

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14865

研究課題名(和文)次世代ゲノム編集システムCRISPR/Cas9を用いた犬iPS細胞の作製

研究課題名(英文)Establishment of canine induced pluripotent cells using the CRISPR/Cas9 system

研究代表者

西村 亮平(Nishimura, Ryohei)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：80172708

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：先行研究に基づき、犬iPS様細胞の作製を試みたが、樹立が困難であったため、初期化を行う対象の細胞の幹細胞能について再検討した。使用した細胞は新たな犬骨髄間葉系幹細胞のBM-PACsであるが、BM-PACsは従来の骨髄間葉系幹細胞であるBMMSCsと比較し、老化を伴わない、より未分化な細胞であった。また、レトロウイルスを用いた遺伝子導入を目的に、BM-PACsの増殖能を促進させる因子を検討したところ、bFGFはBM-PACsの増殖能を有意に上昇させるとともに、未分化性も上昇させた。以上から、bFGF処理を行ったBM-PACsを用い、より効率的な初期化が行えることが期待できた。

研究成果の概要(英文)：Since it was difficult to generate canine iPS-like cells according to previous studies, we re-examined the stemness of the cells which we used for inducing the initializing factors. The cells used in this study were BM-PACs, which we established as novel mesenchymal stem cells, were more immature with less senescence than conventional canine bone marrow mesenchymal stem cells. In addition, we explored the promoting factor for proliferation ability of BM-PACs for inducing the initializing factors with retrovirus. We found that bFGF promoted the proliferation ability of BM-PAC with enhancing the immaturity. These results suggested that BM-PACs treated with bFGF are expected to be available for efficient induction of initializing factors to generate canine iPS-like cells.

研究分野：再生医療

キーワード：犬 iPS細胞 骨髄間葉系幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

申請者らはこれまで、再生医療への応用を目的に犬の間葉系幹細胞 (MSCs) の性状解析を重ねてきた。その結果、MSCs は増殖能が高く、SOX2 や Oct4 を発現する未分化な細胞であることが明らかになったが、神経細胞分化能は限定的で、多分化能の限界も明らかとなり (Chung CS, et al. J Vet Med Sci. 2013)、より高い多能性が期待される犬 iPS 細胞の利用が望まれた。

犬 iPS 細胞は中村らが最初に報告して以降 (Shimada H, et al. Mol Reprod Dev. 2010)、他の研究者らによって様々報告されているが、いずれも初期化因子 (Oct4, SOX2, Klf4, c-Myc) をウイルスベクターで導入し、胎仔線維芽細胞の初期化を行っている。しかし、導入効率が極めて悪く、恒常的な利用は困難であり、犬 iPS 細胞を利用した研究の伸展が妨げられている。

一方、2013年に次世代型のゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 が開発された。CRISPR/Cas9 は標的ゲノム領域での自由なノックアウトやノックインが可能であることに加え、これまでのゲノム編集技術と比較し、極めて簡便で、高い導入効率が期待できる。

### 2. 研究の目的

以上から、CRISPR/Cas9 を用いて初期化因子を導入するシステムを構築できれば、効率的な犬 iPS 細胞の作製が可能となり、犬 iPS 細胞を用いた研究を発展させられるという着想に至った。そこで、本研究では犬胎仔線維細胞への初期化因子導入が可能で CRISPR/Cas9 システムを構築し、犬 iPS 細胞が作製可能かを検証することとした。また、犬 MSC は成体由来であるが、未分化性が高く、初期化の誘導に適していると期待できるが、成体由来細胞から iPS 作製が可能であれば、疾患治療研究や再生医療研究の強力なツールとなりえるため、犬胎仔線維細胞と合わせて犬 MSC でも CRISPR/Cas9 を用いた iPS 細胞作製を試みることにした。中村らが報告した方法で犬 iPS 細胞を作製し、初期化因子の挿入部位の同定により、CRISPR/Cas9 の標的配列を明らかにする。同定された配列を標的とし、CRISPR/Cas9 を用いて犬胎仔線維芽細胞に初期化因子を導入し、犬 iPS 細胞を作製可能であることを明らかにする。また、申請者らは独自に新規の犬 MSC である犬骨髓脂肪細胞周囲細胞 (Bone Marrow Peri-adipocyte Cells; BM-PACs) を樹立している。BM-PACs は従来の犬間葉系幹細胞 (BMMSCs) と比較し、幹細胞特性に優れ、増殖能が高い。したがって、BM-PACs を用いることにより、効率的に初期化因子を導入できることが期待できたため、本研究では、犬 BM-PACs に対し CRISPR/Cas9 を用いて初期化因子を導入し、犬 iPS 細胞を作製可能であることを検討する。

