

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461546

研究課題名(和文) ダウン症候群の多様な症状を引き起こす21番染色体の病態責任領域の同定

研究課題名(英文) Analysis of responsible region in chromosome 21 for the disease phenotype in Down syndrome

研究代表者

北畠 康司 (KITABATAKE, YASUJI)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80506494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ダウン症候群は21番染色体のトリソミーによって起こる。多彩な合併症を呈し、とくに造血異常が特徴的に見られる。申請者は21トリソミーとGATA1変異によって引き起こされる一過性骨髄異常増殖症(TAM)に注目した。TAMのメカニズムおよび原因領域を明らかにするために、ダウン症患者から樹立したヒトiPS細胞とゲノム編集技術を組み合わせTAMの実験モデルの確立を行った。とくに21番染色体上にある4Mbの領域をアレルの1本から欠失させた「21番部分トリソミーiPS細胞」を作製し、血球分化誘導を行うことによって、責任領域を決定することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Down syndrome (DS) is caused by the presence of three copies of human chromosome 21. Among various medical symptoms, DS patients have an increased likelihood of certain hematopoietic abnormalities. We focused on transient abnormal myelopoiesis (TAM) in DS, which are characteristically associated with somatic mutations in GATA1. To better understand pathological mechanism and identify the causal genes in TAM, we constructed cellular disease models using human induced pluripotent stem cells (iPSCs) and genome-editing technologies. By generating a partial trisomy 21 iPSCs in which a 4-Mb region was deleted from a single copy of chromosome 21, we succeeded in proving this segment as a critical region for TAM.

研究分野：幹細胞研究、小児科学

キーワード：iPS細胞 ゲノム編集 ダウン症候群 小児科

1. 研究開始当初の背景

ダウン症候群は700人に1人という小児遺伝性疾患において最も高い頻度で発症し、精神発達障害に加えて心臓・消化管などの内臓奇形、血液系・内分泌系の異常など多彩な合併症を呈する。とくに白血病のリスクが高いことが知られており、ダウン症新生児の約10%が一過性骨髄増殖症 (transient abnormal myelopoiesis; TAM) とよばれる類白血病状態を呈し、その20-30%が4年以内に急性巨核芽球性白血病(M7/AMKL)を発症する。TAM患者のほぼ全例の芽球において、X染色体上にコードされる転写因子GATA-1の突然変異が認められることから、TAMの発症には21番染色体のトリソミーと胎児期におけるGATA-1突然変異の両者が必須と考えられている。つまりこの疾患は染色体レベルの異常が単一の遺伝子変異と相互作用することによって引き起こされる特異な病態といえるが、その発症メカニズムについてはこれまでトリソミーの状態を正確に表す実験モデル系がなかったためよく分かっていない。

2. 研究の目的

染色体異常と複雑な遺伝子変化がもたらす病態について詳細な解析を行うためには、正確な病態モデルを得ることが大切である。しかしながら330個以上の遺伝子数が同時に変化する染色体トリソミーと、GATA1遺伝子の変化を同時に解析する実験モデルを得るのは容易でない。

ヒト人工多能性幹細胞 (iPS細胞) の発明により、難治性疾患患者由来の体細胞をもとに、同じゲノム構築を持つヒト幹細胞を作成することが可能となった。申請者らは新生児集中治療室 (NICU) という臨床の現場で勤務していることを活かし、臍帯血をもちいてヒトiPS細胞を樹立する技術を確立した。これによって出生前にあらかじめ胎児診断を受けた新生児について、侵襲なく疾患特異的ヒトiPS細胞を作成することが可能となり、すでに健常児およびTAMを発症したダウン症新生児の臍帯血をもとに、正常核型 21トリソミー・GATA-1変異あり 21トリソミー・GATA-1変異なし の3通りのヒトiPS細胞の樹立を行った。

