

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19513

研究課題名(和文)小核移行トリガー蛋白質の探索と後天的トリソミックレスキューへの応用

研究課題名(英文) Search for micronucleus migration trigger proteins and their application to acquired trisomic rescue

研究代表者

脇田 幸子(WAKITA, SACHIKO)

三重大学・医学部・技術員

研究者番号：20782981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：小核移行トリガー蛋白質の特定は、二次元電気泳動法にて小核特異的蛋白質の分離に難航したため、CRISPR/Cas9を用いて標的染色体を特異的に切断、小核へ移行後、後天的トリソミックレスキューを誘導する方略に変更した。13箇所での切断で最もdisomy細胞が多く出現し、後天的トリソミックレスキューが誘導されたと考えられる。今後、更に再現性を確認する必要があるが、二本鎖切断された標的染色体は、DNA修復しきれず小核へ移行・分解される頻度が増し、結果として後天的トリソミックレスキューが誘導出来たと推察される。現在これらの誘導disomy細胞に対し、STR解析やMLPA法などの詳細な解析を実施中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

標的染色体1本のみを切断し、小核へ移行・分解させることにより、後天的にトリソミックレスキューを誘導することが出来た。この結果から、ダウン症候群を始めとする染色体異数性の根本的治療、またはがん遺伝子治療の新規治療方法の開発に新たな可能性が広がったと考える。まだ効率やドラッグデリバリーシステム等の課題はあるが、標的染色体を小核に移行させることが有用な手法となりうる。今後は、切断箇所の数の追加による効率化、切断箇所の組み合わせ最適化、エクソソームを用いた標的細胞特異的な核型修正、最終的にはDNA二本鎖の切断を用いない方法を構築し、臨床応用に近づけたい。

研究成果の概要(英文)：Identification of small nuclear migration trigger protein, since it was difficult to separate the small nuclear-specific protein by two-dimensional electrophoresis, specifically cleavage the target chromosome using CRISPR / Cas9, after the transition to a small nucleus, it was changed to a strategy to induce acquired trisomic rescue. Most disomy cells appeared in 13 cleavage, it is believed that acquired trisomic rescue was induced. In the future, it is necessary to further confirm the reproducibility, double-stranded cut target chromosome, the frequency of migration and decomposition to the small nucleus can not be dna repair is increased, it is presumed that acquired trisomic rescue was able to induce as a result. Currently, for these induced disomy cells, detailed analysis such as STR analysis and MLPA method is being carried out.

研究分野：人類遺伝学

キーワード：ダウン症 トリソミックレスキュー 小核 染色体消去 Cas9

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

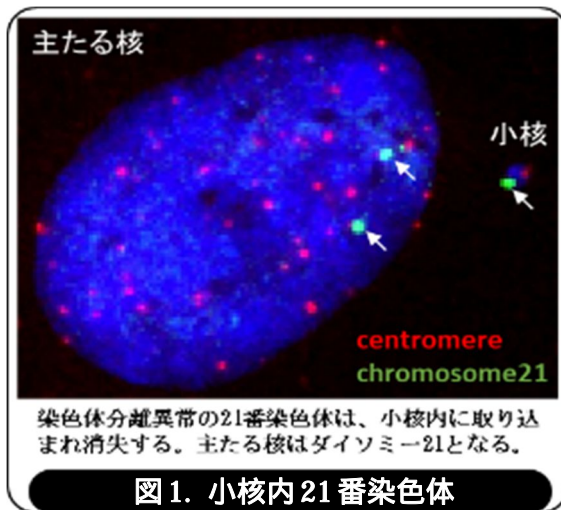
ダウン症候群 (DS) は、21 番染色体の数的異常 (過剰) が病因であり、この過剰染色体により知的障害をはじめ多彩な合併症を生じにわたり生じる。この点、核型正常化のみが複雑な合併症を低減する唯一の根本的な解決法といえる。

近年、ゲノム改変技術の発展により医療とゲノム編集技術は応用可能な技術となりつつある。一方、効率よくアレル特異的に過剰染色体の消去を行う方法は存在せず、ゆえに、ダウン症候群に対する臨床的介入法は開発されていない。

一方で、21 番染色体のトリソミー細胞における過剰染色体を後天的に排除し、正倍数性の細胞 (21 番染色体が 2 本の正常核型細胞) を誘導することを目的とした研究は、これまでも行われてきた。しかし染色体消失の効率の低さ、および染色体アレル選択性の欠如が大きな障壁となり、いずれの研究も未だ途上の域を出ていない。

