

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640106

研究課題名(和文)TALEN法により疾患ゲノムを修復したiPS細胞を用いた自家臓器再生技術開発

研究課題名(英文)Technology development for generation in vivo of organ using iPS cells after repair of the disease genome by TALEN

研究代表者

石丸 善康 (Ishimaru, Yoshiyasu)

徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究部・学術研究員

研究者番号：50435525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム配列の決定により、任意の遺伝子をノックアウトあるいはノックインできるゲノム編集技術TALENやCRISPR/Casシステムが近年開発されており、様々な生物種において効率よくノックアウトが可能となった。この技術と胚盤胞補完法を組み合わせることで、簡単に異種動物内に臓器を作製できることが想定される。本研究において、マウスを用いて実験を行っているが、少なくともノックアウト作製に関しては、非常に効率がよいことが明らかとなった。そこで、ゲノム編集を行った受精卵を培養し、胞胚期にさらにiPS細胞を注入する胚盤胞補完により簡便に動物体内でiPS細胞由来の臓器作製が可能となった。

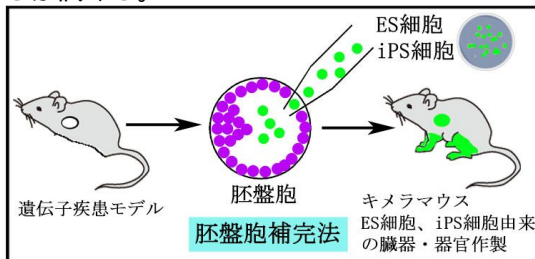
研究成果の概要(英文)：Recently, gene knockout or knock-in technologies that disrupts genome sequence, the transcription activator-like effector nuclease (TALEN) system or the clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated protein (Cas) system, have been developed and used to edit the genomes of various organisms. Our results demonstrate that CRISPR/Cas system more effectively elicits single-step biallelic mutations in mice. In addition, we hypothesized that targeted organs in deficient mice can be produced using a blastocyst complementation in a xenogenic environment. We therefore demonstrate that injection of mouse iPS cells into blastocysts derived from a mutant mouse strain in which the gene necessary to form a particular organ is deficient resulted in generation in vivo of organ almost entirely derived from injected mouse iPS cells.

研究分野：再生生物学

キーワード：ゲノム編集 CRISPR/Casシステム TALEN iPS細胞 胚盤胞補完法 FGF10 臓器・器官再生 ノックイン

1. 研究開始当初の背景

多能性幹細胞から *in vitro* で臓器を作製することは再生医療の実用化を推進するため重要な目的である。iPS 細胞を再生医療へ応用する最も有力な技術は細胞シート工学である。細胞シートは生体組織へ速やかに生着する特徴を有しており、複数の細胞シートを積層化し厚みのある組織、臓器を作製することが研究されている。しかし、組織を構成する細胞の多様性や3次元構造の再現は非常に困難である。そこで、本研究では胚盤胞補完法(Blastocyst complementation)の方法論に着目した(下図)。胚盤胞補完法とは、ある遺伝子欠損マウス由来の胚盤胞(受精卵が着床する寸前の細胞)に、野生型のES細胞またはiPS細胞を注入すると、遺伝子欠損した細胞が完全にES/iPS細胞由来の正常な細胞に置き換えられる現象を言う。この胚盤胞補完法を応用することで、遺伝子欠損マウスの生体でiPS細胞由来の臓器・器官が作製できるか試みる。

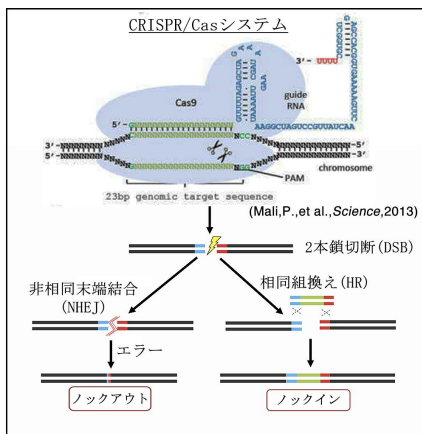


2. 研究の目的

ゲノム配列の決定により、任意の遺伝子をノックアウトあるいはノックインできるゲノム編集技術としてCRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas法が近年開発され(下図)、マウスにおいても効率よくノックアウトが可能となった。CRISPR/Cas法で作製したノックアウトマウスの胚盤胞と正常マウスES/iPS細胞による胚盤胞補完法を活用し、動物体内の発生過程を利用して欠損した臓器・器官をES/iPS細胞で作製可能(*in vivo* 臓器・器官作製)が示す。

