

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17H03568
研究課題名(和文) ヒト多能性幹細胞評価を革新する非ヒト霊長類-マウス異種間キメラ解析システムの開発

研究課題名(英文) Development of mouse-non-human primate chimera analysis innovating evaluation methods of human pluripotent stem cells

研究代表者
杉山 文博 (Sugiyama, Fumihiro)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：90226481
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,200,000円

研究成果の概要(和文)：多能性幹細胞(PSC)と初期胚とのキメラ形成は最も厳格な多能性評価方法である。最近、マウス原腸胚へのヒトPSC注入によりマウス胚組織にPSCが統合され、運命決定されることが明らかとなった。しかしながら、PSCがどの胚葉系の組織に駐在して移動・分化をしていくのか継時的に容易に解析することは困難であった。そこで我々は、ヒト多能性幹細胞評価を革新させるため、三胚葉を区別し同時にマッピングできるMIERU(Multi-color Imaging of Embryonic Development by Reporter Units)マウスを作製し、原腸胚における詳細な表現型形質を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マウス原腸胚において、Otx2-2A-tdTomatoマウスは外胚葉を、T-2A-TagBFPマウスは中胚葉を、Sox17-2A-EGFPマウスは内胚葉を、さらにトリプルノックインマウスは三胚葉を区別しマッピング可能であり、PSC評価のため原腸胚による異種間キメラ解析システムのツールとして有用であることを示した。またこれら各ノックインマウスは理研バイオリソース研究センターに寄託され、研究者がPSC評価や多能性研究だけでなく、in vivoにおける三胚葉分化研究等にも利用可能とした。

研究成果の概要(英文)：Chimera formation between pluripotent stem cells (PSCs) and early embryos is the most rigorous method for assessing pluripotency of PSCs. Recently, it was revealed that human PSC injection into mouse gastrula-stage embryos resulted in efficient PSC integration and fate determination. However, it was difficult to easily analyze which germ layer tissue the PSC migrate, reside in and then differentiate. Therefore, in order to innovate the evaluation of human pluripotent stem cells, we produced a novel knock-in reporter mouse strain, MIERU (Multi-color Imaging of Embryonic Development by Reporter Units), by the CRISPR/Cas9 system and bicistronic gene expression system and then revealed that the three germ layers in MIERU mouse embryos at the gastrula stage were identified differentially.

研究分野：実験動物学

キーワード：レポーターノックインマウス 原腸胚 三胚葉 多能性幹細胞 CRISPR/Cas9 バイシストロニック

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

着床前の初期胚をホストとしたキメラ動物作製は多能性幹細胞評価において最も厳格な解析方法として認められている。しかしながら、ヒトPSCを用いた異種キメラ動物作製には規制があり、動物胚とヒト細胞からなる動物性集合胚の使用はクローン技術規制法に基づいて研究申請の手続きが必要であり、動物性集合胚は原始線条が出現した胚、受精後14日を超えた胚の取扱いは禁止である。一方、アメリカNIHでもヒト以外の脊椎動物の原始線条以前の胚にヒトPSCを注入する研究費が凍結されていたが、2016年8月に霊長類を除く原始線条以前の動物胚へのヒトPSC注入研究等について解除する方針であると発表された。日本でも科学的な妥当性と社会の理解が合致した際、上記した規制の改正が大きく期待されていた。しかし、同年8月に『日本におけるヒト細胞を含むキメラ動物を使った研究に関する意識調査』が発表され、動物-ヒトキメラ研究を受け入れる研究者は50%、一般者は25%程度と許容度が低いことが明らかとなった。従って、社会的な理解をさらに深めるためにはPSCの異種動物間キメラ研究を強化し、科学的な理解を深めることが必要な状況であった。

ヒトPSCは異種キメラ形成能を欠くことより、多能性評価は*in vitro*とマウストラトーマ形成のみであった。ところが、2016年にヒトPSCをマウス円筒胚に注入し体外培養した場合、異種間キメラを形成し、ヒトPSCは発生上予測されている運命決定で空間的な秩序を保って三胚葉の組織に分化することが証明され、ヒトPSCの多能性評価がStage-matching異種間キメラ方法で可能であることが明らかとなった(Cell Stem Cell. 18: 67, 2016)。しかし、キメラ実験の難点は個々のキメラ胎児によりキメラの状態が異なることである。従って、キメラ胎児毎、経時的解析が必要であり、特にPSCの分化状態を理解するためマウス胎児の三胚葉マッピングとPSCとの位置関係の容易に解析する方法が必要不可欠であった。

