

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03638

研究課題名(和文)染色体移植によるヒトトリソミーモデルマウスの開発

研究課題名(英文)Development of a mouse model of human trisomy by chromosome transfer

研究代表者

水谷 英二 (Mizutani, Eiji)

筑波大学・医学医療系・准教授

研究者番号：80443034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は哺乳類胚・細胞間での染色体移植技術の開発と新たなヒトトリソミーモデルマウスを作出することを目的に行った。マウス卵子にヒト細胞核を核移植した異種間核移植胚を作製し、H2B-mCherry mRNA注入と試薬処理により卵細胞質内でヒト染色体を可視化し、分散させることに成功した。分散したヒト染色体を単離し、マウス受精卵に注入後培養することでヒト染色体を保有するマウスES細胞株の樹立にも成功した。樹立したES細胞株はマウス受精卵へ注入することでキメラマウス形成能を持ち、これらキメラマウス体内でヒト染色体を保持したまま各組織へ分化していた。本技術は将来の新たなモデル動物作製への応用が期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

染色体を直接操作する手法はこれまでに例がなく、本研究で確立された技術は哺乳類胚の染色体研究、発生工学研究に新たな視点と発展をもたらすものと期待される。染色体を一本丸ごと導入することで既知の染色体異常症の重要な研究ツールとなることに加え、胚性致死などで解析できる材料がない希少な染色体異常症に対する研究サンプルの提供が可能となる。これにより、医学においては言うに及ばず、動物の発生・分化といった基礎生物学上においても重要な知見をもたらすこととなる。また、将来初期胚での特定染色体操作が可能となれば、本邦が直面している少子化問題の一因である高齢出産に伴うトリソミーなどの根本治療法の確立も期待できる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to develop a technique for chromosome transfer between mammalian embryos and cells and to generate a new mouse model of human trisomy. We generated nuclear-transferred embryos by nuclear transfer of human cell nuclei into mouse oocytes and succeeded in visualizing and dispersing human chromosomes in the oocyte cytoplasm by injection of H2B-mCherry mRNA and treatment with reagents. The dispersed human chromosomes were isolated and injected into fertilized mouse eggs, which were then cultured to establish mouse ES cell lines possessing human chromosomes. The established ES cell lines were capable of forming chimeric mice by injecting them into fertilized embryos, and differentiated into various tissues in these chimeric mice while retaining the human chromosomes. This technology is expected to be applied to the creation of new animal models in the future.

研究分野：発生工学

キーワード：染色体移植 ES細胞 キメラマウス

## 1. 研究開始当初の背景

染色体異常症は多くの場合、この発生初期段階で生じていると考えられており、トリソミー、モノソミーといった数的異常、転座や一部領域の欠失・重複などの構造異常が知られている。ヒトにおいて染色体数的異常のうち、常染色体モノソミーはほとんどの場合が胎生致死になる。21番染色体、13番染色体、18番染色体のトリソミーでは出生可能であるものの、重篤な異常を伴う。最もよく知られている21番トリソミーによるダウン症においては、患者は700人に1人といわれており、出産年齢の高齢化に伴ってその頻度は上がっている。ヒト21番染色体に対応している16番染色体上の一部をトリソミーとして持つマウスをモデル動物として、ダウン症に関してはこれまでに多くの研究がなされてきており、*slim2*, *DYRK1A*, *olig1/olig2* などいくつかの遺伝子が原因遺伝子の候補として同定されている (Ema et al. Hum. Mol. Genet. 1999, JR Arron et al. 2006 Nature, Chakrabarti et al. Nat. Neurosci. 2010)。しかしながら、これらの研究はあくまで21番染色体に相当する領域の部分トリソミーとなった動物を用いているため、実際の患者における発症のメカニズムについては未だ不明な点が多い。この状況を打破し治療に結び付けていくためには、より確実に患者の病態を再現可能なモデル動物を用いた更なる研究が必須である。

植物では異種ゲノムから特定の染色体を一本だけ導入した単一異種染色体添加系統が知られており、種々の遺伝・育種学的研究に用いられている。哺乳類でもこのような細胞を利用することで、導入された要素が発生・分化に与える影響を知ることができる。すなわち、ヒト染色体が導入されたマウスES細胞を作ることができれば染色体異常症モデル細胞として、またキメラ技術を組み合わせることで染色体異常症のモデル動物としての利用が期待できる。現在のところ、哺乳類細胞で染色体を操作するほとんど唯一の技術として microcell mediated chromosome transfer (MMCT) によりヒト人工染色体 (HAC) を導入した humanized mouse の作出がいくつか報告されている (Kobayashi et al. Mol Pharmacol 2019, Kazuki et al. PNAS 2019)。また、MMCT を用いて21番染色体を含むいくつかのヒト染色体をマウスに導入した研究も報告されており (Shinohara et al. Hum Mol Genet 2001, Tomizuka et al. Nat Genet 1997)、少なくとも導入されたヒト染色体上のいくつかの遺伝子が発現していることがわかっている。MMCT はヒト染色体異常症研究において非常に有望かつ重要な技術であるものの、人工染色体ではまだ大きな染色体領域の導入は困難であるうえ、現状の MMCT では特定の A9 腫瘍細胞株ライブラリーを用いなければヒト染色体の導入ができないといった技術的な限界もある。

