

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07687

研究課題名(和文) マウス半数体ES細胞の簡便な継代培養法の開発

研究課題名(英文) Establishment of simple culture system for haploid embryonic stem cells

研究代表者

堀居 拓郎 (Horii, Takuro)

群馬大学・生体調節研究所・准教授

研究者番号：00361387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：半数体細胞はゲノムが1セットしかないため、遺伝子破壊による機能解析を容易に行うことができる。近年では、半数体ES細胞はマウスやラット、サルなど様々な動物種で樹立されており、哺乳類のゲノム解析を単純化することに貢献するものと考えられる。一方、半数体ES細胞は培養中に自発的に2倍体化してしまうため、定期的に半数体のみを取り出す作業が必要である。本研究費の支援を受けて、我々は標準レーザーを搭載したFACSで実施可能な簡便な半数体細胞の抽出と培養法を開発した。

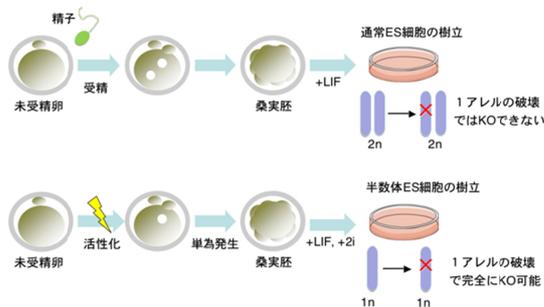
研究成果の概要(英文)：Haploid cells are useful for studying gene functions because disruption of a single allele can cause loss-of-function phenotypes. Recent success in generating haploid embryonic stem cells (ESCs) in mice, rats, and monkeys provides a new platform for simple genetic manipulation of the mammalian genome. Haploid ESCs tend to diploidize spontaneously due to endoreduplication or missed cytokinesis. It is therefore necessary to purify cells with haploid G1 DNA content at certain intervals. Supported by KAKENHI, we developed a novel haploid purification system that used a scatter plot generated by FACS analysis with a standard 488 nm laser.

研究分野：発生工学

キーワード：半数体 ES細胞 FACS

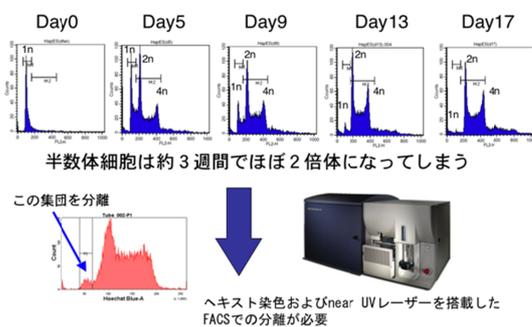
1. 研究開始当初の背景

ゲノムセットを1つしかもたない半数体 ES 細胞株は、1 アレルを破壊するだけで完全に遺伝子機能を破壊できる。また、最近開発されたバクテリアの免疫系を利用した CRISPR/Cas 法は効率良く標的箇所に二本鎖切断および非相同末端結合を引き起こすことにより、遺伝子機能を破壊することができる。最近、我々は半数体 ES 細胞と CRISPR/Cas 法を組み合わせることで、効率的に遺伝子機能を破壊する方法を発表した (Horii et al., PeerJ, 2013)。しかし、半数体 ES 細胞は継代中に徐々に2倍体化してしまう。そのため、半数体 ES 細胞の継代維持には特殊なレーザー (near UV) を搭載した FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) による煩雑な分離作業が定期的に必須であり、まだまだ手技を簡素化、効率化する余地が残っている。一方、マウス以外にもラットやサルでも半数体 ES 細胞が樹立されてきており (Li et al., Cell Stem Cell, 2013; Yang et al., Cell Res, 2013) 半数体 ES 細胞を用いた遺伝子の機能解析はヒトを含めた様々な動物種に利用できると考えられる。



2. 研究の目的

半数体 ES 細胞を継代培養するとおよそ3週間で全て2倍体化してしまうことから、継続的な半数体 ES 細胞の培養には、定期的にセルソーター (FACS) を用いた煩雑な分離作業が必須である。



