

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：14603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26640058

研究課題名(和文)細胞系譜除去マウスの網羅的作製とそのレスキュー

研究課題名(英文)Random but systematic establishment of the cell lineage-ablated mouse lines and their rescue

研究代表者

石田 靖雅 (Ishida, Yasumasa)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号：10221756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ジフテリア毒素(DT)遺伝子を用いた新型のプロモータートラップをマウスES細胞中で実行すると、分化した細胞で初めて発現が誘導される遺伝子がトラップされた場合にのみ実験が成立し、変異型細胞株が得られる。本研究では、そのようなES細胞をテトラプロイド胚に注入し、マウスを発生させ、DTが内在性遺伝子の制御下に発現されるために、特定の細胞系譜が除去されるマウスの作出を試みた。さらに、第二のES細胞をテトラプロイド胚に共注入し、マウスの表現型をレスキューすることを目指した。

研究成果の概要(英文)：When we perform gene-trapping experiments with mouse undifferentiated embryonic-stem (ES) cells by using a novel promoter-trapping strategy termed DTrap, in which the diphtheria-toxin (DT) gene is involved as a negative selectable marker, we are able to establish only the ES-cell clones whose transcriptionally silent genes had been trapped (disrupted). In the current research, we have tried to create the cell lineage-ablated mouse lines by performing complementation of mouse tetraploid embryos with such 'DTrapped' ES cells. We also aimed at rescuing the complemented tetraploid embryos by co-injecting the second type of wild-type or mutant ES cells.

研究分野：マウスの分子遺伝学と免疫学

キーワード：遺伝子トラップ UPATrap DTrap ジフテリア毒素 細胞系譜の除去 ES細胞 マウス

## 1. 研究開始当初の背景

### 欧米のノックアウトマウス・プロジェクト(KOMP)

欧米では2007年頃からKOMPが実質的に開始され、遺伝子ターゲティングによって約8千株、ランダムな遺伝子トラップによって約12万5千株の変異型ES細胞が産出された。しかし、報告者らが解析したところ、マウスES細胞中で恒常的に発現する遺伝子の約81%がKOMPにおいてトラップされたのに対し、同細胞中で発現しない遺伝子の場合、わずか22%がトラップされたに過ぎないことが判明した(Mayasariら、*Nucleic Acids Res.* **40**, e97, 2012)。

### 我が国のナショナルバイオリソース・プロジェクト(NBRP)

我が国ではNBRP(文科省)のもとで、報告者らが開発した遺伝子トラップ法UPATrap(重岡ら、*Nucleic Acids Res.* **33**, e20, 2005)の改良が行われ(H19-20年度・基盤技術整備プログラム)、異なる「タグ」によって標識された15種類の*Tol2*トランスポゾンと混合して遺伝子トラップに使用する新手法が開発された(Mayasariら、*Nucleic Acids Res.* **40**, e97, 2012)。さらに同じNBRPの中では、標的細胞中で発現しない遺伝子のみを選択的にトラップするための新しい技術DTrapが開発された(H22-23年度・基盤技術整備プログラム)。

## 2. 研究の目的

### 研究の内容

遺伝子トラップ法によって、標的細胞中で発現しない遺伝子を捕捉・破壊することは容易ではないが、この欠点を補うために、ジフテリア毒素(DT)の細胞殺傷能力を負の選択に利用し、標的細胞中で発現しない遺伝子のみを捕捉・破壊する新手法DTrapが開発された。マウスES細胞を標的とした実験では、分化した細胞・組織で初めて発現が誘導される遺伝子内にDTrapベクターが挿入された時にのみ、変異型ES細胞株を得ることができた(未発表)。そのようなES細胞を、胚体外組織(胎盤など)には分化できるが、胎児自体には分化できないテトラプロイド胚に注入してマウスを発生させた場合、トラップした内在性遺伝子の制御下にDTが発現されるため、特定の細胞系譜(cell lineage)が除去されたマウスが得られる。マウスがどの段階まで発生するかは、除去される細胞系譜によるが、本研究では、「第二のES細胞」をテトラプロイド胚に共注入(co-inject)し、細胞系譜除去の表現型をレスキューすることを目指す。

### この研究によって何を明らかにできるのか?

レスキューのための「第二のES細胞」には、まずは野生株を用い、DTにより除去された細胞系譜がその細胞の共注入によって再建されることを確認する。次に特定の遺伝子がbi-allelicに破壊されたES細胞株(後述の方法で、ハプロイドES細胞を用いて網羅的に作出することができ

る)を用いてレスキューを試みるが、レスキューの不成功は、共注入するES細胞でbi-allelicに破壊された遺伝子が、注目する細胞系譜の形成にとって必須のものであることを意味する。

