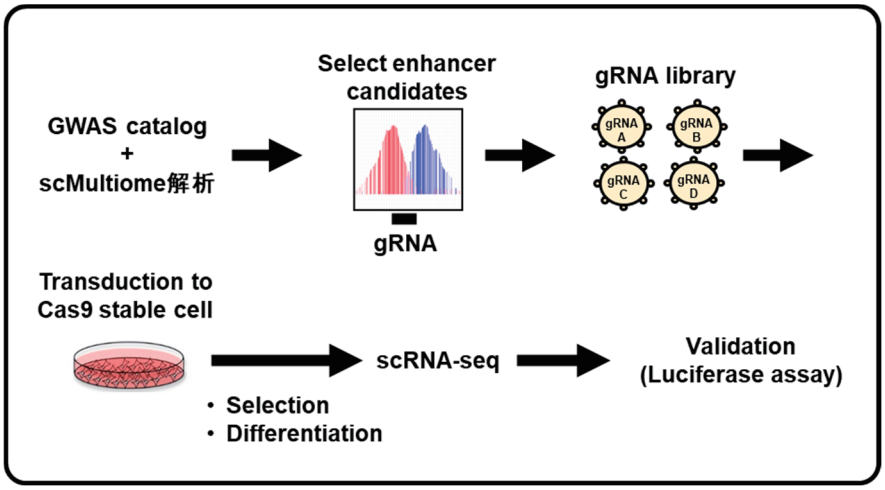
80　一細胞CRISPR解析を用いた疾患関連SNP探索法の開発	北條　宏徳

【目的】近年、人の遺伝病や生活習慣病を対象としたゲノムワイド関連解析（Genome Wide Association Study：GWAS）が活発に行われ、疾患との関連が示唆される一塩基多型（SNP）のビックデータが蓄積している。最近の研究で、これら疾患と関連する SNP（GWAS-SNP）の多くが遺伝子制御領域であるエンハンサー領域に集積していることから、SNP によるエンハンサー活性の変化が疾患と深く関連することが明らかになってきた。そこで本研究では、研究代表者がこれまで取り組んできた、ゲノム編集と一細胞 RNA-seq を統合したエンハンサースクリーニング法を用いて、GWAS-SNP データから表現型に寄与する SNP を効率的に選別する手法の開発を行った。さらにその proof of concept を示すため、骨格系疾患に関する GWAS-SNP データベースから疾患の病因となる SNP の同定を目指した。

【方法】1. ヒト SNP 関連骨発生エンハンサー候補選定：ヒト GWAS-SNP データとヒト骨芽細胞エンハンサーデータセットの統合解析により、骨関連疾患への関与が疑われる SNP の中で、エンハンサー領域に位置する候補を選定した。2. ガイド RNA（gRNA）レンチウイルスライブラリーと CRISPR レポーター細胞の作製：各エンハンサー候補領域を標的とするガイド RNA ウイルスライブラリーの作製のため、CROPseq ベクターを用いた。Cas9 を恒常的に発現する骨芽細胞株を用いた。3. エンハンサースクリーニングおよび機能検証：樹立した CRISPR 細胞に gRNA ウイルスライブラリーを感染させた後、骨芽細胞への分化誘導を行い、細胞を単離した。10x Genomics 社の Chromium システムによる一細胞 RNA-seq 解析を行った。有望エンハンサーの機能検証としてルシフェラーゼアッセイを行った。

