

135. 骨髄異形成症候群の新規責任遺伝子単離システムの構築

長町 安希子

広島大学 原爆放射線医科学研究所 附属放射線先端医学実験施設

Key words : 骨髄異形成症候群, ゲノム編集

緒言

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。症例の約 60% に、5 番染色体や 7 番染色体のモノソミーや長腕の部分欠失 (-5/5q-, -7/7q-) などの多様な染色体異常が検出され、発症や予後に深く関与する。染色体欠失領域に存在する責任遺伝子の欠失が発症起因になると考えられ、共通欠失領域から責任遺伝子の単離が進められた結果、特に 7q- においては近年複数の研究グループから発症に深く関与する遺伝子が相次いで報告された。例えばエピジェネティック制御遺伝子である *Ezh2* や、細胞周期や分化に関係する *Cux*、RNA splicing 因子の *LUC7L2* など、その遺伝子機能は多彩で、また遺伝子座位も広範囲に点在している¹⁾。我々も集中欠失領域である 7q21.3 領域から 4 つの責任遺伝子 (*Miki*, *CG-NAP*, *Samd9*, *Samd9L*) を単離し解析を行った結果、*Miki* と *CG-NAP* はハプロ不全で 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²⁾、また老齢の *Samd9L* 遺伝子ヘテロ・ホモ欠失マウスの約 60% が MDS を発症することを明らかにし³⁾、7q- は単一責任遺伝子の片アレル欠損だけで発症する疾患ではなく、染色体欠失領域の複数の遺伝子の片アレル欠失に伴うハプロ不全が病態促進に関与するという新しい発症メカニズムの可能性が考えられた。そこで、ヒト iPS 細胞に人工ヌクレアーゼ CRISPR/Cas9 システムを用いて 7 番染色体上に任意の領域を欠失させた、7 番染色体領域欠失 iPS 細胞株 (7q-iPS) を樹立し、これを造血細胞へ分化させ、*in vitro* で MDS を再現することにより欠失領域と造血細胞異形成との関連を直接的に評価する、新規の造血細胞異型性システムの構築を立案した。本研究では手技の確立と、染色体大領域欠失の影響を個体で解析することも視野に入れ、以下の検討を進めた。

方法および結果

1. 導入方法の最適化

まず始めに基盤技術の確立のため、CRISPR/Cas9 の切断効率と変異導入効率を白血病細胞株 (HL60 細胞) とマウス受精卵で検証した。数種類の切断標的配列を導入した CRISPR/Cas9 ベクター (pX330, Addgene) を作製し、切断活性の高い配列を選抜したのち HL60 細胞にエレクトロポレーション法で導入し、シングルセルソーティングでクローン化した細胞の目的配列の切断効率を評価した。その結果、約 50% のクローンの標的配列に 1~数 10 bp の微小欠失が認められ、このシステムで高効率に標的配列が切断できることを確認した。7q-iPS 細胞では巨大領域を欠失させる必要があり、そのためには 2 種類の CRISPR/Cas9 ベクターと、相同領域間に Cre-loxP で薬剤耐性遺伝子を挟んだターゲットベクターの計 3 種類を共導入し、薬剤セレクションでの選抜を計画している。そこで CRISPR/Cas9 ベクターと、約 3~4 kb のホモロジーアームに蛍光タンパクをコードしたレポーター遺伝子と loxP 配列で挟んだ薬剤耐性遺伝子を組み込んだターゲットベクターを HL60 細胞に共導入し、薬剤選択を行ったのち 100 クロオンを単離し、蛍光レポーター遺伝子の挿入と相同組換え効率について検討した (図 1)。その結果、約 60% の細胞で組換えが認められ、さらに両アレル/片アレルに蛍光配列が挿入されていた割合は 49/12 と両アレル挿入が半数以上を占め、変異導入細胞を効率的に単離することができた。

