

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04286

研究課題名(和文) iPS細胞とゲノム編集技術による先天性難治性疾患モデルの構築

研究課題名(英文) Establishment of hereditary disease models using iPS cells and genome editing

研究代表者

本多 新 (Honda, Arata)

京都大学・京都市・特定准教授

研究者番号：10373367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究計画はカニクイザルやヒトの多能性幹細胞やゲノム編集技術を用いて、多能性幹細胞の分化能を向上させたり、新しい疾患モデル動物を作出したりすることを目指している。最終的には、カニクイザルのナイーブ変換(ナイーブ様変換による体外分化誘導能力の向上)や、絶滅危惧種アマミトゲネズミのナイーブ型iPS細胞の樹立と、異種間キメラの作成、そして生殖細胞への分化までを成し遂げ誌上発表に至った。さらにゲノム編集に関する多数の誌上発表にも至った。本研究課題によって成し遂げられた科学的進展を、今後も橋渡し研究や絶滅危惧種由来iPS細胞の研究に反映させて発展させる。

研究成果の概要(英文)：This research project had been aimed for the establishment of hereditary disease models using iPS cells and genome editing using several animal species. We achieved naive-like conversion of cynomolgus monkey ES/iPS cells, which can enhance their in vitro differentiation potential. Moreover, following mice and rats, the 3rd true naive-iPS cells were successfully established from an endangered species, Tokudaia osimensis. We produced interspecific chimera and elucidated the sexual plasticity of the germ cells of the endangered species.

研究分野：Experimental Animals

キーワード：Experimental Animals ES cells iPS cells naive germ cells chimera

1. 研究開始当初の背景

先天性難治性疾患は「患者数の少なさ」が問題である。その解決策として人工多能性幹 (iPS) 細胞が期待されている。iPS 細胞は、患者本人から樹立できるため、iPS 細胞から疾病の原因細胞を分化誘導すれば、患者自身の病態を体外で再現できる。iPS 細胞はげっ歯類から樹立されるナイーブ型と、ヒトを含むそれ以外の動物種から樹立されるプライム型に分けられる。ナイーブ型はキメラ形成能や生殖細胞への分化能を有している点で、プライム型幹細胞より分化能において圧倒的に優れている。我々はウサギを用いた胚性幹細胞研究(Honda et. al., 2008, 2009) を通じて、ウサギはヒトと同様にプライム型多能性幹細胞を樹立でき、(繁殖力、動物倫理、価格などの面において) 実験動物として優れているため、ヒト iPS 細胞と動物個体を用いた橋渡し研究を行う上で便益であることを明らかにしてきた。また、ウサギ iPS 細胞にはヒト iPS 細胞と同様の不完全性があること (Honda et al. 2010) や、分化能力の乏しいプライム型 ES/iPS 細胞をナイーブ様型に変換し、その分化能力を著しく改善させる方法などを見いだしてきた (Honda et al. 2013, Honsho, et al. 2014)。現在、世界中で「真のナイーブ型ヒト iPS 細胞」を樹立する研究が行われているが成功した例はない。ヒトではキメラ形成能や生殖細胞への分化能解析が困難であることが一因である。そこで我々はウサギで真のナイーブ型 iPS 細胞を開発し、その技術をヒト iPS 細胞に適用して、分化誘導が困難な疾患原因細胞へと分化誘導し、その病態を *in vitro* で再現するような技術開発に繋げる。

他方、「患者数の少なさ」を克服する上で効果的なのが、ヒト疾患モデル動物の作製である。近年、ゲノム編集技術が発達し、これまで困難とされてきたマウス以外の哺乳動物種における遺伝子破壊の道が開けた。我々は

ウサギでげっ歯類以外の哺乳動物におけるゲノム編集成功例として、国内では初の論文発表に至った (Honda et al. 2014)。ウサギやサルでヒトと同じような難治性疾患モデルが「細胞」と「個体」で作製できれば、他の疾患も含めた治療法の開発に向けて大きな前進となる。

2. 研究の目的

iPS 細胞を用いた *in vitro* での先天性難治性疾患病態モデルの構築

ウサギの iPS 細胞で、体外分化誘導能やキメラ形成能を指標にした質的改善と品質評価を行い、より目的細胞への分化能力に優れたヒト iPS 細胞作製に適用し、細胞レベルで病態を再現する。

