

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860799

研究課題名(和文) ヒトiPS細胞へのゲノム改変によるダウン症候群の病態モデルの確立とその解析

研究課題名(英文) Disease modeling of Down syndrome using human iPSC and genome-editing technologies

研究代表者

平田 克弥 (Hirata, Katsuya)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30724306

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)：ダウン症新生児の約10%が一過性骨髄増殖症(TAM)とよばれる前白血病状態を呈する。GATA-1の遺伝子突然変異がほぼ全例で認められ、21番染色体のトリソミーと、(short form産生型の)GATA-1突然変異の両者の存在が必要と考えられている。そこで本研究では、疾患特異的ヒトiPS細胞の作成・分化誘導技術と遺伝子改変技術を組み合わせ、GATA-1と21番染色体の形態によりGATA-1の遺伝子型の3タイプ(null / short form / full length) × 21番染色体の核型2種類(ディプロイド / トリソミー)に基づいて6種類のiPS細胞ラインの樹立を行うことができた。

研究成果の概要(英文)：Children with Down syndrome (DS) are predisposed to developing transient myeloproliferative disorder (TMD) which are supposed to be caused by constitutive trisomy 21 and acquired mutations in X-linked GATA1 gene. These mutations lead to production of a variant GATA1 protein that is truncated at its N terminus. To clarify each pathogenic role of trisomy 21 and GATA1 short form in TMD, we aimed to generate precise disease model. We created human induced pluripotent stem cells (iPSCs) from mononuclear cells of a male TMD neonate with somatic hemizygous mutation in GATA1 as well as iPSCs of the same patient without the mutation. Using TALE nucleases (TALENs), we obtained various iPSC lines with normal GATA1, GATA1 short and GATA1-null from Trisomy 21 and normal karyotype male. Our experimental model using human disease specific iPSCs and gene targeting system will be a powerful tool in studying the several congenital disease pathogenesis in pediatric research field.

研究分野：幹細胞研究

キーワード：iPS細胞 ゲノム編集 ダウン症候群

1. 研究開始当初の背景

ダウン症候群は700人に1人という高い頻度で発症し、多彩な合併症を呈する。とくに白血病のリスクが高く、ダウン症新生児の約10%が一過性骨髄増殖症 (transient abnormal myelopoiesis; TAM) とよばれる前白血病状態を呈する。TAM 患者の血液中の芽球について調べてみると、X染色体上にコードされるGATA-1の遺伝子突然変異がほぼ全例で認められるが、ほとんどの変異が exon2 の開始コドンのすぐ下流に起こり、N末領域が失われた短縮型 (GATA-1 short form) のみが産生されていることが分かる。興味深いことにGATA-1 short form が産生されない null 変異やC末端での変異などの症例は報告されておらず、TAM におけるGATA-1 short form の特殊な役割が示唆される。その一方でGATA-1 変異を遺伝的に有する家系 (X連鎖性血小板減少症; トリソミーではない) では血球の異常増殖はほとんど認められないことから、TAM の発症には21番染色体のトリソミーと、(short form 産生型の) GATA-1 突然変異の両者の存在が必要と考えられている。単一遺伝子変異と染色体異常が協調して引き起こすこの特異な病態を明らかにするためには実験モデル系の構築が必要であるが、これまでヒトトリソミーとGATA-1 変異を正確に表す細胞・動物モデルがなかったため、TAM の発症メカニズムはまだよく分かっていない。

2. 研究の目的

ヒト人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) の発見により、ヒト21トリソミーを再現できる細胞モデルを構築することが可能となった。当研究室ではこれまで、末梢血および臍帯血をもとに健常児・ダウン症患者 (TAM 発症なし)・ダウン症患者 (TAM 発症あり) の3種類の疾患特異的ヒトiPS細胞を樹立し、それらの血球分化誘導能について解析を行ってきた。その結果、

- ダウン症患者 (TAM 発症なし) の iPS 細胞では、健常児からのものに比較して、血球の増殖と分化誘導の亢進がみられる。
- ダウン症患者 (TAM 発症あり) の iPS 細胞では、ダウン症患者 (TAM 発症なし) のものと比較して、赤芽球系への分化が強く阻害されている