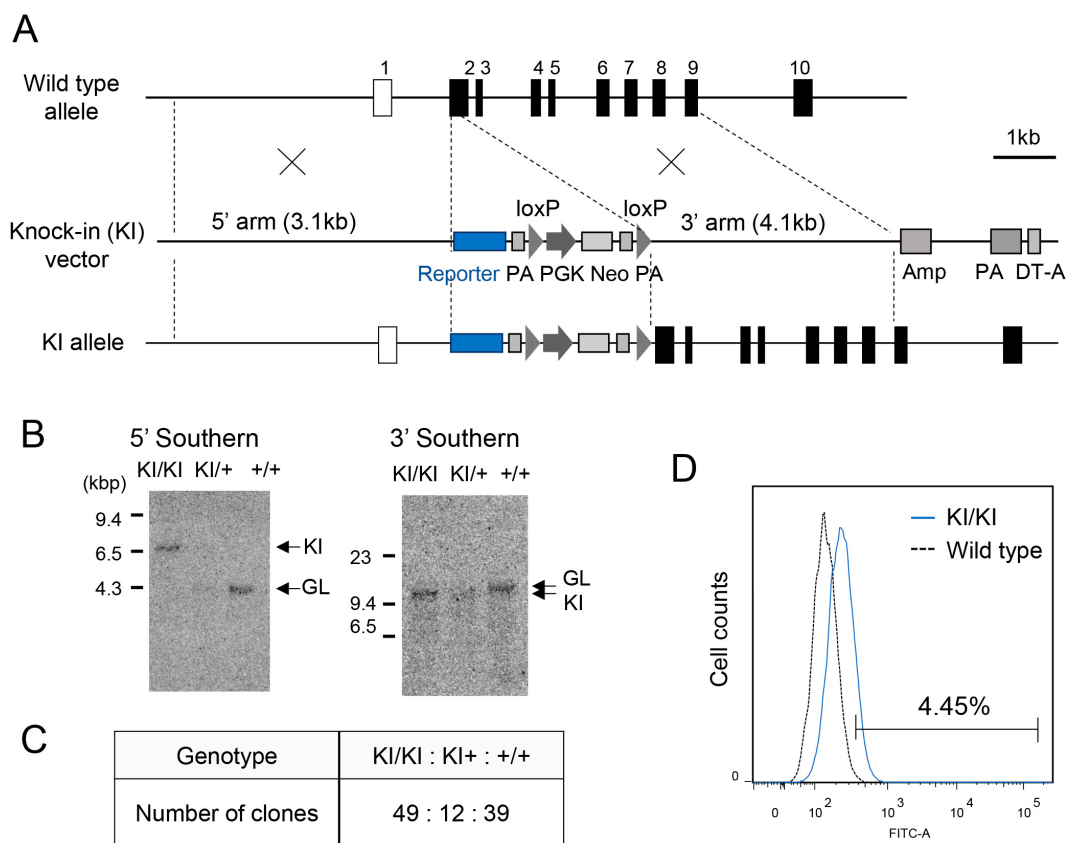


図1. 白血病細胞株 HL-60 細胞への CRISPR/Cas9 法の変異導入効率の検討

- A) ターゲティングベクターの設計
 B) サザンブロット法での変異導入確認
 C) 変異導入後に単離した HL-60 細胞クローンの標的遺伝子座の遺伝子型判定
 D) KI/KI 遺伝子型クローンの蛍光発現の確認

続いてマウス受精卵前核に環状 pX330 (5 ng/ μ l) をマイクロインジェクションしたのち偽妊娠マウスに移植し、産仔マウスの尻尾 DNA で切断効率を検討したところ、受精卵の生存率は 86.5% で、135 個の 2 細胞期胚移植で 4 匹の産仔が得られた (3%)。しかし、産仔 4 匹中 2 匹のマウスは微小欠失 (1~15 bp) が両アレルに挿入されたホモ欠失マウス、さらに 1 匹はヘテロ欠失マウスで、受精卵への毒性影響は強烈だが変異マウスの産出率が高いことが分かった。そこで毒性を軽減させる目的で、合成 crRNA/tracrRNA と Cas9 タンパク質をインジェクションする手法に切り替え同様に検討したところ、特に産仔数が劇的に増加し (32%)、なかでも産仔 13 匹中 12 匹に変異が認められ、pX330 環状 DNA をインジェクションする手法と比較してより効率良く変異マウスを作成することができた (表 1)。

表1. マウス受精卵への CRISPR/Cas9 法の変異導入効率の検討

A) PN injection with pX330				
Injected	two-cell /survived	pups /two-cell	GMO /pups	homo : hetero : wt
85	71 / 85 (83%)	2 / 71 (2.8%)	1 / 2 (50%)	0 : 1 : 1
80	64 / 71 (90%)	2 / 64 (3.1%)	2 / 2 (100%)	2 : 0 : 0

B) PN injection with crRNA/tracrRNA and Cas9 protein				
Injected	two-cell /survived	pups /two-cell	GMO /pups	homo : hetero : wt
46	41 / 46 (89%)	13 / 41 (32%)	12 / 13 (92%)	6 : 6 : 1

マウス受精卵前核に、A) 環状 pX330 (5 ng/ μ l) B) 合成 crRNA/tracrRNA と Cas9 タンパク質をマイクロインジェクションし、変異導入効率を比較した。