2. 研究の目的

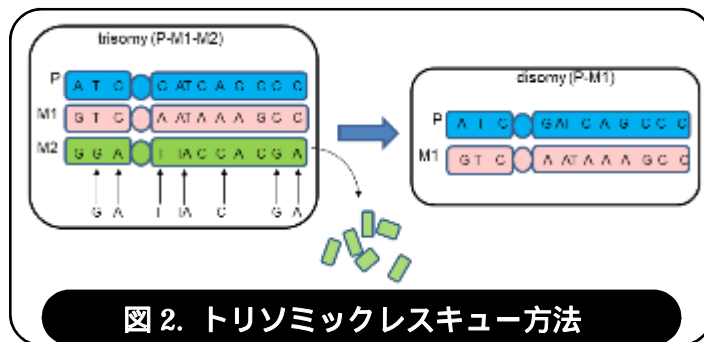
細胞内の主たる核とは独立した存在で、異常染色体等の少量の核酸を包含し、場合によっては内部核酸を分解し喪失させる核を小核と呼ぶ。本研究は、ダウン症候群 (DS) の人由来多能性幹細胞 (iPS 細胞) を用いて、小核移行トリガー蛋白質を特定の染色体に結合させ、標的染色体を小核に移行させ、結果、細胞から消去し、トリソミー-21 細胞の核型を後天的に正常化 (ダイソミー化) する概念実証を目的としていた。研究代表者らグループは、臨床応用には不適格な方法であるゲノム編集を用いた核型正常化には成功している (図 1)。本研究では小核移行シグナルを有する機能性蛋白質を用いたゲノム改変を利用しない核型正常化技術の構築を試みようとして計画していたが、小核特異的タンパク質の同定に難航したため、過剰染色体



1 本のみを CRISPR/Cas9 で切断または dCas9 を結合し、小核移行を誘導することとした。小核移行性蛋白質の特定は出来なかったものの、標的染色体を小核内へ取り込み、最終目標である後天的トリソミックレスキューの誘導を実証した。併せて誘導効率とその必要条件を調査した。

3. 研究の方法

本研究で使用した DS 由来細胞は、本施設の臨床試験で採取された、21 番染色体の由来が判明している細胞株である。小核形成誘導薬を用いて小核形成を誘導し、濾過分離法および密度勾配遠心分離法から主たる核と小核を分離した。小核内に特異的に発現するタンパク質を同定するため、分離された小核内発現蛋白質の網羅的解析を行い、主たる核との発現量の



の差異を比較検討する予定であったが、二次元電気泳動法にて小核特異的蛋白質の分離が難航した。小核形成条件下において、DNA 損傷応答に関連する蛋白質やアポトーシス関連蛋白質等の比較的膨大な蛋白質ネットワークの変化が認められ、これらを除外した小核移行に直接関与する特異的な蛋白質のみを同定することは、今回用いた実験系では困難であった。代替法として、DS 細胞の特定 21 番染色体 1 本のみを CRISPR/Cas9 で切断または dCas9 結合し、小核内へ取り込ませ、後天的トリソミックレスキュー誘導の実証を行った (図 2)。

(1) 21 番染色体アレル特異的箇所の選定

本研究で使用した DS 由来細胞は、STR 解析により母親由来 21 番染色体が 2 本、父親由来が 1 本であることが確認されている。我々は、母親由来の 2 本を M1 および M2 染色体と名付け、P、M1、および M2 の disomy 細胞株を樹立後、各々の全ゲノムシーケンスを次世代シーケンサー (NGS) にて行い、これら NGS 解析結果の比較より、M2 染色特異的な塩基配列を複数特定した。その中で CRISPR/Cas9 が設計可能である箇所 (PAM 配列が 23 塩基内に存在する) の絞り込みを行った。

(2) gRNA の設計とプラスミド作製

設計した gRNA と Cas9 が標的 DNA を切断すると EGFP が発現する系 (EGxxFP レポータープラ

スミド)を用いて off-target の切断がなく on-target のみ切断される 13 箇所を選定した。それらを U6 プロモーターで連結し、かつ CAG プロモーター下で Cas9 を発現するカセットと共に 1 つのプラスミド上に配置させ、gRNA・Cas9 を単一のプラスミドで発現するオールインワン発現プラスミドを複数種作製した。セントロメアを挟んだ 2 箇所を組合わせた 2x-gRNA-Cas9 とそれに長腕テロメア側等の gRNA を追加した 6x-gRNA-Cas9、および 13x-gRNA-Cas9 の 3 種を作製した。更に、DNA 切断活性が不活性化されている Cas9 変異体である dCas9 に置き換えた 13x-gRNA-dCas9 を作製した。dCas9 は、gRNA と共に特定の塩基配列に結合するのみで DNA の切断はしないが、比較的長時間 target 配列に結合することにより染色体複製を阻害し、ゆえにトリソミックレスキューを引き起こす可能性があると考えられた。全て発現プラスミドには、positive selection に利用するための puromycin 耐性遺伝子が、Cas9 配列後に 2A peptide 配列を介して搭載された。