### 3. 研究の方法

中村らの報告 (Shimada H. et al. Mol Reprod Dev. 2010) を参考に、pMX-IRES-GFP (右図) とレトロウイルスを用いて犬胎仔線維芽細胞に Oct4-Sox2-Klf4-cMyc (OSKM) を導入する。胚葉体の形成がみられた場合は、安定性の高い iPS 細胞の選出を目的とし、3 継代以上胚葉体形成がみられるコロニーを選抜し、ALP 染色陽性反応とリアルタイム PCR による初期化因子の発現上昇の確認から犬 iPS 細胞と判定し、ゲノムの抽出を行う。

次に、抽出ゲノム上での OSKM 挿入部位を明らかにし、標的領域を特異的に切断する CRISPR/Cas9 システムを設計する。犬胎仔線維芽細胞で犬 iPS 細胞様細胞が得られた場合、さらにこれを犬の BM-PACs へ適応し、同様の iPS 様細胞が得られるか、また、その効率について検討する。

### 4. 研究成果

研究当初の予定と異なり、犬胎仔線維芽細胞等の入手が困難となったため、マウス胎仔線維芽細胞を用い、レトロウイルスベクターによりヒト OSKM を犬 BM-PACs への導入を試みた。しかし、胚様体様コロニーの形成はほとんどみられず、ALP 染色においても、明らかに陽性を示すコロニーの出現は見られなかったため、犬 iPS 様細胞の誘導を再現することができなかった。

そこで、当初の予定を変更し、まず、遺伝子導入を試みる犬の BM-PACs についての幹細胞特性を再度検証することとした。まず初めに、犬 BM-PACs の幹細胞特性を遺伝子プロファイルから検討するため、従来報告されている BMMSCs との遺伝子発現を網羅的遺伝子発現解析により評価した。その結果、BM-PACs で上昇がみられた遺伝子は 43 遺伝子で、減少がみられた遺伝子は 64 遺伝子であった (図 1)。

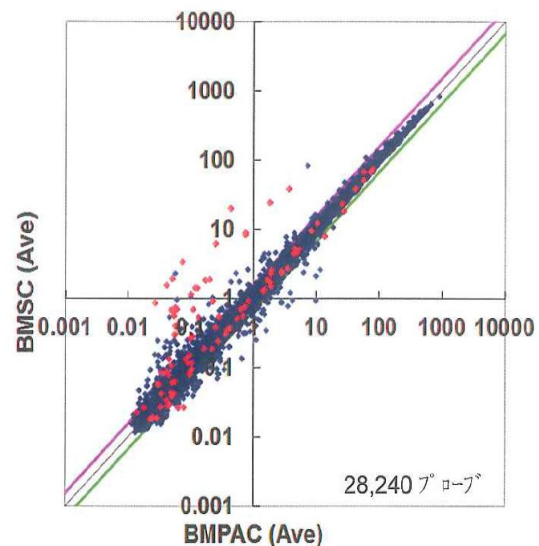


図 1 : BM-PACs と BMSCs の発現プロファイル比較 (スキャタープロット)

グラフの縦軸、横軸ともにアレイ間ノーマライズ後のシグナル値の平均値を示す。ピンク色及び緑色の各線は 1.5 倍及び 0.67 倍の境界を、赤のドットは有意差 ( $p < 0.05$  あるいは  $p < 0.01$ ) がみられたプローブを示す。

したがって、両者は類似した細胞であることが予想された一方で、BM-PACs で減少のみられた遺伝子には、代表的な細胞老化マーカーである、 $\beta$ -GAL が含まれており、BM-PACs と BMSCs の両者とも幹細胞としての性質を保持しているものの、BM-PACs がより未分化であることが示唆された。よって、BM-PACs の利用は BMSCs を用いる場合より、効率よく初期化因子を導入できる可能性があると考えられた。

次に、レトロウイルスによる遺伝子導入を試みる場合は、増殖を促進させる等、細胞の性質を加工する必要が考えられたため、MSCs の増殖促進作用を示すとされる、bFGF による処理を BM-PACs に行い、増殖能力に与える影響を検討した。その結果、bFGF を添加することにより、BM-PACs の増殖能が有意に上昇し、細胞の小型化がみられた (図 2、3)。