ということが分かってきた。これらの成果により TAM の病態の一端は明らかにすることができたと思われる。しかしながら GATA-1 の遺伝子型 (null / short form / full length の3タイプ) および21番染色体の核型 (ディプロイド / トリソミーの2タイプ) に基づいて考えるならば、上記の解析では、6種類の組み合わせのうち3つのタイプを調べたにすぎず、GATA-1 short form と21トリソミーの作用を明確にしたとは言えない。したがって TAM の発症機序を

知るためには、GATA-1 遺伝子型と21番染色体核型を明確に区別できるような実験系の構築が不可欠と思われた。

そこで本研究では、疾患特異的ヒトiPS細胞の作成・分化誘導技術と遺伝子改変技術を組み合わせ、21番染色体核型とGATA-1変異の各組み合わせを再現した病態モデルの確立を目指した。そのためにまずGATA-1と21番染色体の形態によりGATA-1の遺伝子型の3タイプ (null / short form / full length) × 21番染色体の核型2種類 (ディプロイド / トリソミー) に基づいて6種類のiPS細胞ラインの樹立を目指した。

3. 研究の方法

上述の細胞モデルを樹立するためにはiPS細胞への遺伝子改変操作が必須であるが、ヒトiPS細胞はマウスの細胞と異なり相同組換えの頻度が極めて低く、従来マウスES細胞において用いられてきた遺伝子改変操作では作成は期待できない。

近年、さまざまな生物・細胞種における遺伝子改変を可能にする技術としてTALENなどのゲノム編集技術が開発され注目を集めている。当研究室は以前より Zinc Finger Nuclease などの人工ヌクレアーゼの開発に取り組んできており、TALENについても早期からその導入・改変を進めてきた。TALENは、植物病原菌が感染時に注入するタンパク (TALE) 由来の 'DNA 結合ドメイン' に、制限酵素 FokI 由来の 'DNA 切断ドメイン' をつなげたキメラタンパクである。標的配列に結合するTALENを作成し、ドナーDNAとともに細胞内に導入することで、ゲノム上の任意の場所に効率的に遺伝子組換えを誘導することが可能となる (図1)。

そこでこのTALENをもちいて、目的の遺伝子改変を行った。

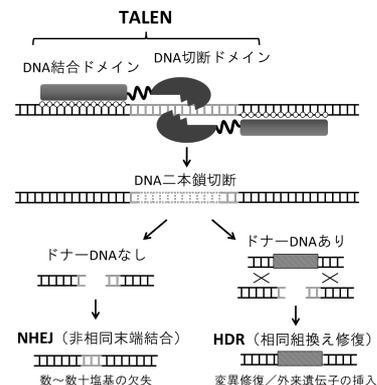


図1. TALENによる遺伝子改変。標的配列に結合したTALENが二量体を形成するとDNA二本鎖切断を引き起こし、塩基の欠失 (左) あるいは相同組換えによる外来遺伝子の挿入 (右) が高率に起こる。

4. 研究成果

まず既に樹立済みの「21番ディプロイド・GATA-1 full length」「21番トリソミー・GATA-1 full length」をもとに、homology-directed repair (HDR)によるGATA-1への欠失変異の導入を行うため、【human EF1a プロモーター + 薬剤選択マーカー (puromycin) + polyA】からなるドナーDNAを作成した(図2)。

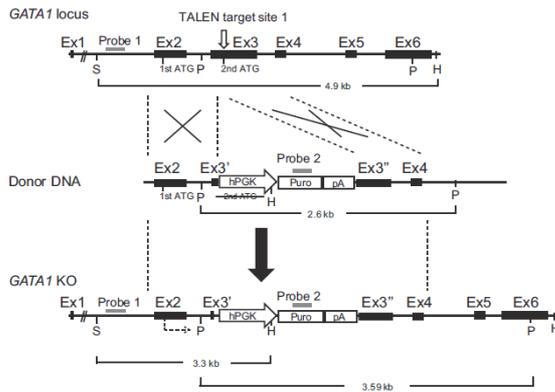


図2. HDRによるGATA1欠失変異の導入のシエマ
(上) 通常のGATA1遺伝子
(中) puromycin耐性遺伝子と800bpの相同配列を組み込んだターゲティングベクター
(下) ターゲティングが行われたGATA1遺伝子
エクソン(黒四角), 制限酵素(S, SpeI; H, HincII; and P, PvuII), TALEN標的位置(白い矢印), Southern blotプローブ(灰色の棒印)

