

令和 2 年 5 月 13 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08135

研究課題名(和文) In vivoの状態を忠実に反映した高品質な新型ES・iPS細胞の樹立

研究課題名(英文) Establishment of high-quality novel ES / iPS cells that precisely reflect the in vivo state

研究代表者

築山 智之 (TSUKIYAMA, Tomoyuki)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・特任准教授

研究者番号：60612132

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)： In vivoの状態を忠実に反映した高品質な新型ヒトおよびカニクイザルES・iPS細胞を樹立するためのレポーターを作製し、カニクイザルES細胞へのレポーターノックインを行った。この過程で、実験初心者でも容易に培養できるよう工夫したレポーター入りのカニクイザルES細胞株を樹立した。また、狙った標的部位に変異を持つノックアウトカニクイザルの作出を試み、常染色体優性多発性嚢胞腎(ADPKD)の主要な原因遺伝子であるPKD1遺伝子を欠損した遺伝子改変個体の作出に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実験初心者でも容易に培養できるよう工夫したレポーター入りのカニクイザルES細胞株が樹立できたことで、今までサルES細胞を用いたことがない研究者でもサルES細胞を用いた研究がよりやりやすくなり研究の裾野を広げられると考えられる。

また、カニクイザルにおいて疾患モデルを作出することにより、マウスなどの小動物を用いた従来の疾患モデルよりも正確にヒトにおける病態を再現できることを示した。作製されたサルモデルは新しい治療戦略を確立するための技術基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)： We generated reporters for establishing high-quality novel human and cynomolgus monkey ES / iPS cells that precisely reflect the in vivo state, and performed reporter knock-in on cynomolgus monkey ES cells. In this process, we established a cynomolgus monkey ES cell line with a reporter, which was manipulated so that even beginners could easily culture it. We also attempted to create a knockout cynomolgus monkey with a mutation at the targeted site, and succeeded in creating a genetically modified monkeys that lacked the PKD1 gene, which is the major causative gene of autosomal dominant polycystic kidney disease (ADPKD).

研究分野：生殖・幹細胞生物学

キーワード：iPS細胞 ES細胞 カニクイザル 霊長類 ゲノム編集 CRISPR/Cas9

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトにおいて iPS 細胞が樹立され、再生医療の実現が現実味を帯びてきているが、ヒト ES・iPS 細胞の品質は、マウス ES・iPS 細胞のそれと比べて低いという問題が依然としてある。結果、樹立する手法、機関、樹立者によって品質に大きな偏りが発生し、細胞株間において分化能に差が生じてしまい、臨床に向けた研究における大きな障害となっている。

マウスとヒトにおける多能性幹細胞の能力の差は、それぞれが対応する生体内での発生段階の違いに起因していると考えられている。エピプラスト幹細胞 (EpiSC) の樹立により、そのコロニー形態や遺伝子発現パターンの類似から、ヒトの多能性幹細胞は、胚盤胞期胚内部細胞塊 (ICM) よりさらに一段階進んだ発生段階であるエピプラストに対応し、bFGF / Activin A 経路に増殖を依存している“Primed な”状態にあるのに対し、マウスやラットなどの齧歯類の多能性幹細胞は、より未分化な内部細胞塊の発生段階に対応し、LIF 経路あるいは MEK および GSK3 阻害剤 (2i or 3i) によって多能性が維持されている“Naïve な”状態あるいは最も未分化な“Ground state”(多能性の基底状態)にあると考えられてきた。

なお、ヒト多能性幹細胞の不均一性に加え、培養の煩雑さ、不安定さ、増殖の遅さ、遺伝子導入の難しさもこの問題に起因していると考えられ、ブタ、サル等の大型哺乳動物を用いた医用モデル動物の作出、それを応用した前臨床試験の実施も同一の理由により困難であるのが実情である。

そこで、“Primed な”状態にあるヒトの ES・iPS 細胞をマウス型に変換する、もしくはマウス型のヒト ES・iPS 細胞を直接樹立する“Naïve 化”が多能性幹細胞研究における一つのトピックとなっている。しかし、樹立した細胞株が実際にマウス型の能力を持っているか判定するためにはキメラ貢献能および生殖細胞寄与能を持つことを示すことが究極的には求められるため、倫理的、技術的な理由から前述の問題の解決には至っていない。