ゲノム編集を用いた *in vivo* での難治性疾患克服モデルの構築

我々はすでに、CRISPR/Cas9 によりウサギで生殖細胞への伝搬も含めた遺伝子破壊個体の作製に成功した。その技術を基盤として、PMD モデルウサギ・サルを作出する。

3. 研究の方法

本研究は iPS 細胞とゲノム編集 (CRISPR/Cas9 による遺伝子破壊) の双方向から、先天性難治性疾患の実験動物モデルを構築し、その病態再現を細胞・個体レベルで行うのが目的である。

プライム型ウサギ iPS 細胞を真のナイーブ型に変換する方法を開発する。その後サルおよびヒトの iPS 細胞に適用する。神経系細胞や褐色脂肪細胞へ体外化誘導し、分化誘導率や移植後の安全性を調べる。

CRISPR/Cas9 システムを活用して、ウサギ・サルで一塩基置換技術や薬剤誘導型時期特異的な遺伝子破壊技術を開発する。

PMD 由来 iPS 細胞にナイーブ化を施して分化誘導が困難な病態原因細胞に変化さ

せ観察する。

PMD の原因遺伝子 PLP1 をウサギやサルで破壊して、PMD の動物モデルを作製する。

4 . 研究成果

本研究計画はカニクイザルやヒトの多能性幹細胞やゲノム編集技術を用いて、多能性幹細胞の分化能を向上させたり、新しい疾患モデル動物を作出したりすることを目指している。最終的には、カニクイザルのナイーブ変換(ナイーブ様変換による体外分化誘導能力の向上)や、絶滅危惧種アマミトゲネズミのナイーブ型 iPS 細胞の樹立と、異種間キメラの作成、そして生殖細胞への分化までを成し遂げ誌上発表に至った。さらにゲノム編集に関する多数の誌上発表にも至った。本研究課題によって成し遂げられた科学的進展を、今後も橋渡し研究や絶滅危惧種由来 iPS 細胞の研究に反映させて発展させる。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 17 件)

1. Arata Honda . Applying iPSCs for preserving endangered species and elucidating the evolution of mammalian sex determination. *BioEssays (in press)*
2. M. Afanassieff, Arata. Honda, E. Gocza, D. Bosnakovski, and P. Savatier. Pluripotent stem cells in rabbit. *Rabbit Genetics*, (CAB eBooks)(book chapter)(in press)
3. Koji Yamamoto, Makiko Kawaguchi, Takeshi Shimomura, Aya Izumi, Kazuomi Konari, Arata Honda, Chen-Yong Lin, Michael D. Johnson, Yoshihiro Yamashita, Tsuyoshi Fukushima and Hiroaki Kataoka. Hepatocyte growth factor activator inhibitor type-2 (HAI-2)/SPINT2 contributes to invasive growth of oral squamous cell carcinoma cells. *Oncotarget* (2018) in press
4. Mitsuyoshi Tanishima, Shigeo Takashima,

Arata Honda, Daisuke Yasuda, Takashi

Tanikawa, Satoshi Ishii, Takashi MaruYama.

Identification of Optineurin as an Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1-Binding Protein and its Role in Regulation of MyD88-Dependent Signaling. *J. Biol. Chem.* (2017) 292: 17250-17257.

5. Arata Honda and Atuo Ogura. Rabbit Models for Biomedical Research Revisited via Genome Editing Approaches . *Journal of Reproduction and Development*. **63**: 435-438.
6. Yasuhiro Kawano and Arata Honda. Gene targeting in rabbits: single-step generation of knockout rabbits by microinjection of CRISPR/Cas9 plasmids. *Genome Editing in Animals: Methods in Molecular Biology*. 1630:109-120, 2017 (book chapter)
7. Yuki Hatanaka, Takeshi Tsusaka, Natsumi Shimizu, Kohtaro Morita, Takehiro Suzuki, Shinichi Machida, Manabu Satoh, Arata Honda, Michiko Hirose, Satoshi Kamimura, Narumi Ogonuki, Toshinobu Nakamura, Kimiko Inoue, Yoshihiko Hosoi, Naoshi Dohmae, Toru Nakano, Hitoshi Kurumizaka, Kazuya Matsumoto, Yoichi Shinkai, Atsuo Ogura. Histone H3 methylated at arginine 17 is essential for reprogramming of the paternal genome in zygotes. *Cell Reports* (2017) 20: 2756-2765.
8. Arata Honda, Narantsog Choijookhuu, Haruna Izu, Yoshihiro Kawano, Mizuho Inokuchi, Kimiko Honsho, Ah-Reum Lee, Hiroki Nabekura, Hiroshi Ohta, Tomoyuki Tsukiyama, Yasuhide Ohinata, Asato Kuroiwa, Yoshitaka Hishikawa, Mitunori Saitou, Takamichi Jogahara, and Chihiro Koshimoto. Flexible adaptation of male germ cells from female iPSCs of endangered *Tokudaia*