さらに近年、多様な細胞・動物種における遺伝子改変を可能とするゲノム編集技術が開発されたことによって、ヒトiPS細胞における遺伝子を自由に操作することができるようになってきた。これはゲノム上の任意の配列に対してDNA二本鎖切断 (double strand break; DSB) を導入することでその部位における相同組換え頻度を上げ、NHEJによる塩基欠失あるいはHDRによる外来配列挿入をもたらす技術である (図1)。申請者らはこのゲノム編集技術が一般に広まるよりも早くその開発に携わっていたことから、

いち早くその応用に着手し、すでにヒトiPS細胞上での遺伝子改変が可能である。

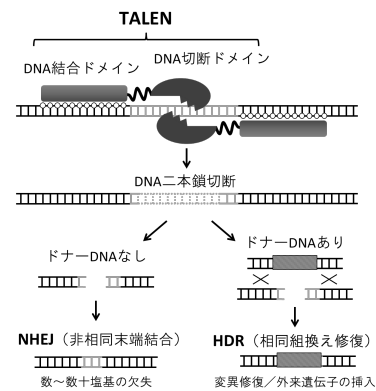


図1. TALENによる遺伝子改変。標的配列に結合したTALENが二量体を形成するとDNA二本鎖切断を引き起こし、塩基の欠失(左)あるいは相同組換えによる外来遺伝子の挿入(右)が高率に起こる。

そこで本研究では、臍帯血由来ヒトiPS細胞にTALENuclease (TALEN)、CRISPR/Cas9システムなどのゲノム編集技術を組み合わせることにより、TAM発症において

- ・ GATA-1変異の具体的な役割はなにか
 - ・ 21番染色体上のどの遺伝子領域が関与しているのか
- について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

21番染色体上の責任遺伝子・領域を同定するには、TAMにおける「GATA-1変異」と「21番染色体トリソミーの役割」を区別する必要がある。この区別を明らかにするために、21番染色体の核型(ダイソミー/トリソミーの2通り)と、GATA1の遺伝子型(正常/短縮型/欠失型の3通り)の組み合わせによる6通りのヒトiPS細胞の樹立を目指した (図2)。健常児、TAMを発症していないダウン症児、TAMを発症したダウン症児の臍帯血から樹立したヒトiPS細胞をもとにゲノム編集を加え、GATA1欠失および数塩基置換を導入した。続いてこれらをもちいて血球系へと分化誘導し、トリソミーとGATA1の機能について解析を行った。

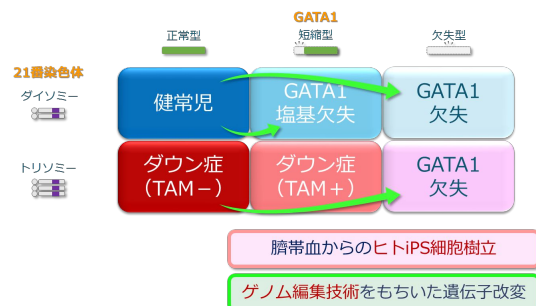


図2. ヒトiPS細胞とゲノム編集技術によるTAMの病態モデルの作製。

つぎに、21 番染色体上での病態責任領域の同定を行った。近年の研究により、染色体上の遺伝子は生物学的な機能に基づいて集まっており、'topological domain' を形づけていることが分かりつつある。たとえば部分トリソミー患者における Genotype - Phenotype の相関をしらべた研究では、21 番染色体上には各病態の発症と有意な相関が見られる領域が存在する。実際、上述のヒト iPS 細胞を血球分化誘導し多様な遺伝子の発現を解析したところ、TAM の発症時に大きく発現量が増加する遺伝子群がクラスターを作っていることが分かってきた。そこでゲノム編集技術によってこの候補領域を 1 アレル分だけ欠失させた部分トリソミー iPS 細胞を作成し、血球系へと分化誘導することで、その領域が病態に関与するかどうかについて検証をおこなった (図 3)。

