

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19589

研究課題名（和文）ヒトiPSCミニ肝臓における細胞間相互作用因子の準網羅的な機能的スクリーニング

研究課題名（英文）Semi-exhaustive functional screening of cell-cell interaction factors in human iPSC mini-liver

研究代表者

関根 圭輔（Sekine, Keisuke）

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：00323569

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヒトiPSCミニ肝臓を対象にCRISPR/CAS9法を用いて効率的な機能的スクリーニング系の構築を行った。効率よく遺伝子欠損を実施するため、ドキシサイクリン添加によりCas9の発現を誘導可能な遺伝子をヒトiPS細胞のAAVS1遺伝子座に相同組換えにより導入したiCrispr-iPS細胞を複数のiPSC株について樹立した。未分化iPSC残存に關与すると考えられた遺伝子のノックアウトiPSCを用いた機能解析を実施し未分化残存のし易さに関わる因子の同定に成功した。また、尿素サイクル異常症の原因でもある尿素サイクル関連遺伝子について複数のノックアウトiPSCを作製し機能検証を実施した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではiPSCを用いて極めて効率よく遺伝子欠損細胞を作製し機能検証する手法を確立した。この技術を用いて、移植医療に用いる再生医療等製品における安全性の確保において極めて重要な未分化iPSCの残存に関わる因子を同定した。また、先天的な代謝性疾患の原因でもある尿素サイクル関連遺伝子について複数のノックアウトiPSCを作製し、尿素サイクルのそれぞれの酵素欠損によってバイパスされる代謝経路が異なる可能性が示唆された。今後、尿素サイクルに異常症に対する薬治療法や代謝改善のための検証が可能になると期待される。以上のことから、本手法を用いることで様々な細胞における効率よい遺伝子機能の検証が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we constructed an efficient functional screening system for human iPSC mini-liver using CRISPR / CAS9 method. In order to efficiently carry out gene deletion, iCrispr-iPS cells in which a gene capable of inducing Cas9 expression by addition of doxycycline was introduced into the AAVS1 locus of human iPS cells by homologous recombination were established for a several iPSC lines. We performed a functional analysis using knockout iPSCs of genes that are thought to be involved in the residual undifferentiated cells in differentiated cell products, and succeeded in identifying the factors involved in the predisposed to remain the undifferentiated cells in differentiated cell products. In addition, we made several knockout iPSCs for urea cycle-related genes, which are also the cause of urea cycle abnormality, and performed functional verification.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：iPS細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々はヒト iPS 細胞を用いて肝臓の基となる 3 次元組織 (iPSC ミニ肝臓) を *in vitro* 培養条件下で創出することに成功した (*Nature*, 2013)。iPSC ミニ肝臓は平面培養した iPS 細胞由来肝細胞よりも機能的にも、遺伝子発現レベルでも生体肝臓に類似していることから、異なる細胞種による立体的な細胞間相互作用が、3 次元組織の形成に必須であることを実証する結果である。そこで、iPSC ミニ肝臓のシングルセル RNA シークエンス解析を実施し、複数の細胞系譜をより分ける手法を開発し、iPSC ミニ肝臓内で生じる異なる細胞種間の細胞間相互作用の解明に成功した (*Nature* 2017)。この研究により、数多くの細胞間相互作用に関わる因子を同定することができた一方で、これらの相互作用因子の中で機能的に重要な因子という観点では、少数の相互作用因子についての検証を実施したに過ぎず、明らかにした多くの相互作用因子の解析が手付かずとなっていた。