GATA-1の開始コドン近傍(第2エクソン)を標的とするTALENを合成し、このドナーDNAとともに遺伝子導入を行った。

Puromycinによるポジティブセレクションによりクローン選択を行い、得られたクローンについて、PCRおよびサザンハイブリダイゼーションにより遺伝子改変を確認したところ、目的のクローンを得ることができた(図3)。

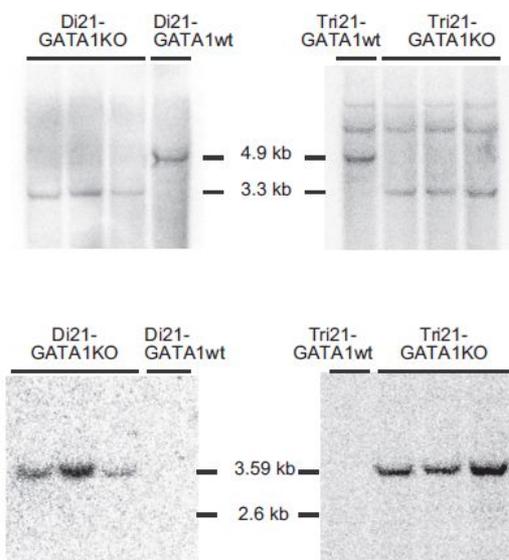


図3. 遺伝子改変を行ったiPS細胞のSouthern blot解析

改変前; Di21- / Tri21-GATA1wt

改変後; Di21- / Tri21-GATA1KO

(上段) probe 1 (下段) probe 2

想定されるPCRフラグメントサイズ;

Probe 1 (SpeI/HincII切断) wild-type allele, 4.9 kb;

targeted allele, 3.3 kb.

Probe 2 (PvuII消化) wild-type allele, no band; targeted

allele, 3.59 kb; random integration, 2.6 kb.

次に「21番ディプロイド・GATA-1 short form」の樹立を目指した。

GATA-1 short formは、(第2エクソンにある)本来の1st ATGの直後に変異が入り、早期の停止コドンの発生と(第3エクソンにある)2番目のATGからの発現開始が起こることであり、N末端を欠失した短縮型のタンパクが作られる状態である。すなわち第3エクソン以降の「短縮型タンパク」の発現が必要であるため、その前の部分に「停止コドン+polyA」をもつような配列を入れることができない。つまりこれまでのようにHDRによる薬剤選択マーカーの挿入とポジティブセレクションによる方法は採れない。そのため健康児由来iPS細胞をもとにnon-homologous end-joining (NHEJ)によってGATA-1の1st ATG直後への変異導入を目指した(図4)。

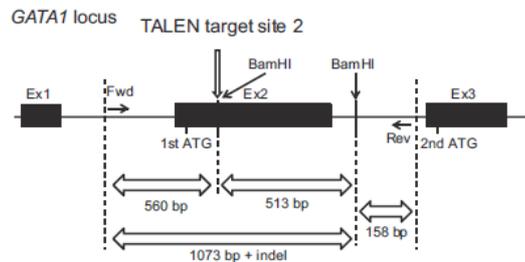


図4. NHEJによるGATA1変異導入のシエマ
エクソン(黒四角), 制限酵素(BamHI), TALEN標的位置(白い矢印), PCRプライマーの位置

まず通常のTALENをもちいて試してみたが、遺伝子組換え効率があまり高くないため目的のクローンを得ることができなかった。次にsingle-stranded DNA oligonucleotides (ssODN)と呼ばれる方法をもちいてみたが、数百個以上のクローンピックアップにてもやはり目的のクローンは得られなかった。

その後、Platinum TALENというさらに切断効率の高いTALENをもちいることによって、ようやく17bpの欠失を伴ったNHEJの起こったクローンを得ることに成功した(図5)。



