

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21080

研究課題名(和文) 遺伝子改変カニクイザルES・iPS細胞を駆使した新型多能性幹細胞株の樹立

研究課題名(英文) Establishment of novel pluripotent stem cells using genetically modified cynomolgus ES and iPS cells.

研究代表者

築山 智之(TSUKIYAMA, Tomoyuki)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・助教

研究者番号：60612132

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：非ヒト霊長類における遺伝子改変技術は、疾患モデル動物の作製や前臨床試験に非常に有用であると考えられるが、依然として報告例は少ない。本研究では、カニクイザルをヒトのモデル動物として用い、遺伝子改変個体および多能性幹細胞の効率的作出を試みた。

本研究では、レンチウイルスベクター法により、全身でGFPを発現するトランスジェニックカニクイザル個体を得ることに世界で初めて成功した。また、CRISPR/Cas9システムを駆使したレポーターシステムを応用することによって、高品質な非齧歯類ES・iPS細胞の樹立に繋げる基盤技術を確立した。

これらの基盤技術は将来的に医療産業の振興に発展するものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Although transgenic technologies in non-human primates are useful for production of disease models and preclinical studies, only few reports have been published. In this study, we tried to generate transgenic animals and stem cells efficiently in cynomolgus monkeys. By using lentiviral vectors, we generated transgenic cynomolgus monkeys that express EGFP throughout the whole body for the first time. Additionally, we established a novel basic technology for generating high-quality ES/iPS cells in non-rodent species by using a CRISPR/Cas9 reporter system. We propose that these technologies can be applied to the medical industry in the future.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：iPS細胞 ES細胞 カニクイザル トランスジェニック動物

1. 研究開始当初の背景

ヒトにおいて iPS 細胞が樹立され、再生医療の実現が現実味を帯びてきているが、依然として解決されなければならない問題が存在する。その一つが、ヒト ES・iPS 細胞の品質が、マウス ES・iPS 細胞のそれと比べて低いという点である。結果、樹立する手法、機関、人物によって品質に大きな偏りが発生し、細胞株間において分化能に差が生じてしまい、臨床に向けた研究における大きな障害となっている。

また、ヒト多能性幹細胞の不均一性に加え、培養の煩雑さ、不安定さ、増殖の遅さ、遺伝子導入の難しさもこの問題に起因していると考えられ、ブタ、サル等の大型哺乳動物を用いた医用モデル動物の作出、それを応用した前臨床試験の実施も同一の理由により困難であるのが実情である。

そこで、ヒトの ES・iPS 細胞をマウス型に変換する、もしくはマウス型のヒト ES・iPS 細胞を直接樹立することが多能性幹細胞研究における一つのトピックとなっている。しかし、樹立した細胞株が実際にマウス型の能力を持っているか判定するためにはキメラ貢献能および生殖細胞寄与能を持つことを示すことが究極的には求められるため、倫理的、技術的な理由から前述の問題の解決には至っていない。

2. 研究の目的

我々はこれまで、独自に確立した高効率かつ精密な iPS 細胞樹立系を駆使することによって(Tsukiyama T. et al., Genes Cells, 2011, 16:815-825, Tsukiyama T. et al., PLoS One, 2014, 9:e92973)、従来の報告に囚われること無く新規の培養条件を探索することが可能となり、現存の非齧歯類多能性幹細胞の欠点を克服した新型多能性幹細胞株を樹立できると考え、複数の新規幹細胞培養条件を発見、発表してきた(Tsukiyama T. et al., PLoS One, 2014, 9:e95329, Ohinata Y. and Tsukiyama T., PLoS One, 2014, 9:107308)。

本研究では、ヒトに近い旧世界ザルの一種であるカニクイザルをヒトのモデル動物として用い、近年新たなゲノム編集技術として注目を浴びている CRISPR/Cas9 システムを駆使したレポーターシステムを応用することによって、マウス ES 細胞型の高品質なカニクイザル ES・iPS 細胞を樹立、ヒトでは不可能なキメラ実験を通してその品質を評価することで高品質な非齧歯類 ES・iPS 細胞の樹立に繋げる基盤技術の確立を目的とした。