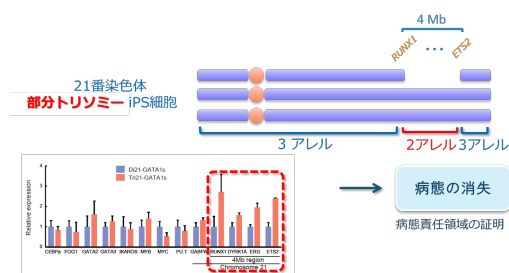


図 3. 部分トリソミー iPS 細胞の樹立と病態責任領域の同定。トリソミーの状態では TAM という病態が見られるが、21 番染色体上のある領域について 1 アレル分だけ欠失させた iPS 細胞 (部分トリソミー iPS 細胞) でもその病態が消失したならば、その部分こそが病態責任領域であると確認できるであろう

4. 研究成果

臍帯血とセンダイウイルスベクターをもちいたヒト iPS 細胞の作成、さらに TALEN をもちいることで図 2 に示した TAM の細胞モデルを樹立することに成功した。これらを血球分化誘導することで、以下のことが判明した。

正常型 GATA1 存在下においては、21 トリソミー iPS 細胞では赤芽球系・骨髄球系・巨核芽球系いずれにおいても産生細胞の増加が見られ、21 トリソミーには造血を異常亢進させる作用があることが分かった (図 4)。

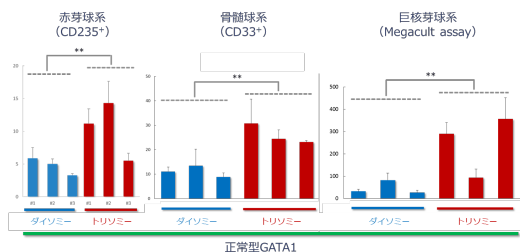


図 4. 21 トリソミーによる造血亢進作用

さらに初期造血について解析したところ、

KDR+CD31+細胞により代表される造血性血管内皮細胞 (Hemogenic Endothelium Cells) の細胞数には有意差は見られないにもかかわらず、その後の造血細胞数の割合 (CD34+CD38-Lin- 細胞における CD43+細胞の比率) では明らかにトリソミーで増加が見られた。このことは 21 トリソミーは内皮 - 造血 転換 (Endothelial-to-Hematopoietic Transition; EHT) の亢進によって造血を活性化していることを示している (図 5)。

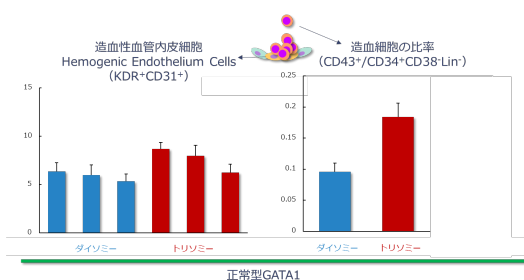


図 5. 21 トリソミーは EHT の刺激により造血を亢進させる

GATA1 変異をもつ iPS 細胞を巨核芽球系へと分化誘導したところ、GATA1 が欠失している場合は分化そのものが起こらず、一方で短縮型 GATA1 の存在下では、CD34+CD41+ の異常な巨核芽球が産生されることが分かった (図 6)。

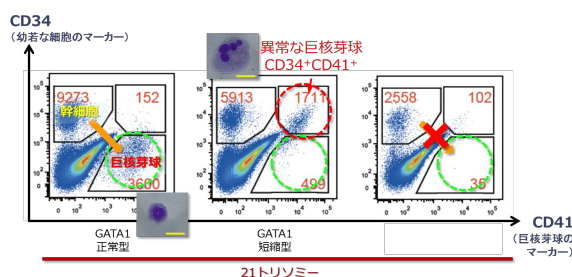


図 6. 21 トリソミー存在下において、GATA1 欠失型巨核芽球の分化そのものを阻害するが、一方で短縮型 GATA1 は CD34+CD41+、かつ多核の異常な巨核芽球を産生する

これらの結果により、TAM は「21 トリソミーによる血球増殖促進作用」と「GATA1 短縮型変異による異常分化作用」によって引き起こされることが示唆された。

次に 21 番染色体上の責任領域の同定を行った。GATA1 短縮型変異をもつダイソミー・トリソミーの iPS 細胞を造血分化誘導し、その遺伝子発現を調べたところ、ある 4Mb の領域に発現量のとくに高い遺伝子がクラスターを作っていることが分かってきた (図 3)。そこでこの両端にある RUNX1 と ETS2 に対して loxP を挿入し、さらに Cre リコンビナーゼで領域欠失を行うことによって、

