

令和 5 年 4 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19232

研究課題名（和文）蛍光局在＋バーコード二重標識による新規lineage tracing法の開発

研究課題名（英文）A novel lineage tracing system using dual labeling of fluorescence localization and barcoding

研究代表者

川又 理樹（Kawamata, Masaki）

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：80602549

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：これまで細胞の標識法は、蛍光で4色程度しか識別することができず、解像度が低い問題があった。そこで、2本のアレルに対するCRISPR-Cas9によるindelの誘導を蛍光識別できるAIMSを構築し、2色から蛍光の局在変化を利用し、9パターンを蛍光で識別できるシステムを開発した。また、CRISPR-Cas9のindelを利用したDNA barcodeを同時に標識することで、同色でも異なるクローン解析が可能なシステムへと発展させた。実際に蛍光パターンやbarcodeは細胞集団の中で多様性に富んでおり、これを確認し、新規二重標識 lineage tracing法の有用性を実証することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでのlineage tracingシステムは、蛍光のみで見分けられる細胞数が4個程度で解像度が低い解析系となり、実験結果から誤った仮説を提唱する恐れがあった。今回の二重標識技術を利用することで、識別できる細胞数を格段に増やすことができた。解析精度が格段に高まることによって、今まで築くことができなかったような真の生命現象を解き明かすことに貢献できる点で、学術的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）：Labeling methods for cells have so far only been able to discriminate several colors by fluorescence, and have had the problem of low resolution. Therefore, we constructed an AIMS that can identify the induction of indels by CRISPR-Cas9 for two alleles by fluorescence, and developed a system that can identify 9 patterns by fluorescent localization patterns. In addition, by simultaneously labeling DNA barcodes using indels induced by CRISPR-Cas9, we have developed a system that enables analysis of different clones among the same color. We confirmed that the fluorescent patterns and barcodes are diverse in the cell population, and demonstrated the usefulness of the new dual-labeling lineage tracing system.

研究分野：分子生物学、発生学、再生医療

キーワード：Lineage tracing DNA barcode CRISPR-Cas9

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

個々の細胞を標識することでそれぞれの細胞が組織内でどのように分布し、増殖するかを解析できる lineage tracing 法は、組織や臓器の発生や分化、がんなどの疾患メカニズム解明のために極めて重要な手法である。これまで細胞の標識法として 1. 多色蛍光での標識(Rainbow システム)と 2. ゲノム上への DNA バーコード配列の付加が主に行われてきた。それぞれの標識法に関して、蛍光標識は組織内の細胞分布が可視化でき、cell sorter での回収が可能である点で優れている。しかし、使用できる蛍光試薬は 4 色程度であるため、組織内に同蛍光の細胞集団クラスターが複数存在した場合、これらが 1 つの幹細胞か複数から発生、分化したかを結論づけることができない。また、4 色の蛍光を使用すると、解析したい遺伝子の発現レポーターを同時に搭載できず、蛍光免疫染色での遺伝子発現解析も限定的となる。一方、DNA バーコード法は無数の細胞の標識を可能とするが、組織・臓器内の細胞分布を視覚的に解析することができない。

2. 研究の目的

本研究では、それぞれの標識法が有する問題を解決すべく 2 つの標識法を融合させた「蛍光+DNA バーコード」による二重標識法によって 1 細胞レベルでの解析が可能で新規 lineage tracing 法を開発する。この際、従来の Rainbow 蛍光標識法とは異なり、蛍光の細胞局在の違いを利用した 2 色蛍光で 9 つの細胞集団を識別できる新しい技術を導入する。一般的な蛍光顕微鏡で 9 クローンを容易に識別できることは、多くの研究者に対して研究の利便性を高める点で意義は大きい。また、本技術は蛍光識別だけでなく、同時に indel のシーケンス解析によって最大で 1,000,000 (1000 x 1000 パターン) クローンをバーコード識別できる機能も同時に搭載できる。つまり、細胞集団の蛍光マクロ解析と、その集団を 1 細胞レベルでマイクロ解析が可能となり、これまでにない二重の細胞標識技術となる。この技術を駆使して、これまでの手法で解明できなかった肝臓がんの起源細胞を、倍数性肝細胞と、肝内転移がんか多中心性がんかという観点から同定を行い、本技術の in vivo 解析での有効性を証明することを目的とする。

3. 研究の方法

二重標識法は、我々が新しく開発した活性調節型 CRISPR-Cas9 技術と、2 本のアレルに対する insertion/deletion (indel) の誘導を 1 細胞レベルでリアルタイムに蛍光識別できる Allele-specific Indel Monitor System (AIMS) を組み合わせて行う (引用文献 1)。AIMS の P2A を sgRNA のターゲットにすることで、Cdh1-P2A-AIMS の蛍光は indel による frameshift で消失し (蛍光パターン 1)、in frame indel の場合は P2A ペプチド配列の破綻によりエンドペプチダーゼでの切断が起こらず、E-cadherin (Cdh1 gene) との fusion タンパクとなるため蛍光が膜局在となる (蛍光パターン 2)。