- osimensis*. *Science Advances* (2017) 3: e1602179
9. Kimiko Inoue, Michiko Hirose, Hiroki Inoue, Yuki Hatanaka, **Arata Honda**, Ayumi Hasegawa, Keiji Mochida, Atsuo Ogura. The rodent-specific microRNA cluster within the *Sfmbt2* gene is imprinted and essential for placental development. *Cell Reports* (2017)19(5):pp949-956
 10. **Arata Honda**, Yoshihiro Kawano, Haruna Izu, Narantsog Choijookhuu, Kimiko Honsho, Tomonori Nakamura, Yukihiro Yabuta, Yasuhiro Takashima, Takuya Yamamoto, Michiko Hirose, Tadashi Sankai, Yoshitaka Hishikawa, Atsuo Ogura, and Mitinori Saitou. Discrimination of Stem Cell Status after Subjecting Cynomolgus Monkey Pluripotent Stem Cells to Naïve Conversion. *Scientific Reports* (2017)7, 45285
 11. Michiko Hirose, Ayumi Hasegawa, Keiji Mochida, Shogo Matoba, Yuki Hatanaka, Kimiko Inoue, Tatsuhiko Goto, Hideki Kaneda, Ikuko Yamada, Tamio Furuse, Kuniya Abe, Yoshihisa Uenoyama, Hiroko Tsukamura, Shigeharu Wakana, **Arata Honda**, and Atsuo Ogura. CRISPR/Cas9-mediated genome editing in wild-derived mice: generation of tamed wild-derived strains by mutation of the *a* (nonagouti) gene. *Scientific Reports* (2017) 7, 42476
 12. Kotaro Shide, Takuro Kameda, Takumi Yamaji, Masaaki Sekine, Naoki Inada, Ayako Kamiunten, Keiichi Akizuki, Kenichi Nakamura, Tomonori Hidaka, Yoko Kubuki, Haruko Shimoda, Akira Kitanaka, **Arata Honda**, Akira Sawaguchi, Hiroo Abe, Tadashi Miike, Hisayoshi Iwakiri, Yoshihiro Tahara, Mitsue Sueta, Satoru Hasuike, Shojiro Yamamoto, Kenji Nagata, and Kazuya Shimoda. Calreticulin mutant mice develop essential thrombocythemia that is ameliorated by the JAK inhibitor ruxolitinib. *Leukemia* (2017) 31, 1136–1144
 13. Tomokazu Fukuda, Tetsuya Tani, Seiki Haraguchi, Keichiro Donai, Nobuyoshi Nakajima, Hirohide Uenishi, Takahiro Eitsuka, Makoto Miyagawa, Sanghoun Song, Mananu Onuma, Yumi Hoshino, Eimei Sato, and **Arata Honda**. Expression of Six Proteins Causes Reprogramming of Porcine Fibroblasts Into Induced Pluripotent Stem Cells with Both Active X Chromosomes. *J. Cell. Biochem.* (2016) 118 (3):pp537-553
 14. Kaori Motomura, Mami Oikawa, Michiko Hirose, **Arata Honda**, Sumie Togayachi, Hiroyuki Miyoshi, Yasuhide Ohinata, Michihiko Sugimoto, Kuniya Abe, Kimiko Inoue, and Atsuo Ogura. Cellular Dynamics of Mouse Trophoblast Stem Cells: Identification of a Persistent Stem Cell Type. *Biol. Reprod.* (2016) 94 (6):122, pp1-14
 15. Hisae Kadowaki, Atsushi Nagai, Takeshi Maruyama, Yasunari Takami, Pasjan Satrima Fitrah, Hironori Kato, **Arata Honda**, Tomohisa Hatta, Tohru Natsume, Takashi Sato, Hirofumi Kai, Hidenori Ichijo, and Hideki Nishitoh. Preemptive Quality Control Protects the ER from Protein Overload via the Proximity of ERAD Components and SRP. *Cell Reports* (2015)13(5):pp944-956
 16. Kimiko Honsho, Michiko Hirose, Masanori Hatori, Lubna Yasmin, Haruna Izu, Shogo Matoba, Sumie Togayachi, Hiroyuki Miyoshi, Tadashi Sankai, Atsuo Ogura, **Arata Honda**. Naïve-like conversion enhances the difference in innate in vitro differentiation capacity between rabbit ES cells and iPS cells. *J. Reprod. Dev.* (2015)61:pp 13-19
 17. **Arata Honda**, Michiko Hirose, Lubna

