

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19042

研究課題名(和文)心外膜前駆細胞の網羅的細胞系譜解析

研究課題名(英文)Comprehensive cell lineage analysis of epicardial progenitor cells

研究代表者

阿部 高也(Abe, Takaya)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイエンス技術基盤研究センター・研究員

研究者番号：10720609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：心臓の形態形成は複雑で心臓を作る元になる細胞の起源がまだ明らかにされていない。一つの原因として既存の解析手法の限界が上げられる。そこで個々の細胞を区別するバーコードをゲノムへ挿入することのできる新規細胞系譜解析マウスの開発を試みた。本計画では遺伝子可変技術により目的の遺伝子改変マウスの樹立に成功した。今後はこれらのマウスを用いてさらに解析を進めて行く予定である。

研究成果の概要(英文)：The morphogenesis of the heart is complicated and the origin of the cells that make up the heart has not yet been clarified, because it is very difficult to analyze the phenomenon with existing methods. To overcome this problem, I'm trying to develop a novel method, which allow us to trace whole cells. In this program, I succeeded in establishing the cell lineage tracing mice with mouse genetic engineering. I'm planning to further analyze using these mice in the future.

研究分野：医化学一般

キーワード：心臓前駆細胞 ゲノムバーコーディング 細胞系譜解析

1. 研究開始当初の背景

心臓は新生児奇形で最も頻度が高い疾患の一つである。その背景には心臓の形成が発生のもっと早くから始まることや複数の起源の異なる細胞系譜が複雑に寄与しながら、ダイナミックな形態変化を経て形成されることにある。心臓は4つの前駆細胞群から構築される：心臓中胚葉 (Cardiac mesoderm cells: CMC)由来の FHF 前駆細胞 (First Heart Field) と SHF 前駆細胞 (Second Heart Field)、心外膜前駆細胞 (proepicardium: PE)、心臓神経堤細胞 (cardiac neural crest cells: NCC)。マウスの心臓発生は、原腸陥入時期に CMC から FHF と SHF と呼ばれる2つの前駆細胞系譜が発生して(受精後6日目:E6.5)、心原基を頭部側に形成する(E7.5)。これらの細胞群が中央に移動して、原始心筒を形成し(E8.0)、さらに伸長する。その後、右側に屈曲し(E9.0)、E10.0には左右心室と心房の形態が確認できるようになる。FHFは左心室 (Left Ventricle: LV) および一部の右心室 (Right Ventricle: RV) と心房、SHFは円錐動脈幹領域 (outflow tract: OFT) と右心室および一部の心房となる。PEはE9.0に proepicardium organ (PEO) と呼ばれる一過的に生じる器官より発生し、心臓を被う心外膜を形成する。さらに、心外膜細胞 (epicardium) は心臓繊維芽細胞、間葉系細胞、血管平滑筋細胞、冠状動脈などへ分化する。NCCは神経堤から OFT の入り口付近へ移動し、大動脈弓、動脈幹、肺動脈を形成する。心臓はこれらの細胞群が分化しながら最終目的地まで移動して複雑な機能構造を構築する。心臓を形成するこれらの前駆細胞群の派生メカニズムの解明は、先天性心奇形や心臓疾患の病理学的な原因を理解するうえで非常に重要である。

2. 研究の目的

本研究ではこれらの前駆細胞の中でも、多様な心臓系細胞へ分化する能力があるため再生医療への応用が注目されている PE にフォーカスをあて、その派生時期の特定および FHF と SHF 細胞系譜との関係性を明らかにする。先に述べたように PE は E9.0 に PEO より派生するとされているが、PE となる細胞群の由来については、少なくとも2つの異なる見解がある：(1) FHF および SHF と同じ CMC に由来し、FHF 系譜と同じ時期に PE 系譜も決定される。また FHF 系譜と PE 系譜は可逆性がある。SHF 系譜はこれらの後に決定される (Lescroart., 2014)。(2) SHF の細胞群に由来する (Zhou., 2008)。これらの報告より PE は FHF と SHF の両方から派生する可能性が考えられるが、まだ明確に示された報告はなされていない。また PE の細胞群は heterogeneity (不均一性) があり、少なくとも2種類の細胞群が存在することが遺伝子発現レベルで示されている (Cai., 2008)。この様に心臓発生は複数の前駆細胞群が関与し

ており、それらの細胞系譜の派生時期や前駆細胞間の相互関係を理解することは、従来の細胞系譜解析 (Cre/loxP システムなど) では極めて難しい。そのためには、器官発生における複雑な細胞間相互関係を包括的に理解するには、新たな手法の開発が必須であると考えられる。

3. 研究の方法

従来の細胞系譜解析手法は組換え酵素 Cre とその認識配列 loxP を用いて、loxP 配列で挟まれたストップ配列を除去することでレポーター遺伝子を発現させて系譜を追跡する。しかしながら、この解析法は：(1) 細胞のアイデンティティはレポーター遺伝子 (GFP など) の発現のみで決定される。(2) 1つの集団あるいは細胞しか追跡することができない。そのため、心臓発生に見られるような、複数の細胞系譜が関与する場合に包括的な解析 (複数の系譜を同時に追跡する) が不可能である。そこで CRISPR/Cas9 システムを利用した新たな手法を考案した。CRISPR/Cas9 はゲノム配列を認識する guide RNA (gRNA) とそれと複合体を形成する Cas9ヌクレアーゼにより標的ゲノム配列に二本鎖切断を引き起こす。切断後の修復過程に生じる塩基挿入や欠損 (indel) が起こることで遺伝子を破壊することができる新しい遺伝子改変技術である (Cong., 2013, Mali., 2013)。興味深いことにその indel は様々なパターンが生じることが知られている。この解析法では二本鎖切断により生じるゲノム DNA の遺伝子変異 indel のパターンバリエーションを細胞の ID / バーコードとして細胞系譜の解析を行う。変異のパターンは非常に豊富であり、網羅的な解析が期待できる。さらに、ゲノムの変異により細胞系譜を識別するため、レポーターの発現有無で判断していた従来の手法とは異なり、細胞一つ一つを区別することが可能となる。