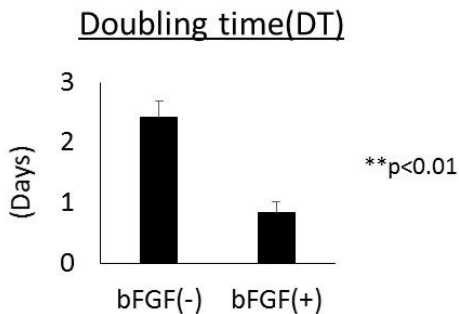


図 2 : bFGF 添加により BM-PACs の増殖能が有意に上昇した

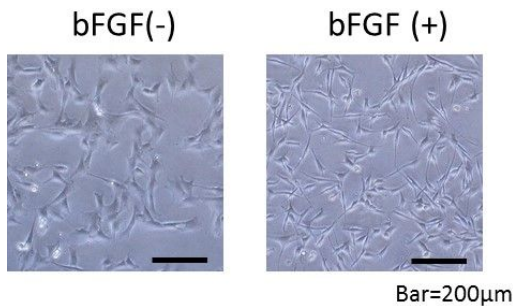


図 3 : bFGF 添加後、細胞の小型化がみられた

次に、bFGF 添加後の BM-PACs の多分化能について検討したところ、bFGF 刺激後の細胞において、脂肪分化能や軟骨分化能の亢進がみられた (図 4、5)

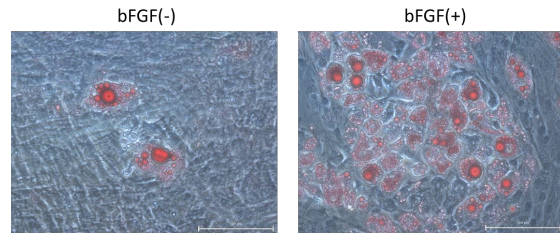


図 4 : bFGF 刺激前後の BM-PACs の脂肪分化能刺激後のオイルレッド O 染色により、脂肪蓄積の顕著な増加が認められた。

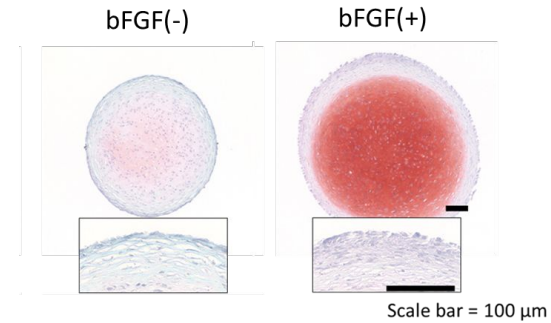


図 5 bFGF 刺激前後の BM-PACs の軟骨分化能刺激後のサフラニン O 染色により、顕著な軟骨基質発現の上昇がみられた。

以上から、bFGF は BM-PACs の幹細胞能を上昇させることが予想されたことから、未分化マーカーである Oct4 および Sox2 について遺伝子発現変化を評価したところ、初期化因子のひとつである SOX2 の有意な発現上昇がみられた (図 6)。

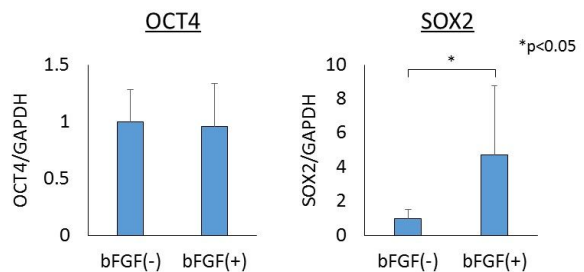


図 6 : bFGF 処理後の BM-PACs では、SOX2 発現の有意な上昇がみられた

以上から、BM-PACs を bFGF で処理することにより、増殖能を上昇させるとともに、未分化性も上昇させることが示唆された。したがって、bFGF 処理を行った BM-PACs に対し、レトロウイルスを用いて遺伝子導入を行うことで、より効率的な初期化因子の導入が期待できた。現在、この手法を用いて、初期化を試みており、犬 iPS 様細胞の出現がみられた場合は、ゲノム抽出を行い、挿入位置の解析を試みる予定である。

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)

[学会発表](計1件)  
「犬間葉系幹細胞の効率的な軟骨分化条件の検討」遠藤健太郎、藤田直己、林杏怡、中川貴之、西村亮平、日本再生医療学会総会、2017年3月、仙台

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.vn.a.u-tokyo.ac.jp/geka/>

6．研究組織

(1)研究代表者  
西村 亮平 (NISHIMURA, Ryohei)  
東京大学・農学生命科学研究科・教授  
研究者番号：80172708

(2)研究分担者  
藤井 涉 (FUJII, Wataru)  
東京大学・農学生命科学研究科・助教  
研究者番号：40708161

中村 達夫 (NAKAMURA, Tatsuo)  
京都大学・再生医科学研究所・准教授  
研究者番号：70227908