## 3. 研究の方法

### 新しいDTrap技術

DTrapベクターの両端のDT遺伝子には、野生型に比べ酵素活性が約1/30に減弱されたtox-176バリエーションを用いる。ES細胞のゲノムに挿入されたDTrapベクターの5'側、あるいは3'側からベクターに向かってRNAが転写された場合、DTタンパクが合成され、細胞は自動的に死滅する(逆に、ベクターがES細胞中で発現しない遺伝子に挿入された場合には、DTは発現されず、細胞は死滅を免れる)。さらに、ベクター内のNEOカセットと内在性遺伝子の後半部分の間で、nonsense-mediated mRNA decay(NMD)の抑制に基づくポリAトラップが成功した場合にのみ、ES細胞は薬剤耐性を示すことができる(重岡ら、*Nucleic Acids Res.* **33**, e20, 2005)。

### DTrap法を細胞系譜除去(cell lineage ablation)に応用する

ポリAトラップが成立した細胞にはFlp発現ベクター(FLPo)が一過性に導入され、*FRT-FRT*間と*F3-F3*間で、複雑な相同組換えが引き起こされる。その結果、Regions 1 & 3が欠失し、Region 2(遺伝子破壊に必要なEGFPカセット)が反転する。通常のノックアウトマウスは、組換え後の細胞を用いて作製するが、このFlpによる組換えを引き起こさずに(DTカセットを残したまま)マウスを作製した場合には、トラップした遺伝子の発現様式に従ってDTが発現され、特定の細胞系譜が除去される。遺伝子トラップでは、少ない時間と労力で多数のES細胞株を用意できるため、様々な細胞系譜を除去するための準備を簡単に整えることができる。

### テトラプロイド胚の利用

2細胞期の胚を用い、電気ショック融合法により作製されるテトラプロイド胚からは、胎盤などの胚体外組織は形成されるものの、胎児自体の分化は誘導されない。そのようなテトラプロイド胚にES細胞を注入し、マウスを発生させることに成功した場合には、そのマウスは、ほぼ完全に注入したES細胞に由来したものとなる。この原理をDTrap法で作出したES細胞株に応用すれば、マウスの交配などに依存せず、多種多様な細胞系譜除去マウスを得ることができる。

### 野生型/両アレル遺伝子破壊型ES細胞によるレスキュー

しかし、この手法でマウスを作製する場合、除去する細胞系譜によっては生体に対する影響が大き過ぎるために、マウス胎児が最後まで発生を完了できない可能性がある。そこで、テトラプロイ

ド胚に「第二の ES 細胞」を共注入することによって、細胞系譜除去の表現型をレスキューすることを目指す。このステップには、野生型の ES 細胞に加え、特定の遺伝子を bi-allelic に破壊した ES 細胞株を用いる。両アレル遺伝子破壊型 ES 細胞株は、ハプロイド ES 細胞と次項で述べるような特殊な遺伝子トラップ技術を利用すれば、簡単に作出することができる。このようにして、細胞系譜除去 ES 細胞と両アレル破壊 ES 細胞の共注入によるテトラプロイド胚のコンプリメンテーションを系統的に実施すれば、特定の細胞系譜の形成にとって必要不可欠な多数のエLEMENT を、短期間に明らかにすることができる。

#### 4 . 研究成果

特に継代数の少ない B6-129 F1 マウス由来の KY1.1 野生型 ES 細胞を選別して、あるいは DTrap 法で作製した ES 細胞クローン (Gamma-E-crystallin 遺伝子 - 眼球のレンズで特異的に発現 - と perilipin-1 遺伝子 - 脂肪細胞で特異的に発現 - がトラップされたもの) を用いて、テトラプロイド胚のコンプリメンテーションを試みた。しかしながら、いずれの場合もマウスが胎生後期まで発生しなかった。

本研究の後半では、両アレル遺伝子破壊 ES 細胞株 (ハプロイド ES 細胞由来) の共注入による細胞系譜のレスキューを試みるため、平成 28 年度にも、ハプロイド ES 細胞株を利用してランダムなポリ A トラップを行い、ベクターが細胞あたり 1 コピーで挿入されたハプロイド ES 細胞株のみを迅速に選別した。ハプロイド ES 細胞株には、時間経過とともに自然にディプロイド化する、という性質があるため、当初は細胞あたり 1 コピーであったベクターが、ディプロイド化にともない、細胞あたり 2 コピーになる。その状態で一過性に Cre を発現させた場合、一部の細胞では確率的に片方の NEO-PURO カセットのみが反転し、そのような細胞は、G418 と puromycin の両者に耐性を示すようになる。このようにして、平成 27 年度までに用意したクローンに加え、さらに多数の両アレル遺伝子破壊 ES 細胞株を樹立し、定法にしたがい、トラップされた遺伝子を判別した。この両アレル遺伝子破壊のステップは、大阪大学医学部・竹田潤二博士との共同研究によって遂行した。

