

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔平成28年度研究進捗評価用〕

平成25年度採択分
平成28年3月18日現在

染色体工学技術を用いたダウン症候群の発がん機構の解明

The elucidation of the carcinogenic mechanism of the Down's syndrome using chromosome engineering technology

課題番号：25221308

押村 光雄 (OSHIMURA MITSUO)

鳥取大学・染色体工学研究センター・特任教授



研究の概要

ダウン症候群は21番染色体トリソミーにより引き起こされる先天性疾患である。本研究の目的は独自に開発した染色体工学技術を用いて、新規のダウン症候群モデルマウスおよびモデルヒトES細胞を作製し、ダウン症候群に高頻度に見られる急性巨核芽球系白血病の発症メカニズムを解明することである。

研究分野：医歯薬学・内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児血液学・染色体工学

1. 研究開始当初の背景

ダウン症候群は21番染色体トリソミーにより引き起こされる先天性疾患であり、白血病、心奇形、精神発達遅滞など多様な表現型を示す。中でも急性巨核芽球性白血病(acute megakaryoblastic leukemia: AMKL)は非ダウン症児に比べ、ダウン症児に約500倍も高頻度に見られる病態である。ダウン症児に見られるAMKL(DS-AMKL)には、X染色体上の転写因子GATA1遺伝子に変異が見られ、GATA1遺伝子のN末が欠損したGATA1sタンパク質が発現している。また、非ダウン症児のAMKLではGATA1変異が見られないことから、トリソミー21とGATA1変異がDS-AMKL発症の必要条件であると考えられている。現在のところ、「トリソミー21により、なぜGATA1変異が高頻度に誘発されるのか?」、「DS-AMKLを引き起こすヒト21番染色体上の原因遺伝子(群)は何か?」、についてはほとんど明かにされていない。このDS-AMKLの原因解明と有効な治療法・治療薬開発のためにはダウン症候群モデル細胞・モデル動物の作製が必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究の目的は独自に開発した染色体工学技術を用いて、新規のダウン症候群モデルマウスおよびモデルヒトES細胞を作製し、ダウン症候群に高頻度に見られる急性巨核芽球系白血病の発症メカニズムを解明することである。具体的には、1)染色体工学技術により様々なヒト21番染色体領域を持つ染色体断片を作製し、2)マウスやヒトES

細胞に個別に導入することで、様々な部分トリソミーマウスやヒトES細胞を作製し、3)急性巨核芽球系白血病と遺伝子領域との関係を明かにして、4)最終的には原因遺伝子の同定と発症メカニズムの解明を目指す。以上のような解析はDS-AMKLだけでなく成人のがん発症機構の理解を深め、症状改善のための医薬品開発などに貢献するばかりでなく、ダウン症候群で高頻度に見られる除脈性不整脈、早期アルツハイマー病など、罹患者数の多い疾患の創薬開発にも貢献できることが期待される。

3. 研究の方法

マウスモデルおよびヒトES細胞を使った以下の2つの新たな染色体工学的アプローチでDS-AMKLの原因遺伝子の同定と発症メカニズムの解明を目指す。

1) マウスモデルによるストラテジー

血液系細胞で高頻度にヒト21番染色体を維持することができる新規のモデルマウスを作製し、一般表現型解析ならびに血液学的表現型解析を行う。また、既存のGATA1sマウスと交配することで、DS-AMKL様症状が引き起こされるかを検索する。さらに、遺伝子領域内から候補遺伝子を絞り込み、ヒト21番染色体上の候補遺伝子だけを破壊したヒト21番染色体導入マウスを作製し、症状回復が見られるかを検討し、原因遺伝子を同定する。

2) ヒトES細胞を用いたストラテジー

ヒトES細胞を用いてコントロール細胞と同一遺伝的背景を持つ21番染色体トリソミー

ヒト ES 細胞(ダウン症候群モデル ES 細胞)を作製し、血液学的異常を検索する。一方で、正常ヒト ES 細胞内でゲノム編集技術を用いて GATA1 遺伝子を GATA1s タンパクが発現するように変異を導入し、さらにヒト 21 番染色体を導入することで 21 番染色体トリソミー/GATA1s 導入細胞を作製し、DS-AMKL 様の表現型が観察されるかを検索する。また、1) と同様の方法を用いて原因遺伝子を同定する。