一方で研究代表者らは染色体を構成するヒストン H2B タンパク質を蛍光ラベルしてクローン胚の初期発生過程をライブセルイメージング解析し、クローン胚の初期発生過程における染色体の異常分配が発生停止を引き起こしている要因であることを明らかにした (Mizutani et al. Dev. Biol. 2012)。また同様にマウス卵細胞質中に導入されたマウス、ラット、サル、ヒト染色体が H2B で蛍光ラベル可能であり、マイクロマニピュレーターによりラベルされた染色体を抜き出して他の胚に移植できることも確認している (図2)。これは、研究代表者らの持つマニピュレーション技術、イメージング技術さらにはゲノム編集技術を駆使することで、哺乳類胚において染色体操作が可能であることを示している。この手法であれば、A9 といった腫瘍細胞への導入やマイクロセル化という複雑なステップを踏むことなく、直接ヒト染色体一本を丸ごとマウス胚へ導入できる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は哺乳類胚・細胞間での染色体操作技術を開発することにより、ヒト染色体保有マウス ES 細胞を作製しこれを用いた細胞性状解析、キメラ個体作製および解析によって、新たに、より確実に患者の病態を再現可能なヒトトリソミーモデルマウスを作製することである。

## 3. 研究の方法

異種間核移植技術を応用したヒト単一染色体移植技術の確立。

マウス卵子にヒト iPS 細胞を注入して、H2B-mCherry mRNA でラベルして染色体を可視化する。この際、ヒトクローン胚とならないように除核していないマウス卵子をレシピエント卵として用いる。ヒト細胞核の注入後コルセミド等の薬品処理により各染色体を操作可能な程度に卵細胞質中に分離させたうえで、極細のガラスピペットにより単一染色体を少量の卵細胞質とともに抜き取る。抜き取った染色体を含む卵細胞質を別に準備したマウス卵子にマウス精子とともに注入する。これにより、ヒト染色体を保有するマウス胚が作製できる。マウス卵細胞質中でのヒト染色体の効率的な分散方法などは、薬品処理の時間、濃度、組み合わせ等を検討して最適条件を確定する。

ヒト染色体保有マウス ES 細胞の樹立および解析。

の手法によりヒト染色体が導入されたマウス胚を *in vitro* で胚盤胞期まで培養し、ヒト染色体をもつマウス ES 細胞株を作製する。各ヒト染色体各所に設計した特異的プライマーを用いた PCR と核型解析・FISH により、何番のヒト染色体が導入されているか、また全長が導入されているかを調べる。

ヒト染色体保有マウス ES 細胞を用いたキメラマウス作製と解析

樹立したヒト染色体保有マウス ES 細胞を別のマウス受精卵へ注入し、キメラ個体を作成する。キメラマウスが得られた場合、蛍光レポーターを用いた組織学的手法、デジタル PCR によるゲノムコピー数定量等を用いて各臓器へのドナー細胞寄与率とヒト染色体保持率を測定する。併せて組織より RNA を抽出し、次世代シーケンシングによるトランスクリプトーム解析や qPCR により、ヒト染色体からの転写とその影響を評価する。さらに HE 染色・免疫染色により病理学的解析を実施し、染色体トリソミーによる発生および臓器形成への影響を調べる。

目的ヒト染色体の標識法の開発

より効率よく目的の染色体トリソミー細胞を得るために、ゲノム編集ツールである CRISPR/Cas9 システムを応用して、マウス胚に導入されたヒト染色体の可視化を試みる (Chen et al., Cell, 2013)。Cas9 ヌクレアーゼの DNA 切断活性部位を破壊した dead Cas9 に蛍光タンパクを連結した融合タンパク質の mRNA と、染色体特異的な反復配列もしくは人工的に挿入したリピート配列に対する gRNA を顕微注入し、任意のヒト染色体を標識する。これにより、目的染色体を狙って操作できる系を確立する。

ゲノム編集技術によるヒト染色体の遺伝子改変

これまでの HAC 等を用いた研究報告から、細胞培養中に導入されたヒト染色体が脱落していくことが予測される。このため CRISPR/Cas9 等のゲノム編集技術を用いて、ヒト各染色体上のセーフハーバー領域に薬剤耐性遺伝子をノックインし、薬剤選択により異種染色

体が導入された細胞の安定維持、選別を可能とする。また同部位に蛍光レポーターも挿入する事で、キメラマウス組織中のヒト染色体保持細胞の認識が容易になる。さらに薬剤選択圧を解除することでヒト染色体の抜け落ちた細胞を意図的に作り出すことができ、コントロール細胞として比較実験に用いることができる。