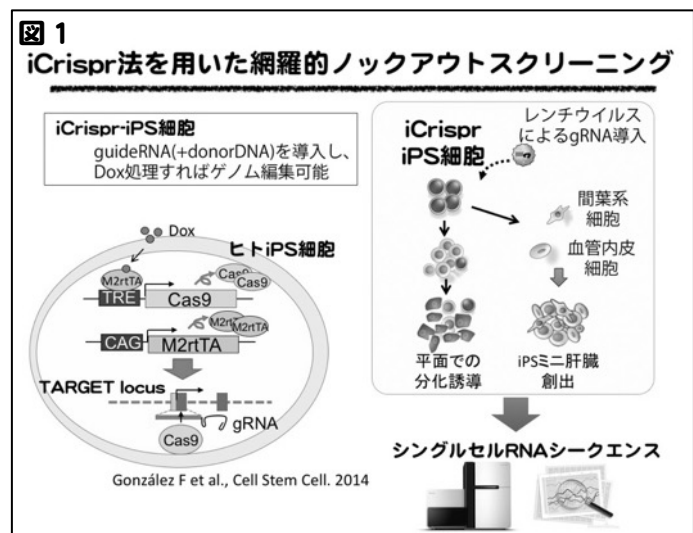
他の多くの網羅的遺伝子発現解析においても発現変動が見られる遺伝子など注目する遺伝子群を同定できたとしても、その機能解析には、多くの時間と労力を必要とすることから、ごく一部の遺伝子にとどまる。解析対象とする遺伝子は最も発現変動が多かったものや、ある程度機能が予想されるものなど、往々にして脆弱な科学的根拠の元に選択されている。言い換えると、科学的根拠の元に機能検証する因子を極少数に絞り込むことは不可能である。

そこで、苦勞して取得した網羅的遺伝子発現情報を有効に活用し、時間と労力を抑えて数十～数百個程度を対象とした準網羅的な機能的なスクリーニングシステムの構築を考え、本研究の推進を目指すこととした。

2. 研究の目的

我々はどんなに高機能な細胞を作り出すことが出来たとしても、臓器としての特性、機能を反映するためには、いかに臓器を創るかといことを目指すべきとの信念から、発生過程に立ち返り、肝臓の発生過程を模倣することを目指した。その結果、世界で初めて、ヒト iPS 細胞から分化誘導した肝内胚葉細胞と、血管内皮細胞、間葉系細胞を最適な比率で混ぜ合わせることで、肝臓の基となる 3 次元組織 (iPSC ミニ肝臓) を *in vitro* 培養条件下で創出することに成功した

(*Nature* 2013)。本技術はヒトの立体臓器を *in vitro* において人為的に構成することを可能にするという、これまでに成しえていなかったヒューマンバイオロジーを解析するための糸口となる基盤技術である。特に、ダイナミックな組織形成過程をヒトを対象に実施することを可能にするのと共に、ノックアウトマウスなどのモデル動物の解析では明らかにすることの出来ない、ダイナミックな細胞同士の立体的な相互作用を人為的に創りだし解析することが可能になった。そこで、iPSC ミニ肝臓のシングルセル RNA シークエンス解析を実施し、複数の細胞系譜をより分ける手法を開発、胎児肝臓の段階に相当する iPSC ミニ肝臓内で生じる異なる細胞種間の細胞間相互作用因子の解明に成功した (*Nature* 2017)。この研究で同定した因子の機能および作用機序を解明することができれば、立体的な肝臓がかたち作られるのか明らかにすることできると期待される。



一方、機能的に意義のある作用因子の同定は iPSC ミニ肝臓を用いた再生医療を実現する上で、iPSC ミニ肝臓の更なる機能向上、発現強度を指標とした製造工程での品質評価に極めて重要である。

