miyamoto Tatsuo, Hosoba Kosuke, Itabashi Takeshi, Iwane Atsuko H, Akutsu Silvia Natsuko, Ochiai Hiroshi, Saito Yumiko, Yamamoto Takashi, Matsuura Shinya	4. 巻 39
2. 論文標題 Insufficiency of ciliary cholesterol in hereditary Zellweger syndrome	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 e103499
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2019103499	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 該当する

1. 著者名 Tomioka K, Fujita K, Akutsu SN, Yanagihara H, Tauchi H, Yamamoto T, Kobayashi M, Kudo Y, Miyamoto T, Matsuura S	4. 巻 73
2. 論文標題 Quantitative evaluation of the NBS1 I171V variant as a candidate genetic factor underlying individual differences in radiation sensitivity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 広島医学	6. 最初と最後の頁 224-227
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 無
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 Akutsu Silvia Natsuko, Fujita Kazumasa, Tomioka Keita, Miyamoto Tatsuo, Matsuura Shinya	4. 巻 9
2. 論文標題 Applications of Genome Editing Technology in Research on Chromosome Aneuploidy Disorders	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 239 ~ 239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9010239	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 該当する

1. 著者名 Akutsu SN, Miyamoto T, Oba D, Tomioka K, Ochiai H, Ohashi H, Matsuura S.	4. 巻 14
2. 論文標題 iPSC reprogramming-mediated aneuploidy correction in autosomal trisomy syndromes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0264965
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0264965	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 該当する

1. 著者名 Miyamoto T, Hosoba K, Akutsu SN, Matsuura S.	4. 巻 2374
2. 論文標題 Imaging of the ciliary cholesterol underlying the Sonic Hedgehog Signal transduction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods Mol. Biol.	6. 最初と最後の頁 49-57
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-1701-4_5	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 該当する

1. 著者名 Tomioka K, Miyamoto T, Akutsu SN, Yanagihara H, Fujita K, Royba E, Tauchi H, Yamamoto T, Koh I, Hirata E, Kudo Y, Kobayashi M, Okada S, Matsuura S.	4. 巻 11
2. 論文標題 NBS1 1171V variant underlies individual differences in chromosomal radiosensitivity within human populations.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19661
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-98673-7	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 該当する

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 Akutsu SN, Miyamoto T, Tomioka K, Oba D, Ohashi H, Matsuura S.
2. 発表標題 iPSC reprogramming-mediated aneuploidy correction in autosomal trisomy syndromes.
3. 学会等名 放射線災害・医科学研究拠点 第5回国際シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tonioka K, Fujita K, Akutsu SN, Tauchi H, Yamamoto T, Kobayashi M, Kudo Y, Miyamoto T, Matsuura S.
2. 発表標題 Quantitative evaluation of the NBS1 1171V variant on radiosensitivity.
3. 学会等名 放射線災害・医科学研究拠点 第4回国際シンポジウム(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 富岡啓太、Silvia Natsuko Akutsu、柳原啓見、田内 広、山本 卓、小林正夫、工藤美樹、藤田和将、宮本達雄、松浦伸也
2. 発表標題 NBS1 1171V 多型による放射線感受性個人差の定量的評価
3. 学会等名 第45回中国地区放射線影響研究会プログラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤田春美、佐々木貴史、宮本達雄、阿久津シルビア夏子、佐藤尚武、森毅彦、中林一彦、秦健一郎、鈴木寿人、小崎健次郎、松浦伸也、松原洋一、天谷雅行、久保亮治。
2. 発表標題 A novel premature aging syndrome showing random chromosome number instability with CDC20 mutation
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第65回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮本達雄、細羽康介、板橋岳志、岩根敦子、阿久津シルビア夏子、落合博、齋藤裕見子、山本卓、松浦伸也
2. 発表標題 Peroxisome biogenesis disorder Zellweger syndrome as a ciliopathy
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第65回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Miyamoto T, Hosoba K, Itabashi T, Iwane AH, Akutsu SN, Ochiai H, Saito Y, Yamamoto T, Matsuura S.
2. 発表標題 Peroxisomes ensure to supply cholesterol into the ciliary membrane : a lesson from a peroxisome-biogenesis disorder Zellweger syndrome.
3. 学会等名 日本分子生物学会第43回
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Silvia Natsuko Akutsu
2. 発表標題 The generation of mosaic trisomy 21 model cells using patient cells with full trisomy 21 by trisomy rescue during cell reprogramming and their modification with fluorescent nuclear markers by genome editing technique
3. 学会等名 The 65th Brazilian Congress of Genetics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Silvia Natsuko Akutsu
2. 発表標題 Generation of Down syndrome iPS cells tagged with fluorescence marker in chromosome 21 using genome editing technology
3. 学会等名 第64回大会 日本人類遺伝学会 (ポスター発表)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Silvia Natsuko Akutsu
2. 発表標題 CRISPR-ObLiGaRe法を用いたiPS細胞における蛍光核標識によるモザイク・トリソミー21のモデル細胞系の開発
3. 学会等名 The 4th Annual Meeting of the Japanese Society for Genome Editing (ポスター発表)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

Excellent poster presentation, Hybrid session in the 6th International Symposium of the Network-type Joint Usage/ Research Center for Radiation Disaster Medical Science, title: iPSC reprogramming-mediated random trisomy correction in aneuploidy syndromes(2022年02月07日)

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
---------	---------