これらの染色体移植技術、ヒト染色体保有細胞およびキメラマウス作出と解析により、新たなヒトトリソミーモデルマウスを作出する。

#### 4 . 研究成果

マウス卵細胞質中にヒト染色体の効率的な分散方法を検討した。その結果、ヒト細胞核および H2B-mCherry mRNA を注入したマウス卵子をノコダゾールおよびオカダ酸を添加したマウス胚培養培地で一晚 37 °C 5% CO<sub>2</sub> に設定したインキュベーター内で培養することにより、効率よく染色体の可視化および卵細胞質中の分散が可能であることがわかった。

上述の方法でマウス卵細胞質内に分散したヒト染色体をマイクロマニピュレーターで単離し、別に用意したマウス受精卵へ導入し、ここからヒト染色体保有マウスES細胞株を樹立した。樹立した細胞株を各ヒト染色体特異的に設計したプライマーを用いたPCRにより解析し、ヒト染色体保持の有無、保持していた場合何番染色体かを解析した。これにより、1、11、19番染色体と性染色体を除くヒト染色体について、これらのヒト染色体を保有するマウスES細胞株が得られた。さらにダウン症の原因染色体である21番染色体および以前に導入が確認されたヒト4番染色体に蛍光マーカーと薬剤耐性遺伝子のノックインを行った。4番染色体導入細胞については、全ゲノムシーケンスにより、ヒト4番染色体上のゲノムが欠けることなく存在していることが確認できた。また、本細胞を用いて形成したキメラマウスの各臓器についてRNA-seqを行った結果、ヒト染色体上の遺伝子が転写されていることが確認された。さらに、4番、21番に加えてエドワーズ症候群およびパトウ症候群の原因染色体である18番、13番染色体を保有するマウスES細胞株も得られたため、これら細胞株も含めてキメラマウス形成実験を行った。キメラマウスの各臓器のキメリズム、ヒト染色体保有率などを解析した結果、それぞれのヒト染色体を保有するマウスES細胞株はホスト胚と協調して分化し、キメラマウス体内の各臓器への寄与が認められた。さらに遺伝子発現解析により、ヒト染色体由来の遺伝子の転写も確認され、導入ヒト染色体がマウス体内で機能していることが確認された。

残念ながら、研究の方法の目的ヒト染色体の標識法の開発に関しては、いくつかのラベル方法を試したものの、共焦点顕微鏡であれば蛍光シグナルが見えるが操作には耐えられないなど満足のいく結果は得られておらず今後の重要な課題であるととらえている。

研究期間中に我々は実験動物として広く利用されているマウスおよびラットの簡便な顕微授精技術の開発、胚盤胞補完法によるES細胞からの機能的副甲状腺作製にも成功した。将来、本研究により樹立したヒト染色体導入細胞のみからなる臓器作製がマウス体内で特定臓器に対して可能となれば、より高精度なモデル動物としての利用も期待できると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 TORIKAI Kohei, SHIMIZU Kazuma, NAGATOMO Hiroaki, KASAI Mariko, KATO-ITOH Megumi, KAMADA Yuko, SHIBASAKI Ikue, JEON Hyojung, KIKUCHI Riko, WAKAYAMA Sayaka, SUCHY Fabian, NAKAUCHI Hiromitsu, WAKAYAMA Teruhiko, MIZUTANI Eiji	4. 巻 69
2. 論文標題 Removal of sperm tail using trypsin and pre-activation of oocyte facilitates intracytoplasmic sperm injection in mice and rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Reproduction and Development	6. 最初と最後の頁 48 ~ 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1262/jrd.2022-065	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Mayuko Kano, Naoaki Mizuno, Hideyuki Sato, Takaharu Kimura, Rei Hirochika, Yasumasa Iwasaki, Naoko Inoshita, Hisato Nagano, Mariko Kasai, Hiromi Yamamoto, Tomoyuki Yamaguchi, Hidetaka Suga, Hideki Masaki, Eiji Mizutani and Hiromitsu Nakauchi	4. 巻 -
2. 論文標題 Functional calcium-responsive parathyroid glands generated using single-step blastocyst complementation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 the Proceedings of the National Academy of Sciences (in press)	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) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 水谷英二、水野直彬、山本祐美、山口智之、中内啓光
2. 発表標題 染色体移植によるヒトトリソミーモデルマウス作出の試み
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 ヒト染色体の分散方法、単離方法およびその動物胚への移植方法	発明者 中内啓光、山口智之、水谷英二、水野直彬	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/ 13163	出願年 2021年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	水野 直彬  (Mizuno Naoaki)  (30815642)	東京医科歯科大学・高等研究院・特任研究員   (12602)	
研究分担者	山口 智之  (Yamaguchi Tomoyuki)  (80392158)	東京薬科大学・生命科学部・教授   (32659)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------