

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15433

研究課題名(和文) CRISPR/Cas9を用いた疾患モデルオルガノイドの樹立と変異解析手法の開発

研究課題名(英文) Establishment of disease model organoid by CRISPR/Cas9 method and the analysis method for mutations

研究代表者

洪 繁 (Ko, Shigeru)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：90402578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：CFTRが関わる上皮膜を介したイオン輸送機能全体を正確に測定可能なオルガノイドモデルを用いて、日本人型CFTR変異蛋白の機能を簡便に測定する疾患モデルの樹立を目的とした。マウスCftrゲノム152kbを全長組換えベクターに置き換えたヘテロノックインマウスES細胞から、キメラマウスを得た。キメラマウスを交配したが、ノックインマウスは得られなかった。マウス膵導管細胞のオルガノイドを樹立するために、実顕微鏡でマウス膵導管細胞を単離し、オルガノイド培養条件で培養を行った。既報の消化管オルガノイドの培養条件によって、マウス膵導管細胞からもオルガノイドが樹立され、培養、継代が可能であった。

研究成果の概要(英文)：The aim of the study was to establish a disease model that are able to measure the function of Japanese type CFTR mutants using a pancreatic organoid. Chimeric mice were obtained from knock-in mouse ES cells in which the 152 kb of whole mouse Cftr genome was replaced with a recombination vector. Chimeric mice were mated, but no knock-in mice were obtained. In order to establish pancreatic organoids, mouse pancreatic ducts were isolated under microscope and cultured in an organoid culture condition. Pancreatic organoids were established from the mouse pancreatic ducts cells in a same culture condition for the gastrointestinal organoids.

研究分野：膵生理学

キーワード：Cftr オルガノイド 膵導管細胞

1. 研究開始当初の背景

Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR)は、消化管や肺など全身のすべての上皮膜に発現するクロライド(Cl-)チャネルであり、上皮膜を介したCl⁻と重炭酸イオン輸送に最も重要な役割を果たしている。嚢胞性線維症(Cystic Fibrosis, CF)はCFTR遺伝子の変異によって発生する遺伝性疾患である。欧米の白色人種においては最も頻度の高い遺伝病の一つで、出生約2500人に1人の患者が発生する。乳幼児期に発症し、適切な治療を行っても予後不良であることから、精力的な研究、治療薬の開発が行われてきた。

欧米型CFの特徴として、疾患アレルの約70%が508番目のフェニルアラニン(Phe)残基の欠損によるΔF508タイプの遺伝子異常が占めていることである。ΔF508変異は、蛋白成熟過程において折りたたみに異常をきたすことで正常な蛋白として膜に発現しない。

最近、米国の製薬企業Vertex Pharmaceuticalsは、CFTR corrector (Lumacaftor, VX-809)とよばれる低分子化合物を開発し、ΔF508変異に対する特効薬として上市している。我が国では、CFの発症頻度は極めて低いものの、CFと確定診断される患者数はある一定頻度存在する。小児では慢性特定疾患として医療費の公費負担制度が整備されていたが、本年7月から成人のCF患者でも公的支援が受けられるようになったのは大きな進歩である。

CF患者や患者家族、主治医への疾患・治療法情報提供などを目的として、厚労省難治性肺疾患調査研究班の研究成果として嚢胞性線維症患者登録制度(事務局名古屋大学総合保健体育科学センター健康栄養医学)が整備されている。5年毎のCF全国調査では、我が国のCF患者は海外に比べて極めて予後が悪く、多くが小児期に死亡していることから、適切な治療が提供されていないことが問題である。更に日本を含むアジア人のCFの問題点は、欧米型の頻度の高い遺伝子変異が殆ど無く、de novo変異によるまれな変異が殆どであるため、変異蛋白の機能解析も進んでおらず、欧米では既に特効薬が2剤(VX-770, Ivacaftor; VX-809, Lumacaftor)上市されているにも関わらず、これらの薬剤が日本人のCF変異に有効かどうかは不明で、確認手法もない。

以前から変異CFTR蛋白の機能解析方法として、パッチクランプを用いた電気生理学解析が主に用いられてきたが、CFTRは自身がCl⁻チャネルであるだけでなく、もっと重要な機能として他の膜タンパクを調節する働きがある。細胞株に発現させCl⁻チャネル機能を測定するだけでは、CFTR変異上皮膜全体の機能不全の程度を正確に解析することは不可能である。最近CF患者の大腸から、LGR5陽性腸幹細胞をin vitroで培養し作成したオルガノイド(Sato T et al, Nature 2009)を用

いて、変異CFTR機能を簡便に解析する技術が開発された(Dekkers JF et al, Nat Med 2013)。

2. 研究の目的

そこで本研究では、CFTRが関わる上皮膜を介したイオン輸送機能全体を正確に測定可能な(即ち病態モデルになり得る)オルガノイドモデルを用いて、CRISPR/Cas9システムを用いたゲノム編集技術を活用することで、これまで殆ど解析されてこなかった日本人型CFTR変異蛋白の機能を簡便に測定する疾患モデルの樹立を目的とした。

3. 研究の方法

(1) Cfr片アレルノックアウトマウスの樹立

遺伝子組換え用ベクターコンストラクトの構築

マウスcfr遺伝子は、全27エクソンがゲノム上に152kbpにわたって存在している。平成28年度は、片アレルのcfr全エクソンを欠損するcfrノックアウトマウスのヘテロ接合体を作成するため、cfrを除くためのベクターを作成した。cfrはエクソン1に翻訳開始点が存在するため蛋白コード領域に蛍光蛋白Emeraldを挿入した。Emeraldの3'側にはES細胞セレクション用pGKneoカセットを挿入する。guide RNAをcfr遺伝子の5'、3'側の2箇所に設計した。