2. ゲノム編集ベクターとターゲットベクターの構築

iPS 細胞に巨大欠失を導入するためのゲノム編集ベクターとターゲットベクターを構築した。導入する欠失領域は、我々が単離した責任遺伝子群を含む 7q21 バンド近辺、*Ezh2* 遺伝子が座する 7q36 バンド近辺、他ヒトの MDS 症例で高頻度に欠失が見られる領域を標的に、約 100 kb の領域を 7 番染色体上に数箇所設計した。ゲノム編集ベクターは HL60 細胞で高い変異導入株を得た pX330 ベクターを使用し、欠失させたい領域の両端を標的に 2 種類ずつ作製した。ターゲットベクターは 3~4 kb の相同領域の間に Cre-loxP で薬剤耐性遺伝子を挟んだものを作製した。iPS 細胞への導入にあたり懸念のひとつは広範囲の欠損頻度が低いことであり、もし困難な場合は欠失領域の両端に loxP 配列と異なる薬剤マーカを 2 段階で置き換えたのち、Cre 誘導により領域を欠損させる方法を採用する。また変異導入頻度が低い場合は、マウス受精卵で高頻度に変異が導入された crRNA/tracrRNA、Cas9 タンパク質を用いる手法に切り替え、より高効率な遺伝子導入の実現を目指す。

考 察

今回はまず培養細胞を用いて効率的な遺伝子導入の手法の確立を開始した。その結果、HL60 細胞株では CRISPR/Cas9 ベクターである pX330 を使用した検討で非常に高い切断効率を得られ、さらに薬剤耐性遺伝子を共導入することで、変異細胞をより効率的に単離することができた。しかし今回の検討から、7q-iPS 細胞の作製で想定している約 100 kb もの広範囲の領域を欠失させるには切断標的部位は一か所ではなく、欠失領域両端の二か所を標的に、薬剤耐性遺伝子を含む相対するターゲットベクターの共導入が不可欠であるという認識を得た。さらに、マウス受精卵での検討から合成 crRNA/tracrRNA と Cas9 タンパク質を用いる手法で高効率に両アレル変異を挿入することができ、iPS 細胞でも応用するべく培養細胞と iPS 細胞で検討を開始した。現在、7q-iPS 細胞樹立のため、理化学研究所で提供している健常人の上皮細胞から樹立された iPS 細胞 (201B) で切断効率と欠失誘導についての検討と、造血細胞への分化誘導の系の確立、オフターゲット切断の効率的な単離手法の開発を進めている。7q-iPS 細胞が作製できればすぐに、大領域遺伝子欠失の誘導の可否について検討するとともに、サイトカインにより各種造血細胞へと分化させたのち、増殖能や分化能、細胞形態異常を検証し、領域欠失と造血細胞異形成との関係を直接的に評価できるシステムの構築を進める。さらにこのシステムで得られた知見を基に、7q 欠失領域内に存在するハプロ不全の遺伝子群や MDS 発症や悪性化に関与する新規責任遺伝子の探索や、CRISPR/Cas9 を用いた改変マウスモデルの作製へと展開させていきたい。

本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Jerez A, Sugimoto Y, Makishima H, Verma A, Jankowska AM, Przychodzen B, Visconte V, Tiu RV, O'Keefe CL, Mohamedali AM, Kulasekararaj AG, Pellagatti A, McGraw K, Muramatsu H, Moliterno AR, Sekeres MA, McDevitt MA, Kojima S, List A, Boultonwood J, Mufti GJ, Maciejewski JP. Loss of heterozygosity in 7q myeloid disorders: clinical associations and genomic pathogenesis. *Blood*. 2006;119(25):6109-17. doi: 10.1182/blood-2011-12-397620. PMID: 22553315.
- 2) Ozaki Y, Matsui H, Asou H, Nagamachi A, Aki D, Honda H, Yasunaga S, Takihara Y, Yamamoto T, Izumi S, Ohsugi M, Inaba T. Poly-ADP Ribosylation of Miki by tankyrase-1 Promotes Centrosome Maturation. *Mol. Cell*. 2012;47:694-706. doi: 10.1016/j.molcel.2012.06.033 PMID: 22864114.
- 3) Nagamachi A, Matsui H, Asou H, Ozaki Y, Aki D, Kanai A, Takubo K, Suda T, Nakamura T, Wolff L, Honda H, Inaba T. Haploinsufficiency of SAMD9L, an endosome fusion facilitator, causes myeloid malignancies in mice mimicking human diseases with monosomy 7. *Cancer Cell*. 2013;24(3):305-317. doi: 10.1016/j.ccr.2013.08.011. PMID: 24029230.