

染色体欠失患者由来 iPS 細胞病態モデルに対する ゲノム編集を応用した責任遺伝子探索

理化学研究所バイオリソース研究センター iPS細胞高次特性解析開発チーム・チームリーダー
林 洋平



[背景]

染色体異常は非常に高頻度で見られる遺伝的疾患であるが、効果的な治療法は現在のところ存在しない。1 遺伝子変異・機能異常に起因する疾患については遺伝子改変マウスなどの動物モデルが用いられるのが従来一般的であった。しかし、染色体異常に関しては、大規模な染色体構造が生物種ごとに異なっているために動物モデルが適用しにくい。また、近年ではゲノム編集によって、人工的に遺伝子改変することが可能であるが、大規模な染色体欠失を人工的に作出することはまだ困難である。そこで、染色体異常疾患を持つ患者から直接に採取した疾患特異的ヒト多能性幹 (iPS) 細胞を用いて、様々な細胞種へと分化誘導することによって、染色体異常によって引き起こされる多彩な臨床症状をよく反映させることができるモデルを開発し、症状ごとの責任遺伝子や治療法の探索ができるのではないかと期待される。

申請者は、これまでの研究で、iPS細胞の分子機構と患者由来の疾患特異的iPS細胞を用いた難病研究において数々の研究成果を上げてきた。iPS細胞の作製と培養における技術開発や分子機構の解明により、難病研究にiPS細胞を利用しやすいよう整備してきた (Hayashi et al., PNAS 2015, Hayashi et al., Communications Biology 2018)。さらに、染色体異常関連疾患として、環状染色体に焦点を当て、その病態モデルを作製し、染色体を修復させる新規治療法のアイデアを得ることに成功した (Bershteyn*, Hayashi*, et al., Nature 2014 (*equally contributed))。

以上の知見を反映し、本研究では、数多く存在する染色体異常疾患の中でも、4p欠失症候群 (Wolf-Hirschhorn Syndrome (WHS) ; 指定難病198) と22q11.2欠失症候群 (指定難病203) に焦点を当てる。これらの疾患を先駆けた対象として、新規技術を応用した独自の原因遺伝子探索法、創薬アッセイを開発し、これまで不明であった染色体異常疾患の原因遺伝子を同定し、創薬ターゲットとして将来的な治療法開発の道を拓く。

[方法]

本研究計画では、まず、4p欠失症候群と22q11.2欠失症候群患者由来iPS細胞を作製した。その特性解析を行い、自己複製能、多能性を維持しているかどうかを確認した。さらにそれぞれの病気に特有の染色体欠失を保持しているか、CGHアレイで解析した。さらに、これらの疾患に特有の特徴的顔貌、口蓋裂・軟口蓋閉鎖不全といった症状から、その発生過程で存在する神経堤細胞に着目し、神経堤細胞の特徴である遊走能や末梢神経、シュワン細胞、骨・軟骨細胞といった細胞種への多分化能や遺伝子発現における異常を解析した。

[結果・考察]

4p欠失症候群に関しては、世界で初めて患者4人から特異的iPS細胞を作製した。iPS細胞の作製にあたっては、患者由来の繊維芽細胞に、リプログラミング因子を搭載したエピソードプラスミドベクターを遺伝子導入した。これらの4p欠失症候群由来iPS細胞が自己複製と多分化能を有していることを示した。さらに、4p欠失症候群の網羅的なゲノム異常の有無を調べるために、CGHアレイの解析を行った。その結果、これらのiPS細胞株は4p16.3領域で共通して100遺伝子をヘテロに欠失していることが判明した。また、他の染色体領域には異常がなかった。これらの結果から、これらのiPS細胞が本研究計画、および、今後の4p欠失症候群に対する研究において、患者由来細胞モデルとして十分活用できると考えられる。

22q11.2欠失症候群に関しては、4名分の患者由来の繊維芽細胞に、リプログラミング因子を搭載したエピソードプラスミドベクターを遺伝子導入した。これらの22q11.2p欠失症候群由来iPS細胞が自己複製と多分化能を有していることを示した。さらに、22q11.2欠失症候群の網羅的なゲノム異常の有無を調べるために、CGHアレイの解析を行った。その結果、これらのiPS細胞株は22q11.2領域で共通してヘテロに欠失していることが判明した。また、他の染色体領域には異常がなかった。これらの結果から、これらのiPS細胞が本研究計画、および、今後の4p欠失症候群に対する研究において、患者由来細胞モデルとして十分活用できると考えられる。以上の内容を論文発表した (Shimizu et al., Stem Cell Research 2022)。

現在、これらのiPS細胞を神経堤細胞へと誘導させ、その異常表現型の有無を健常人由来iPS細胞と比較解析している。

[論文]

Tomoya Shimizu, Mami Matsuo-Takasaki, Dorian Luijckx, Miho Takami, Yutaka Arai, Michiya Noguchi, Yukio Nakamura, Tadayoshi Hayata, Megumu K. Saito d, Yohei Hayashi
Generation of human induced pluripotent stem cell lines derived from four DiGeorge syndrome patients with 22q11.2 deletion
Stem Cell Research 61 (2022) 102744