Yasmin, Kazuaki Yuzawa, Kimiko Honsho, Haruna Izu, Atsushi Iguchi, Masahito Ikawa, and Atsuo Ogura. Single-step generation of rabbits carrying a targeted allele of Tyrosinase gene using CRISPR/Cas9. **Experimental Animals** (2015)64:pp 31-37

〔学会発表〕(計 12 件)

1. **本多 新**、絶滅危惧種の特徴を iPS 細胞と発生工学で解き明かす、関西実験動物研究会、京都府、2018 年 3 月 2 日(講演依頼)
2. **本多 新**、メスの細胞から精子 | 性染色体 XO 型の絶滅危惧種アマミトゲネズミ細胞の性的柔軟性、ConBio2017、2017 年 12 月 6 日、兵庫県 (ConBio2017 ワークショップでの講演)
3. **Arata Honda**, Narantsog Chojookhuu, Haruna Izu, Yoshihiro Kawano, Yoshitaka Hishikawa, Takamichi Jogahara, Chihiro Koshimoto. Germ Cells from Induced Pluripotent Stem Cells of an Endangered Species, *Tokudaia Osimensis*, Fourth World Congress of Reproductive Biology 2017、2017 年 9 月 28 日、沖縄県
4. **本多 新**、iPS 細胞と医療を繋ぐ、日本看護遺伝学会第 16 回学術大会、市民公開講座、2017 年 9 月 23 日、宮崎県 (日本看護遺伝学会での講演 : 市民公開講座)
5. **本多 新**、多能性幹細胞で挑む再生医療への展開、医療と福祉の講演会、2016 年 11 月 19 日、宮崎県 (宮崎県難病団体連絡協議会での医療講演)
6. **本多 新**、発生工学を利用した多能性幹細胞の質の評価、2016 年 5 月 20 日、第 63 回日本実験動物学会総会、神奈川県 (シンポジウムでの講演)
7. **本多 新**、ゲノム編集による新たな哺乳類モデルの樹立、第 4 回実験動物科学シンポジウム 「新たな疾患モデル動物が切り開

く橋渡し研究」、2015 年 12 月 11 日、岡山県 (シンポジウムでの講演)

8. **本多 新**、複数種の実験動物で挑む橋渡し研究の展開、第 11 回霊長類医学科学フォーラム「先端医科学研究の現状」、2015 年 12 月 4 日、茨城県 (シンポジウムでの講演)
9. **本多 新**、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集の基礎から応用、筑波実験動物研究会、第 23 回総会、第 49 回講演会、2015 年 6 月 12 日、茨城県 (シンポジウムでの講演)
10. **本多 新**、CRISPR/Cas9 による遺伝子破壊ウサギの作製とその展開、第 62 回日本実験動物学会総会、2015 年 5 月 28 日、京都府、(学会での講演)
11. **本多 新**、iPS 細胞の基礎とその応用、第 62 回日本実験動物学会総会、2015 年 5 月 28 日、京都府、(学会での講演)
12. **本多 新**、「iPS 細胞・ゲノム編集・実験動物」で挑む臨床応用への効果的な橋渡し、第 118 回日本小児科学会学術集会、2015 年 4 月 17 日、大阪府、(学会での講演)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.cc.miyazaki-u.ac.jp/maruhon/index.html>
<http://www.anim.med.kyoto-u.ac.jp/resea>

<rch/seika.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本多 新 (HONDA Arata)
京都大学大学院医学研究科・附属動物実験
施設・特定准教授
研究者番号：10373367

(2) 研究分担者

山海 直 (SANKAI Tadashi)
独立行政法人医薬基盤・栄養・健康研究
所・霊長類医科学研究センター・主任研究員
研究者番号：80300937

下島 圭子 (SHIMOJIMA Keiko)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：30578935

(3) 連携研究者

小倉 淳郎 (OGURA Atsuo)
独立行政法人理化学研究所・バイオリソー
ス研究センター・室長
研究者番号：20194524

松田 修 (MATSUDA Osamu)
京都府立医科大学・医学系研究科・教授
研究者番号：00271164

(4) 研究協力者

()