【結果】1. ヒト SNP 関連骨発生エンハンサー候補選定：ヒト GWAS-SNP データとして、GWAS catalog データベースから骨関連疾患との関与が疑われる SNP プロファイルを取得した。また、ヒト骨芽細胞エンハンサープロファイルとして、研究代表者らが開発したヒト骨発生モデルを用いたシングルセル多層解析（scMultiome）を行った。以上の統合解析により候補エンハンサーを取得した。2. ガイド RNA（gRNA）レンチウイルスライブラリーと CRISPR レポーター細胞の作製：マウス MC3T3E1 細胞において Cas9 が恒常的に発現する細胞株（Cas9-MC3T3E1）を用いて検討を行った。同定した骨格系疾患と関連する SNP を有する骨芽細胞エンハンサー候補領域の中で、マウスにおいても配列が保存された有望領域 50 領域選定し、50 領域に対するガイド RNA を設計した。各 gRNA 配列を CROPseq ベクターにクローニングし、gRNA レンチウイルスライブラリーとした。3. エンハンサースクリーニングおよび機能検証：gRNA レンチウイルスライブラリーを Cas9-MC3T3E1 細胞に感染させ、薬剤セレクションおよび骨芽細胞分化誘導を行った後、10x Genomics 社の Chromium システムによる一細胞 RNA-seq 解析を行った。解析の結果、有望なエンハンサーとして Enh1 を同定した。Enh1 の機能検証を行うため、Enh1 配列を有するルシフェラーゼレポーターDNA を構築した。線維芽細胞と骨芽細胞を用いてレポーターアッセイを行ったところ、線維芽細胞および分化誘導前の骨芽細胞に比べて、分化誘導後の骨芽細胞ではレポーター活性が顕著に促進した。

本研究の概念図



80. 一細胞 CRISPR 解析を用いた疾患関連 SNP 探索法の開発

北條　宏徳

東京大学 大学院医学系研究科 疾患生命工学センター 臨床医工学部門

Key words：CRISPR，一細胞解析，エンハンサー，SNP

緒　言

近年、人の遺伝病や生活習慣病を対象としたゲノムワイド関連解析（Genome Wide Association Study：GWAS）が活発に行われ、疾患との関連が示唆される一塩基多型（SNP）のビックデータが蓄積している。これらの多くは一般公開され、情報を自由に使えるものの、GWAS-SNP データベースから、病気と関連する SNP を選別する手法はほとんど開発されていない。最近の研究で、これら疾患と関連する SNP（GWAS-SNP）の多くが遺伝子制御領域であるエンハンサー領域に集積していることから、SNP によるエンハンサー活性の変化が疾患と深く関連することが明らかになってきた［1］。そこで本研究では、研究代表者がこれまでに取り組んできた、ゲノム編集と一細胞 RNA-seq を統合したエンハンサースクリーニング法を用いて、GWAS-SNP データから表現型に寄与する SNP を効率的に選別する手法の開発を行った。さらに、その proof of concept を示すため、骨格系疾患に関する GWAS-SNP データベースから病因となる SNP の同定を目指した。

方　法

1. ヒト SNP 関連骨発生エンハンサー候補選定

ヒト GWAS-SNP データとヒト骨芽細胞エンハンサーデータセットの統合解析により、骨関連疾患への関与が疑われる SNP の中で、エンハンサー領域に位置する候補を選定した（図 1）。

2. ガイド RNA（gRNA）レンチウイルスライブラリーと CRISPR レポーター細胞の作製

各エンハンサー候補領域を標的とするガイド RNA ウイルスライブラリー作製のため、CROPseq ベクターを用いた。Cas9 が恒常的に発現する骨芽細胞株を用いた。骨芽細胞の分化過程を蛍光タンパク質で可視化するため、骨芽細胞特異的レポーター活性を有する Col2.3Ob の利用を検討した（図 1）。

3. エンハンサースクリーニングおよび機能検証

樹立した CRISPR 細胞に gRNA ウイルスライブラリーを感染させた後、骨芽細胞への分化誘導を行い、細胞を単離した。CROPseq ベクターにはピューロマイシン耐性遺伝子がコードされている。そのため、ウイルス感染細胞をピューロマイシンにより選別した。その後、リコンビナントヒト Bone morphogenetic protein（rhBMP2）を含む骨芽細胞分化誘導培地で一週間培養し、骨芽細胞分化誘導を行った。次に、10x Genomics 社の Chromium システムによる一細胞 RNA-seq 解析を行った。有望エンハンサーについては、機能検証としてルシフェラーゼアッセイを行った（図 1）。