(3)核型修正の実証

DS 由来 iPS 細胞を対象に M2 染色体を特異的に認識する gRNA を発現するプラスミドをそれぞれ電気穿孔法 (Neon, ThermoFisher) にて導入した。エレクトロポレーション後、24~72 時間 puromycin に暴露させ、ベクター導入細胞を選択した。エレクトロポレーションから約 1 週間後の細胞を FISH 解析用に供した。同様に DS 由来 iPS 細胞から M2 染色体を消去した M2 disomy 細胞においても遺伝子導入後、FISH 解析を実施した。

(4)核型修正の評価

細胞をカルノア固定後、低張処理し標本を作製した。我々が作製した 21 番染色体を特異的に認識する 2 種類の異色プローブを用いて FISH を実施した。単色においてシグナル数が 2 ずつの細胞を disomy 細胞、シグナル数 3 ずつの細胞を trisomy 細胞と解釈し、各々の細胞数をカウントした。約 100 個の細胞をカウントし、その総数で除することで disomy 細胞の割合を求めた。ベクターの種類毎に計算し、核型修正効率を比較した。

4. 研究成果

小核移行トリガー蛋白質の特定は、二次元電気泳動法にて小核特異的蛋白質の分離に難航したため、CRISPR/Cas9 を用いて標的染色体を特異的に切断することで、標的染色体を小核へ移行し後天的トリソミックレスキューを誘導する方略に変更した。核型修正効率を FISH 法にて評価したところ、切断箇所数に比例して disomy 細胞の出現率が上昇した (図 3-5)。6 箇所の切断では、標準偏差がやや大きいものの、最大 7.1%の核型修正効果が認められ、更に 13 箇所の切断では、disomy 細胞が約 13%出現した。

dCas9 は、DNA 切断活性が不活性化されている Cas9 変異体で、gRNA と共に特定の塩基配列に比較的長時間 (3 時間以上) 強く結合するとされる。DNA 複製障害あるいは細胞分裂時の染色体不分離を来たし小核移行を誘導する可能性を期待したが、disomy 細胞はほとんど認められなかった (図 6)。

以上の結果から、2 箇所のみ DNA 二本鎖切断では、切断された DNA は修復機構により DNA 修復が起こっていると考えられた。一方、13x-gRNA-Cas9 で最も disomy 細胞が多く出現し、後天的トリソミックレスキューが誘導されたと考えられるが、今後、更に多くの組合せで再現性を確認する必要がある。より多くの箇所二本鎖切断された標的染色体は、DNA 修復しきれず小核へ移行・分解される頻度が増し、結果として後天的トリソミックレスキューが誘導出来たと推察される。現在これらの誘導 disomy 細胞に対し、STR 解析や MLPA 法などの詳細な解析を実施中である。さらに、小核へ移行した M2 染色体を可視化して画像上確認し、M2 染色体が消去された一連の過程を科学的に今後追求する。

総じて今後は、切断箇所数の追加による効率化、切断箇所の組み合わせ最適化、エクソソームを用いた標的細胞特異的な核型修正、最終的には DNA 二本鎖の切断を用いない方法で高効率に核型修正が可能な方法の構築に邁進する予定である。

