

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659180

研究課題名(和文) ホモ変異体 ES 細胞バンクを用いた奇形腫形成を起こさない変異体の単離と解析

研究課題名(英文) Isolation and analysis of mutants that do not form teratoma using homo-mutagenized mouse ES cell library

研究代表者

吉村 康秀 (Yoshimura, Yasuhide)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60263307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000 円、(間接経費) 900,000 円

研究成果の概要(和文)：我々はマウスES細胞においてバーコードを有するホモ変異体ライブラリーを作製した。ライブラリーを用いた *in vitro* の実験系において紫外線や酸化損傷に対する感受性に関して検定を行いライブラリーの有効性を検証した。ライブラリーに対し損傷を与えて培養した後に、ゲノムDNAを抽出し次世代シーケンサーのリード数で細胞数を検出した。その結果、特に酸化損傷において複数の lincRNA を有する細胞が残存していた。我々は、分化実験においてライブラリー中に中胚葉分化が阻害される変異体を見出しており、今後これをマーカーとして *in vivo* におけるテラトーマ形成による分化を起こさない変異体の解析に繋げてゆく。

研究成果の概要(英文)：We established the homo-mutagenized mouse ES cell library labeled with retrovirus. Two sets of 60-mer barcode are introduced into the retrovirus vector and enable to estimate the cell number by counting of the barcode sequence. First we checked the accuracy of this system by counting the read number of barcode of each mutant. This read number is almost coincident with the proliferation speed that we got in advance. By using this system, we isolated some mutant of lincRNA *in vitro*. We isolated a mutant that had deficiency for differentiation to mesoblast. Using this clone as a marker, we will try to isolate the noble mutant that is not able to form teratoma. Analysis for the clone might lead to the answer how to prevent oncogenesis of implanted iPS cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 実験病理学

キーワード：再生医学 テラトーマ

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞において移植細胞の腫瘍化は、c-Myc 等がん遺伝子の影響によるものと、その多分化能ゆえの奇形腫形成に分けられる。特定の細胞種に分化させた iPS 細胞の奇形腫形成は、混在している未分化細胞が原因と考えられている (Miura et al., Nature Biotechnology 27:743-745, 2009)。がん遺伝子の影響に関しては、プラスミドベクターや microRNA によるリプログラミング方法の開発などにより改善されてきている。一方で、混在する未分化細胞の奇形腫形成抑制という観点からの網羅的かつ体系的な解析は手付かず、というのが現状であった。ホモ変異体 ES 細胞の単離を可能にした我々の手法で (Nature Methods doi:10.1038/nmeth.1739)、当初、我々は既に約 2,000 株のヘテロ変異体、約 250 株のホモ変異体を取得済みであった。プロモータートラップ法により変異体を得ているため、ライブラリー中には多くの詳細な機能が分かっていない遺伝子の変異体も多く、これらの中に未知の機能を持つ遺伝子がある事が期待された。

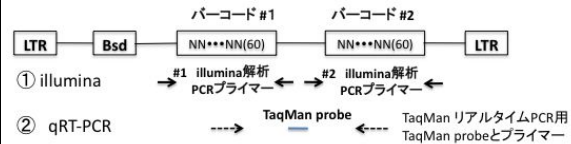
さらに我々は、60 塩基のランダムな配列 (バーコード) を 2 セット持つレトロウイルスベクターを開発しており、個々の変異体をラベルし、pool する事により、多数の変異体を同時に解析する事を可能にしていた。これらを組み合わせ、奇形腫形成のキーファクターを捉えられれば、再生医療の可能性は大きく広がると考えられた。ES/iPS 細胞の奇形腫形成のキーファクターが単離できれば、その阻害剤の開発によって ES/iPS 細胞の医療応用への拡大が期待された。

2. 研究の目的

再生医療での ES/iPS 細胞の利用において、移植細胞の奇形腫形成は大きな問題である。その阻害剤の開発へ繋げるため、奇形腫形成のキーファクターを捉える。ホモ変異体 ES 細胞バンクの個々の変異体をバーコードでラベル、pool して奇形腫形成を行い、バーコード領域の定量により出現頻度が大きく下がる変異体を単離する。それらについて個別に奇形腫形成能を確認し、種々の分化誘導により分化能を調べる。奇形腫形成を起こさないうちながら何らかの分化能を示した変異体について、分化前後の遺伝子発現変化をマイクロアレイで調べる。変異体間の遺伝子発現の比較から、奇形腫形成と分化能の関連について体系的解析を行う。奇形腫形成のキーファクターやパスウェイが見つければ、その阻害剤の開発によって iPS 細胞の医療応用への拡大が期待された。

3. 研究の方法

ホモ変異体 ES 細胞バンクをバーコードでラベルし、*in vivo* における奇形腫形成を行い、分化誘導前と誘導後のゲノム DNA について、バーコード領域を PCR で増幅し、illumina 社の次世代シーケンサーにより各バーコードの出現頻度を定量する。



60塩基からなるバーコード配列が、各ベクターに2ユニットずつ配置されている。定量はilluminaとTaqManリアルタイムの2つを併用して行う。

2ユニットともを用いる事で定量性を高められる。Bsd: Blasticidin 耐性遺伝子

(バーコード概念図: レトロウイルスベクター中に 60 塩基 2 セットのランダムにオリゴ合成したバーコードを有している)