2. 研究の目的

多能性幹細胞(PSC)と初期胚とのキメラ形成は最も厳格な多能性評価方法である。しかし、ヒトPSCは異種キメラ形成能を欠くことからこの多能性評価が困難であった。最近マウス原腸胚へのヒトPSC注入によりPSCが統合され、運命決定されることが明らかとなった。しかしながら、PSCがどの胚葉系の組織に駐在して移動・分化をしていくのか継時的に容易に解析することは困難であった。そこで申請者は、ヒト多能性幹細胞評価を革新するマウス原腸胚の高精度Stage-matching異種間キメラ解析システムのツール構築のため、マウス原腸胚の三胚葉を蛍光マッピングできるMIERU(ミエル、Multi-color Imaging of Embryonic Development by Reporter Units)マウスを作製し、詳細なMIERUマウス表現型形質の特徴を明らかとすることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

外胚葉、中胚葉、内胚葉の解剖学的な識別はそれら組織特異的に蛍光タンパクを発現させることが最も効果的である。通常、組織特異的遺伝子に蛍光タンパク遺伝子をKnock-inした場合、内在性遺伝子の機能欠失が生じ、胚発生を妨げる結果となる。そこで我々は自ら開発したCRISPR/Cas9システムによるバイシストリックKnock-in方法にて胚葉特異的にレポーター遺伝子を発現するマウスの作製を行った(図1)。

(1) 外胚葉マッピング

マウス受精卵の*Otx2*(Orthodenticle homeobox 2)遺伝子STOP配列近傍を切断するためgRNA、Cas9遺伝子及びドナーplasmid(STOP配列を持たない*Otx2*遺伝子と2A配列連接*tdTomato*融合遺伝子)を注入し、相同組換え修復(HDR)を介して野生型*Otx2*遺伝子座にて*Otx2*遺伝子発現制御下で*Otx2*と*tdTomato*をバイシストリックに発現するマウスを作製した。

(2) 中胚葉マッピング

マウス受精卵の*T*遺伝子(Brachyury)STOP配列近傍を切断するためgRNA、Cas9遺伝子及びドナーplasmid(STOP配列を持たない*T*遺伝子と2A配列連接*TagBFP*遺伝子融合遺伝子)を注入し、相同組換え修復(HDR)を介して野生型*T*遺伝子座にて*T*発現制御下で*T*と*tdTomato*をバイシストリックに発現するマウスを作製した。

(3) 内胚葉マッピング

マウス受精卵の*Sox17*遺伝子(SRY, Sex determining region Y, Box 17)STOP配列近傍を切断するためgRNA、Cas9遺伝子及びドナーplasmid

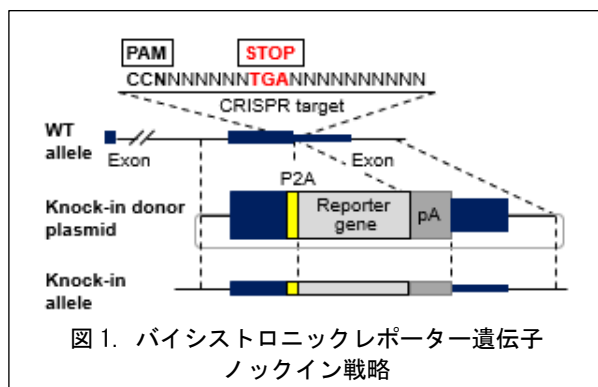


図1. バイシストリックレポーター遺伝子ノックイン戦略

(STOP 配列を持たない *Sox17* 遺伝子と 2A 連接 EGFP 融合遺伝子) を注入し、相同組換え修復 (HDR) を介して野生型 *Sox17* 遺伝子座にて *Sox17* 遺伝子発現制御下で *Sox17* と EGFP をバイシストリックに発現するマウスを作製した。

4. 研究成果

(1) レポーターノックインマウスの作製

上記方法にて 3 種類のレポーターノックインマウスを受精卵でのゲノム編集により作製した (表 1)。 *Sox17* 遺伝子を標的としたノックインマウスは *Sox17*-2A-EGFP、 *Otx2* 遺伝子を標的としたノックインマウスは *Otx2*-2A-tdTomato、 *T* 遺伝子を