一方、マウス初期胚の詳細な遺伝子発現解析の結果、マウス ES 細胞は ICM よりもむしろ胎齢 4.5 日齢 (E4.5) の着床前エピプラストと似た発現を示すこと、カニクイザル胚における single-cell RNA-Seq を用いた発現データベースの構築により、カニクイザル ES 細胞やヒト ES 細胞は従来考えられていたよりも発生後期の着床後期 E16-17 エピプラストと似た発現様式を持つことが明らかになり、従来の Naïve、Primed の概念の再構築の必要性が指摘されてきた。

2. 研究の目的

本研究では、ヒトのモデル動物としてカニクイザルを用い、近年新たなゲノム編集技術として注目を浴びている CRISPR/Cas9 システムを応用したレポーターシステムを駆使することによって、“Naïve”という概念にこだわることなく、より in vivo に近い状態を反映した高品質なカニクイザル ES・iPS 細胞を樹立し、ヒトでは不可能なキメラ実験を通してその品質を評価することで高品質なヒト ES・iPS 細胞の樹立に繋げることを目的とした。

前述の研究の結果、現状のカニクイザル ES 細胞およびヒト ES 細胞は、マウス E5.5-6.5 に対応する着床後期 E16-17 エピプラストに対応しており、エピプラスト幹細胞とも異なる状態にあることが分かっている一方、カニクイザルエピプラストは着床後、長期に渡ってほとんど遺伝子発現パターンが変わらないことから、安定的に未分化状態を維持するメカニズムの存在が示唆されている。この研究で得られた情報を駆使し、カニクイザルエピプラストの未分化維持メカニズムを解明し、マウス E4.5 エピプラストに対応すると考えられるカニクイザル E10-12 エピプラストに相当する新型の多能性幹細胞を樹立・選抜しようと考えた。

また、カニクイザルに CRISPR/Cas9 システムを応用するにあたり、狙った標的部位に変異を持つノックアウトカニクイザルの作出が可能か明らかにしようと考えた。このため、最も頻度の高い遺伝的腎疾患であるにも関わらず、決定的な治療法は存在しない常染色体優性多発性嚢胞腎 (ADPKD) の主要な原因遺伝子である Pkd1 遺伝子を標的とし、ノックアウトカニクイザルの作出を試みた。

3. 研究の方法

(1) In vivo の状態を忠実に反映した高品質な新型多能性幹細胞を選抜するためのレポーター系の構築

高い精度のレポーター系を構築するため、CRISPR / Cas9 システムを駆使して、複数の組み合わせの多能性レポーターを持つカニクイザル ES 細胞および iPS 細胞を作製した。

京都大学斎藤通紀研究室との共同研究によって構築された、カニクイザル胚における single-cell RNA-Seq の発現データベースの情報を用い、in vivo の状態を忠実に反映した多能性幹細胞を樹立・選抜するためのレポーターに有用な遺伝子を複数同定し、それら複数の候補についてベクターを構築した。これらのレポーターを組み合わせることにより、非常に高品質な多能性幹細胞の樹立を目指した。

また、リプログラミング因子を、人為的に発現制御可能な遺伝子強制発現系を用いて導入し、

導入遺伝子依存的に高品質化された多能性幹細胞を樹立できるか検討するために、TET-ON system の Transactivator を同一ベクターに含む第3世代 TET-ON piggyBac ベクターを構築した。

(2) CRISPR/Cas9 システムによるノックアウトカニクイザルの作出

狙った標的部位に変異を持つノックアウトカニクイザルの作出が可能か明らかにするために、常染色体優性多発性嚢胞腎 (ADPKD) の主要な原因遺伝子である Pkd1 遺伝子を標的とし、CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウトカニクイザルの作出を試みた。

4. 研究成果

(1) In vivo の状態を忠実に反映した高品質な新型多能性幹細胞を選抜するためのレポーター系の構築

In vivo の状態を忠実に反映した高品質な新型ヒトおよびカニクイザル ES・iPS 細胞を樹立するためのレポーターを作製し、カニクイザル ES 細胞へのレポーターノックインを行った。カニクイザル胚における single-cell RNA-Seq の発現データベースの情報を用い、in vivo の状態を忠実に反映した多能性幹細胞を樹立・選抜するためのレポーターに有用な遺伝子を 4 つ同定した。これまでに、これらのレポーターを単独、あるいは組み合わせてノックインしたカニクイザル ES 細胞を樹立した。

また、この過程で、新たに樹立したカニクイザル ES 細胞株 (Seita Y., Tsukiyama T. et al., Biology of Reproduction)、ならびに実験初心者でも容易に培養できるよう工夫したレポーター入りのカニクイザル ES 細胞株 (Kobayashi K., Tsukiyama T. et al., Stem Cell Research) を樹立し、それぞれ論文として報告した。

