

機関番号：14301
研究種目：国際共同研究加速基金（帰国発展研究）
研究期間：2018～2020
課題番号：17K20146
研究課題名（和文）CRISPR スクリーニングを用いたヒト iPS 細胞の内胚葉系分化機構の解明
研究課題名（英文）Analysis of human iPSC differentiation into definitive endoderm using CRISPR screening
研究代表者
遊佐 宏介 (YUSA, Kosuke)
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授
研究者番号：00813180
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）45,000,000 円

研究成果の概要（和文）：ヒト多能性幹細胞(iPS/ES 細胞)の可能性を最大限発揮するためには、各種分化において高効率かつ高品質に目的細胞を作製することが欠かせない。しかし、分化効率には細胞株差や株ごとの分化指向性が認められ、個別に最適化が必要となり、効率的な研究またはヒト多能性幹細胞の使用において障壁となる。本研究では、内胚葉分化、特に胚性内胚葉分化に着目し、CRISPR スクリーニング法を用いて関連遺伝子を同定した。このうち、細胞分化を阻害する因子の機能を抑制することで、幅広い多能性幹細胞株において分化誘導が大幅に上昇する結果を得た。さらに開発を継続することで、新たな分化法の開発に結びつく成果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに複数の大型プロジェクトによって正常および患者由来ヒト iPS 細胞が作製されている。またヒト ES 細胞株も多数存在する。このようなヒト多能性幹細胞の応用例として、培養容器上で細胞分化を行って病気を再現し、メカニズム解明や治療法探索があげられる。しかし、提供者が異なる iPS 細胞は分化効率の差が大きく、応用研究の障壁となっている。本研究は、この障壁の原因となる候補因子をゲノム編集技術を用いた遺伝子スクリーニングによって同定した。より効率が良く高品質な分化細胞を得るための分化法の開発につながり、今後のヒト多能性幹細胞を用いた研究への応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：It has been known that there is substantial heterogeneity of differentiation preference among human pluripotent stem cell (hPSC) lines. Highly efficient differentiation is prerequisite for the usage of hPSCs in various applications such as in vitro disease modeling and cell-based therapy; however, the heterogeneity can limit the potential of hPSC lines. The current study aimed to address this issue by identifying factors that affect hPSC differentiation, particularly into definitive endoderm (DE). We conducted CRISPR screening and identified several differentiation blocker candidates. Genetic inactivation of these factors increased DE differentiation in multiple hPSC lines. The molecular basis of this effect remains elusive, but our findings may generate an efficient differentiation protocol applicable for a wide range of hPSC lines.

研究分野： 幹細胞生物学、遺伝学

キーワード： ヒト ES 細胞、ヒト iPS 細胞、分化、胚性内胚葉、CRISPR スクリーニング

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ヒト ES/iPS 細胞はこれまで様々なプロジェクトの元で、研究用または臨床グレードの細胞が作製され、世界中でバンク化され供給されている。これらのヒト ES/iPS 細胞は臨床応用が考えられている細胞治療における移植用細胞の供給源としてだけでなく、*in vitro* 病態モデルとしてその分子メカニズムの解析また治療薬の網羅的スクリーニングプラットフォームとして、またゲノム改変を通してヒト発生等の基礎研究に幅広く用いられている。ヒト ES/iPS 細胞の応用には細胞を標的細胞種へと分化させる必要があり、主にマウス発生学から得られた知見を元にサイトカインや阻害剤を組み合わせた様々な分化プロトコールが作成されてきた。詳細に各因子の処理濃度、時間、タイミングを検討することでより分化効率の改善が行われ、新しい分化プロトコールが作成されている。しかし、様々なドナーより作製されるヒト ES/iPS 細胞は遺伝的背景が異なるため、細胞分化の効率が株間で著しく異なることが知られており、特に内胚葉系細胞の分化で顕著に見られる。低い分化効率は、細胞治療製品の質の不安定性や製造コストの上昇、そして細胞バンクの有用性の低下を招くため、ES/iPS 細胞バンクの再生医療分野での幅広い運用に向けた課題の一つである。細胞株間の分化効率の差を生む分子基盤の理解とその解決により、多くのヒト ES/iPS 細胞株に適用できる普遍的な分化プロトコールを作成することが、これらの課題克服に必須である。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト ES/iPS 細胞の細胞株間の分化効率の差あるいは分化指向性の分子メカニズムを解明し、様々なヒト ES/iPS 細胞に適用できる分化プロトコールの作成を目指す。これにより、ヒト ES/iPS 細胞バンクの細胞株をより有効に利用することができ、研究あるいは臨床応用に貢献するものと期待される。