一方、遺伝的要因で疾患のある患者の体細胞からヒトiPS細胞を樹立した場合、遺伝性疾患の

原因となる遺伝子異常は、iPS細胞においても保持される。その原因遺伝子の変異をCRISPR/Cas法により欠損、挿入、置換するこ



とで正常な遺伝子に置き換え、正常なヒトiPS細胞を得ることが必須となるため、ノックイン法の開発を目的にココロギ胚を用いた基礎技術開発を行う。

3. 研究の方法

(1) FGF10 ノックアウトマウスの作製を行う。CRISPR/Casシステムを働かせるため、FGF10遺伝子配列を標的としたgRNAとCas9のmRNAを合成する2つのコンストラクトを作製する。合成したgRNAとCas9 mRNAをマウスの受精卵にインジェクションし遺伝子改変マウスを選択する。

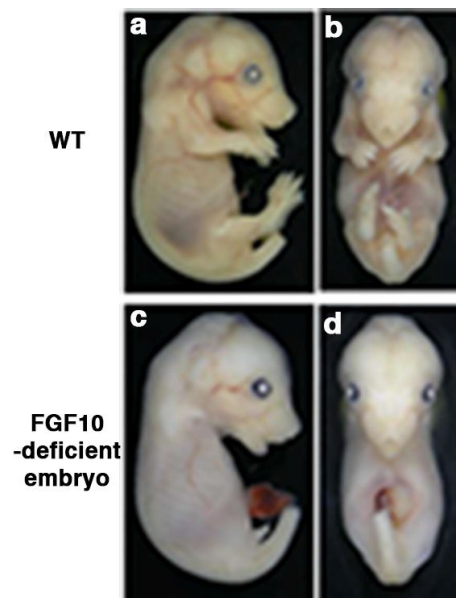
(2) *in vivo* 臓器・器官作製を目的に、F0世代のヘテロ変異体をスクリーニングし、ヘテロ同士の交配で得られたFGF10ホモ変異体の胚盤胞に、GFPを導入させたマウスES/iPS細胞をインジェクションし、生まれたキメラ個体の解析を行う。

(3) ゲノム編集技術を用いたノックイン法を開発し、マーカー遺伝子を標的遺伝子の一部にノックインすることにより、得られたタンパク質の発現挙動をリアルタイムで観測できるようにする。

4. 研究成果

(1) CRISPR/Cas法によるFGF10ノックアウトマウス作製

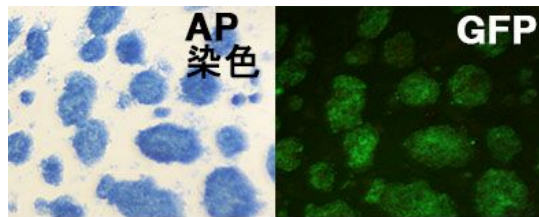
FGF10は、ニワトリ胚での異所性発現による過剰肢形成や、ノックアウトマウス解析で四肢と肺が完全に欠損することから四肢と肺形成に重要な因子であることが知られる。CRISPR/Cas法によりFGF10ノックアウトマウスを作製するため、FGF10の塩基配列に対応するgRNAとCas9 mRNAを作製し、このmRNAをマウス受精卵へインジェクションにより注入し、その卵を仮親の子宮に移植後、遺伝子改変マウスとなる新生仔を得た。その結果、F0世代のFGF10欠損胚(下図c,d)において



も四肢の欠損が高効率で確認された(徳島大学・秦江章博助教と共同研究)。

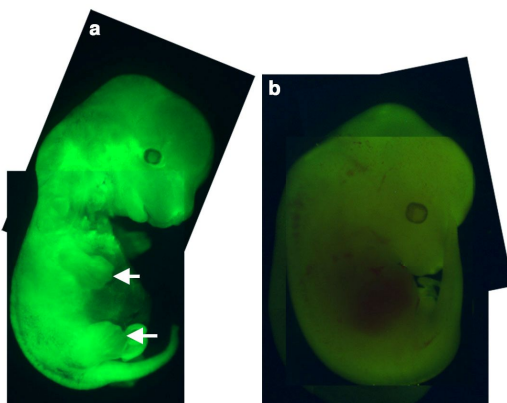
(2) in vivo 臓器・器官作製

FGF10 ノックアウトマウスの作製を行った結果、四肢欠損のノックアウト個体を作製することに成功した。そこで、EGFP を発現するマウス多能性幹細胞(miPSもしくはmES細胞)を FGF10 ノックアウトマウスの胚盤胞へ注入し、マウス-マウス同種間のキメラ作製を試みた。胚盤胞補充に用いるマウス iPS 細胞の維持培養技術は、文部化学省「再生医療の実現化プロジェクト」の一環として理研、京都大学により作成されたプロトコルに従い、MEF (マウス胎児線維芽細胞) をフィーダー細胞 (Merck Millipore 社製) に用いて培養を行ったところ、良好な維持培養が可能となった。未分化細胞マーカーとしてアルカリフォスファターゼ (AP) 染色を行った結果、その活性が確認された(下図)。



miPS細胞

得られた新生仔を解析した結果、同種間の胚盤胞補充により、GFP を指標として生体の発生とともに欠損している細胞が iPS 細胞由来のもので補われ、iPS 細胞の分化誘導により FGF10 ノックアウトマウスの生体に四肢が形成された(下図 a 矢印)。また、FGF10 ノックアウトマウスにおいて一様に EGFP 蛍光を示す四肢が形成されたことから、遺伝的に欠損したマウスの胚盤胞に多能性幹細胞を注入する胚盤胞補充法により *in vivo* で多能性幹細胞に由来する臓器・器官が作製可能であると示された。