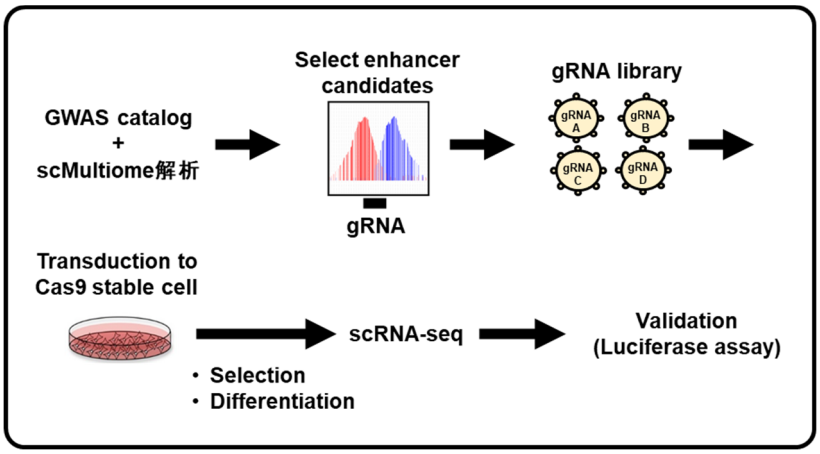


図 1. 本研究の概念図

結　果

1. ヒト SNP 関連骨発生エンハンサー候補選定

ヒト GWAS-SNP データとして、GWAS catalog（https://www.ebi.ac.uk/gwas/）データベースから骨関連疾患との関与が疑われる SNP プロファイルを取得した。“bone density”、“bone disease”、“bone mineral content measurement”、“bone fracture”を含む 10 個のカテゴリー中で報告があった SNP セットを用いた。

ヒト骨芽細胞エンハンサープロファイルとして、研究代表者らが開発したヒト骨発生モデルを用いた［2］。オープンクロマチンと遺伝子発現解析を一細胞レベルで同時に解析可能なシングルセル多層解析（scMultiome）を行った。オープンクロマチン領域には複数の転写因子が作用し、エンハンサー活性と正の相関を有することが知られている。本解析を通して骨芽細胞におけるエンハンサー群を同定した。本データセットと SNP データセットを、BEDTools（https://bedtools.readthedocs.io/en/latest/）により intersection を行い、SNP を有するエンハンサー群を同定した。

2. ガイド RNA（gRNA）レンチウイルスライブラリーと CRISPR レポーター細胞の作製

ヒト間葉系細胞の safe harbor 領域に Col2.3Ob-GFP 細胞をノックインした細胞を作製した。しかし、骨芽細胞分化誘導前から GFP 陽性細胞が認められ、スクリーニングに用いることは不適切であると判断した。そのため、本研究では、既にスクリーニングで機能することを確認していた Cas9-MC3T3E1 細胞［3］を用いることとした。結果 1 で同定した骨格系疾患に関連する SNP を有する骨芽細胞エンハンサー候補領域の中で、マウスにおいても配列が保存された有望領域 50 領域選定し、50 領域に対するガイド RNA を設計した。各 gRNA 配列を CROPseq ベクターにクローニングした。

3. エンハンサースクリーニングおよび機能検証

Cas9-MC3T3E1 細胞に CROPseq ベクター由来レンチウイルスを感染させた。薬剤セレクションおよび骨芽細胞分化誘導を行った後、10x Genomics 社の Chromium システムによる一細胞 RNA-seq 解析を行った。本解析では、一細胞ごとに Chromium システムによる一細胞分子バーコード付与を行った後、遺伝子発現解析を行うことで、各分子バーコードに対する遺伝子発現プロファイルと gRNA プロファイルを取得可能である。バイオインフォマティクスの手法を用いて、各細胞における Genotype（エンハンサー欠損部位）と、Phenotype（遺伝子発現プロファイル）を対応付けることで、どのエンハンサー候補群が、骨芽細胞の分化に寄与するか絞り込んだ。その結果、有望な候補としてエンハンサーEnh1 を同定した。Enh1 の機能検証を行うため、Enh1 配列を有するルシフェラーゼレポーターDNA を構築した。線維芽細胞と骨芽細胞を用いてレポーターアッセイを行ったところ、線維芽細胞および分化誘導前の骨芽細胞に比べて、分化誘導後の骨芽細胞ではレポーター活性が顕著に促進することが確認された（図 2）。