3. 研究の方法

研究代表者は、ほ乳類培養細胞における網羅的遺伝子探索法として 2014 年にゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 システムを応用した CRISPR スクリーニング法を開発し、培養細胞における効率的な順遺伝学的手法を世界に先駆けて確立した (文献 1)。さらに独自に技術改良を実施し作製した CRISPR ライブラリーは、がん細胞における治療標的や治療耐性機構の解明、またマウス ES 細胞の分化機構の解明に応用し成果を上げてきた (文献 2-4)。

本研究においては、ヒト iPS 細胞の内胚葉分化に影響を及ぼす因子を CRISPR スクリーニング法を用いて同定する。まず、ヒト iPS 細胞プロジェクトで作製された複数の細胞株の胚性内胚葉 (Definitive endoderm, DE) への分化効率を CXCR4 の発現をマーカーに調べ、効率の低い細胞株をスクリーニングの対象として選別する。次に Cas9 を構成的発現させ、CRISPR ライブラリーを導入、DE に分化誘導後、CXCR4-high と-low の分画をセルソーターで分取し、NGS および統計解析により候補遺伝子を見出す。候補遺伝子を標的としたガイド RNA を個別に作製し、DE 分化に及ぼす影響をそれぞれ解析し、より分化効率に与える影響の大きい因子を選択し、阻害剤が利用可能な場合はその効果も検証する。これらの因子が得られれば、その分子メカニズムの解明を目指し、新規分化プロトコールとして応用する。

4. 研究成果

Human Pluripotent Cell Initiative (HipSci) の元で作製された 711 iPS 細胞株は、各々の細胞株で三胚葉への分化効率が解析されている (文献 5)。この中から DE への分化効率が高い株と低い株を 11 株選び、個別に再検定して、3 株を分化効率の低い株としてスクリーニング対象株とした。Cas9 発現は、それまでに実施したヒト iPS 細胞での未分化能に関するスクリーニングで使用したターゲティングベクターを用い、対象のヒト iPS 細胞株へ導入した。こうして導入した Cas9 は DE より先に細胞分化を進めると発現抑制することが見出されたため、将来の分化後の細胞を用いた遺伝子スクリーニングを見据え、Cas9 安定発現のために GAPDH と T2A を介して融合させる手法を確立した。ここでは同時に CRISPR-i システムの構築も行い、既報の dCas9-KRAB-MeCP2 をさらに改良した dCas9 コンストラクトを GAPDH に組み込んだ。樹立した CRISPR-i ヒト iPS 細胞は非常に高い遺伝子発現効率を示し、single-cell CRISPR スクリーニングに応用中である。

選択した 3 iPS 細胞株を用いて CRISPR ライブラリーの導入効率を検定した結果、1 細胞株においてのみスクリーニング実施要件を満たしたため、スクリーニングはこの 1 株で実施することとした。分化プロトコールのスケールアップを検討し、スクリーニングを実施した。

統計解析の結果、DE 分化に対し、正にあるいは負に働く複数の遺伝子を見出した。正に働く因子、つまり分化必須遺伝子には Activin のレセプターおよび下流因子 (ACVR1B, SMAD2, SMAD3, FOXH1) や内胚葉分化に必須あるいは関与が報告された転写因子 (SOX17, FOXA2) があり、DE 分化スクリーニングが機能していることが示された。この他にも多くのエピジェネティクス関連因子も見られた。次に、負に働く因子、つまり分化抑制遺伝子には、最近同様の DE

スクリーニングを SOX17 の発現を指標に実施した論文 (文献 6) で報告された ARID1A, CCDC6 や JNK 経路因子 (MAP3K1, MAP2K4, MAP2K7) が見出された。この他、TGF ベータ伝達系分子 (ACVR1, ACVR2A, SMAD1, SMAD5) や転写因子 (SOX4, SOX11)、また複数のエピジェネティクス関連因子も見出された。

