

平成31年 2月

## 平松敬 学位論文審査要旨

主 査 久 郷 裕 之  
副主査 難 波 栄 二  
同 久 留 一 郎

### 主論文

Generation of a novel isogenic trisomy panel in human embryonic stem cells via microcell-mediated chromosome transfer

(微小核細胞融合法を用いたヒト胚性幹細胞における同質遺伝的な新規トリソミー細胞パネルの樹立)

(著者：平松敬、阿部智志、香月加奈子、尾崎充彦、梶谷尚世、矢倉裕奈、押村光雄、香月康宏)

平成31年 Biochemical and Biophysical Research Communications 508巻 603頁～607頁

### 参考論文

1. CRISPR/Cas9-induced transgene insertion and telomere-associated truncation of a single human chromosome for chromosome engineering in CHO and A9 cells

(染色体工学に向けたCHOおよびA9細胞中の単一ヒト染色体上でのCRISPR/Cas9誘導型遺伝子挿入およびテロメア関連短縮化)

(著者：宇野愛海、平松敬、宇野勝洋、古本真也、香月康宏、押村光雄)

平成29年 Scientific Reports DOI:10.1038/s41598-017-10418-7

2. A novel and stable mouse artificial chromosome vector

(安定な新規マウス人工染色体ベクター)

(著者：滝口正人、香月康宏、平松敬、阿部智志、飯田雄一、嵩原昇子、西田直史、大林徹也、若山照彦、押村光雄)

平成26年 ACS Synthetic Biology 3巻 903頁～914頁

# 学位論文要旨

Generation of a novel isogenic trisomy panel in human embryonic stem cells via microcell-mediated chromosome transfer

(微小核細胞融合法を用いたヒト胚性幹細胞における同質遺伝的な新規トリソミー細胞パネルの樹立)

ヒトの染色体数は通常46本であるが、一定の頻度で異数性の個体が発生する。細胞分裂あるいは減数分裂の過程で、染色体数が1本増減してしまうことに起因するが、その発生機序は分かっていない。ヒトでは、21番トリソミー（ダウン症候群）、18番トリソミー（エドワーズ症候群）、13番トリソミー（パトー症候群）、8番トリソミーモザイクなどが挙げられ、各疾患メカニズムの解明、治療法の開発が望まれている。ダウン症については様々なモデルマウスが作製されているが、その他についてはモデルが存在せず、有用なモデルが必要とされていた。

近年、トリソミー患者から誘導多能性幹細胞（iPSCs）が樹立されており、疾患の原因遺伝子の探索が行われている。しかしながら、精神遅滞などのトリソミー症候群に共通する疾患機序を解明しようとした際に、患者由来のiPS細胞では遺伝的背景が異なるため、疾患の原因がトリソミーに起因することを証明することは困難である。また、iPS細胞では同一遺伝的背景を保持する各トリソミー細胞を樹立することも困難である。

そこで、微小核細胞融合法を用いて、1本の染色体を同系のヒト胚性幹細胞（hESCs）に移入し、同一遺伝的背景を保持したトリソミーモデル細胞を樹立することにより、これらの問題を解決することにした。

## 方法

鳥取大学大学院医学系研究科遺伝子機能工学研究室が保有する、ヒト染色体保持マウスA9細胞ライブラリーから、微小核細胞融合法のドナー細胞として、ヒト8番、13番、18番染色体を保持するクローンを選抜し、ヒトES細胞株に各染色体を移入した。各ヒト染色体上には薬剤G418の耐性遺伝子が搭載されているので、ヒトES細胞に移入した後は当該薬剤にて選抜し、クローンを取得した。

核型解析においては、微小管形成阻害剤コルセミドで細胞を処理し、カルノア溶液で固定して、スライドガラス上に溶液を展開した。初めにキナクリンヘキスト染色を実施し、次にマルチカラーFISHを実施し、詳細な核型解析を行った。

網羅的遺伝子発現解析では、各クローンのmRNAをキアゲン社製キットを用いて精製し、

3D-Gene Human Oligo chip 25k (東レ) でマイクロアレイ解析を行った。

テラトーマ形成試験では、各クローンをSCIDマウスの精巣に移植し、8週間後、精巣を摘出して20%ホルマリンで固定し、薄切し、ヘマトキシリンエオジン染色をして、解析を行った。

## 結 果

ヒト8番、13番、18番染色体を保持する各A9細胞を用いて微小核細胞融合を実施した結果、それぞれ20、2、5クローンの薬剤耐性ヒトES細胞を得た。そのうち12、2、5クローンについて核型解析を行ったところ、(47, XX, +8)、(47, XX, +13)、そして(47, XX, +18q-)の核型であるヒトES細胞が4、2、5クローン存在した。18番トリソミー細胞については、長腕に一部欠失を確認したが、8番、13番トリソミーについては、導入した染色体が完全長かつ独立に存在しており、全クローンにおいて宿主染色体に異常は見られなかった。

次に、マイクロアレイの結果より、作製した8番、13番、18番トリソミー細胞における8番、13番、18番染色体上の遺伝子は親株のヒトES細胞と比較して、全体的に発現量が増加していた。一方、得られたクローンにおける21番染色体上の遺伝子の発現量は、親株のヒトES細胞と比較して同等であった。

最後に、テラトーマを作製した結果、各クローンが三胚葉に分化していることを確認した。

## 考 察

本研究で作製した各トリソミーモデル細胞は、導入した染色体特異的な遺伝子発現上昇を示したことから、トリソミー細胞として機能していることが示唆された。

急性骨髄性白血病においては、8番トリソミーの核型が観察されるが、8番トリソミーが原因なのか、結果的に起こるのかは未だ不明である。本研究で樹立した8番トリソミーモデル細胞を用い、ゲノム編集技術を使って遺伝子変異を導入するなど、更なる応用研究が求められる。

鳥取大学大学院医学系研究科遺伝子機能工学研究室の報告では、異数体にしたマウスES細胞を神経に分化させると、アポトーシスが亢進したことから、異数性は神経発生に影響を及ぼし、精神遅滞、発育不全に繋がると推察される。今回作製したトリソミーモデル細胞を用いることで、患者由来のiPS細胞では不可能であった、各種トリソミーの共通性や差異性を比較することが可能となり、疾患の機序解明に向けた研究が進むことが期待される。

## 結 論

本研究で微小核細胞融合法を用いて作製した、同一遺伝的背景を持つヒトのトリソミーモデル細胞は、異数体の発生における神経発生不全や腫瘍発生のメカニズム解明に迫ることが可能なツールであり、生物医学分野における遺伝子の発現量による影響を研究していく上で貴重なツールになると考えられる。