

令和4年 9月14日

各報道機関 御中

国立大学法人山梨大学
国立大学法人北海道大学
国立大学法人広島大学
国立研究開発法人国立成育医療研究センター

論文掲載

CRISPR/Cas9によるゲノム編集技術を用いたフィラデルフィア染色体の生成

-フィラデルフィア染色体陽性白血病の病態解明と新薬開発のためのモデル実験系の確立-

山梨大学医学部小児科学講座の玉井望雅臨床助教と犬飼岳史教授らと、北海道大学病院検査・輸血部の藤澤真一臨床検査副技師長と豊嶋崇徳部長、ワシントン大学医学部（ミズーリ州セントルイス）・発生生物学部門の神元健児研究員および腎臓内科の大町紘平研究員、広島大学・原爆放射線医科学研究所の仲一仁准教授、国立成育医療研究センター・ゲノム医療研究部の要匡部長らの研究グループは、ヒトのがんで最初に同定された染色体異常であるフィラデルフィア染色体を、CRISPR/Cas9によるゲノム編集技術を用いてヒト白血病細胞で人工的に生成することに世界で初めて成功しました。本研究の成果は、Springer Nature 出版の Cancer Gene Therapy に、8月23日付けでオンライン掲載されました。

掲載 URL: <https://doi.org/10.1038/s41417-022-00522-w>

論文

掲載誌：Cancer Gene Therapy

掲載日時：2022年8月23日

論文タイトル：Creation of Philadelphia chromosome by CRISPR/Cas9-mediated double cleavages on BCR and ABL1 genes as a model for initial event in leukemogenesis

著者：Minori Tamai,¹ Shinichi Fujisawa,² Thao T.T. Nguyen,¹ Chiaki Komatsu,¹ Keiko Kagami,¹ Kenji Kamimoto,³ Kohei Omachi,⁴ Shin Kasai,¹ Daisuke Harama,¹ Atsushi Watanabe,¹ Koshi Akahane,¹ Kumiko Goi,¹ Kazuhito Naka,⁵ Tadashi Kaname,⁶ Takanori Teshima,² and Takeshi Inukai¹

1. 山梨大学医学部小児科学講座
2. 北海道大学病院検査・輸血部
3. Department of Developmental Biology, Washington University School of Medicine in St. Louis
4. Division of Nephrology, Washington University School of Medicine in St. Louis
5. 広島大学・原爆放射線医科学研究所
6. 国立成育医療研究センター・ゲノム医療研究部

研究の概要 図1参照

白血病をはじめとする種々のがんにおいて、転座と呼ばれる染色体異常がしばしばみられます。染色体転座とは、偶然に途中で切断された別々の染色体部位が入れ替わって再結合することで生じた、異常な染色体を指します。その結果、本来は別々の遺伝子同士が途中で再結合した融合遺伝子が生じる場合があります。融合遺伝子から転写翻訳された融合蛋白質は、がん細胞の生存と増殖を促進することでがんの発症に関与します。染色体転座の研究の歴史は今から約60年前に遡ります。1960年に、Peter Nowell博士とDavid Hungerford博士は慢性骨髄性白血病(Chronic myeloid leukemia: CML)患者の白血病細胞において、正常細胞では認められない微小染色体を発見しました。この微小染色体は研究所のあった場所にちなんでフィラデルフィア染色体と呼ばれるようになりました。フィラデルフィア染色体は、がん細胞で確認された最初の異常な染色体です。1973年に、Janet Rowley博士はフィラデルフィア染色体が9番染色体と22番染色体の転座であることを突き止めました。後に、9番染色体に位置するABL1遺伝子と22番染色体に位置するBCR遺伝子から、転座によって融合遺伝子BCR::ABL1が生じることがわかりました(遺伝子はイタリック体として表記)。フィラデルフィア染色体はCMLのみならず一部の急性リンパ性白血病(Acute lymphoblastic leukemia: ALL)患者の白血病細胞においても認められます。BCR::ABL1から転写翻訳される融合蛋白質BCR::ABL1は、白血病細胞の生存と増殖を持続的に促進することで、白血病の発症に寄与していることが明らかになっています。その結果、BCR::ABL1の活性を阻害する薬剤(チロシンキナーゼ阻害薬)の開発によって、CMLおよびフィラデルフィア染色体陽性ALLの治療成績は大きく改善しました。その一方で、チロシンキナーゼ阻害薬に対する耐性化の克服などの新たな研究課題が生じています。