3. 研究の方法

まず、カニクイザルにおける遺伝子改変技術を確認するために、レンチウイルスベクターを用いた GFP 発現カニクイザルの作製を行

った。

次に、様々な動物種で多能性基底状態を誘導・維持できる培養条件の同定において、適切な培養条件評価系の確立は極めて重要であることから、より精度の高い培養条件評価のために、Primed なカニクイザル ES 細胞あるいは iPS 細胞、およびヒト iPS 細胞に、多能性レポーターをノックイン、キメラ解析用赤色蛍光レポーターおよび TET-ON リプログラミング因子を、piggyBac 遺伝子導入系もしくは Epstein-Barr Episomal ベクターを用いて導入し、Transgene-dependent に naïve 化された多能性幹細胞を樹立、フィーダー細胞の有無、細胞外マトリックス、基礎培地、血清、血清代替物、ペプチド、増殖因子、化合物等の様々な組み合わせについて培養条件の探索を行い、Transgene-independent な naïve 幹細胞を維持しうる培養条件を同定・評価できる実験系を構築した。この際、多能性レポーターとして、発現制御領域のうち Proximal enhancer (PE) を欠損させた OCT3/4 下流にレポーターをノックインした Δ PE-OCT3/4 レポーターを用いた。しかし、ヒト naïve 多能性幹細胞における Δ PE-OCT3/4 レポーターの発現は極めて微弱であることから、これを増幅する系を構築した。つまり、 Δ PE-OCT3/4 発現制御下で Transactivator 活性を持つ X を発現させ、X に応答する配列を複数持つ発現制御領域下流において蛍光レポーターおよび薬剤耐性遺伝子を発現させた。これらのレポーターのノックインおよび PE のノックアウトには CRISPR/Cas9 システムを用いた。

4. 研究成果

我々が所属する滋賀医科大学動物生命科学研究センターは、ヒトに近い旧世界ザルの一種であるカニクイザルを用いた発生工学が可能な日本唯一、世界でも数少ない研究施設であり、この特色を最大限に活かした他機関では追従できないような研究が可能である。

遺伝子改変霊長類はヒト疾患モデルとしての重要性が認識されているものの、2001年に霊長類初の遺伝子導入アカゲザルの作出がアメリカで報告されて以降、未だ世界で7報しか作出報告が無いのが現状である。我々は、レンチウイルスベクター法によって遺伝子導入カニクイザルの作出を試み、全身で GFP を発現するトランスジェニックカニクイザル個体を得ることに世界で初めて成功した (Seita Y., Tsukiyama T. et. al., 2016 Scientific Reports, 6: 24868, 図1)。本研究センターでは、カニクイザルにおける腹腔鏡下での採卵、電気刺激による精子採取、マイクロマニピュレータによる顕微授精、腹腔鏡下での経卵管的胚移植などの基盤技術を確立しており、本研究でも同様の技術を駆使することで遺伝子改変カニクイザルの作出に至った。非ヒト霊長類を用いたヒト疾患モデル動物を作製す

ることは、新たな前臨床モデルの創出に繋が
り、将来的に医療産業の振興に発展するもの
と期待される。

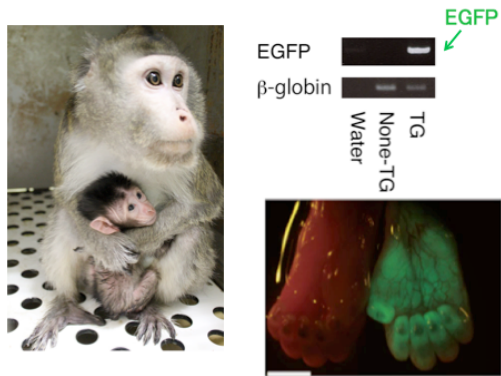


図1. GFP 導入カニクイザルの作出

次に、トランスアクチベーター活性を持つ因子を Oct3/4 タンパク質の C 末端に 2A ペプチドを介して接続した融合タンパク質を、Oct3/4 遺伝子の発現制御下で発現させ、それに応答する配列を複数持つ発現制御領域下で蛍光タンパク質および薬剤耐性遺伝子を発現させる遺伝子発現増幅レポーターを、CRISPR/Cas9 システムを用いて、マウスおよびカニクイザル多能性幹細胞にノックインした。

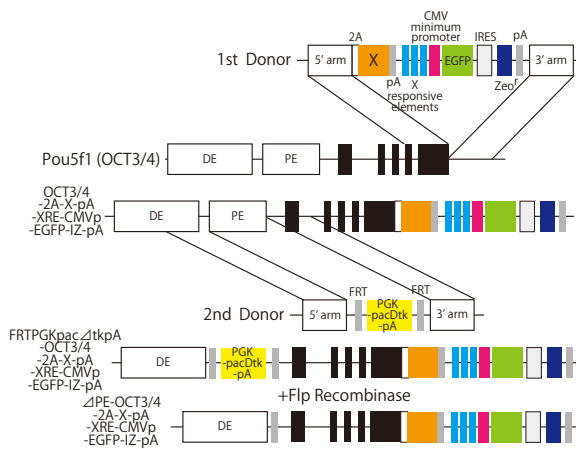


図 2.レポーターノックインの概略

CRISPR/Cas9 システムを用いることにより、非常に高効率で遺伝子ノックイン細胞株の樹立に成功した。また、遺伝子増幅系を使わない通常のレポーターに比べ、遺伝子発現増幅を行うことで、顕著に強い蛍光を検出できることを確認した。