しかしながら、上記の研究では少数の相互作用因子の機能解析に留まっており、解明した多くの相互作用因子の解析はできていない。

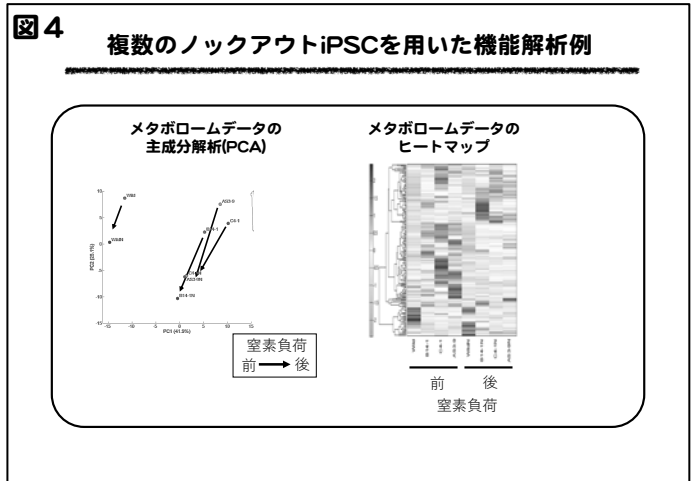
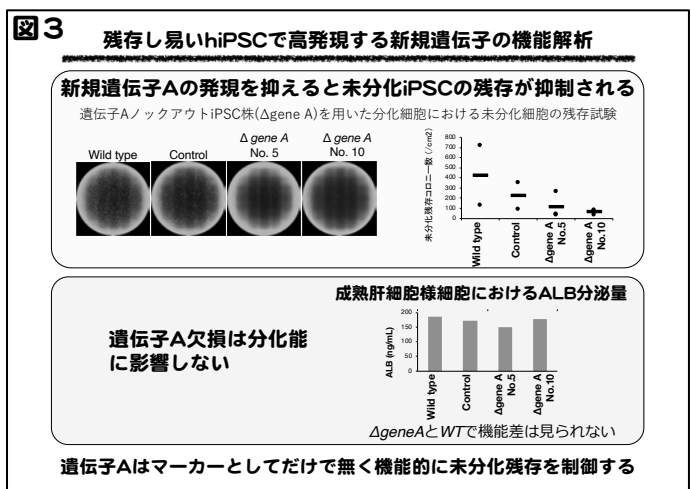
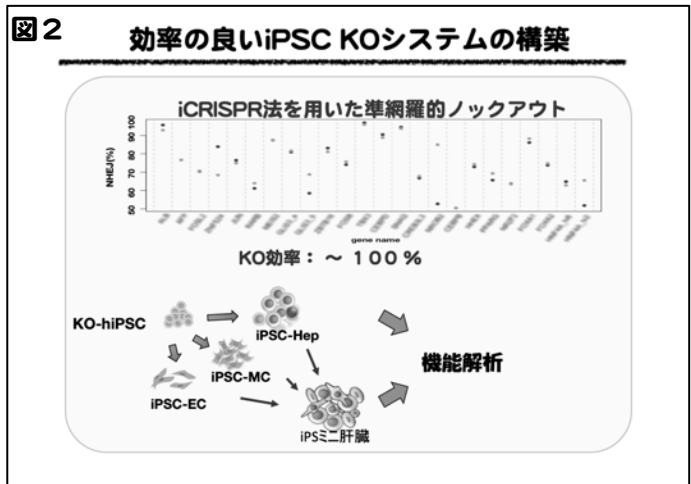
そこで本研究では、ヒト iPSC ミニ肝臓を対象に CRISPR/ CAS9 法を用いて数十～数百個程度の遺伝子を対象とした準網羅的な機能的スクリーニング系の構築と実施を試みた。

3. 研究の方法

まず、効率よく遺伝子欠損を実施するため、ドキシサイクリン添加により Cas9 発現を誘導可能な遺伝子をヒト iPS 細胞の AAVS1 遺伝子座に相同組換えにより導入した iCrispr-iPS 細胞を樹立する。この細胞に対して、これまでの研究で同定した細胞間相互作用因子に対する複数のガイド RNA (gRNA) を導入する。この細胞を肝細胞へ分化誘導し機能解析を実施する (図 1)。