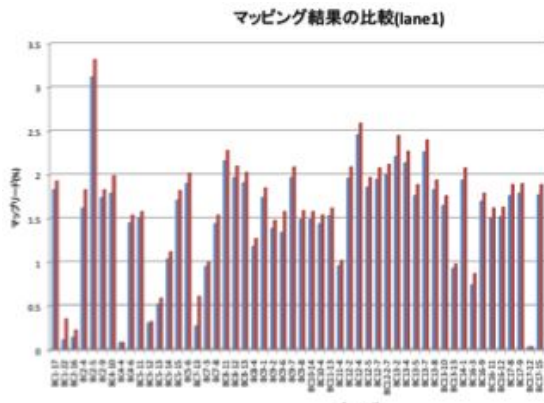
奇形腫形成後に著しく出現頻度の下がった変異体について、それぞれの奇形腫形成能を確認し、*in vitro* における肝細胞分化、心筋分化、神経系分化など、各分化実験を行う。何らかの分化を起こす変異体が単離されれば (多分化含め、複数の分化を起こす変異体を含む) それら変異体それぞれの分化過程を個別に観察すると同時に、分化前後での遺伝子発現変化をマイクロアレイで調べる。

同様の傾向を示す変異体を複数得ることにより、それらの分化前後の発現遺伝子解析に移行する。相互の比較により、共通して変動するパスウェイの探索など、バイオインフォマティクスを活用したより詳細な特定のパスウェイと、キーファクターに関する解析が可能となると考えられる。

4. 研究成果

ホモ変異体 ES 細胞バンクを、さらに有効に生かすのが本研究におけるバーコードの効果的な利用である。バーコードを用いた変異体のスクリーニング方法自体は、出芽酵母の変異体ライブラリーや、shRNA ライブラリーにおいて、その有用性は実証されている。今回申請の研究は、同様の実験系を、哺乳動物細胞の変異体においても可能にするものであった。これまでの手法では、変異 ES 細胞の識別はゲノム改変部位の配列に頼っており、個々の変異細胞ごとに異なる PCR primer が必要で、high-throughput 化が困難であった。本研究では、各変異にレトロウイルスで 60 塩基 2 セットのバーコードを導入してマークする。バーコードの検出にはバーコード両側の共通配列を PCR primer に用いるため、変異細胞を pool しても PCR による増幅が均一になり同時の解析が可能になるように設計した。さらにバーコードを 2 セット用いる事で定量性を高めていた。

我々が作製したホモ変異体マウス ES 細胞バンクを用いた変異体分離における定量性に関し、次世代シーケンサーを用いたバーコードのリード数の解析において細胞の増殖能を反映した結果を得る事ができ、系の定量性を確認し、本手法の有効性を確認した。

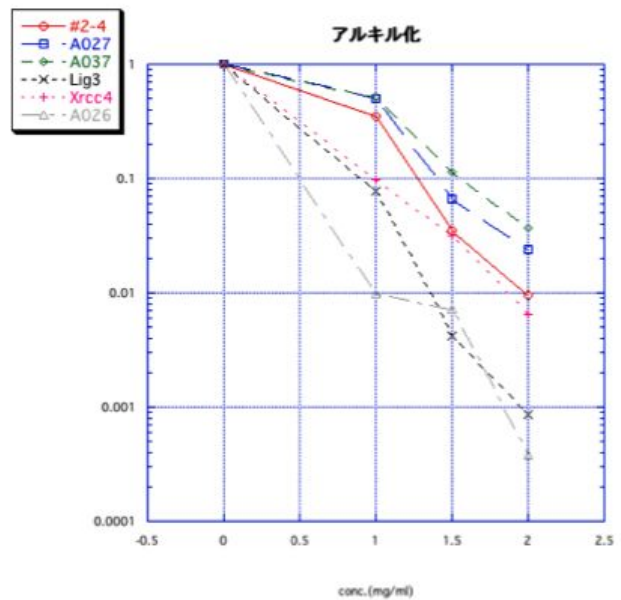


(バーコードラベルされた各変異体株のリード数。約9割についてリード数は揃っており系の有用性が担保された。リード数の少なかった変異体株については別個のバーコードでラベルする)

テラトーマ形成実験から得られるデータを正確かつ有効に活用するため、平成24年度は、まず *in vitro* の実験系において、約100種類 of ホモ変異体 ES 細胞の増殖能 (doubling time) を調べて4群に分類した。その上で次世代シーケンサーでその検出感度を測定した。この結果、それぞれのホモ変異体 ES 細胞の増殖能と、次世代シーケンサーで得られたリード数の相関が得られた。また約100種類 of ホモ変異体 ES 細胞の分化実験も平行して行い、外胚葉分化、中胚葉分化において異常を来す変異体候補を見出した。

平成25年度は、まずはこのライブラリーを用いた *in vitro* の実験系において、紫外線や酸化損傷に対する感受性に関して検定を行いライブラリーの有効性を検証した。ライブラリー中にはDNA損傷に関与する変異体が含まれていたため、ライブラリーの検証を行うには紫外線や酸化損傷に対する感受性が適当であると考えられた。ライブラリーに対し損傷を与えて適当な期間培養した後に、ゲノムDNAを抽出し次世代シーケンサーのリード数で残存する細胞数を検出した。その結果、特に酸化損傷において複数の lincRNA を有する細胞が残存していた。これらの lincRNA は酸化損傷に対して何らかの機能を持っている事が示唆された。

この次世代シーケンサーのリード数によるデータは、コントロールを含めた複数のホモ変異体6株を選んで別個に行った *in vitro* の培養実験において、コロニー数と細胞数を比較することによって確認した(下図参照)



(アルキル化損傷に対して特定の lincRNA ホモ変異体が耐性を示している)

また我々は、分化実験においてライブラリー中に中胚葉分化が阻害される変異体を見出しており、今後これをマーカーとして *in vivo* におけるテラトーマ形成による分化を起こさない変異体の解析に繋げてゆく

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 0 件)

[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
<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/mr-envi/www/japanese/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者
(吉村 康秀)

研究者番号：60263307

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
(堀江 恭二)

研究者番号：30333446