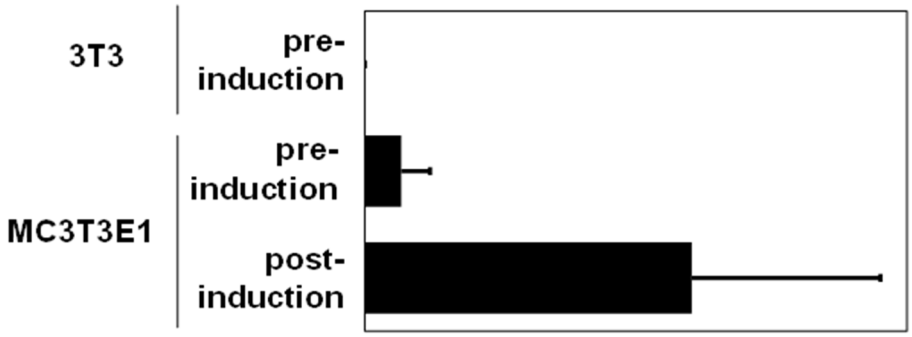


図 2. Enh1 の転写活性アッセイ

Enh1 配列を有するルシフェラーゼレポーターベクターを線維芽細胞 3T3 細胞、骨芽細胞 MC3T3E1 細胞に遺伝子導入した。MC3T3E1 細胞については、通常培地で培養を行ったサンプル（pre-induction）に加えて、骨芽細胞分化誘導を 3 日間行ったサンプル（post-induction）も検討した。

考　察

本研究により、骨格系疾患 SNP と関連するヒト骨芽細胞エンハンサー群を同定した。今後、上述のルシフェラーゼアッセイにおいて、SNP の 1 塩基置換を導入し、SNP によりレポーター活性が変化するか検討する予定である。有望な結果が得られた場合は、同定したエンハンサー活性の組織特異性の検討に進む予定である。また、同定したエンハンサー内で、どのような転写因子が作用するか明らかにするため、JASPAR を用いたモチーフ解析を検討する。今回樹立できなかったヒト間葉系細胞の CRISPR レポーター細胞については、異なるレポーター遺伝子や、PiggyBac システムの利用を検討する予定である。

文　献

1） eGTEx Project. Enhancing GTEx by bridging the gaps between genotype, gene expression, and disease. Nat Genet. 2017 Dec;49(12):1664-1670. PMID: 29019975. DOI: 10.1038/ng.3969. Epub 2017 Oct 11.

2） Shoichiro Tani, Hiroyuki Okada, Shoko Onodera, Ryota Chijimatsu, Masahide Seki, Yutaka Suzuki, Xiaonan Xin, David W Rowe, Taku Saito, Sakae Tanaka, Ung-Il Chung, Shinsuke Ohba, Hironori Hojo. Stem cell-based modeling and single-cell multiomics reveal gene-regulatory mechanisms underlying human skeletal development. *Cell Rep.* 2023 Mar 20;112276. PMID: 36965484, DOI: 10.1016/j.celrep.2023.112276

3） Hironori Hojo, Taku Saito, Xinjun He, Qiuyu Guo, Shoko Onodera, Toshifumi Azuma, Michinori Koebis, Kazuki Nakao, Atsu Aiba, Masahide Seki, Yutaka Suzuki, Hiroyuki Okada, Sakae Tanaka, Ung-Il Chung, Andrew P McMahon, Shinsuke Ohba. Runx2 regulates chromatin accessibility to direct the osteoblast program at neonatal stages. *Cell Rep.* 2022 Sep 6;40(10):111315. PMID: 36070691, PMID: 36070691