本研究では、簡便な半数体 ES 細胞の分離法

を開発するとともに、半数体が2倍体化してしまうメカニズムを解明し、半数体として長く継代できる細胞株を樹立するシステムの開発を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、まずどこの研究室でも簡単に半数体細胞を分離できる方法を確立する。これまでの予備実験により G1 期の半数体 ES 細胞は、2倍体 ES 細胞より小さいことが分かっている (直径 10 μm vs 16 μm)。小さい細胞を分離する最も簡単な方法として、ナイロンメッシュなど細かい網目に細胞を通過させて分離する方法が考えられる。また、どの FACS でも FSC (前方散乱 = Forward Scatter、細胞の大きさと相関) と SSC (側方散乱 = Side Scatter、細胞の密度と相関) で細胞集団を分離する機能が備わっているため、このパラメーターを用いればどこの研究機関の FACS でも半数体細胞の分離を行うことができるかもしれない。

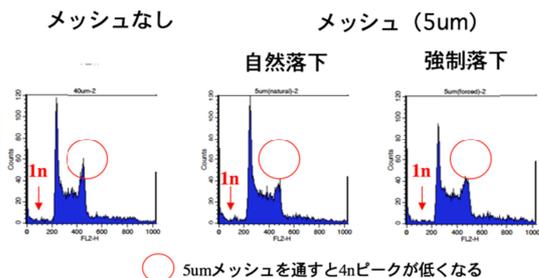
また、そもそも半数体細胞が2倍体にならないようにすれば定期的な分離操作をする必要がなくなる。そのために半数体細胞が2倍体になってしまうメカニズムを明らかにする。4倍体細胞では p53 依存的な倍数性のチェックポイントがあるとされている。正確には倍数性のチェックポイントではなく、細胞に対して相対的にゲノムの量が多くなると、それがストレスとなって p53 依存的な細胞周期の停止や細胞死を起こす (Andreassen et al., Mol Biol Cell, 2001; Fujiwara et al., Nature, 2005)。しかし、半数体細胞にそのようなチェックポイントがあるのかどうかは不明である。我々は、ゲノムが通常の半分になることでもストレスとなり p53 依存的なチェックポイントが働くと考えている。そこで、p53 を欠損した半数体 ES 細胞や p53 阻害剤を用いて半数体 ES 細胞を培養することにより、半数体が維持されるのか確認する実験を行う。これらの因子を KO もしくは阻害することにより継代中の半数体細胞の比率がどのように変化するのか調べる。このメカニズムを解明することにより、恒常的に半数体を維持できる細胞株を得ることができる。

4. 研究成果

精密ナイロンメッシュを用いた半数体細胞の分離

通常の2倍体 ES 細胞の直径が 16 μm 程度に

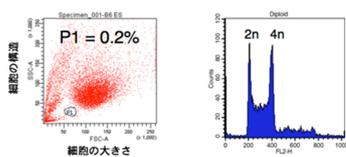
対し、半数体 ES 細胞は 10 μ m 程度しかない。よって、半数体細胞のみ通過できるナイロンメッシュに細胞を通過させると、直径の小さい半数体細胞のみ分離できないか検討した。このナイロンメッシュは規格品では、5、10、15 μ m のものが市販されているので、これら 3 種類を試した。結果、5 μ m のメッシュを使用することで最も大きな直径の G2/M 期の 2 倍体細胞 (4n) をある程度除去することができたものの、半数体細胞のみを濃縮することはできなかった (下図)。



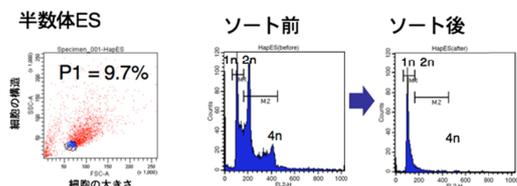
FSC と SSC による半数体細胞の分離

市販の FACS はどの機器でも FSC (前方散乱=Forward Scatter) と SSC (側方散乱=Side Scatter) を保有している。FSC は細胞の大きさに相関があり、SSC は細胞内構造と相関があるため、この 2 つのパラメーターを指標に半数体細胞を分離することを試みた。半数体細胞の集団を FSC/SSC で展開した場合、最も左下にある小さな細胞集団 (P1) は、2 倍体の細胞集団では見られなかった。P1 集団をソートし、固定~PI 染色の後、FACS にて半数体細胞の純度を調べたところ、約 91% の高純度で G1 期の半数体細胞を濃縮できていることが判明した (下図)。