以上のように、フィラデルフィア染色体は、9番染色体上のABL1遺伝子と22番染色体上のBCR遺伝子が同時に切断されることで形成されると想定されていますが、その過程を直接に検証した研究はありませんでした。今回、私たちはゲノム編集技術を応用して、ABL1遺伝子とBCR遺伝子を同時に切断することによって、人工的なフィラデルフィア染色体の生成を試みました。ゲノム編集技術は、2012年にEmmanuelle Charpentier博士とJennifer Doudna博士によってCRISPR/Cas9が開発されたことで、幅広い分野に応用することが可能になりました。CRISPR/Cas9を利用すれば、遺伝子上の任意の部位を切断することができます。両博士は2020年にノーベル化学賞を受賞しています。前述のように、フィラデルフィア染色体を獲得した細胞は、自律的に増殖できるようになります。そこで、私たちはヒトのTF-1細胞をモデルに用いて実験を行いました。TF-1細胞は、造血因子(GM-CSF)を添加した培養条件ではフラスコ内で増殖しますが、造血因子を添加しないと増殖できずに死滅してしまいます。TF-1細胞のABL1遺伝子とBCR遺伝子に対してCRISPR/Cas9を作用させた後に、造血因子を添加しない条件で培養したところ、期待通りに自律的に増殖する細胞が得られました。この自律増殖するTF-1細胞において、私たちはフィラデルフィア染色体が形成されていることを確認しました。

フィラデルフィア染色体の発見から60年あまりの時を経て、ゲノム編集技術を応用することで、世界で初めてヒトの細胞において人工的にフィラデルフィア染色体を生成することに成功しました(図1)。この研究成果は、実際にフィラデルフィア染色体が、9番染色体上のABL1遺伝子と22番染色体上のBCR遺伝子が同時に切断されることがきっかけで形成されることを裏付けるものです。また、本研究で樹立した細胞系は、フィラデルフィア染色体陽性白血病の研究や新薬開発のモデル実験系として、今後の研究に寄与するものと期待されます。