FGF10 KO

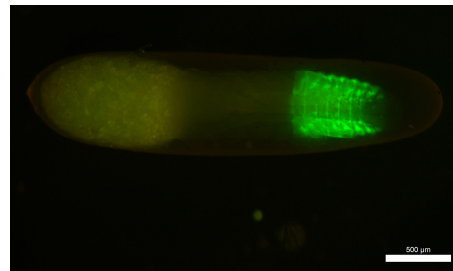
+miPS cells

FGF10 KO

(3) ノックイン法の確立

再生医療研究を進める上で、遺伝性疾患の

原因となる遺伝子異常を保持する iPS 細胞において、CRISPR/Cas 法によりその原因遺伝子の変異を挿入、置換(標的特異的へのノックイン)するリプログラミングは必要不可欠である。そこで、コオロギ胚を用いて CRISPR/Cas 法による *laccase2* (*lac2*) 遺伝子への変異導入及びノックアウト系統の作製を試みた。CRISPR の *lac2* gRNA および Cas9 をコオロギ内に導入した結果、ふ化した白い幼虫が観察され、高効率で両アレルに変異が導入された。さらにノックインの方法を検討し、EGFP 遺伝子を標的のゲノムの位置に導入することが可能となった。下図は *Gb' abd-A* に導入した例を示す。胚の腹部体節に特異的に EGFP 蛍光を観察できることから、ノックインが成功したと考えられる。



(4) おわりに

CRISPR/Cas 法は、任意の遺伝子をノックアウトあるいはノックインできるゲノム編集技術であり、マウスにおいても容易に効率よくノックアウトが可能となった。本研究により、CRISPR/Cas 法で作製した FGF10 ノックアウトマウスと iPS 細胞を用いた胚盤胞補充によるキメラマウスの生体に同種間の四肢が作製可能となったことから、この技術と胚盤胞補充法を組み合わせることで、簡単に異種動物内に臓器を作製できることが想定される。一方、ノックアウトマウスの体細胞から iPS 細胞を樹立し、CRISPR/Cas 法による遺伝子異常のリプログラミングで正常化した iPS 細胞とノックアウトマウスを用いたキメラマウスで正常な臓器・器官が作製されるか現在検討中である。また、遺伝子の多様性に対し、CRISPR/Cas 法を用いた組織特異的エンハンサー領域の変異により遺伝子発現調節することで、iPS 細胞が目的の組織以外にならないよう制御できるか明らかにすることも重要である。

今後、この方法は、ヒト iPS を用いてブタの中にヒト臓器を作製する技術に発展することは明白であるが、実際には、例えば臓器そのものはヒトの細胞でできて、血管はブタのものであるなどの問題がまだ多く残っている。もちろん、血管もヒトの細胞にするか、あるいは血管の細胞はアポトーシスにより除去するか、などの方法を考えなくてはならないが、いずれにしても大きな問題である。このような問題を解決するための基礎技術をモデル動物を用いて開発するのが本研究の今後の課題である。

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1件)

Ishimaru Y, Nakamura T, Bando T, Matsuoka Y, Ohuchi H, Noji S, Mito T. Involvement of dachshund and Distal-less in distal pattern formation of the cricket leg during regeneration. *Sci. Rep.*, 2015 Feb. 11;5:8387. doi: 10.1038/srep08387.

[学会発表](計3件)

Bando T, Ishimaru Y, Yoshida H, Nakamura T, Mito T, Ohuchi H and Noji S.

Mechanisms underlying regeneration of the cricket leg, based on an extended steepness model.

EMBO conference: The molecular and cellular basis of regeneration and tissue repair, Sant Feliu de Guixols, Spain, Sep.9, 2014

Noji S, Mito T, Bando T, Nakamura T, Watanabe T, Ishimaru Y and Ohuchi H. Regeneration of insect legs from stem cells.

Thirteenth International Congress on Invertebrate Reproduction and Development, Detroit, MI, USA, Jul. 16, 2014

Noji S, Watanabe T, Ishimaru Y, Nakamura T, Yoshida H, Bando T, Ohuchi H and Mito T.

Regeneration of insect legs from stem cells Blastema formation to leg size determination.

Thirteenth International Congress on Invertebrate Reproduction and Development, Detroit, MI, USA, Jul. 16, 2013

6. 研究組織

(1)研究代表者

石丸 善康 (Ishimaru Yoshiyasu)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・学術研究員

研究者番号：50435525