#### < 結論 >

本研究では、まず、新しく開発された DTrap 法を完成させ、マウス未分化 ES 細胞中で発現しない遺伝子のみをランダムかつ選択的に破壊 (トラップ) するストラテジーを確立した (論文投稿準備中)。

しかしながら、DTrap 法で樹立された ES 細胞クローンによるマウス・テトラプロイド胚のコンプリメンテーションのステップは、これまでのところ成功していない。

本研究の第二の大きな成果としては、マウスのハプロイド ES 細胞と特殊な (新型の) NMD 抑制性ポリ A トラップ・ベクターを用いて遺伝子トラップを実行することにより、多数の両アレル遺伝子破壊 ES 細胞株をランダムに樹立する手法を確立できたことがあげられる (論文投稿中)。

#### 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 9 件)

石田靖雅. PD-1 の発見について語るときに私の語ること. 現代化学、査読なし (東京化学同人) 通巻第 551 号, pp.24-27 (2017).  
<http://www.tkd-pbl.com/book/b279413.html>

Kotoku, T., Kosaka, K., Nishio, M., Ishida, Y., Kawaichi, M., and Matsuda, E. CIBZ Regulates Mesodermal and Cardiac Differentiation of by Suppressing T and Mesp1 Expression in Mouse Embryonic Stem Cells. *Sci. Rep.* 査読あり Vol.6, p.34188, (2016).  
DOI: 10.1038/srep34188

石田靖雅. PD-1 はこうして発見された. 肝胆膵、査読なし (アークメディア) Vol.73, pp.317-322 (2016).  
[http://arcmedium.co.jp/publication02.php?a=201609\\_1](http://arcmedium.co.jp/publication02.php?a=201609_1)

工藤正俊、石田靖雅、池田公史、田中真二 (発言順). 座談会: “免疫チェックポイント阻害剤”の基礎から臨床成績および開発動向. 肝胆膵、査読なし (アークメディア) Vol.73, pp.429-443 (2016).  
[http://arcmedium.co.jp/publication02.php?a=201609\\_1](http://arcmedium.co.jp/publication02.php?a=201609_1)

Nakamura, A., Funaya, H., Uezono, N., Nakashima, K., Ishida, Y., Suzuki, T., Wakana, S., and Shibata, T. Low-cost three-dimensional gait analysis system for mice with an infrared depth sensor. *Neurosci. Res.* 査読あり Vol.100, pp.55-62 (2015).  
DOI: 10.1016/j.neures.2015.06.006

石田靖雅. PD-1: 発見の経緯と研究の歴史. Year Book of RCC 2014, 査読なし (メディカルレビュー社) pp.35-41 (2015).  
<http://www.m-review.co.jp/book/detail/978-4-7792-1393-9>

石田靖雅. PD-1 の発見から治療の標的分子へ. RCC INSIGHT, 査読なし (メディカルレビュー社) 通巻第 4 号, pp.10-11 (2015).

石田靖雅. 新しい癌免疫療法「PD-1 発見の

経緯と研究の歴史」 THE LUNG perspectives、  
査読なし (メディカルレビュー社) Vol.23,  
pp.409-413 (2015).  
[http://www.m-review.co.jp/magazine/detail/J0013\\_2304](http://www.m-review.co.jp/magazine/detail/J0013_2304)

石田靖雅. 今明かす PD-1 発見の舞台裏.  
細胞工学、査読なし (秀潤社) Vol.33,  
pp.1038-1041 (2014).  
[https://booklive.jp/product/index/title\\_id/40005728/vol\\_no/003](https://booklive.jp/product/index/title_id/40005728/vol_no/003)

〔学会発表〕(計 2 件)

石田靖雅 (招待講演). PD-1 とがん、そして  
自己と非自己の識別. 第 104 回日本肺癌学会  
関西支部学術集会、薬業年金会館(大阪府、大  
阪市) (2016 年 07 月 16 日).

石田靖雅 (招待講演). Gene discovery in  
haploid ES cells. 第 66 回日本細胞生物学会年  
会(テクニカルシンポジウム「革新的なゲノム編  
集技術とハプロイド細胞の利用」)、奈良春日野  
国際フォーラム薨(奈良県、奈良市) (2014 年 6  
月 11 日).

〔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://bsw3.naist.jp/ishida/>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

石田 靖雅 (ISHIDA, Yasumasa)  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエ

ンス研究科・准教授  
研究者番号:10221756

(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  
( )