マウスES細胞株への遺伝子組換えベクターの導入と組換えES細胞の選別

作成したノックアウト用ベクターは、マウスES細胞株にリポフェクション法で遺伝子導入し、CRISPR/Cas9ゲノム編集技術でcfrノックアウト用ES細胞を作成した。

マウス胚盤胞へのマイクロインジェクションとキメラマウスの作成

得られた組換えES細胞は、胚盤胞へのinjectionを依頼する。

キメラマウスからcfrノックアウトマウスヘテロ接合体の作成

(2) 膵導管細胞からのオルガノイドの樹立

マウス膵から実態顕微鏡を用いて、膵導管細胞オルガノイドを樹立する技術を確立する。

4. 研究成果

(1) Cfr片アレルノックアウトマウスの樹立

研究方法に従って、マウスCfrゲノム152kbを全長組換えベクターに置き換えたヘテロノックインマウスES細胞を合計3クローン選別した。組換えES細胞は、マウス胚盤胞にマイクロインジェクションを行い、マウスを得た。3クローンをインジェクションし、1クローンのみからキメラマウスが得られたが、得られた仔はキメラ率が低かった。これらのキメラマウスから交配によって生殖細胞系列にノックインされたマウスを得る努力を行ったが、残念ながらキメラマウス

からはノックインマウスは得られなかった。
現在再度同じ組換えベクターを用いて、ES細胞のスクリーニングから再開しており、組換え ES 細胞が得られ次第マウスを樹立する予定である。

(2) 膵導管細胞からのオルガノイドの樹立
マウス膵導管細胞のオルガノイドを樹立するために、実態顕微鏡でマウス膵導管細胞を単離し、オルガノイド培養条件で培養を行った。既報の消化管オルガノイドの培養条件によって、マウス膵導管細胞からもオルガノイドが樹立され、培養、継代が可能であった。本研究により、マウス膵導管細胞のオルガノイドは培養が可能となったため、Cfr ノックインマウスが樹立され次第、今後オルガノイドでの遺伝子組換え実験を行う予定である。

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)

[雑誌論文](計7件)

洪 繁、秋山智彦、スラバゴパラジュ、平山雅敏、洪 実、Quick-Tissue テクノロジー: ヒト転写因子合成 mRNA を用いたヒト多能性幹細胞の新しい細胞分化誘導法とその将来展望、月刊バイオインダストリー 査読無、Vol.34, No.8, シーエムシー出版 2017年8月12日発行

洪 繁、我が国で処方可能な各種消化酵素製剤の特長とそれに応じた製剤の使い分け、膵臓、査読有、32巻2号 Page125-139(2017.04)

Arai Y, Takahashi D, Asano K, Tanaka M, Oda M, Ko SB, Ko MS, Mandai S, Nomura N, Rai T, Uchida S, Sohara E. Salt suppresses IFN γ inducible chemokines through the IFN γ -JAK1-STAT1 signaling pathway in proximal tubular cells. Sci Rep. 査読有 2017 Apr 20;7:46580. doi: 10.1038/srep46580.

Yamaguchi M, Steward MC, Smallbone K, Sohma Y, Yamamoto A, Ko SB, Kondo T, Ishiguro H. Bicarbonate-rich fluid secretion predicted by a computational model of guinea-pig pancreatic duct epithelium. J Physiol. 査読有、2017 Mar 15;595(6):1947-1972. doi: 10.1113/JP273306.

黒田 学, 洪 繁、本邦で承認されている医療用消化酵素製剤の消化力比較、消化と吸収 査読有、(0389-3626)38巻2号 Page118-125(2016.05)

洪 繁、ヒト膵内外分泌組織の再生と機能的回復: ヒトの膵は再生しないというドグマを超えて、BIO Clinica、査読無、第31巻、第

7号、page88-93、北隆館、2016年6月10日発行

洪 繁、ヒト膵の組織再生と組織幹細胞、BIO Clinica、査読無、第31巻、第3号、page 90-94
北隆館、2016年3月10日発行

[学会発表](計4件)

黒田 学, 洪 繁、消化管モデルを用いた医療用消化酵素製剤の総合脂肪消化力試験、膵臓基礎2、第15会場、マリンメッセ福岡アリーナ、第59回日本消化器病学会大会(JDDW2017)
2017年10月12日木曜日 14:00-14:30

洪 繁、膵外分泌機能障害に対する消化酵素製剤の使い分け、第58回日本消化器病学会大会、JDDW2016,2016.11.03-06
ワークショップ19「膵内外分泌機能障害における治療戦略」
消化器病学会、消化器内視鏡学会、消化器外科学会、兵庫県、神戸市、ポートピアホテル本館 偕楽3、第19会場
2016年11月5日(土) 9:00-11:20、

黒田 学, 洪 繁、消化管モデルを用いた医療用消化酵素製剤の胃と腸における総合消化力比較試験、第58回日本消化器病学会大会、JDDW2016,2016.11.03-06
兵庫県、神戸市、神戸国際展示場一号館、第15会場、2016年11月3日(木) 10:12-10:42、

黒田 学, 洪 繁、消化管モデルを用いた医療用消化酵素製剤の総合消化力比較試験、日本膵臓学会大会2016、仙台、ポスター発表 2016.08.04-07、仙台国際センター

[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0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

6．研究組織

(1)研究代表者

洪 繁 (KO, Shigeru)
慶應義塾大学・医学部 (信濃町)・准教授
研究者番号：90402578

(2)研究分担者

石黒 洋 (ISHIGURO, Hiroshi)
名古屋大学・総合保健体育科学センター・
教授
研究者番号：90303651

石黒 啓一郎 (ISHIGURO, Keiichiro)
熊本大学・発生医学研究所・准教授
研究者番号：30508114