4Mb 領域を 1 染色体分だけ欠失した部分トリソミー-iPS 細胞の樹立をおこなった(図 7)。

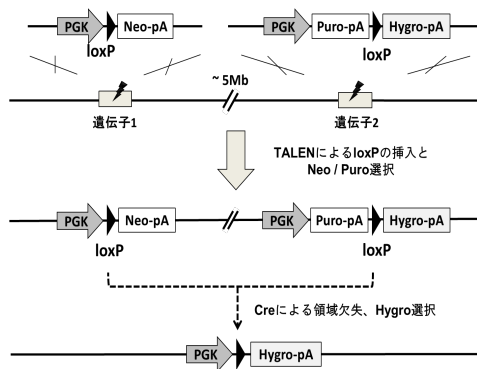


図 7. 部分トリソミー-iPS 細胞作成のストラテジー。
 まず TALEN を用いて責任候補領域の両端に loxP を挿入する(左は Neomycin、右は Puromycin でセレクト)。このとき Hygromycin 耐性遺伝子はプロモーターがないため発現しない。Cre を導入することにより loxP 間欠が欠失される(このとき PGK プロモーター下で Hygromycin 耐性遺伝子が発現し選択マーカーとなる)。4Mb と遠く離れた 2 つの loxP を同一アレルに入れる必要があるため、3 本のアレルの判別が重要となる。

このようにして樹立に成功した部分トリソミー-iPS 細胞について、核型解析・CGH アレイ・DNA-FISH など種々の方法によってその領域欠失の確認を行った。

このようにして樹立した iPS 細胞を血球分化誘導したところ、正常 GATA1 存在下において、21 トリソミーによって引き起こされていた CD43⁺ / CD34⁺CD38⁻Lin⁻ の比率の増加、赤芽球系細胞・骨髄球系細胞・巨核芽球系細胞の産生増加などがいずれも低下し、ほぼダイソミーと同じ程度まで戻った(図 8)。

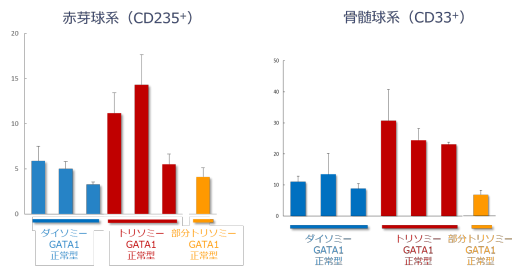


図 8. 4Mb 領域を欠失することにより、正常型 GATA1 存在下で 21 トリソミーがもたらす造血亢進作用が消失する

この部分トリソミー-iPS 細胞にさらに GATA1 短縮型変異を導入し、巨核芽球分化を調べると、CD34⁺CD41⁺の異常な巨核芽球の産生が低下することが判明した(図 9)。

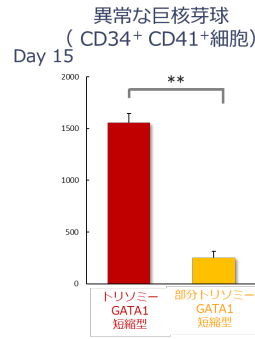


図 9. 4Mb 領域を欠失することにより、短縮型 GATA1 による異常な巨核芽球産生作用が消失する

これらの研究結果により、RUNX1 と ETS2 に挟まれた 4Mb 領域が、TAM の責任領域であると同定することに成功したといえる。

今後さらに、この 4Mb 領域にある遺伝子群の中から責任遺伝子を見出し、さらにトリソミーと GATA1 の相互作用について解析を進める予定である。

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 4 件)