一方、sgRNA にシトシン (C) を付加することで自在に Cas9 活性を低下させ、片側アレルのみに indel を誘導する方法を開発した (図 2, 5C-35C)。これにより、indel が誘導されないアレルからの蛍光が細胞全体に局在する「蛍光パターン 3」を追加することができる。これが Venus アレルと tdTomato アレルの組み合わせとなるため、2 色の蛍光のみで 9 つの標識パターンが作り出せる。また、indel 自体が最大 1000 の異なる配列からなるため、これを DNA バーコードとして二重標識法として成立させることができるため、その有用性を AIMS のマウス ES 細胞で主に実証する。Indel DNA バーコードはサンガーシーケンスで確認し、tdTomato と Venus アレルの組み合わせにより、最大 1,000,000 パターンの indel パターンが検出できる。AIMS マウス ES 細胞は受精卵に injection し、キメラマウスを経てホモ型 KI としての AIMS マウスを作製する。AIMS マウス固体や組織由来の培養細胞を用いて、同様の蛍光パターンとバーコード解析を行い、二重標識法の有用性を検証する。

4. 研究成果

AIMS マウス ES 細胞において、[C]gRNA により Cas9 活性と indel による蛍光変動パターンを解析した結果、[15C]gRNA を用いた場合が蛍光パターンの多様性が最も高いと判断できた。両アレルに indel が挿入される場合、tdTomato アレルと Venus アレルに対する誘導バイアスは無く、均等に誘導されることも確認できた。さらに、indel が frameshift や巨大欠損などでの蛍光消失、in-frame による膜局在がそれぞれのアレルに起きる割合は、両アレルに indel が起きた場合において算出すると、規則性を持って分布することが分かった (図 3)。片アレル indel の場

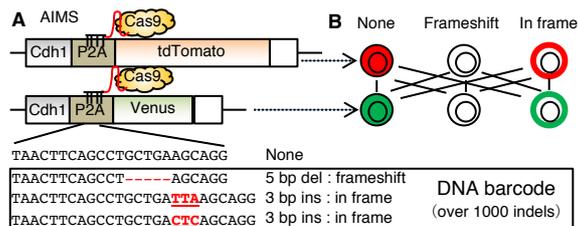


図1 AIMSによる蛍光+DNAバーコード標識

(A) Cdh1 dual color KI reporterマウスES細胞。Cdh1 codingの末端にP2A-蛍光カセットを連結。sgRNA-Cas9のターゲット配列をP2A内に設定。1000種類以上のindel配列導入により個々の細胞を識別可能。
(B) Indelによる蛍光局在と両アレルの組み合わせ。9パターンの蛍光組合せ。

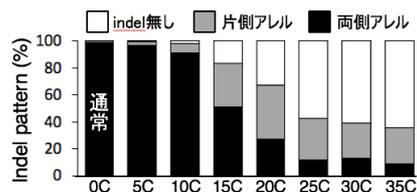
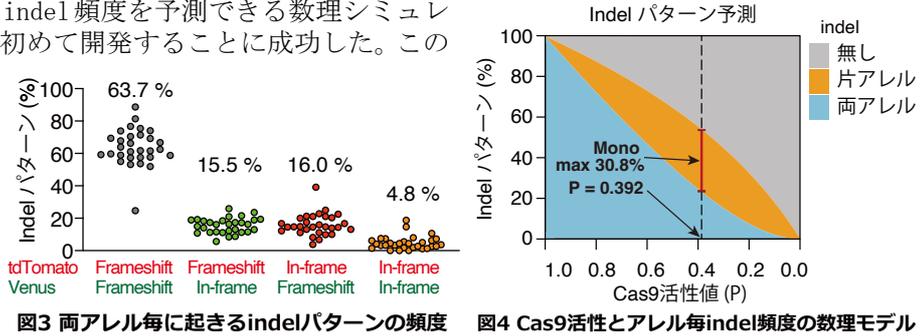


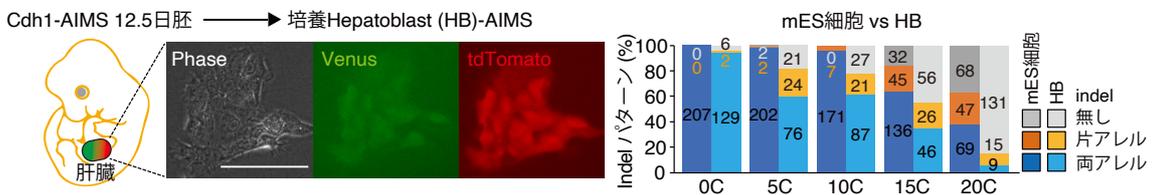
図2 C付加sgRNAによる片側アレルゲノム編集誘導法
AIMSを用いて両アレルに対するindel patternを解析。
C付加の長さ依存的にCas9活性が低下し、片側アレルのみにindelが誘導できるようになる。

合もそれぞれのアレルに均等に indel が誘導された。一方で、これまでに Cas9 活性とアレル毎の indel 頻度の相関関係を調べた報告はないため、本研究では、さまざまな gRNA ターゲット部位 (gRNA の種類) と、それぞれの gRNA に [0C]~[30C] を伸長させることで解析した。その結果、全ての gRNA で [C] の長さ依存的に活性が抑制され、両アレルから片アレル indel、編集無しの細胞の頻度の規則的な変動が見られた。そして、これら得られた大量データをもとに、Cas9 活性値からアレル毎の indel 頻度を予測できる数理シミュレーションモデルを初めて開発することに成功した。このモデルから、Cas9 活性値が 39.2% の時に、片アレル編集効率を 30.8% の頻度で最大化できることを明らかにした (図 4) (引用文献 1)。



Indel が誘導された ES 細胞のコロニー (クローン) からゲノム DNA を回収し、シークエンス解析を行ったところ、ほとんど重複のない DNA バーコードとしてダイバーシティを確認することができた。tdTomato と Venus アレル両方のバーコードの掛け合わせパターンを考慮すれば、ほとんどの細胞を識別可能になる。蛍光標識に関しては、各クローンを継代培養後、蛍光局在パターンは保持されたまま子孫の細胞に受け継がれることを蛍光顕微鏡で確認できた。したがって、今回開発した二重標識法が新規の Lineage tracing 法として有用であることを確認した。

次に、個体解析に向けて AIMS マウスの作製を行った。キメラマウス、ジャームライントランスミッションを経て、それぞれの KI マウスを交配することで、tdTomato と Venus アレル両方を持つ、ホモ型 AIMS マウスを得た。まず、二重標識法が上記のマウス ES 細胞以外の組織細胞に対しても有用であるかを in vitro 培養系で解析した。妊娠 12.5 日目のマウス胚の肝臓から初代培養細胞の Hepatoblast (Cdh1 を恒常的に発現) を樹立し、トランスフェクションにより indel を誘導した。その結果、興味深いことに、マウス (AMIS) ES 細胞に比べて [C] gRNA による活性抑制に対する感受性が高く (引用文献 1)、[5C] gRNA が蛍光パターンの多様性を最大化させるための最適条件であることを見出した (図 5)。



上記 in vitro の系において肝臓の細胞での二重標識法の有用性が確認できたため、次に AIMS マウス個体の肝臓で二重標識法が適応できるかを検証した。Indel を誘導するための all-in-one CRISPR プラスミド (上記の in vitro でも使用) を、hydrodynamic tail vein injection (HTVI) で導入した。HTVI 導入法は効率的に肝臓の肝細胞にプラスミドを発現させる方法で知られるが、免疫染色の結果、蛍光の消失や膜局在化した細胞はごく僅か (1%以下) しか得られなかった。

本研究では、マウス肝臓がんの発症や転移のメカニズムを解明することを最終目標と設定したが、今研究期間で達成することはできなかった。今後、この目標達成に向けてまず行わなければならないことは、肝臓の大部分の細胞において二重標識を誘導することである。上記の HTVI 法に代わる具体的な実験プランとして、アデノ随伴ウイルス 8 (AAV8) を媒体とした indel 誘導を計画している。AAV8 は肝臓への指向性が非常に高いことで知られ、実際に 9 割以上の肝細胞に目的遺伝子を導入、発現させることができる。この方法により大部分の肝細胞に対して二重標識が確認でき次第、diethylnitrosamine (DEN) の投与により肝臓がんを誘導する。腫瘍部位は蛍光パターン以外に、レーザーマイクロダイセクションでゲノムを抽出し、バーコード解析を行う。これにより、肝臓内に複数存在するがん細胞クラスターが、1 つの細胞由来 (クローナル) で、肝臓内を転移して発生したものか、もしくは複数箇所を原発とした起源細胞が異なるポリクローナルな多中心性がんであるかを特定し、肝臓がん発症と悪性化のメカニズムを解明する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kawamata Masaki, Suzuki Hiroshi I., Kimura Ryota, Suzuki Atsushi	4. 巻 -
2. 論文標題 Optimization of Cas9 activity through the addition of cytosine extensions to single-guide RNAs	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Biomedical Engineering	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/s41551-023-01011-7	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川又理樹、鈴木洋、鈴木淳史
2. 発表標題 活性調節型CRISPR-Cas9による安全で効率的な遺伝子治療技術の開発
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会 第六回総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川又理樹、鈴木洋、鈴木淳史
2. 発表標題 CRISPR-Cas9による新規Rainbow/バーコード二重標識システムの開発
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masaki Kawamata, Hiroshi I Suzuki, Atsushi Suzuki
2. 発表標題 Development of CRISPR-Based Rainbow/Barcode Dual Labeling System
3. 学会等名 Hot Spring Harbor Symposium 2022
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川又理樹
2. 発表標題 蛍光（位置情報）+ バーコード（1細胞情報）細胞同時標識システムの開発
3. 学会等名 第四回若手ワークショップ（細胞ダイバース）
4. 発表年 2021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