(2) CRISPR/Cas9 システムによるノックアウトカニクイザルの作出

狙った標的部位に変異を持つノックアウトカニクイザルの作出を試み、常染色体優性多発性嚢胞腎 (ADPKD) の主要な原因遺伝子である PKD1 遺伝子を欠損した遺伝子改変個体の作出に成功した (図1)。分子生物学的手法により、全頭において変異導入を確認した上、流産胎仔ならびに生存産仔を詳細に解析した結果、腎臓、肝臓、膵臓における嚢胞発生を確認した。



図1. 本研究で作出した ADPKD モデルカニクイザル

また、従来のマウスを用いた疾患モデルでは再現ができなかった幼若期からの嚢胞形成も確認された (図2)。ADPKD は、世界中に約 600 万人の患者がいると言われているにも関わらず、げっ歯類などの小動物モデルでは、ヘテロ接合体では腎臓において嚢胞発生がほとんど見られず、ヒトの病態を正確に再現することができない。よって、発症前の段階における嚢胞発生と拡大の根底をなすキーとなる病態進行プロセスはよく分かっていなかった。この結果より、カニクイザルにおいて疾患モデルを作出することにより、マウスなどの小動物を用いた従来の疾患モデルよりも正確にヒトにおける病態を再現できることが示された。

さらに、選択的アレルターゲティングによるヘテロ変異サルの効率的作出や、Floxed allele ノックインサル胚の作出に世界で初めて成功し、これらの成果を論文として報告した (Tsukiyama T., Kobayashi K., Nakaya M. et al., Nature Communications)。

ADPKD は、最も頻度の高い遺伝的腎疾患であるにも関わらず、決定的な治療法は存在しない。本研究で得られた成果により、今まで全く分かっていなかった病態形成の最初期の状態を明らかにすることができた。これにより、従来治療標的とされてきた腎の集合管ではなく、遠位尿管を標的とする新規薬剤の開発への道が拓かれるのみならず、作製されたサルモデルは新しい治療戦略を確立するための技術基盤となることが期待され、今後、ADPKD の研究が飛躍的に進展する可能性があると考えられる。

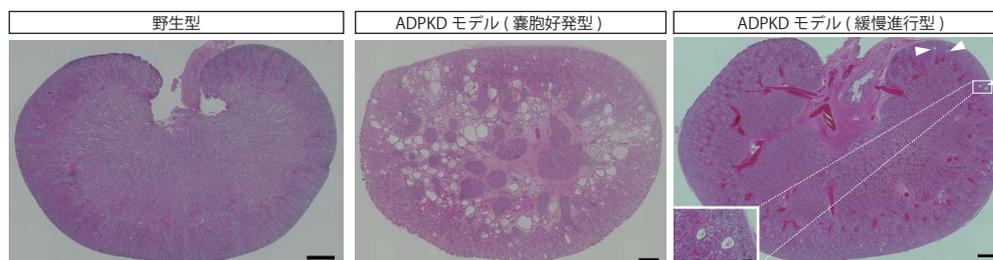


図2. ADPKD モデルカニクイザル腎臓における嚢胞形成

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Seita Y., Morimura T., Watanabe N., Iwatani C., Tsuchiya H., Nakamura S., Suzuki T., Yanagisawa D., Tsukiyama T., Nakaya M., Okamura E., Muto M., Ema M., Nishimura M., and Tooyama I.	4. 巻 -
2. 論文標題 Generation of Transgenic Cynomolgus Monkeys Overexpressing the Gene for Amyloid- Precursor Protein	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3233/JAD-191081	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 -
1. 著者名 Tsukiyama T. *, #, Kobayashi K. #, Nakaya M. #, Iwatani C., Seita Y., Tsuchiya H., Matsushita J., Kitajima K., Kawamoto I., Nakagawa T., Fukuda K., Iwakiri T., Izumi H., Itagaki I., Kume S., Maegawa H., Nishinakamura R., Nishio S., Nakamura S., Kawauchi A., and Ema M. *	4. 巻 10
2. 論文標題 Monkeys mutant for PKD1 recapitulate human autosomal dominant polycystic kidney disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 5517
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-13398-6	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 -
1. 著者名 Sakai Y., Nakamura T., Okamoto I., Gyobu-Motani S., Ohta H., Yabuta Y., Tsukiyama T., Iwatani C., Tsuchiya H., Ema M., Morizane A., Takahashi J., Yamamoto T., and Saitou M.	4. 巻 102
2. 論文標題 Induction of the germ cell fate from pluripotent stem cells in cynomolgus monkeys†	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 620 ~ 638
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/biolre/iox205	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 -
1. 著者名 Kobayashi K. #, Tsukiyama T. *, #, Nakaya M., Kageyama S., Tomita K., Murai R., Yoshida T., Narita M., Kawauchi A., and Ema M. *	4. 巻 37
2. 論文標題 Generation of an OCT3/4 reporter cynomolgus monkey ES cell line using CRISPR/Cas9	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 101439 ~ 101439
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2019.101439	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 -

