

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860735

研究課題名(和文) ゲノム編集技術を用いた染色体大領域欠失AML/MDSモデルマウスの作製

研究課題名(英文) Generation of mice models of AML/MDS with large genomic deletion using CRISPR/Cas9 genome editing

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：人工ヌクレアーゼを用いて、7q-の3つの責任遺伝子候補Miki, CG-NAP, Samd9Lをヘテロ欠失させた、新規AML/MDSモデルマウスの作製を試みた。CRISPR/Cas9プラスミドDNAを環状のまま受精卵前核へ注入する手法を用いたところ、目的配列の高い切断効率が得られ、単一遺伝子の遺伝子欠失マウスの作出に成功した。さらに複数遺伝子の同時ヘテロ欠失マウスの作出は、細胞毒性の問題から現在手法を変えて継続しており、解析結果が待たれる。

研究成果の概要(英文)：We use the CRISPR/Cas9 system of genome editing to generate model mice of myeloid malignancy which is deleted the candidate 7q- responsible genes, Miki, CG-NAP, and Samd9L. By injection of circular plasmid expressing sgRNA and hCas9 into mouse zygotes, we generated mice carried the mutations at the target locus with high efficiency. However, it was difficult to generate the multiple genes (Miki/CG-NAP/Samd9L) deficient mice by co-injection of the plasmids targeting a single allele. Thus we are trying to generate multiple gene deficient mice use a different technique to complement the current knockout project.

研究分野：血液腫瘍学、発生生物学

キーワード：ゲノム編集 骨髄異型性症候群

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、代表的な血液がんの一つである。われわれは、MDS のなかでも特に予後の悪い染色体異常として知られる 7 番染色体長腕欠損 (-7/7q-) に注目し、マイクロアレイ CGH 法を用いて 4 つの責任遺伝子候補 Miki, CG-NAP, Samd9, Samd9L を単離した。これら遺伝子の機能解析を進めた結果、Miki と CG-NAP は中心体成熟を促進し、染色体分配の遂行に関与すること、そのハプロ不全は 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が明らかとなった。一方 Samd9 と Samd9L はアミノ酸レベルで約 60% の相同性を有する関連タンパク質で、初期エンドソームの融合を介したサイトカイン受容体の分解に関与していることが明らかになった。そこで遺伝子欠損マウスを作製して解析を進めたところ、Samd9L 遺伝子欠損マウスは高齢になると (>18 月齢) 約半数が MDS を発症し、しかもハプロ不全マウスもホモ欠失マウスと全く同様の月齢と頻度で MDS を発症し、発症後も Samd9L 残存アレルは失われていなかった。一方、Miki を欠損させたマウスは高齢になっても MDS や白血病を発症せず、骨髄像でも異型性は認められないことから、マウスの生体内において Miki 単独が白血病発症のトリガーとなるのではなく、細胞の異型性を促すような補完的な役割を担っていると考えた。この結果から、われわれは 7q- は Samd9L などの単一の遺伝子機能の全喪失で発症する疾患ではなく、片アレル欠失領域に存在する複数のハプロ不全の遺伝子が、多角的に MDS 発症やその病態形成に関与しているのではないかと推察した。

2. 研究の目的

そこで本申請では 7q- のモデルマウスとして、Miki, CG-NAP, Samd9L の 3 遺伝子及びその周辺領域のヘテロ欠損マウスを作製し、7q- が MDS や AML の発症を促進するメカニズムを解明することを目的とする。しかし欠損マウスを作製にあたって従来の手法を用いた場合、Samd9L と Miki は遺伝子座が近すぎるため相同組み換えが起こらず、遺伝子欠損マウス同士の交配で Samd9L/Miki 両遺伝子欠損マウスを作製することはできない、CG-NAP はマウスでは Samd9L や Miki とは異なる染色体上に位置するものの、複雑なスプライス多型を持つ巨大遺伝子であることから欠損マウスを作製自体が困難である、という問題が予想される。そこでゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 システムを用いて 3 遺伝子ヘテロ欠損マウスを作製し、研究を特段に発展させることを計画した。さらに、この手法を応用して広汎な領域を欠損させたマウスの作製に挑戦し、ヒトで同定した共通微小欠失領域に相同する遺伝子領域