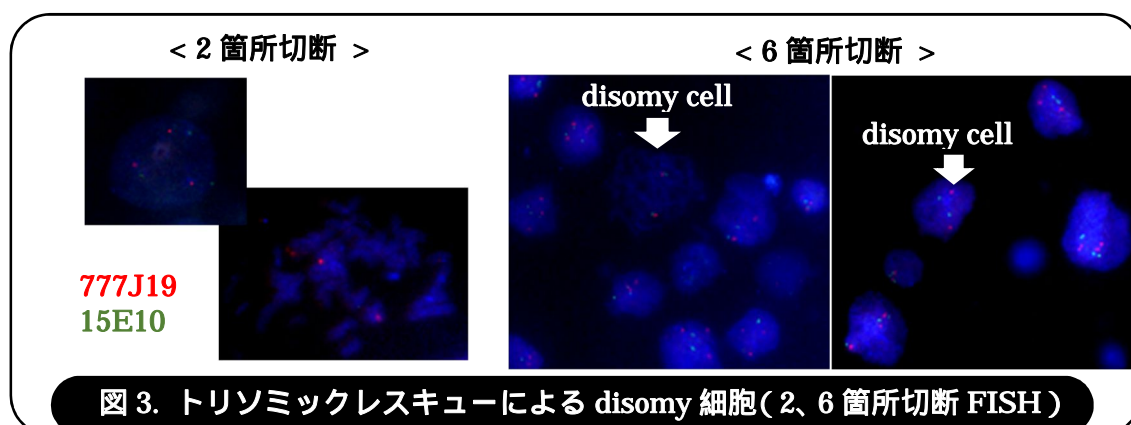


図 3. トリソミックレスキューによる disomy 細胞 (2、6 箇所切断 FISH)

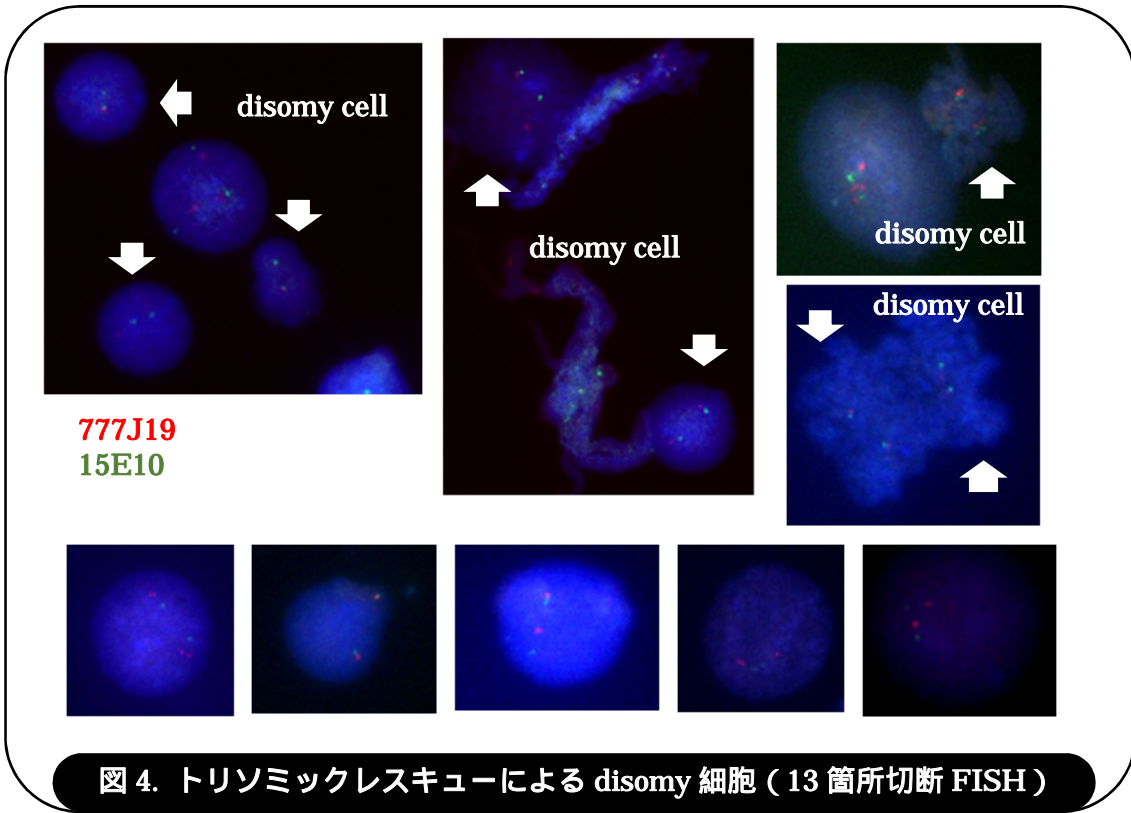


図 4. トリソミックレスキューによる disomy 細胞 (13 箇所切断 FISH)