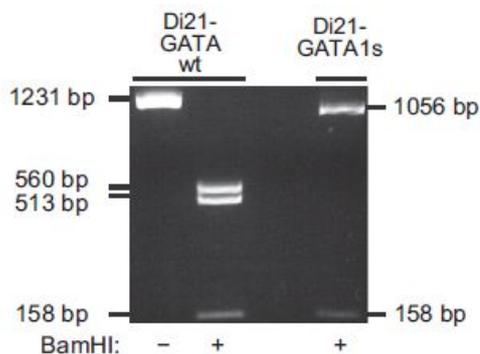


図5. NHEJによって得られたDi21-GATA1siPS細胞のGATA1座位におけるPCR解析
 (上段) Di21-GATA1siPS細胞のGATA1座位の塩基変異。17塩基の欠失が起っている
 (下段) PCRによる解析。想定されるPCR断片長: Di21-GATA1wt (BamHI-) 1,231 bp, (BamHI+) 560/513/158 bp; Di21-GATA1s (+BamHI) 1,073 (+indel)/158 bp. A 17-bp deletion by NHEJ resulted in production of 1,056/158 bp.

得られたiPS細胞について、実際に目的のGATA1が発現しているかどうかを確認する必要があります。そこでiPS細胞を造血系へと分化誘導を行った。8日目の胚様体からフローサイトメトリーによってCD34+CD38+細胞を選択し、それらからmRNAを精製した。RT-PCRによって変異部位の増幅を行ったところ、いずれも想定通りのGATA1が発現しており目的の細胞ラインを得ることができた(図6)。

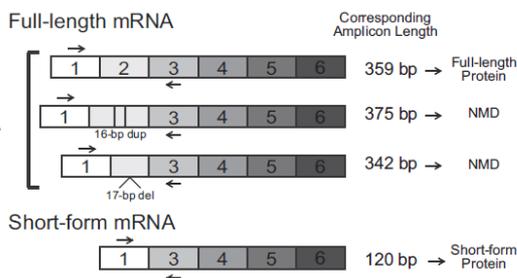
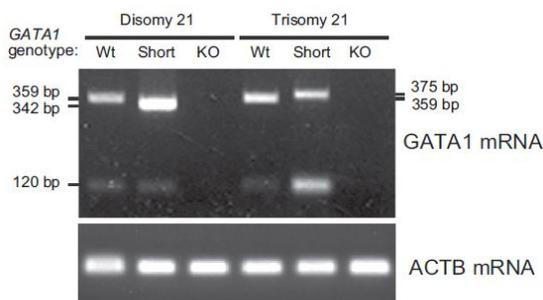


図4. GATA1発現の確認
 (上) GATA1およびb-actin (ACTB) mRNAにおけるGATA1のRT-PCRの電気泳動の図。
 想定される断片サイズ: Di21-/Tri21-GATA1wt, 359/120 bp; Di21-/Tri21-GATA1KO, バンドなし; Di21-GATA1s (17bp欠失), 342/120 bp; Tri21-GATA1s (16bp重複), 375/120 bp.
 (下) 各mRNAとPCRプライマーの位置のシェーマ

このように本研究課題においては、目的とする細胞ラインをすべて予定通り作成することができ、さらに造血分化による病態メカニズム解析に進むことが可能となった。

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2件)

1. Hirata K, Nishihara M, Oshima Y, Hirano S, Kitajima H. Application of transcutaneous carbon dioxide tension monitoring with low electrode temperatures in premature infants in the early postnatal period. *Am J Perinatol.* 31(5):435-40, 2014 (査読あり)
doi: 10.1055/s-0033-1352485.
2. Banno K, Omori S, Hirata K, Nawa N, Nakagawa N, Nishimura K, Ohtaka M, Nakanishi M, Sakuma T, Yamamoto T, Toki T, Ito E, Yamamoto T, Kokubu C, Takeda J, Taniguchi H, Arahori H, Wada K, Kitabatake Y, Ozono K. Systematic Cellular Disease Models Reveal Synergistic Interaction of Trisomy 21 and GATA1 Mutations in Hematopoietic Abnormalities. *Cell Rep.* 15(6):1228-41, 2016 (査読あり)
doi: 10.1016/j.celrep.2016.04.031.

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年月日:
 国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 取得年月日:
 国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平田 克弥 (HIRATA, Katsuya)
大阪大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：26860799

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()