	Injected zygotes	Neonates	Knock-in mice
<i>Sox17</i> -2A-EGFP	301	65	4 (6.2 %)
<i>Otx2</i> -2A-tdTomato	243	67	2 (3.0 %)
<i>T</i> -2A-TagBFP	242	66	9 (13.6 %)

表 1. ノックインマウスの作製率

標的としたノックインマウスは *T*-2A-TagBFP と命名した。 *Sox17*-2A-EGFP マウス作製においては 301 個の受精卵をゲノム編集し、 65 匹の新生児が発生した。内 HDR により DNA ドナーのレポーター遺伝子が *Sox17* 遺伝子終始コドン直前に正確にノックインされたファウンダーマウスが 4 匹 (6.2%) 同定された。 *Otx2*-2A-tdTomato マウス作製においては、 243 個の受精卵を用い、得られた 67 匹の新生児から 2 匹のファウンダーマウスが同定された。さらに、 *T*-2A-TagBFP マウス作製においては、 242 個の受精卵を用い、得られた 66 匹の新生児から 9 匹のファウンダーマウスが同定された。 3 種類の系統で作製率が異なる原因は gRNA を構成する塩基に起因する安定性や活性の違いが理由であると考えているが、その詳細は不明である。しかしながら、同様な戦略にて作製した未発表の 60 系統以上のノックインマウス作製率では平均 8.0% (最小 0~最大 37.9%) であることから、本研究における作製効率はいずれとほぼ同様程度であると考えられた。

(2) ホモ接合体レポーターノックインマウスの発生

Sox17 のノックアウトマウス解析において *Sox17*^{-/-} マウスは発生に異常は見られず生存可能であるが、 *Sox17*^{-/-} マウスは内胚葉形成異常を示し、胎齢 10 日前後で致死することが報告されている。 *Otx2* のノックアウトマウス解析では、 *Otx2*^{-/-} マウスの 3 割以上で産仔において顔や頭に異常な形態が見られ、生後すぐに致死ことや *Otx2*^{-/-} マウスはより重篤であり、前脳から中脳が欠損し、胎齢 9.5 日ほどで致死することが報告されている。 *T* の変異マウス解析では、 *T*^{+/Wis} マウスは生存可能であるが、尻尾が短いもしくは形成されない。また、 *T*^{Wis/Wis} マウスは前脳および中脳が欠損し、原始線条での中胚葉形成や移動が停止して胎齢 10.5 日ほどで致死することが報告されている。そこで、 *Sox17*-2A-EGFP、 *Otx2*-2A-tdTomato および *T*-2A-TagBFP マウス各系統においてヘテロ接合体マウス間での交配を行い、ホモ接合体マウスの発生を解析した。ヘテロ接合体マウス間交配から得られた産児の遺伝型は離乳時に観察され、ホモ接合体ノックインマウスがほぼメンデルの法則に従って生まれてくることが明らかとなった (表 2)。また、いずれの系統のホモ接合体ノックインマウスとも、正常な形態であり、健康状態は良好、稔性を有していることが明らかとされた。これらのことより、本レポーター遺伝子のバイシストリックなノックインは、標的遺伝子機能に支障をもたらしていないことが示唆された。

Intercrosses of +/KI mice	No. of postnatal mice	+/+	+/KI	KI/KI
<i>Sox17</i> -2A-EGFP	13	3 (23.1 %)	6 (46.1 %)	4 (30.8 %)
<i>Otx2</i> -2A-tdTomato	21	9 (42.9 %)	8 (38.1 %)	4 (19.0 %)
<i>T</i> -2A-TagBFP	30	10 (33.3 %)	14 (46.7 %)	6 (20.0 %)

表 2. ホモノックインマウスの発生率

(3) 原腸胚におけるレポーター発現

各系統の胚齢 (E) 6.5~8.5 日の原腸胚におけるレポーター蛍光を蛍光実体顕微鏡で解析した (図 2)。

Sox17-2A-EGFP 原腸胚は、胚令 (E) 6.5 日に胚体外臓側内胚葉で、E7.5 で胚体臓側内胚葉および胚体内胚葉でも、E8.5 では腸管内胚葉組織で、緑色蛍光である EGFP タンパクの発現が見られた。

