

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

骨髄異形成症候群 (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、責任遺伝子候補の単離と遺伝子機能解析を進めた結果、染色体欠損により発症する MDS は、単一遺伝子ではなく複数のハプロ不全遺伝子が同時に片アレル欠損することが発症要因となるという新しい発症概念を示唆する結果を得た。そこで染色体研究の新ツールになり得るゲノム編集技術を駆使し、複数遺伝子同時欠損ヒト iPS 細胞の樹立を進め、これを造血細胞へ分化させて *in vitro* で MDS を再現する、造血細胞異形成評価システムの確立を目的として、本研究ではまず手技の確立を行った。CRISPR/Cas9 の切断効率と変異導入効率を HL60 細胞で検証したところ、約半数の細胞に微小欠失が認められ、さらに蛍光レポーター遺伝子と薬剤耐性遺伝子を組み込んだターゲットベクターを HL60 細胞に共導入し同様に検討したところ、両アレル変異挿入を中心に約 60% の細胞で組換えが認められ、効率的に変異導入細胞を単離できた。さらにマウス受精卵前核に crRNA/tracrRNA と Cas9 タンパク質をマイクロインジェクションし同様に検討したところ、産仔 13 匹中 12 匹に変異が認められ、効率良く変異マウスを作出することができた。

CRISPR/Cas9 法の白血病細胞株 HL-60 細胞とマウス受精卵への変異導入効率

CRISPR/Cas9 KO plasmid and HDR plasmid transfection
of HL-60 cell line

Genotype	KI/KI : KI+ : +/+
number of clones	49 : 12 : 39

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