2 倍体 ES



半数体 ES

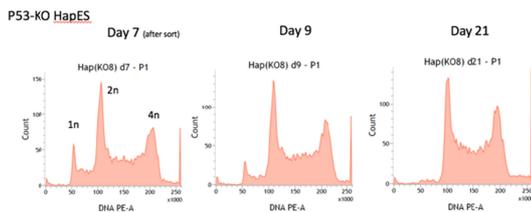


従来法では、細胞をヘキストで染色し、特殊なレーザー (near UV) を搭載した FACS でしか半数体細胞を分離することはできなかったが、本方法により市販のどの FACS でも半数体細胞を分離できる方法が確立で

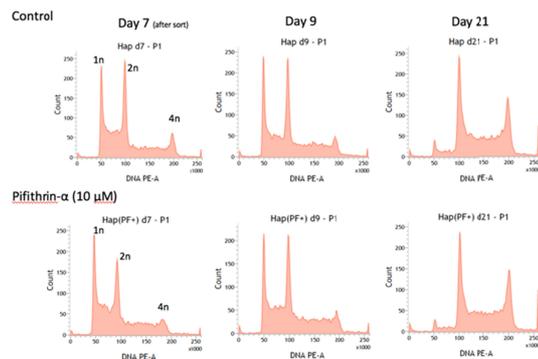
きた。

阻害剤による 2 倍体化抑制法の開発

4 倍体細胞に存在する p53 依存的な倍数性のチェックポイントが、半数体にも存在すると考え、p53-KO 半数体 ES 細胞の樹立を行なった。半数体の G1 期集団をソート後、3 週間培養を行い、半数体の割合を検定した。その結果、野生型ではほぼ全ての細胞が 2 倍体化していたが、p53-KO 細胞でも同様に 2 倍体化していた (下図)。



p53 を破壊すると何らかの補正が働いている可能性もあるため、野生型細胞に p53 転写阻害剤 (Pifithrin-、10 μ M) を添加して、同様の実験を行なった。その結果、p53 阻害剤添加区は非添加区と同様、3 週間ではほぼ 2 倍体化していた (下図)。これらのことから、半数体の 2 倍体化には p53 は関与していないことが示唆された。



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 6 件)

- 1) Horii T, Morita S, Kimura M, Terawaki N, Shibutani M, Hatada I. Efficient generation of conditional knockout mice via sequential introduction of lox sites. *Sci Rep*. 2017 Aug 11;7(1):7891. 査読有 doi: 10.1038/s41598-017-08496-8.
- 2) Morita S, Noguchi H, Horii T, Nakabayashi K, Kimura M, Okamura K, Sakai A, Nakashima H, Hata K, Nakashima K, Hatada I. Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions. *Nat*

- Biotechnol.* 2016 Oct;34(10):1060-1065. 査読有 doi: 10.1038/nbt.3658.
- 3) Hasei J, Teramura T, Takehara T, Onodera Y, **Horii T**, Olmer M, **Hatada I**, Fukuda K, Ozaki T, Lotz MK, Asahara H. TWIST1 induces MMP3 expression through up-regulating DNA hydroxymethylation and promotes catabolic responses in human chondrocytes. *Sci Rep.* 2017 Feb 21;7:42990. 査読有 doi: 10.1038/srep42990.
- 4) Morita S, Nakabayashi K, Kawai T, Hayashi K, **Horii T**, Kimura M, Kamei Y, Ogawa Y, Hata K, **Hatada I**. Gene expression profiling of white adipose tissue reveals paternal transmission of proneness to obesity. *Sci Rep.* 2016 Feb 12;6:21693. 査読有 doi: 10.1038/srep21693.
- 5) Kafer GR, Li X, **Horii T**, Suetake I, Tajima S, **Hatada I**, Carlton PM. 5-Hydroxymethylcytosine Marks Sites of DNA Damage and Promotes Genome Stability. *Cell Rep.* 2016 Feb 16;14(6):1283-92. 査読有 doi: 10.1016/j.celrep.2016.01.035.
- 6) **Horii T**, **Hatada I**. Genome Editing Using Mammalian Haploid Cells. *Int J Mol Sci.* 2015 Oct 1;16(10):23604-14. 査読有 doi: 10.3390/ijms161023604.