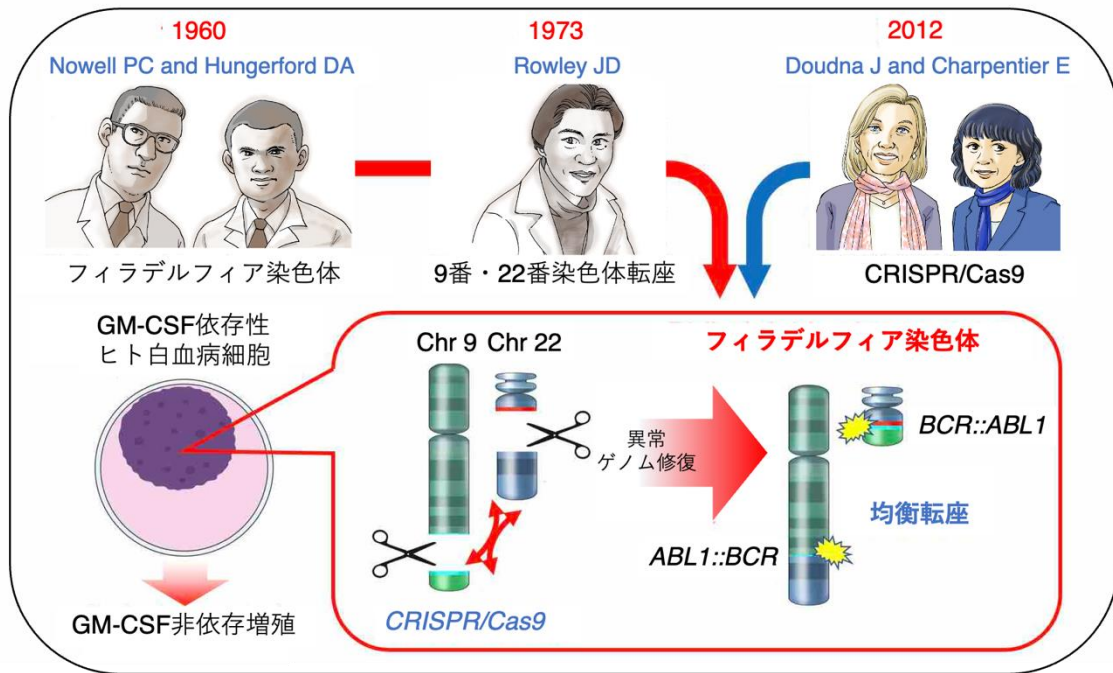


図 1. BCR::ABL1 を巡る研究の歴史と CRISPR/Cas9 技術の融合による本研究内容の模式図

背景

遺伝子にはエクソンとイントロンと呼ばれる領域があり、遺伝子から mRNA が転写される際にイントロンは切断され、エクソンが翻訳されてアミノ酸すなわち蛋白質となります。これまで *BCR::ABL1* のエクソン領域 (complementary DNA: cDNA) を細胞に強制発現させることで、融合蛋白質 *BCR::ABL1* の機能解析がなされ、イマチニブなどのチロシンキナーゼ阻害薬が開発されました。しかし、*BCR::ABL1* 陽性白血病の病態解明においてはまだ不明な点があります。これは実際の CML 患者でみられる *BCR::ABL1* をいくつかの点において正確に再現できていないためである可能性があります。まず、3'末端非翻訳領域(3'-untranslated region: 3'-UTR)の関与が挙げられます。3'-UTR は蛋白質へ翻訳されない遺伝子の末端領域であり、3'-UTR には microRNA が結合することで、遺伝子発現が調節される仕組みがあります。*BCR::ABL1* cDNA は 3'-UTR が欠損しているため、microRNA による遺伝子発現調節を受けることができません。次に、イントロンの関与が挙げられます。実際の *BCR::ABL1* ではいくつかのスプライス変異が存在し、*BCR::ABL1* 陽性白血病の病態に関係することが知られています。*BCR::ABL1* cDNA によってもたらされる産物は 1 種類の *BCR::ABL1* に限定されるためスプライス変異が生じることはありません。さらに、均衡転座として *ABL1::BCR* が存在することが知られており、この *ABL1::BCR* ががん幹細胞の増殖と複製に関与している可能性が報告されています。当然 *BCR::ABL1* cDNA は *BCR::ABL1* のみをコードしており、*ABL1::BCR* がコードされることはありません。これらの点を克服するために、私たちは外来遺伝子として cDNA を導入する方法に代え、内在する本来の *ABL1* 遺伝子と *BCR* 遺伝子から *BCR::ABL1* を人工的に生み出すことができないかどうか検討しました。そこで注目したのが、2020 年にノーベル化学賞を受賞した Emmanuelle Charpentier 博士と Jennifer Doudna 博士による CRISPR/Cas9 でした。CRISPR/Cas9 を *ABL1* 遺伝子と *BCR* 遺伝子の両遺伝子において作用させ、CRISPR/Cas9 により両遺伝子が切断された後、DNA が修復される際に *BCR::ABL1* が生成されるだろうと考えました。

方法と結果

図 2 に示すように、主に *BCR::ABL1* には *BCR* 遺伝子のエクソン 13~15 以前またはエクソン 2 以前と、*ABL1* 遺伝子のエクソン 2 以降が転座することで生じる p210 *BCR::ABL1* と p190 *BCR::ABL1* があります。私

私たちはヒトの細胞において **p210 BCR::ABL1** を生成することを目的として、**BCR** 遺伝子のイントロン 13 と **ABL1** 遺伝子のイントロン 1 に対して **CRISPR/Cas9** を作用させる計画を立てました。しかし、ここで一つ問題がありました。実験室で用いられる細胞株は培養容器の中で一定の性質を維持しながら安定的に増殖できる状態になった細胞なので、多くの細胞株は **BCR::ABL1** の導入の有無によらず増殖してしまうため、**BCR::ABL1** の導入に成功した細胞だけを選択して取ってくることができません。そこで造血因子 **GM-CSF** 依存性に増殖する **TF-1** という白血病細胞株に着目しました。**TF-1** において **BCR** 遺伝子のイントロン 13 と **ABL1** 遺伝子のイントロン 1 に対して **CRISPR/Cas9** を作用させ、その後 **GM-CSF** 無添加の条件で細胞を培養しました。親株の **TF-1** は **GM-CSF** 無添加の条件では増殖することができませんが、**CRISPR/Cas9** を作用させた細胞からは **GM-CSF** 非依存性に増殖する細胞が現れてきました。得られた亜株において、**CRISPR/Cas9** を作用させた **BCR** 遺伝子と **ABL1** 遺伝子の切断点の塩基配列を確認したところ、**BCR::ABL1** および **ABL1::BCR** が形成されていることが分かりました(図 3A)。また、**Western Blot** 法により亜株において **p210 BCR::ABL1** が発現していることを確認しました(図 3B)。さらに、**Fluorescence in situ hybridization (FISH)**法により亜株において **BCR::ABL1** の単一シグナルを有する細胞のみならず、均衡転座である **ABL1::BCR** が同時に形成されている細胞集団も存在していることが分かりました(図 3C)。同様にして、**BCR** 遺伝子のイントロン 1 と **ABL1** 遺伝子のイントロン 1 に対して **CRISPR/Cas9** を作用させた **TF-1** からは **p190 BCR::ABL1** を獲得した亜株を樹立することができました。これらの亜株は親株にはみられないチロシンキナーゼ阻害薬(イマチニブ・ニロチニブ・ダサチニブ・ポナチニブ)に対する感受性も示しました。

まとめ

これまで半世紀以上かけて数多くの研究者によって **BCR::ABL1** 陽性白血病の病態は解明され、治療法が開発されてきました。今回私たちは **BCR::ABL1** cDNA の持つウィークポイントを克服し、**CRISPR/Cas9** の力を借りて **BCR::ABL1** 陽性白血病研究の新たなステージを切り開きました。本研究において樹立された **p210** および **p190 BCR::ABL1** 亜株は **BCR::ABL1** 陽性白血病のさらなる詳細な研究における有用なリソースとなる可能性があります。また造血幹細胞において本手法を用いることで、これまで再現することが困難であった **BCR::ABL1** 陽性 **CML** の発症モデルが樹立できる可能性があります。

要点

- **CRISPR/Cas9** を用いることで内在する遺伝子より人工的に **BCR::ABL1** を生成することに成功しました。
- **p210** および **p190 BCR::ABL1** 陽性白血病細胞株の樹立に成功しました。
- 本技術によって、**BCR::ABL1** 陽性白血病の病態解明における新たな研究基盤が築かれました。