これらヒット遺伝子のうち、分化抑制遺伝子は機能抑制

することで、分化効率の改善が期待できる非常に有用な遺伝子である。実際、文献 6 において JNK の阻害剤を DE 分化プロトコールに加えることで DE への分化効率が改善し、その後の膵臓や肺の前駆細胞への分化効率も上昇することが示されている。今回、新たに同定された遺伝子を CRISPR システムを用いて個別にノックアウトし DE 分化へ与える影響を解析したところ、ほぼ全ての候補遺伝子で程度に差はあるものの分化改善が見られた (図 1)。

今回得られた分化抑制遺伝子には、すでに高品質の阻害剤が利用できる遺伝子もあり、今後、既存の分化プロトコールと複数の阻害剤を組み合わせることで、分化効率を飛躍的に向上させることができると期待される。現在のところ、DE 分化にのみ焦点を当てていることから、さらに内胚葉系細胞 (膵臓、肝臓、肺、腸) へ分化させ、各々の機能を検証することも必要であると考えられる。これらが検証されれば、効率の高い内胚葉分化プロトコールとして幅広く利用されると期待される。また、今回、iPSC から DE への一段階分化におけるスクリーニングで複数の遺伝子を同定することができたことから、DE に続く分化段階に CRISPR スクリーニングを適用することで各段階における正および負に作用する遺伝子を同定できると考えられる。これらの機能制御を通して最終分化に至る各段階の改善を行うことが可能であると期待される。

今後、候補遺伝子の中から、複数のヒト多能性幹細胞に同様に効果のある遺伝子を絞り込む必要がある。その遺伝子が分化に関わる分子メカニズムを明らかとし、論文発表を行う予定である。

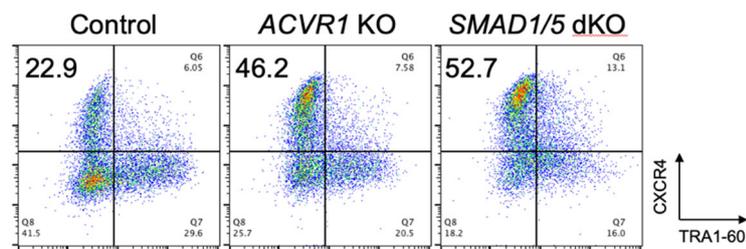


図 1. ヒット遺伝子の破壊細胞における DE 分化の分化効率上昇
コントロールに比べ、*ACVR1* や *SMAD1/5* 破壊細胞では CXCR4 陽性/TRA1-60 陰性をマーカーとした DE 分化解析において 2 倍以上の分化効率改善が確認された。

<引用文献>

1. Koike-Yusa H, Li Y, Tan EP, Velasco-Herrera MD, Yusa K. Genome-wide recessive genetic screening in mammalian cells with a lentiviral CRISPR-guide RNA library. *Nature Biotechnol.* 32:267-273 (2014)
2. Tzelepis K, Koike-Yusa H, De Braekeller E, Li Y, Metzakopian E, Dovey OM, Mupo A, Grinkevich V, Li M, Mazan M, Gozecka M, Ohnishi S, Cooper J, Patel M, McKerrell T, Chen B, Domingues AF, Gallipoli P, Teichmann S, Ponstingl H, McDermott U, Saez-Rodriguez J, Huntly BJ, Iorio F, Pina C, Vassiliou GS, Yusa K. A CRISPR Dropout Screen Identifies Genetic Vulnerabilities and Therapeutic Targets in Acute Myeloid Leukemia. *Cell Reports* 17:1993-1205 (2016)
3. Behan FM, Iorio F, Picco G, Goncalves E, Beaver CM, Migliardi G, Santos R, Rao Y, Sassi F, Pinnelli M, Ansari R, Harper S, Jackson DA, McRae R, Pooley R, Wilkinson P, Meer D, Dow D, Buser-Doepner C, Bertotti A, Trusolino L, Stronach EA, Saez-Rodriguez J, Yusa K, Garnett MJ. Prioritisation of oncology therapeutic targets using CRISPR-Cas9 screening. *Nature* 568:511-516 (2019)
4. Li M, Yu JSL, Tilgner K, Ong SH, Koike-Yusa H, Yusa K (corresponding). Genome-wide CRISPR-KO screen uncovers mTORC1-mediated GSK3 regulation in naïve pluripotency maintenance and Dissolution. *Cell Reports* 24:489 (2018)
5. Kilpinen H, Goncalves A, Leha A, Afzal V, Alasoo K, Ashford S, Bala S, Bensaddek D, Casale FP, Culley OJ, Danecek P, Faulconbridge A, Harrison PW, Kathuria A, McCarthy D, McCarthy SA, Meleckyte R, Memari Y, Moens N, Soares F, Mann A, Streeter I, Agu CA, Alderton A, Nelson R, Harper S, Patel M, White A, Patel SR, Clarke L, Halai R, Kirton CM, Kolb-Kokocinski A, Beales P, Birney E, Danovi D, Lamond AI, Ouwehand WH, Vallier L, Watt FM, Durbin R, Stegle O, Jaffney DA. Common genetic variation drives molecular heterogeneity in human iPSCs. *Nature* 546: 370-375 (2017)
6. Li QV, Dixon G, Verma N, Rosen BP, Gordillo M, Luo R, Xu C, Wang Q, Soh CL, Yang D, Crespo M, Shukla A, Xiang Q, Dundar F, Zumbo P, Witkin M, Koche R, Betel D, Chen S, Massague J, Garippa R, Evans T, Beer MA, Huangfu D. Genome-scale screens identify JNK-JUN signaling as a barrier for pluripotency exit and endoderm differentiation. *Nat. Genet.* 51:999-1010 (2019)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