(Samd9L, Miki 遺伝子を含む領域) を欠損させた、新しい AML・MDS モデルマウス作製を目指す。

3. 研究の方法

(1) 当実験施設で CRISPR/Cas システムを用いた遺伝子欠損マウス作製手法を確立する。今回、クローニングした pX330 (gRNA と Cas9 の配列が連結) CRISPR プラスミドベクターをマウス受精卵にインジェクションすることにより、遺伝子欠損マウスを作製する手法を用いる。実験条件の最適化のため、CRISPR プラスミドベクター-pX330-Cent1/1 (大阪大学 伊川先生よりご供与) を C57BL/6 マウスの受精卵前核にマイクロインジェクションし、Cent1 遺伝子欠損マウスの作出を試みる。Cent1 の発現が消失したマウスは精子の構造変化が生じ不妊となるため、交配による仔産匹数、変異導入効率の評価、受精卵へのプラスミド注入量など手技的な調整を行い実験条件の最適化を図る。さらに作出したマウスのオフターゲット切断について解析する。

(2) CG-NAP 遺伝子欠損マウスに加え、Samd9L/Miki 同時遺伝子欠損マウスの作製に着手し、掛け合わせにより 3 遺伝子欠損マウス (Samd9L/Miki/CG-NAP) を作製する。作製したマウスは造血幹細胞を中心とした解析を行い、Miki と CG-NAP 遺伝子の白血病発症への関与とその機序について検討する。

(3) さらによりヒト 7q- に近いマウスモデルを作製するため、CRISPR/Cas システムを応用し、広範囲の遺伝子領域を欠損させた染色体大領域欠失マウスの作製を試みる。

4. 研究成果

(1) CRISPR/Cas9 プラスミドベクター-pX330-Cent1/1 をマウス受精卵前核にマイクロインジェクションし、Cent1 遺伝子改変マウスの作製を試みたところ、5 ng/ul の濃度でインジェクションした受精卵の生存率は 86.5% で、さらに 135 個の 2 細胞期胚の移植で 4 匹のマウスが得られた (2.9%)。当施設でのトランスジェニックマウス作出時の DNA インジェクションで得られる産仔数は通常 25% 前後であるのに比べて、作出率は極めて低い。しかし、産仔 4 匹の tail DNA を用いて変異導入解析を行ったところ、4 匹中 1 匹は野生型であったが、残り 3 匹のマウスは PAM 配列近辺に微小欠失 (1~15bp del.) が両アレルに挿入されたホモ欠失マウスであることが分かった。また Cent1 の発現が消失したオスマウスは不妊であることを確認した。さらに、オフターゲット切断が予想される 8 か所の配列を対象に変異解析を行ったところ、3 匹とも変異導入は認められなかった。このことから、CRISPR プラスミドベクターの受精卵への毒性は高いものの、変異導入マウスの産出率は極めて高いことが分かった。

(2) CG-NAP 遺伝子欠損マウスと、2 遺伝子 (Samd9L/Miki) 欠損マウスの作製を同様の手法で試みたところ、CG-NAP 遺伝子ヘテロ欠損マウスについては問題なく作出でき、現在経過観察と解析が進行している。しかし Samd9L/Miki 遺伝子欠損マウスは複数回のインジェクションを行ったが、未だ産仔が得られていない。これは 2 種類の CRISPR プラスミドベクターをインジェクションした際の受精卵への負荷と切断活性のバランスの悪さが原因と考えている。現在 CRISPR プラスミドベクターではなく、受精卵への毒性が低く高い切断効率を示すことが報告された、Cas9 タンパクと合成 crRNA/tracrRNA をインジェクションする手法に切り替え、検討を進めている。