4. これまでの成果

1) マウスモデルによるストラテジー

Cre-loxP システムを用いてヒト 21 番染色体長腕領域(約 30Mb)を独自に開発したマウス人工染色体(MAC)上に転座クロニングすることに成功した(hChr.21q-MAC とよぶ)。さらに、子孫伝達可能な新規の hChr.21q-MAC 保持ダウン症候群モデルマウスの系統化に成功した。これらの系統化したマウスにおいて、ヒト 21 番上の遺伝子はヒトと同様の組織特異的発現パターンで発現しており、各組織における FISH 解析により hChr.21q-MAC の保持率を解析したところ、95%以上の高い保持率であることが確認された。hChr.21q-MAC マウスの行動解析を行ったところ、正常マウスに比べ、hChr.21q-MAC 保持マウスにおいて優位に学習能力の低下が観察された。また、hChr.21q-MAC マウスにおいて、血液学的異常を検索した結果、正常マウスに比べ、優位に血液学的異常が観察された。

2) ヒト ES 細胞を用いたストラテジー

ヒト ES 細胞にゲノム編集技術を用いて X 染色体上の GATA1 遺伝子に GATA1s 変異を導入することに成功した。次に上記で作製した GATA1s-ES 細胞あるいは正常 ES 細胞にヒト 21 番染色体を導入した。得られた各種 ES 細胞を SCID マウス精巣に移植することでテラトーマを作製し、各種 ES 細胞が 3 胚葉に分化能を持つことが確かめられた。また、マイクロアレイ解析により 21 番上の遺伝子がグローバルに 1.5 倍程度過剰発現していることが確かめられた。上記で作製した Ts21-ES、GATA1s-ES、GATA1s/Ts21-ES と正常 ES 細胞の 4 種の ES 細胞を用いて、ES-sac 法による分化誘導と赤血球系分化細胞における Western blot 解析を行ったところ、21 番上の BACH1 遺伝子は正常 ES、GATA1sES に比べ 21 番導入により高発現しており、GATA1s 変異導入により GATA1 発現は消失し、GATA1s が高発現していることが確かめられた。さらにフローサイトメトリー解析を行ったところ、正常 ES 細胞に比べ、Ts21 導入細胞では赤血球系分化が亢進し、GATA1s 導入細胞では赤血球系分化が抑制され、巨核球分化は

Ts21 導入と GATA1s 導入の相乗的な影響で分化異常が観察された。

5. 今後の計画

1) マウスモデルによるストラテジー

GATA1s マウスと hChr.21-MAC マウスを交配し、コントロールマウスとの表現型比較を行うことで、TAM 様症状がみられるか、DS-AMKL 発症がみられるか、等の検討を行い原因遺伝子の同定を行う。

2) ヒト ES 細胞を用いたストラテジー

血液表現型解析と原因遺伝子領域ならびに原因遺伝子を同定する。GATA1s/Ts21-ES 細胞にさらに変異を導入することで DS-AMKL 様表現型を呈するかを検討する。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

1. **Oshimura M.**, Uno N, **Kazuki Y.**, Katoh M, Inoue T. A pathway from chromosome transfer to engineering resulting in human and mouse artificial chromosomes for a variety of applications to bio-medical challenges. *Chromosome Res.* 2015 Feb;23(1):111-33.
2. 香月康宏、押村光雄:「進化するゲノム編集技術」(株)NTS第1編-第1章「第5節 人工染色体技術とゲノム編集技術の融合による遺伝子改変技術」p.49-58 (2015)
3. **Kazuki Y.**, Yakura Y, Abe S, **Osaki M.**, Kajitani N, Kazuki K, Takehara S, Honma K, Suemori H, Yamazaki S, Sakuma T, Toki T, Shimizu R, Nakauchi H, Yamamoto T and **Oshimura M.** Down syndrome-associated haematopoiesis abnormalities created by chromosome transfer and genome editing technologies, *Sci. Rep.* 2014 Aug 27;4:6136.
4. Kazuki K, Takehara S, Uno N, Imaoka N, Abe S, Takiguchi M, Hiramatsu K, **Oshimura M.**, **Kazuki Y.** Highly stable maintenance of a mouse artificial chromosome in human cells and mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Dec 6;442(1-2):44-50.
5. 香月康宏(連携研究者):平成27年5月29日、第62回日本実験動物学会総会(第27回)奨励賞受賞

ホームページ等

<http://www.med.tottori-u.ac.jp/chromosome/>