本研究で使用した遺伝子発現増幅技術は、発現が微弱であることが想定されるレポーターの発現を増幅することに有用であると考えられる。この遺伝子発現増幅型レポーターのノックインは、その技術が確立されると、今後標準的な手法となり得るポテンシャルがあり、意欲的な課題であると考えている。

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 6 件)

1) Honda A., Chojookhuu N., Izu H., Kawano Y., Inokuchi M., Honsho K., Lee A., Nabekura H., Ohta H., Tsukiyama T., Ohinata Y., Kuroiwa A., Hishikawa Y., Saitou M., Jogahara T., Koshimoto C. 「Flexible adaptation of male germ cells from female iPS cells of endangered Tokudaia osimensis」, 『**Science Advances**』, in press、査読有り

2) Kawaguchi T., Cho D., Hayashi M., Tsukiyama T., Kimura K., Matsuyama S., Minami N., Yamada M. and Imai H. 「Derivation of Induced Trophoblast Cell Lines in Cattle by Doxycycline-Inducible piggyBac Vectors.」, 『**PLoS One**』, 第 11 巻 第 12 号、e0167550、2016、査読有り、DOI: 10.1371/journal.pone.0167550

3) Khoa le TP., Azami T., Tsukiyama T., Matsushita J., Tsukiyama-Fujii S., Takahashi S., Ema M. 「Visualization of the Epiblast and Visceral Endodermal Cells Using Fgf5-P2A-Venus BAC Transgenic Mice and Epiblast Stem Cells.」, 『**PLoS One**』, 第 11 巻 第 7 号、e0159246、2016、査読有り、DOI: 10.1371/journal.pone.0159246

4) Seita Y., Tsukiyama T., Iwatani C., Tsuchiya H., Matsushita J., Azami T., Okahara J., Nakamura S., Hayashi Y., Hitoshi S., Itoh Y., Imamura T., Nishimura M., Tooyama I., Miyoshi H., Saitou M., Ogasawara K., Sasaki E. and Ema M. 「Generation of transgenic cynomolgus monkeys that express green fluorescent protein throughout the whole body」, 『**Scientific Reports**』, 第 6 巻、24868、2016、査読有り、DOI: 10.1038/srep24868

5) Kawaguchi T., Tsukiyama T., Kimura K., Matsuyama S., Minami N., Yamada M. and Imai H. 「Generation of naive bovine induced pluripotent stem cells using piggyBac transposition of doxycycline-inducible transcription factors」, 『**PLoS One**』, 第 10 巻 第 8 号、e0135403、2015、査読有り、DOI: 10.1371/journal.pone.0135403

6) Suzuki S., Tsukiyama T., Kaneko T., Imai H. and Minami N. 「A hyperactive piggyBac transposon system is an easy-to-implement method for introducing foreign genes into mouse preimplantation embryos.」, 『**The Journal of Reproduction and Development**』, 第 61 巻 第 3 号、pp 241-244、2015、DOI: 10.1262/jrd.2014-157

〔学会発表〕（計4件）

- 1) ○Seita Y., Tsukiyama T., Iwatani C., Tsuchiya H., Matsushita J., Azami T., Ogasawara K. and Ema M., 「Generation of GFP transgenic cynomolgus monkeys」, 『**SRF Annual Conference 2016**』, Number P08, University of Winchester, Winchester, UK, (July 11-13 2016)
- 2) ○清田 弥寿成, 築山 智之, 岩谷 千鶴, 松下 淳, 土屋 英明, 佐々木 えりか, 依馬 正次 「全身で GFP を発現するトランスジェニックカニクイザルの作製」, 『**日本繁殖生物学会**』, 講演番号 P-84, 麻布大学, 2016年9月12～15日
- 3) ○清田 弥寿成, 築山 智之, 岩谷 千鶴, 松下 淳, 土屋 英明, 浅見 拓哉, 佐々木 えりか, 依馬 正次 「全身で GFP を発現するトランスジェニックカニクイザルの作製」, 『**日本分子生物学会**』, ポスター番号 2P-0847, パシフィコ横浜, 2016年11月30日～12月2日
- 4) ○築山 智之, 丹羽 仁史, 岩谷 千鶴, 土屋 英明, 清田 弥寿成, 松下 淳, 依馬 正次 「マウスおよびカニクイザル多能性幹細胞における CRISPR/Cas9 を用いた発現増幅型多能性幹細胞レポーターのノックイン」, 『**日本繁殖生物学会**』, OR1-21, 宮崎大学, 2015年9月

〔図書〕（計1件）

- 1) 築山 智之, 依馬 正次 「胚性致死（胎生致死）」, 『**実験医学別冊 マウス表現型解析スタンダード**』, pp 141-149, 2016

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

築山 智之 (TSUKIYAMA, Tomoyuki)
滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・
助教
研究者番号：60612132

(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

()