(3) 広範囲の遺伝子領域を欠損させたマウスの作製するため、2 種類の CRISPR プラスミドベクター pX330 と、切断箇所に相当する相同配列で loxP を挟んだ 2 種類の ssDNA とを同時にインジェクションしたところ、得られた産仔から同じアレル上の 2 か所で loxP 全長が置換されたマウスは得られなかった。今回の検討では、少なくともマウス個体レベルにおいて単一遺伝子を標的とした遺伝子ノックアウトの確立に成功したが、複数遺伝子のノックアウトと両側の遺伝子置換については条件検討の追加や実験手法の変更が必要であることが考えられた。

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 7 件)

1. 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*. 2016 (in press) (査読有)
2. 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*. 2016 (in press) (査読有)
3. Okubo H, Kushiyama A, Sakoda H, Nakatsu Y, Iizuka M, Taki N, Fujishiro M, Fukushima T, Kamata H, Nagamachi A, Inaba T, Nishimura F, Katagiri H, Asahara T, Yoshida Y, Chonan O, Encinas J, Asano T. Involvement of resistin-like molecule β in the development of

methionine-choline deficient diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Sci Rep*. 6: 20157, 2016 (査読有)

4. Ueda T, Nagamachi A, Takubo K, Yamasaki N, Matsui H, Kanai A, Nakata Y, Ikeda K, Konuma T, Oda H, Wolff L, Honda Z, Wu X, Helin K, Iwama A, Suda T, Inaba T, Honda H. Fbxl10 overexpression in murine hematopoietic stem cells induces leukemia involving metabolic activation and upregulation of Nsg2. *Blood* 125(22): 3437-46, 2015 (査読有)
5. Inoue D, Kitaura J, Matsui H, Hou HA, Chou WC, Nagamachi A, Kawabata KC, Togami K, Nagase R, Horikawa S, Saika M, Micol JB, Hayashi Y, Harada Y, Harada H, Inaba T, Tien HF, Abdel-Wahab O, Kitamura T. SETBP1 mutations drive leukemic transformation in ASXL1-mutated MDS. *Leukemia* 29(4): 847-57, 2015 (査読有)
6. Honda H, Nagamachi A, Inaba T. -7/7q- syndrome in myeloid-lineage hematopoietic malignancies: attempts to understand this complex disease entity. *Oncogene* 34(19): 2413-2425, 2015 (査読有)
7. Nagamachi A, Nakata Y, Ueda T, Yamasaki N, Ebihara Y, Tsuji K, Honda Z, Takubo K, Suda T, Oda H, Inaba T, Honda H. Acquired deficiency of A20 results in rapid apoptosis, systemic inflammation, and abnormal hematopoietic stem cell function. *PLoS One* 9(1): e87425, 2014 (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

1. Nagamachi A, Matsui H, Kanai A, Inaba T. Low Miki expression in myelodysplastic syndromes results in polynuclear cell formation through decondensation of chromosomes in prolonged prometaphase. 第 57 回米国血液学会年次総会 2015 年 12 月 6 日 オーランド (米国)
2. Nagamachi A, Matsui H, Kanai A, Inaba T. eEF1A2 is a target gene of DNA demethylating agents for improving anemia of MDS. 第 77 回日本血液学会学術総会, 2015 年 10 月 17 日 金沢市

3. Nagamachi A, Inaba T. Exploring haplo-insufficiency of multiple anti-oncogenes that facilitate malignant transformation. 第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 9 日, 名古屋市
4. Nagamachi A, Matsui H, Kanai A, Inaba T. Roles of translational machinery in epigenetic therapy in MDS. 第 76 回日本血液学会学術総会, 2014 年 10 月 31 日 大阪市
5. Nagamachi A, Matsui H, Kanai A, Inaba T. Roles of translational machinery in epigenetic therapy in MDS. 第 73 回日本癌学会学術総会, 2015 年 9 月 26 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