4. 研究成果

iCrispr-iPS 細胞を用いて同時に 24 遺伝子のノックアウトを試みた結果、最高で約 100% のノックアウト効率を達成し、効率が悪い遺伝子でも 50% 以上と高効率の KO-iPSC 作製システムの構築に成功した (図 2)。この技術を用いて、移植医療に用いる再生医療等製品における安全性の確保において極めて重要な未分化 iPSC の残存に関わる因子を同定した (図 3)。また、先天的な代謝性疾患の原因でもある尿素サイクル関連遺伝子について複数のノックアウト iPSC を作製し、尿素サイクルのそれぞれの酵素欠損によってバイパスされる代謝経路が異なる可能性が示唆された (図 4)。今後、尿素サイクルに異常症に対する薬剤療法や代謝改善のための検証が可能になると期待される。以上のことから、本手法を用いることで様々な細胞における効率よい遺伝子機能の検証が期待される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takahashi Yoshinobu, Sekine Keisuke, Kin Tatsuya, Takebe Takanori, Taniguchi Hideki	4. 巻 23
2. 論文標題 Self-Condensation Culture Enables Vascularization of Tissue Fragments for Efficient Therapeutic Transplantation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 1620 ~ 1629
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2018.03.123	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 Ayabe Hiroaki, Anada Takahisa, Kamoya Takuo, Sato Tomoya, Kimura Masaki, Yoshizawa Emi, Kikuchi Shunyu, Ueno Yasuharu, Sekine Keisuke, Camp J. Gray, Treutlein Barbara, Ferguson Autumn, Suzuki Osamu, Takebe Takanori, Taniguchi Hideki	4. 巻 11
2. 論文標題 Optimal Hypoxia Regulates Human iPSC-Derived Liver Bud Differentiation through Intercellular TGF β Signaling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 306 ~ 316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2018.06.015	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 Nie Yun-Zhong, Zheng Yun-Wen, Miyakawa Kei, Murata Soichiro, Zhang Ran-Ran, Sekine Keisuke, Ueno Yasuharu, Takebe Takanori, Wakita Takaji, Ryo Akihideo, Taniguchi Hideki	4. 巻 35
2. 論文標題 Recapitulation of hepatitis B virus?host interactions in liver organoids from human induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EBioMedicine	6. 最初と最後の頁 114 ~ 123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ebiom.2018.08.014	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 Zhang Ran-Ran, Koido Masaru, Tadokoro Tomomi, Ouchi Rie, Matsuno Tatsuya, Ueno Yasuharu, Sekine Keisuke, Takebe Takanori, Taniguchi Hideki	4. 巻 10
2. 論文標題 Human iPSC-Derived Posterior Gut Progenitors Are Expandable and Capable of Forming Gut and Liver Organoids	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Reports	6. 最初と最後の頁 780 ~ 793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.stemcr.2018.01.006	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

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 8件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Keisuke Sekine
2. 発表標題 Generation of human liver using iPS cells for regenerative therapies
3. 学会等名 American Association for the Study of Liver Diseases(AASLD) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keisuke Sekine
2. 発表標題 Generation of functional human liver from pluripotent stem cell.
3. 学会等名 26th East Asia Joint Symposium on Biomedical Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keisuke Sekine
2. 発表標題 Multicellular cancer organoid cultures for recapitulating cancer ecosystems
3. 学会等名 The 78th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関根圭輔
2. 発表標題 Recapitulating pancreatic cancer ecosystems by multicellular cancer organoid cultures based on patient-derived cancer cells
3. 学会等名 患者由来がんモデル (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keisuke Sekine
2. 発表標題 Generation of three-dimensional cancer tissue using patient-derived pancreatic cancer cells
3. 学会等名 Asia-Pacific Scientific Workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関根圭輔
2. 発表標題 再生医療応用へ向けたiPSC肝芽製造技術の開発
3. 学会等名 幹細胞の培養法・培養工学のためのコンソーシアム 第三回シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関根圭輔
2. 発表標題 ヒト組織三次元的再構成技術を用いたヒューマンバイオロジーの解析
3. 学会等名 第11回Symphony (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 関根圭輔
2. 発表標題 患者由来膵癌細胞を用いた三次元的癌組織の人為的創出
3. 学会等名 講演会：新しい治療法の開発を目指す患者由来がんモデル (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 関根圭輔	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 294
3. 書名 患者由来がんモデルを用いたがん研究実践ガイド、佐々木博己 / 編	

〔産業財産権〕

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----