- Systematic cellular disease models reveal synergistic interactions of trisomy 21 and GATA1 mutations in hematopoietic abnormalities
 Banno K, Omori S, Hirata K, Nawa N, Nakagawa N, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Sakuma T, Yamamoto Y, Toki T, Ito E, Yamamoto T, Kokubu C, Takeda J, Taniguchi H, Arahori H, Wada K, Kitabatake Y* (*corresponding author*), and Ozono K
Cell Reports (2016) 15: 1228–1241 (査読あり)
 (DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.04.031>)
- Successful induction of sclerostin in human-derived fibroblasts by 4 transcription factors and its regulation by parathyroid hormone, hypoxia, and prostaglandin E2.
 Fujiwara M, Kubota T, Wang W, Ohata Y, Miura K, Kitaoka T, Okuzaki D, Namba N, Michigami T, Kitabatake Y, Ozono K.
Bone (2016) 85: 91-8 (査読あり)
 (DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2016.01.024>)
- Secreted Frizzled-related Protein 3 (sFRP3) regulates antidepressant responses in mice and humans
 Jang M-H*, Kitabatake Y*, Kang E,

Jun H, Pletnikov M.V, Christian M, Hen R, Lucae S, Binder E, Song H and Ming G-l. (**equal contribution*)

Mol Psychiatry (2013) 18: 957-958

(査読あり)

(DOI:10.1038/mp.2012.158)

4. Secreted frizzled-related protein 3 regulates activity-dependent adult hippocampal neurogenesis

Jang M-H*, Bonaguidi M*, Kitabatake Y*, Sun J, Song J, Kang E, Jun H, Zhong C, Su Y, Guo J, Wang M, Sailor K, Kim J-Y, Gao Y, Christian K, Ming G-l and Song H. (**equal contribution*)

Cell Stem Cell (2013) 12: 215-223

(査読あり)

(DOI:10.1016/j.stem.2012.11.021)

〔学会発表〕(計 7 件)

1. International symposium on RNAi and genome editing methods : 14.3.16, 徳島
Generation of disease model of Down syndrome with targeted genome/chromosome modification in human iPS cells

Kitabatake Y

2. 第 37 回日本小児遺伝学会学術集会 : 14.04.10 名古屋

「疾患特異的ヒト iPS 細胞をもちいたダウン症候群の病態解析」

北島 康司、坂野 公彦、大森 早也佳、平田 克弥、那波 伸敏、和田 和子、荒堀 仁美、谷口 英俊、大園 恵一

3. 第 117 回日本小児科学会学術集会 : 14.04.11 名古屋

「ダウン症候群における病態発症メカニズムの解明」

北島 康司、坂野 公彦、平田 克弥、大森 早也佳、荒堀 仁美、松浪 桂、谷口 英俊、和田 和子、大園 恵一

4. 第 38 回日本遺伝カウンセリング学会学術集会 教育講演 : 14.06.28 大阪

「いまさら聞けない iPS 細胞 なにができてなにが問題なのか - ダウン症候群研究をひとつの例として - 」

北島 康司

5. ゲノム編集研究会 : 14.10.06-14.10.07 広島

Targeted genome editing-mediated cellular disease models reveal cooperative interaction of 21 trisomy and GATA1 on hematopoiesis.

北島 康司

6. 第 76 回日本血液学会学術集会 : 14.10.31-14.11.1 大阪

Analysis of transient abnormal myelopoiesis in Down syndrome using gene editing technologies

北島 康司、坂野 公彦、大森 早也佳、平田 克弥、荒堀 仁美、松浪 桂、谷口 英俊、和田 和子、橋井 佳子、大高 真奈美、中西 真人、佐久間 哲史、山本 卓、大園 恵一

7. 第21回JBICバイオ関連基盤技術研究会 2015.09.29, 東京

疾患特異的ヒトiPS細胞とゲノム編集技術による新たな難病研究

北島 康司

〔図書〕(計 1 件)

新しいゲノム編集技術 (TALEN および CRISPR/Cas9 システム) とその可能性
診断と治療社 再生医療シリーズ「脳神経の再生医学 - 発生と再生の融合的新展開 - 」
(2015, P.155-160)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北島 康司 (KITABATAKE YASUJI)

大阪大学医学系研究科・助教

研究者番号 : 80506494

(2) 研究分担者

研究者番号 :

(3) 連携研究者

研究者番号 :