

| | | |
|----|------------------------------|-------|
| 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