用語解説

転写翻訳：遺伝子から mRNA が作られ、mRNA の情報をもとにして蛋白質合成が行われること

9 および 22 番染色体：ヒトには 22 対の常染色体と 2 本の性染色体があり、大きい方から順に番号を付けて呼ばれている。

チロシンキナーゼ：蛋白質のチロシン残基にリン酸基を付加する酵素であり、細胞増殖などのスイッチとして機能する。

GM-CSF：Granulocyte-macrophage colony stimulation factor という造血細胞の成長促進因子

エクソンとイントロン：遺伝情報がコードされている部分をエクソン、遺伝情報がコードされていない部分をイントロンという。

造血幹細胞：血液細胞の元となる細胞のこと

microRNA：遺伝子の機能調節に関わる 20~25 塩基の微小 RNA

スプライス変異：イントロンが切断されて mRNA が成熟する過程において、イントロンの一部が挿入されたり、一部のエクソンが読み飛ばされたり（エクソンスキップ）することで一様でない mRNA が生じること

p210 および p190 BCR::ABL1：蛋白質の分子量の違いによる呼称

Western Blot 法：抗体を用いて蛋白質の発現量を評価することができる。親株と亜株で共通に発現する α -Tubulin の発現量をもとにして目的の蛋白質の発現量を比較している。

Fluorescence in situ hybridization (FISH)法：特定の遺伝子領域を蛍光標識する手法

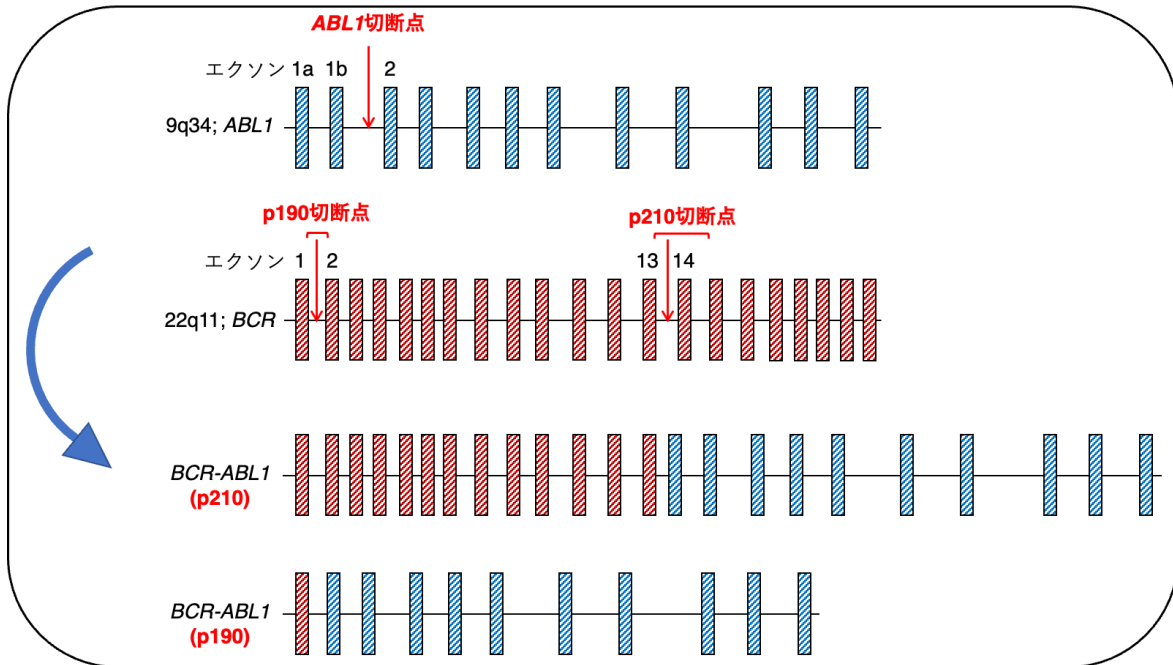


図 2. BCR:ABL1 の模式図(矢印は本研究における CRISPR/Cas9 の作用点)