1. 著者名 Seita Y., Tsukiyama T., Azami T., Kobayashi K., Iwatani C., Tsuchiya H., Nakaya M., Tanabe H., Hitoshi S., Miyoshi H., Nakamura S., Kawauchi A., and Ema M.	4. 巻 100
2. 論文標題 Comprehensive evaluation of ubiquitous promoters suitable for the generation of transgenic cynomolgus monkeys†	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biology of Reproduction	6. 最初と最後の頁 1440 ~ 1452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/biolre/ioz040	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 -

1. 著者名 Watanabe C., Matsushita J., Azami T., Tsukiyama-Fujii S., Tsukiyama T., Mizuno S., Takahashi S., and Ema M.	4. 巻 14
2. 論文標題 Generating Vegfr3 reporter transgenic mouse expressing membrane-tagged Venus for visualization of VEGFR3 expression in vascular and lymphatic endothelial cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0210060
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0210060	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 -

1. 著者名 Honda Arata, Chojookhuu Narantsog, Izu Haruna, Kawano Yoshihiro, Inokuchi Mizuho, Honsho Kimiko, Lee Ah-Reum, Nabekura Hiroki, Ohta Hiroshi, Tsukiyama Tomoyuki, Ohinata Yasuhide, Kuroiwa Asato, Hishikawa Yoshitaka, Saitou Mitinori, Jogahara Takamichi, Koshimoto Chihiro	4. 巻 3
2. 論文標題 Flexible adaptation of male germ cells from female iPSCs of endangered Tokudaia osimensis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 e1602179
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.1602179	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8件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Tsukiyama T.
2. 発表標題 Disease modeling in cynomolgus monkeys using CRISPR/Cas9.
3. 学会等名 日本発生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 築山 智之
2. 発表標題 CRISPR/Cas9を用いたカニクイザルにおける疾患モデリング
3. 学会等名 日本マーモセット研究会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林 憲市, 築山 智之, 影山 進, 岩谷 千鶴, 福田 浩司, 岩切 哲平, 和泉 博之, 中村 紳一朗, 依馬 正次, 河内 明宏
2. 発表標題 カニクイザルを用いた遺伝性腎疾患動物モデルの作製
3. 学会等名 日本泌尿器科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 依馬 正次, 築山 智之, 小林 憲市, 和泉 博之, 河内 明宏
2. 発表標題 CRISPR/Cas9を用いたADPKDモデルカニクイザルの作出と解析
3. 学会等名 日本腎臓学会東部学術大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 築山 智之, 小林 憲市, 中家 雅隆, 岩谷 千鶴, 土屋 英明, 清田 弥寿成, 松下 淳, 北嶋 郁, 河本 育士, 中川 孝博, 福田 浩司, 岩切 哲平, 和泉 博之, 板垣 伊織, 中村 紳一朗, 河内 明宏, 依馬 正次
2. 発表標題 CRISPR/Cas9を用いた遺伝性腎疾患モデルカニクイザルの作出
3. 学会等名 日本分子生物学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsukiyama T., Kobayashi K., Iwatani C., Tsuchiya H., Seita Y., Matsushita J., Kitajima K., Kawamoto I., Nakagawa T., Fukuda K., Iwakiri T., Izumi H., Itagaki I., Nakamura S., Kawauchi A. and Ema M.
2. 発表標題 Disease modeling in cynomolgus monkeys using CRISPR/Cas9 injection into ICSI embryos
3. 学会等名 4th World Congress of Reproductive Biology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 築山 智之
2. 発表標題 CRISPR/Cas9を用いた疾患モデルカニクイザルの作出
3. 学会等名 関西血管生物研究会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 築山 智之, 小林 憲市, 岩谷 千鶴, 土屋 英明, 清田 弥寿成, 松下 淳, 北嶋 郁, 河本 育士, 中川 孝博, 福田 浩司, 岩切 哲平, 和泉 博之, 板垣 伊織, 中村 紳一郎, 河内 明宏, 依馬 正次
2. 発表標題 CRISPR/Cas9を用いた疾患モデルカニクイザルの作出
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017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
--	---------------------------	-----------------------	----