〔学会発表〕(計 14 件)

- 1) **Takuro Horii** “Targeted manipulation of epigenome using CRISPR/Cas9” 4th World Congress of Reproductive Biology (WCRB2017), Okinawa Convention Center (Okinawa), Sep 2017 (招待講演)
- 2) **Horii T**, Yamamoto M, Morita S, Kimura M, Nagao Y, **Hatada I** ”p53 Suppresses Tetraploid Development in Mice”, 3rd International Symposium on Cell Competition, Sapporo, Aug 2017
- 3) **堀居拓郎**「特別講演：CRISPR/Cas によるゲノム編集技術の基礎と応用」第 42 回組織細胞化学講習会、前橋市民文化会館(前橋) 2017 年 8 月(招待講演)
- 4) **堀居拓郎**「CRISPR/Cas9 の応用技術 ～ゲノム編集からエピゲノム編集まで～」TARA セミナー、筑波大学(つくば) 2017 年 6 月(招待講演)
- 5) **堀居拓郎**、森田純代、木村美香、寺脇直美、**畑田出穂**「Cas9 タンパクおよび電気穿孔法を用いた flox マウスの作製」第 39 回日本分子生物学会年会、横浜、2016 年 12 月(優秀ポスター賞受賞)
- 6) **堀居拓郎**「多能性幹細胞およびマウス個体におけるゲノム編集」第 10 回家畜 DNA 西郷シンポジウム、家畜改良センター(福島県白河) 2016 年 9 月(招待講演)

- 7) **堀居拓郎**、森田純代、木村美香、寺脇直美、木村博信、末武勲、田嶋正二、安部由美子、**畑田出穂**「Tet タンパクは転写因子 Nr2f2 のプロモーターを脱メチル化することにより ES 細胞の多能性を維持する」第 109 回日本繁殖生物学会年会、相模原、2016 年 9 月
- 8) **堀居拓郎**、森田純代、木村美香、寺脇直美、**畑田出穂**「Cas9 タンパクおよびエレクトロポレーション法を用いたコンディショナルノックアウトマウスの作製」第 1 回日本ゲノム編集学会、広島、2016 年 9 月
- 9) **堀居拓郎**、森田純代、木村美香、寺脇直美、木村博信、末武勲、田嶋正二、安部由美子、**畑田出穂**「ES 細胞の多能性には Tet による Nr2f2 プロモーター領域の脱メチル化が必要である」第 10 回日本エピジェネティクス研究会年会、大阪、2016 年 5 月
- 10) **堀居拓郎**「CRISPR/Cas の多能性幹細胞およびマウス個体への利用」放射性医学総合研究所、2016 年 2 月(招待講演)
- 11) **Takuro Horii** “Genome Editing in ES/iPS Cells and Animal by CRISPR/Cas” The 3rd International Symposium of Gunma University Program fo Local Area Open Innovation R&D Human Resources, Feb 2016 (招待講演)
- 12) **堀居拓郎**、森田純代、木村美香、小林遼平、田村大樹、木村博信、末武勲、田嶋正二、安部由美子、**畑田出穂**「Tet 遺伝子シングル、ダブルおよびトリプルノックアウト ES 細胞株の特性」第 38 回日本分子生物学会年会、神戸、2015 年 12 月
- 13) **堀居拓郎**「ゲノム編集技術 CRISPR/Cas が生命科学を加速する」第 2 回群馬大学未来先端研究機構シンポジウム、前橋、2015 年 11 月(招待講演)
- 14) **堀居拓郎**、山本正道、森田純代、木村美香、長尾恭光、**畑田出穂**「p53 発現制御による 4 倍体マウスの作製」第 108 回日本繁殖生物学会年会、宮崎、2015 年 9 月

〔図書〕(計 1 件)

- 1) **Horii T**, **Hatada I**. Genome Editing Using Haploid Embryonic Stem Cells. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 2017;152:84-94.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

なし

取得状況(計 0 件)

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://epigenome.dept.showa.gunma-u.ac.jp/~hatada/>

6．研究組織

(1)研究代表者

堀居拓郎 (HORII, Takuro)
群馬大学・生体調節研究所・准教授
研究者番号：00361387

(2)研究分担者

畑田出穂 (HATADA, Izuho)
群馬大学・生体調節研究所・教授
研究者番号：50212147

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし