

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：72611

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16154

研究課題名（和文）マーモセットナイーブ型胚性幹細胞樹立の試み

研究課題名（英文）The trial for the establishment of common marmoset ES cell lines with naive state

研究代表者

岸本 恵子 (Keiko, Kishimoto)

公益財団法人実験動物中央研究所・マーモセット医学生物学研究部・研究員

研究者番号：40616744

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,500,000円

研究成果の概要（和文）：POU5F1遺伝子のレポーターアッセイを行うため、マーモセットES細胞を用いてPOU5F1遺伝子の下流にGFP遺伝子を挿入し、POU5F1-GFP ES細胞株を得たが、検出されたGFPシグナルは予想よりも弱く、その後の解析に用いることは難しいことが考えられた。一方、マーモセットES細胞におけるnaive化の検討も行い、ヒトで用いられている条件よりマーモセットに最適化された条件を見出した。この最適化された条件で新たなES細胞株の樹立も試みた。明視野の観察において、単離されたICMの増殖の仕方が従来のES細胞樹立条件におけるマーモセットICMの増殖の仕方と異なることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにヒトES細胞を用いてES細胞naive化の検討は行われてきた。しかしながら、ヒトES細胞を用いた実験では、その後ヒト胚を用いたキメラ実験を行うことは倫理的に困難である。一方、ヒトと同じく霊長類で、実験動物であるマーモセットで実験を行うと、その後マーモセット胚を用いたキメラ実験が可能となる。今後、本研究で見出されたnaive化条件で培養、樹立されたマーモセットES細胞を用いてマーモセット胚におけるキメラ実験を行うことで、マーモセットES細胞がnaive化されたのか最終的に個体作出も倫理的に可能であるため、in vivoレベルで詳細に解析を行うことができると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The GFP gene was inserted downstream of the POU5F1 gene locus using marmoset ES cells to obtain the POU5F1-GFP ES cell line for the reporter assay. However, a weak GFP signal was detected, and it is possible that it will be difficult to use for analysis. On the other hand, we also examined the conditions for the Naive state in marmoset ES cells and found conditions optimized for marmosets compared to those used in humans. The new marmoset ES cell line was established under these optimized conditions. It was suggested that the outgrowth of isolated ICMs was different from that of marmoset ICMs under conventional ES cell establishment conditions by bright-field observation.

研究分野：発生生物学

キーワード：common marmoset 胚性幹細胞 naive化/prime化 内部細胞塊 キメラ実験

1. 研究開始当初の背景

本研究では、霊長類 ES 細胞がどうしたらキメラを形成するのかを解明するため、マウスにおいて発現機構が naive 型と prime 型で異なることが明らかとなっている、Oct3/4 (POU5F1) の発現機構に着目する。マーマセット ES 細胞、ICM、胚を用いて、マーマセット Oct3/4 遺伝子の発現制御機構を理解し、POU5F1 エンハンサーによる naive 型 ES 細胞の選抜が利用できないか検討する。さらに、新たなマーマセット ES 細胞の樹立を行い、マーマセット ES 細胞からキメラが作製できないか、解析を行う。

2. 研究の目的

本研究では、霊長類 ES 細胞がどうしたらキメラを形成するのかを解明することが最終目的である。そのために、1. POU5F1-GFP ES 細胞の樹立、2. マーマセット ES 細胞における naive 化の検討、3. ES 細胞注入によるキメラ胚の作製、4. 新たなマーマセット ES 細胞の樹立を行った。

3. 研究の方法

1. POU5F1-GFP ES 細胞の樹立

POU5F1 遺伝子の下流に GFP 遺伝子を挿入するために PITCh (Precise Integration into Target Chromosome) 法を応用した (Li HL et al, Methods., 2016)。GFP 遺伝子を挿入するためのドナーベクターやマーマセットゲノム上にある POU5F1 遺伝子の下流とドナーベクターを切断する、CRISPR ベクターを作製した。その後、リポフェクタミンによりこれらのベクターをマーマセット ES 細胞にトランスフェクションした。その後、1 週間程度で GFP シグナルは出現し、GFP が発現する ES 細胞は限界希釈法によりクローニングされた。

2. マーマセットにおける naive 化の検討

研究者が樹立した既存の ES 細胞を用いてこれまでに報告されているヒト ES 細胞で用いられている naive 化の条件を応用した (Semi Kea et al, Dev Growth Differ., 2021)。具体的に naive 化に用いた添加剤については図 1 に示した。また、基本培地はヒトでよく用いられている N2B27 培地が今回新たに Primate ES cell medium (Reprocell 社)を用いた。さらに、これまでにマーマセット ES 細胞では多能性維持に重要な LIF レセプターが発現していないことが知られている (Sasaki E et al, Stem Cells., 2005)。そこで、今回、LIF 同様、JAK/STAT 経路の活性化に機能することが知られている IL6 も添加する条件を加えた。

Initials	component	対応するシグナル (Activation/inhibition)
P	PD0325901	MAPK
G	Go6983	PKC
X	XAV939	WNT
L	hLIF	JAK/STAT
A	Activin A	TGF-β/SMAD
I	IL6	JAK/STAT

Initials	component	対応するシグナル (Activation/inhibition)
5i	PD0325901	MAPK
	IM-12	GSK3β
	SB590885	RAF
	WH-4-023	Src
	Y273632	ROCK
L	hLIF	JAK/STAT
A	Activin A	TGF-β/SMAD
I	IL6	JAK/STAT

図1:マーマセットES細胞のnaive化に用いた添加剤一覧

3. ES 細胞注入によるキメラ胚の作製

2. で検討された naive 化の培地条件で培養した POU5F1-GFP ES 細胞をマウス胚に注入した。霊長類の胚は貴重なため、まずマウス胚を用いて検討実験を行った。また、8 cell 期から桑実胚期のステージの胚を用いた。コントロールとしてこれまでに異種間キメラを形成することが知られている BCL2-GFP を発現する (Masaki H et al, Cell Stem Cell., 2016) マーマセット ES 細胞もマウス胚に注入した。

4. 新たなマーマセット ES 細胞の樹立

免疫手術により単離したマーマセット内部細胞塊を MEF 上で培養した。また、2. で検討した naive 化培地条件で培養した。約 10 日間培養した派生物をアクテースで剥離し、新しい MEF 上に播種し、培養を続けた。さらに、明視野における観察を数値化するため、SI8000 (SONY) の顕微鏡システムを用いて、ICM の増殖を観察した。

4. 研究成果

1. POU5F1-GFP ES 細胞の樹立

まず gene targeting により POU5F1 の下流に GFP 遺伝子の挿入を試みたが、効率が悪く、GFP 遺伝子を挿入することができなかった。そこで、次に PITCh 法により POU5F1 の下流に GFP 遺伝子の挿入を試みた。その結果、図 2 上段で示したように、トランスフェクションから約 7 日後、コロニーの一部で GFP が発現していることを確認した。しかし、そのシグナルはとても弱かった。その後、限界希釈法によりクローニングし、下段のように GFP のシグナルが確認できたコロニーから ES 細胞を増やし、その後の実験に用いた。また、GFP シグナルが思ったより弱かったため、POU5F1 の発現解析を内部細胞塊 (inner cell mass; ICM) から ES 細胞が樹立されるまでの過程と、着床前から着床後の胚発生過程において行なった。その結果、図 3 で示したように、着床前から着床後において POU5F1 の発現量は大きく変化しないことがわかり、ES 細胞が樹立される過程において ES 細胞で POU5F1 の発現量はピークであることが明らかとなった。発現量がピークだと思われる ES 細胞で GFP のシグナルが弱いことから、その後の解析に POU5F1-GFP ES 細胞株を用いることは難しいと考えられた。

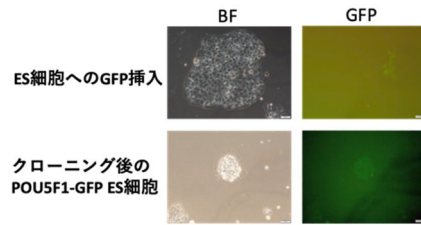


図2:POU5F1-GFP ES細胞株の樹立

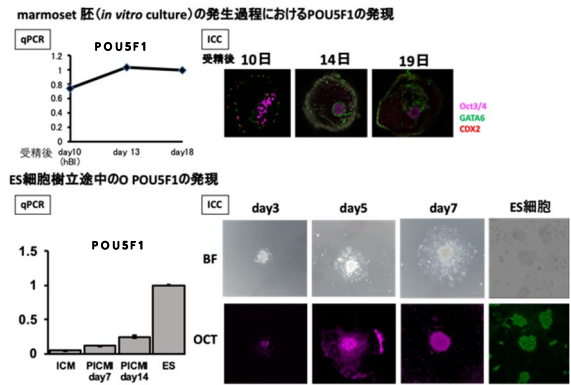


図3: マーモセット胚におけるOct3/4の発現解析

2. マーモセットにおける naive 化の検討

図 1 に示した添加剤を加えた PGXL, PGXLI, PGXLA, PGXLA1, 5iLA, 5iLA1 の 6 条件に基本培地を N2B27, Primate ES cell medium (Reprocell 社) の 2 種類用いた合計 12 種類の条件で検討を行った。その結果、図 4 に示した通り、どの条件でも従来の培地条件である Primate ES cell medium (Reprocell 社) に bFGF を加えた培地で培養した ES 細胞のコロニー形態と比べ、マウス ES 細胞のコロニー形態に似たドーム型のコロニー形態を示した。しかし、基本培地が N2B27 の条件では全体的に増殖速度は遅いように思われた。また、それぞれの培養条件で培養した ES 細胞から RNA を回収し、qPCR を行った結果、図 5 で示したように、基本培地が Primate ES cell medium (Reprocell 社) で培養した ES 細胞で naive 型マーカー遺伝子の発現が上昇することが明らかとなった。中でも特に PGXLI の条件下で naive 型マーカー遺伝子の発現上昇が見られた。さらに、基本培地が Primate ES cell medium (Reprocell 社) である条件で培養した ES 細胞を用いて免疫染色を行った。免疫染色の結果からも特に、PGXLI の条件で SUSD2 の発現がよく認められた (図 6)。これらの結果から、今回試された条件の中では、マーモセット ES 細胞の naive 化において、基本培地が Primate ES cell medium (Reprocell 社) で添加剤が PGXLI の条件が最も適していることが明らかとなった。

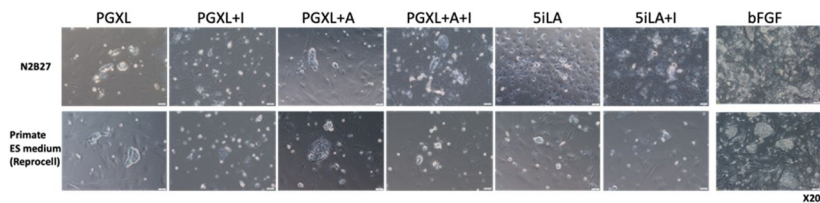


図4:naive化培養を行ったマーモセット ES細胞のコロニー形態

naive 型マーカー遺伝子の発現解析 (qPCR) を行った結果、naive 型マーカー遺伝子の発現が上昇することが明らかとなった。中でも特に PGXLI の条件下で naive 型マーカー遺伝子の発現上昇が見られた。さらに、基本培地が Primate ES cell medium (Reprocell 社) である条件で培養した ES 細胞を用いて免疫染色を行った。免疫染色の結果からも特に、PGXLI の条件で SUSD2 の発現がよく認められた (図 6)。これらの結果から、今回試された条件の中では、マーモセット ES 細胞の naive 化において、基本培地が Primate ES cell medium (Reprocell 社) で添加剤が PGXLI の条件が最も適していることが明らかとなった。

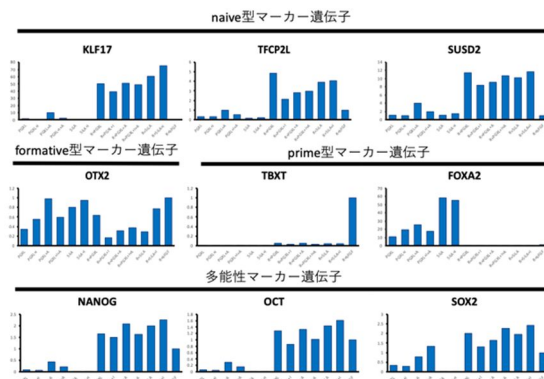


図5: naive化培地条件で培養したマーモセット ES細胞における RNA 発現解析 (qPCR)

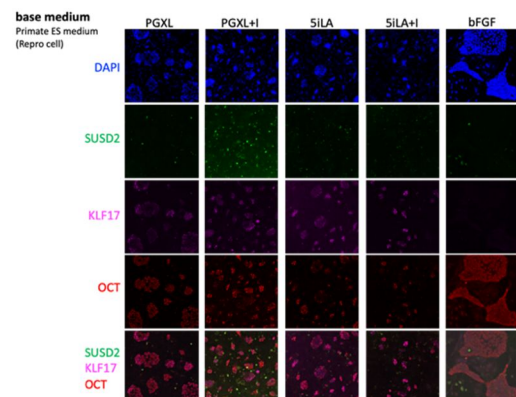


図6: naive化培地条件で培養したマーモセット ES細胞における発現解析 (ICC)

3. ES 細胞注入によるキメラ胚の作製

1. で樹立した POU5F1-GFP ES 細胞を 2. で検討した培地条件 (Primate ES cell medium (Reprocell 社) + PGXL) で培養した。また、同時にレンチウイルスで BCL2-GFP 遺伝子を挿入したマーモセット ES 細胞も用意し、naive 化した POU5F1-GFP ES 細胞と BCL2-GFP が発現する ES 細胞の 2 種類の ES 細胞を 8 cell 期～桑実胚期のマウス胚に注入し、胚盤胞期まで胚を培養した。その結果、POU5F1-GFP ES 細胞では GFP のシグナルが弱く、胚に注入した後、ES 細胞を追跡するのは困難であった。一方、コントロールとして用意した BCL2-GFP が発現する ES 細胞では十分に GFP のシグナルは検出され、胚中における ES 細胞の局在も鮮明に観察可能であった (図 7)。このことから本研究で樹立した POU5F1-GFP ES 細胞を解析に用いることは困難であることが示された。

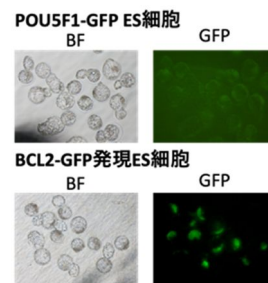


図7: マウス胚へのES細胞注入後、胚盤胞におけるES細胞の様子

4. 新たなマーモセット ES 細胞の樹立

研究開始当初、マーモセット胚に POU5F1-GFP をウイルスなどで感染させ、POU5F1 エンハンサーによる ES 細胞の選抜をしながら、新たな ES 細胞樹立を目指していた。しかし、本研究を行っていく過程でそもそも POU5F1-GFP の GFP シグナルが弱いことが明らかとなり、このままこの機構を利用しながら ES 細胞樹立を行うことは困難だと考えた。そこで、マウス ES 細胞の樹立過程とマーモセットの樹立過程で ICM の増殖の仕方が異なること (Kishimoto K et al, Stem Cell Res., 2021)に着目し、明視野で観察できないか考えた。本研究室で所有している SI8000 (SONY) の顕微鏡を用いて、明視野で観察する細胞の様子を数値化できないか検討した。まず、マウスとマーモセットで ICM から ES 細胞が樹立されるまでの様子をコロニーの形成範囲、細胞の増殖速度 (細胞の動き) に着目し、数値化した結果、図 8 で示した通り、細胞の増殖速度に違いは見られなかったものの、ICM から形成されるコロニーの範囲はマーモセットで広いことが明らかとなった。マーモセットでは ICM からの派生物は中心部分の盛り上がった細胞の集団とその周りに薄く広がった細胞集団の二層の細胞集団を形成するのに対し、マウスでは中心の盛り上がった細胞の集団のみ観察される。この違いが数値化できたことが示唆された。また、2. で検討された naive 化培地条件下でマーモセット ICM を培養し、新たな ES 細胞の樹立を試みたところ、図 9 で示した通り、基本培地 Primate ES cell medium (Reprocell 社) に 5iLA を添加した培養条件では中心の盛り上がった集団と周りの薄く広がった細胞集団が観察されたのに対し、基本培地 Primate ES cell medium (Reprocell 社) に PGXL を添加した培養条件では一層の細胞集団の広がりが観察された。現在、最も naive 化に適していた IL6 も添加した条件でも ES 細胞の樹立を試みている。また、今後 SI8000 (SONY) を用いて、これらの条件における ES 細胞樹立過程を観察する予定である。