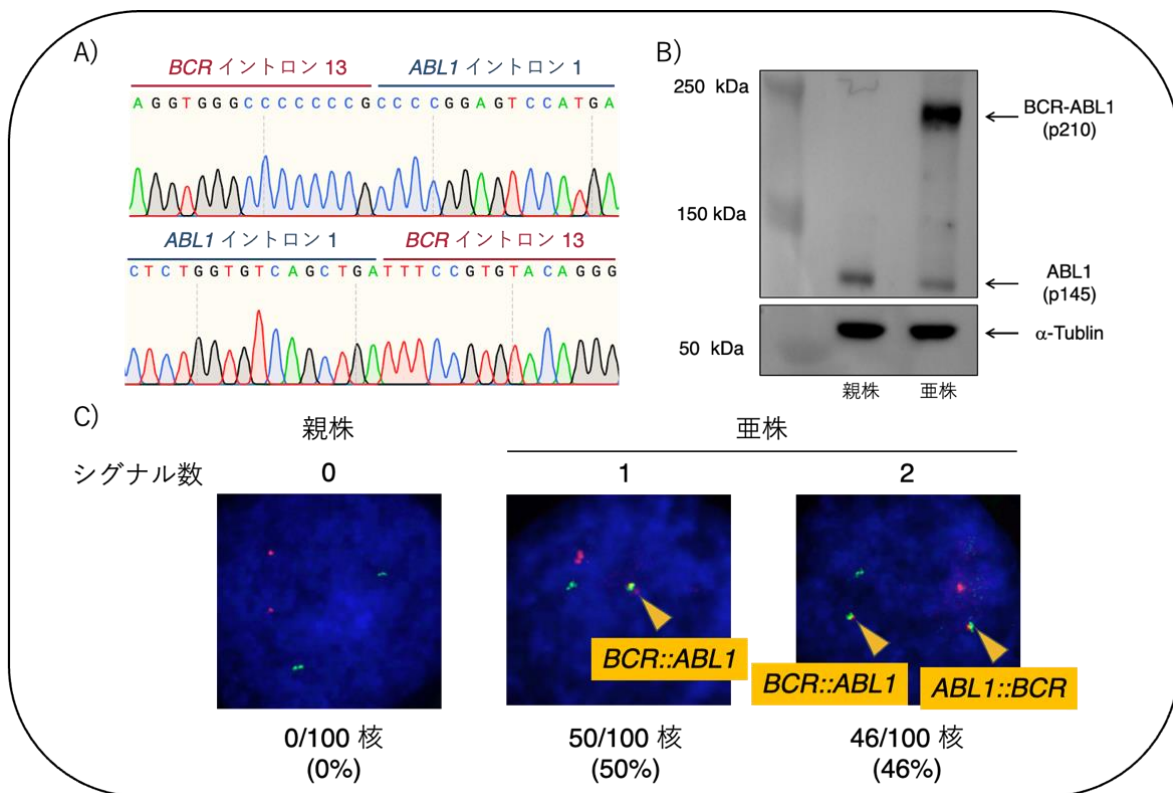


図 3. A)亜株における BCR::ABL1 および ABL1::BCR の結合部位の塩基配列 B)Western Blot 法による p210 BCR::ABL1 蛋白質の発現解析 C) Fluorescence in situ hybridization (FISH)法による BCR::ABL1 と ABL1::BCR の形成(赤：ABL1 遺伝子、緑：BCR 遺伝子)

謝辞

図 1 のイラストはイラストレーター・鈴木律子様(<https://ritsukomobo.wixsite.com/mannenhiyoko>)より頂きました。また本研究は JSPS 科研費 JP21K15528・JP19K08833・JP19H03615 の助成を受けたものです。

お問い合わせ先

➤ 研究に関する事

山梨大学医学部小児科学講座 臨床助教

玉井望雅(たまいみのり)

E-mail: tamaim@yamanashi.ac.jp

➤ 広報に関する事

山梨大学 企画部広報企画課

TEL: 055-220-8005,8006

E-mail: koho@yamanashi.ac.jp

北海道大学病院 総務課総務係

TEL: 011-706-7631

E-mail: pr_office@huhp.hokudai.ac.jp

広島大学 広報室

TEL: 082-424-3701

E-mail: koho@office.hiroshima-u.ac.jp

国立成育医療研究センター 広報企画室

TEL:03-3416-0181 (代表)

E-mail: koho@ncchd.go.jp