4. 研究成果

本科研費申請において考案した細胞系譜解析法 (ゲノムバーコーディング) であるが、採択後の 2015 年 5 月にゼブラフィッシュにおいて、同様な手法を用いた報告がなされた。そこで本研究計画においては ID となる変異を挿入するために必要な gRNA およびその標的配列 (アレイ) の選別を予定していたが、gRNA およびアレイ配列はその報告を参考にして遺伝子改変マウスの作製することに変更した。しかし、本研究ではマウスにおいて時期特異的に変異を挿入させる必要があるため、誘導的に変異を引き起こすことがポイントとなった。また変異のバリエーションを増やすため 10 種類の gRNA を持ちることにした。そのため誘導的に 10 種類の gRNA を発現する発現ユニット、および Cas9 の発現ユニットの構築を行なった。gRNA を誘導的に発現させるため ribozyme を利用して gRNA を 10

種類同時に発現させる DNA の作製を行なった。その後、培養細胞を用いて gRNA の発現および変異挿入の活性を検討した。その結果、変異が確認されたが、10 種類のアレイ配列のうち一部の標的部位のみであった。また挿入効率も非常に低いことがわかった。ribozyme による gRNA の発現効率が変異挿入に十分ではない可能性が示唆された。そのため gRNA を発現させる別の方法としてテトラサイクリンにより Cas9 を誘導的に発現させ gRNA は恒常的に発現させる方法も平行して進めた。最終的に作製したマウスは以下の 3 系統である：(1)誘導型 Cas9 発現マウス、(2)gRNA 発現アレイマウス v1(ribozyme)、(3) gRNA 発現アレイマウス v2(恒常発現 U6 プロモーター)。

遺伝子改変マウス作製法は ES 細胞を用いた gene targeting 法を計画していたが、作製期間の短縮が可能な新たな手法である受精卵で CRISPR/Cas9 を利用して作製する方法を試みた。それによりマウス(1)および(2)の樹立に成功した。一方で、gRNA を恒常的に発現させる系統(3)は受精卵での方法が使えないため計画通り gene targeting による作製を進めた。しかし、この系統では 10 種類の gRNA を発現させるための DNA 構築が繰り返し配列を多く含むため非常に難航した。しかし、最終的に構築し、相同組換え体 ES 細胞を同定した。得られた相同組換え体 ES 細胞へ Cas9 を導入して変異挿入を検討した。アレイ領域を PCR により増幅して電気泳動により増幅された DNA 断片の確認を行なった (図 1)。その結果、期待されたようにサイズの異なる複数の DNA フラグメントが検出された。つまり、CRISPR/Cas9 によりアレイ配列へ欠損や挿入が生じて、バーコード化が起きていること、gRNA の発現はバーコード化に十分であることが示唆された。さらに、そのキメラマウス作出に成功した。

本研究計画においては、gRNA を 10 種類発現させるための DNA 構築が非常に難しく作製の遅れの原因となった。現状では予定より進行が数ヶ月ほど遅れている。また ribozyme システムが機能しないことがわかり、作製する遺伝子改変マウスの作製変更が必要とされた。しかし、受精卵における遺伝子改変マウスの作製法により 2 系統、また gene

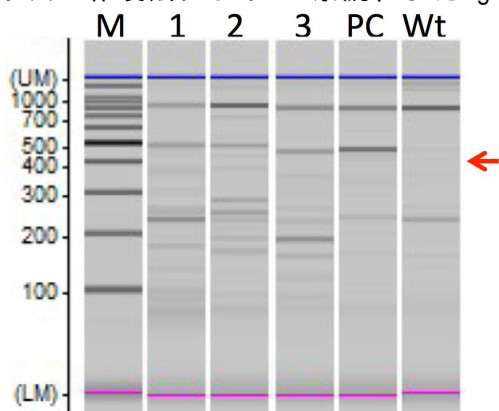


図1

targeting により 1 系統の遺伝子改変マウスの樹立に成功した。

現在、これらのマウスの繁殖を行っており、今後はマウスでの細胞系譜解析を進めて行く予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 6 件)

阿部高也、Multi-gene knockouts by the CRISPR/Cas9 system in mouse ES cells: an approach to phenotyping of embryonic lethal mutants in F0 embryos、日本ゲノム編集学会第一回大会、2016年9月6日、広島国際会議場(広島県、広島市)

阿部高也、マウス着床後初期胚における細胞系譜解析、日本発生生物学会秋季シンポジウム、2016年10月21日、三島市民文化会館(静岡県、三島市)

阿部高也、Cell lineage analysis in early mouse embryo、日本分子生物学会年会、2016年12月2日、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

阿部高也、Harnessing the one-step generation of genetically engineered mice with CRISPR/Cas9 in zygotes @ LAGRE, RIKEN-Kobe、日本ゲノム編集学会第二回大会、2017年6月28日、千里ライフサイエンスセンター(大阪府、豊中市)

阿部高也、CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子改変マウスの作製、日本発生生物学会年会、2017年5月10日、タワーホール船堀(東京都、江戸川区)

阿部高也、Optimizing production of genetically engineered mice with genome editing tools、日本分子生物学会年会、2017年12月7日、神戸国際展示場(兵庫県、神戸市)

〔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

阿部 高也 (ABE, Takaya)

国立研究開発法人理化学研究所・ライフサイ

エンス技術基盤研究センター・研究員

研究者番号：10720609

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()