Otx2-2A-tdTomato 原腸胚は、E6.5 で胚体外胚葉全体、E7.5 で特に前方胚体外胚葉

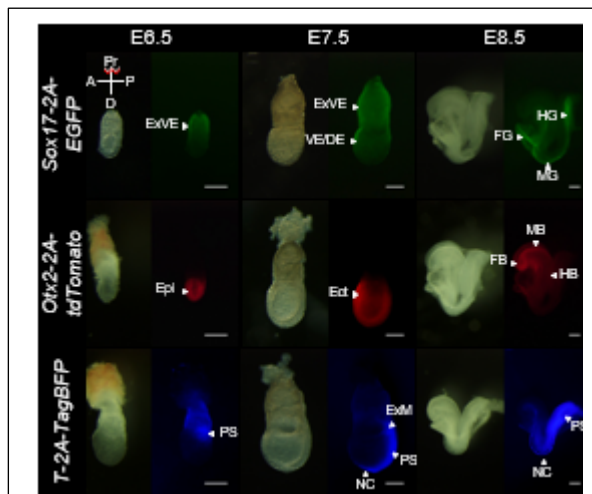


図 2. 原腸胚におけるレポーター蛍光発現様式

で強く、E8.5 で前方の前脳から中脳にかけ、赤色蛍光である tdTomato タンパクの発現が観察された。

T-2A-TagBFP 原腸胚は、E6.5 で胚体外外胚葉と胚体外胚葉が近接する組織に、E7.5 で胚体外中胚葉および後方胚体外胚葉の近位部から遠位部にかけての原始線条にて、E8.5 で胚後方の原始線条と吻側に伸びる脊索で、青色蛍光である TagBFP タンパクの発現が観察された。

(4) 原腸胚におけるレポーターと標的遺伝子産物との胚内局在

蛍光レポーターが標的とした遺伝子産物の発現様式を投射しているか検討するため、各標的遺伝子産物の特異抗体を用いた蛍光免疫解析を行った (図3)。

Sox17-2A-EGFP 原腸胚において、EGFP 蛍光は前背索中胚葉が位置する部分を除き、前方から後方にかけて広がる胚体臓側内胚葉および胚体内胚葉で観察され、Sox17 シグナルと同様であった。

Otx2-2A-tdTomato 原腸胚において、tdTomato 蛍光は前方の胚体外胚葉で強い蛍光が見られ、Otx2 シグナルと同様であった。

T-2A-TagBFP 原腸胚の観察は上記と異なり尾側より観察した像となる。TagBFP 蛍光および Brachyury シグナルとも胚体外胚葉後方の原始線条に沿ってそれらの発現がみられた。

これらのことより、いずれの蛍光レポーターも標的遺伝子産物の発現と共局在していることが明確に示された。

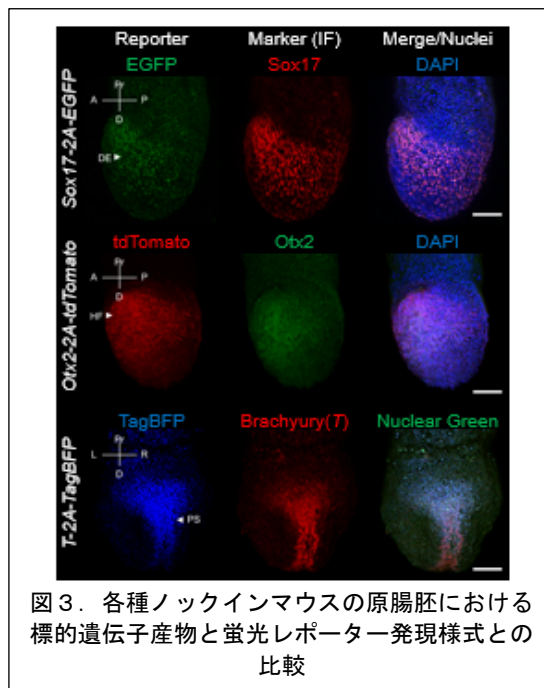


図3. 各種ノックインマウス原腸胚における標的遺伝子産物と蛍光レポーター発現様式との比較

(5) トリプルノックインレポーターマウス原腸胚の蛍光レポーター発現様式

各ノックインレポーターマウスの標的遺伝子は異なる遺伝子座に存在するため、3 系統の交配によりトリプルノックインマウスを作製し、原腸胚における三胚葉の蛍光レポーター発現を解析した。