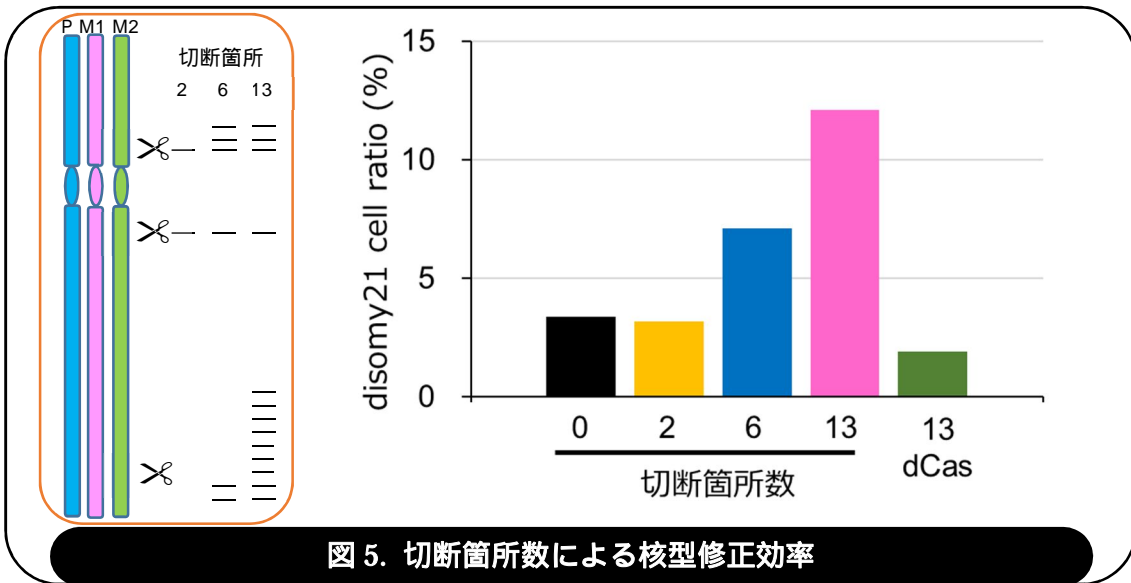


図 5. 切断箇所数による核型修正効率

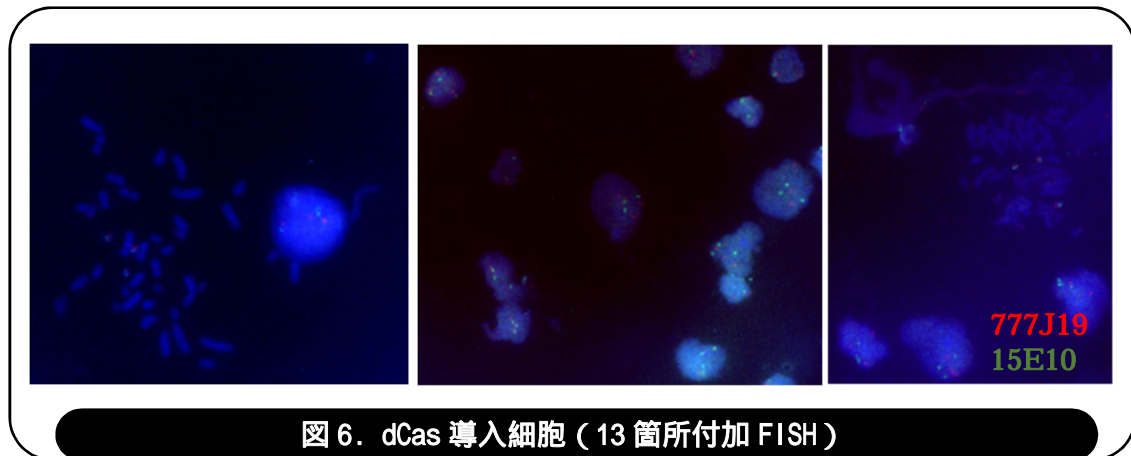


図 6. dCas 導入細胞 (13 箇所付加 FISH)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 橋詰 令太郎
2. 発表標題 染色体消去によるtrisomy21のhaplotype phasing方法構築Chromosome phasing of trisomy 21 by chromosome elimination
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 脇田 幸子
2. 発表標題 CRISPR/Casシステムを用いた過剰21番染色体消去の誘導
3. 学会等名 第2回ダウン症会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 橋詰 令太郎
2. 発表標題 アレル特異的染色体切断による過剰染色体消去の試み
3. 学会等名 第1回ダウン症基礎研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	橋詰 令太郎 (Hashizume Ryotaro) (50456662)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	原 万里 (Hara Mari) (30176383)		