- ①Gonçalves E, Thomas M, Behan FM, Picco G, Pacini C, Allen F, Vinceti A, Sharma M, Jackson DA, Price S, Beaver CM, Dovey O, Parry-Smith D, Iorio F, Parts L, Yusa K, Garnett MJ. Minimal genome-wide human CRISPR-Cas9 library. *Genome Biology* 22: 49 (2021) 査読あり doi: 10.1186/s13059-021-02268-4.
- ②Au YZ, Gu M, De Braekeleer E, Gozdecka M, Aspris D, Tarumoto Y, Cooper J, Yu J, Ong SH, Chen X, Tzelepis K, Huntly BJP, Vassiliou G, Yusa K. KAT7 is a genetic vulnerability of acute myeloid leukemias driven by MLL rearrangements. *Leukemia* 35:1012-1022 (2021) 査読あり doi: 10.1038/s41375-020-1001-z.
- ③Thompson O, von Meyenn F, Hewitt Z, Alexander J, Wood A, Weightman R, Gregory S, Krueger F, Andrews S, Barbaric I, Gokhale PJ, Moore HD, Reik W, Milo M, Nik-Zainal S, Yusa K, Andrews PW. Low rates of mutation in clinical grade human pluripotent stem cells under different culture conditions. *Nature Commun.* 11:1528 (2020) 査読あり doi: 10.1038/s41467-020-15271-3.

[学会発表] (計 11 件)

- ①遊佐宏介、CRISPR-KO スクリーニングの開発とがん研究への応用、日本癌学会、2020
- ②遊佐宏介、CRISPR-KO スクリーニングの開発と創薬研究への応用、千里ライフサイエンスセミナー、2020
- ③遊佐宏介、CRISPR-KO スクリーニングの開発と応用、日本分子生物学会、2020
- ④遊佐宏介、CRISPR-KO スクリーニング法の開発と応用、日本ゲノム編集学会、2019
- ⑤遊佐宏介、CRISPR-KO スクリーニング法の開発と応用、日本遺伝学会、2019
- ⑥遊佐宏介、Development and application of CRISPR-KO screening, Scottish Universities Life Science Alliance, 2019
- ⑦遊佐宏介、CRISPR-KO スクリーニング法の開発と応用、Frontiers in Genome Editing, 2019
- ⑧遊佐宏介、大規模全ゲノム CRISPR スクリーニングによる創薬候補の探索、日本分子生物学会、2018
- ⑨遊佐宏介、Oncology drug candidates identified from genome-wide CRISPR screens of 204 cancer cell lines、日本癌学会、2018
- ⑩遊佐宏介、Identification of novel drug targets using CRISPR screens in cancer、国立遺伝学研究所国際シンポジウム、2018
- ⑪遊佐宏介、CRISPR-based genetic screening、Croucher Summer Course Precision Genome Engineering by CRISPR、2018

[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：
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：
国内外の別：

様 式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/research/lab40/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：該当なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：該当なし

ローマ字氏名：