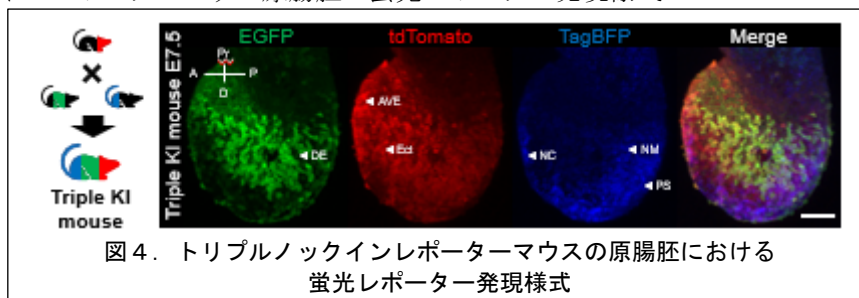


図4. トリプルノックインレポーターマウスの原腸胚における蛍光レポーター発現様式

結果、トリプルノックインレポーターマウスは、正常な発達が見られ、稔性も有していることが明らかとなった。原腸胚における蛍光レポーターの発現は、シングルノックインレポーターマウスと同様であることが示された (図4)。

これらのことより、原腸胚の胚体組織において Otx2-2A-tdTomato ノックインマウスは外胚葉を、T-2A-TagBFP ノックインマウスは中胚葉を、Sox17-2A-EGFP ノックインマウスは内胚葉を、さらにトリプルノックインマウスは三胚葉を識別しマッピング可能なことが明らかとなり、原腸胚における異種間キメラ解析システムとして有用であることが示唆された。また、これらのノックインマウス原腸胚からは FACS (fluorescence activated cell sorting) よりオミックス解析可能な三胚葉の細胞を分取可能なことも明らかとなり、*in vivo* での多能性幹細胞の三胚葉分化研究のための有用なツールとなることも明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suzuki Hayate, Dinh Thi Huong Tra, Daitoku Yoko, Tanimoto Yoko, Kato Kanako, Azami Takuya, Ema Masatsugu, Murata Kazuya, Mizuno Seiya, Sugiyama Fumihiro	4. 巻 68
2. 論文標題 Generation of bicistronic reporter knockin mice for visualizing germ layers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Experimental Animals	6. 最初と最後の頁 499 ~ 509
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1538/expanim.19-0031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hayate Suzuki, Dinh Thi Huong Tra, Seiya Mizuno and Fumihiro Sugiyama
2. 発表標題 A novel creation of reporter mouse model for assessing gastrulation and three germ layer formation
3. 学会等名 TGSW2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木颯, Dinh Thi Huong Tra, 大徳陽子, 加藤花名子, 飯島沙織, 水野聖哉, 杉山文博
2. 発表標題 胚葉特異的ノックインレポーターマウスの作製
3. 学会等名 第65回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木颯, Dinh Thi Huong Tra, 浅見拓哉, 大徳陽子, 加藤花名子, 飯島沙織, 水野聖哉, 依馬正次, 杉山文博
2. 発表標題 原腸胚における遺伝子機能解析に有用な胚葉特異的レポーターマウスの作製
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第3回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木颯, Dinh Thi Huong Tra, 大徳陽子, 加藤花名子, 飯島沙織, 浅見拓哉, 依馬正次, 水野聖哉, 杉山文博
2. 発表標題 原腸胚の胚葉形成を可視化するレポーターマウスの作製
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	村田 知弥 (Murata Kazuya) (60713485)	筑波大学・医学医療系・助教 (12102)	分担：令和元年度
研究分担者	新美 君枝 (Niimi Kimie) (10584534)	国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・ 専門職研究員 (82401)	分担：令和元年度
研究分担者	水野 聖哉 (Mizuno Seiya) (10633141)	筑波大学・医学医療系・助教 (12102)	分担：平成29・30年度
研究分担者	高橋 英機 (Takahashi Eiki) (40446521)	国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・ 副部門長 (82401)	分担：平成29・30年度
研究協力者	鈴木 颯 (Suzuki Hayate)		