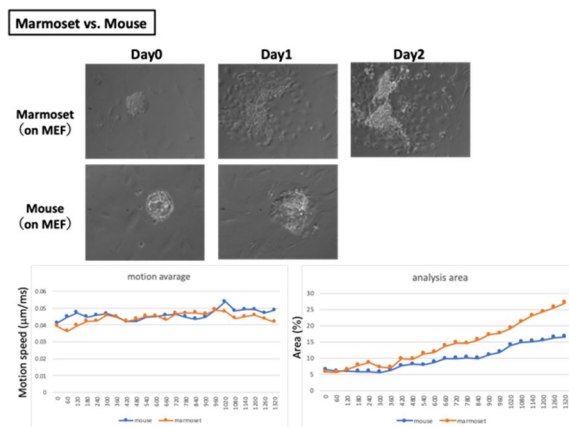


図8: SI8000 (SONY)でのES細胞樹立過程の解析

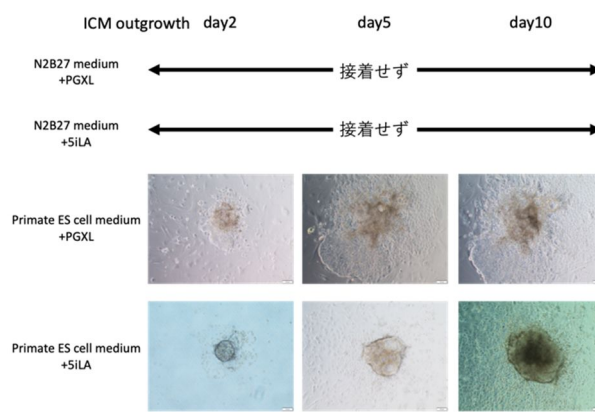


図9: Naive化培地条件におけるICM培養の様子

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Keiko Kishimoto, Akiko Shimada, Haruka Shinohara, Tsukasa Takahashi, Yuko Yamada, Yuichiro Higuchi, Nao Yoneda, Hiroshi Suemizu, Kenji Kawai, Yoko Kurotaki, Kisaburo Hanazawa, Yasuhiro Takashima, Erika Sasaki	4. 巻 53
2. 論文標題 Establishment of novel common marmoset embryonic stem cell lines under various conditions	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Stem Cell Research	6. 最初と最後の頁 102252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.scr.2021.102252	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nomura Jun, Zuko Amila, Kishimoto Keiko, Mutsumine Hiroaki, Fukatsu Kazumi, Nomura Yoshiko, Liu Xiaoxi, Nakai Nobuhiro, Takahashi Eiki, Kouno Tsukasa, Shin Jay W., Takumi Toru, ES library team	4. 巻 -
2. 論文標題 Autism in a dish: ES cell models of autism with copy number variations reveal cell-type-specific vulnerability	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	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) 10.1101/2022.02.02.478766	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Bergmann Sophie, Penfold Christopher A., Slatery Erin, Siriwardena Dylan, Drummer Charis, Clark Stephen, Strawbridge Stanley E., Kishimoto Keiko, Vickers Alice, Tewary Mukul, Kohler Timo N., Hollfelder Florian, Reik Wolf, Sasaki Erika, Behr R?diger, Boroviak Thorsten E.	4. 巻 -
2. 論文標題 Spatial profiling of early primate gastrulation in utero	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature	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) 10.1038/s41586-022-04953-1	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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 岸本恵子、上岡美智子、Huaiyu Hu、佐々木えりか
2. 発表標題 マーモセット胚の着床後における体外培養
3. 学会等名 第67回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Keiko Kishimoto, Michiko Kamioka, Huaiyu Hu, Erika Sasaki
2. 発表標題 SELF-ORGANIZATION OF THE IN VITRO ATTACHED NON-HUMAN PRIMATE EMBRYO.
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research Annual Meeting 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岸本恵子、Huaiyu Hu、Thorsten Edwin Boroviak、佐々木えりか
2. 発表標題 マーモセット胚の着床後における体外培養
3. 学会等名 第66回日本実験動物学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiko Kishimoto, Huaiyu Hu, Erika Sasaki
2. 発表標題 Self-organization of the in vitro attached non-human primate embryo.
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research Annual Meeting 2019. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岸本恵子、Huaiyu Hu、佐々木えりか
2. 発表標題 マーモセット胚の疑似着床後胚の培養法確立
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiko Kishimoto, Michiko Kamioka, Huaiyu Hu, Erika Sasaki
2. 発表標題 NON-HUMAN PRIMATE EMBRYOS CULTURED BEYOND POST-IMPLANTATION
3. 学会等名 International Society for Stem Cell Research Symposium Tokyo. (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岸本恵子、Huaiyu Hu、佐々木えりか
2. 発表標題 マーモセット疑似着床後胚の培養
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岸本恵子、上岡美智子、石淵智子、山田祐子、Huaiyu Hu、黒滝陽子、佐々木えりか
2. 発表標題 疑似着床体外培養コモンマーモセット胚の解析
3. 学会等名 第12回日本マーモセット研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

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

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
---------	---------