

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24613002

研究課題名(和文)ゲノムインプリントを利用した腫瘍形成しにくい多能性幹細胞の開発

研究課題名(英文) Establishment of pluripotent stem cells with low tumorigenesis by use of genomic imprinting

研究代表者

堀居 拓郎 (HORII, Takuro)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：00361387

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、移植医療に用いられる多能性幹細胞由来組織の腫瘍化をいかに低減するかを提示するものである。我々の研究により、片親由来の単為発生胚由来ES (PgES) 細胞は、正常胚由来ES細胞に比べて、分化させて移植した後の腫瘍形成頻度が劇的に低下することが分かってきた。PgES細胞のDNAメチル化および遺伝子発現を調べた結果、Snrpn遺伝子が腫瘍形成に関与していることが明らかとなった。今後は移植する細胞のDNAメチル化や発現をプロファイリングすることで、より安全な移植医療を築くことができるだろう。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is how reduce tumor formation after transplantation of ES/iPS-derived tissues. Our study has shown that parthenogenetic ES (PgES) cells are more suitable than normal diploid ES cells in the point of tumorigenesis after transplantation. Detailed analyses of DNA methylation and gene expression clarified that Snrpn gene causes tumor formation. Profiling of DNA methylation and gene expression before transplantation of ES/iPS-derived tissues will bring more safety transplantation therapy.

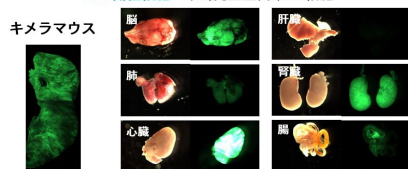
研究分野：発生工学

キーワード：単為発生 ゲノムインプリント 腫瘍形成 テラトーマ 移植医療

1. 研究開始当初の背景

多能性幹細胞を用いた移植医療は、現代の医療において必要不可欠な技術である。しかし、臓器移植を目的としたヒト ES 細胞の樹立は、倫理面における問題が指摘される。また、iPS 細胞は倫理問題をクリアできるが、樹立にはレトロウイルスや強制発現ベクターなど外来遺伝子が必要なことから安全面での実証が必要である。一方、単独では個体発生できない未受精卵由来のため倫理問題が少なく、樹立に外来遺伝子の導入も必要なく安全な単為発生胚由来 ES (PgES) 細胞はいずれの問題もクリアできる。申請者はこれまでに PgES 細胞は、あらゆる組織に分化できることから (Horii et al., *Stem Cells*, 2008)、臓器移植のツールとしての可能性を示唆してきた (Horii & Hatada, 2011 Review)。また、ES 細胞、iPS 細胞を利用した移植医療では、分化させた細胞から高頻度に腫瘍が形成されることが問題となっているのに対し、PgES 細胞は、腫瘍を形成しにくいという決定的利点をもつことがわかってきた。これは、PgES 細胞が単為発生胚由来なのでインプリント遺伝子のエピゲノムが ES 細胞、iPS 細胞などと比較して異なることが原因である。インプリント遺伝子は配偶子特異的に遺伝子修飾され、精子由来アレルと卵子由来アレルとは遺伝子の発現パターンが異なる。卵子由来アレルにはもともと胎子の成長を暴走させないようブレーキをかける役割があるため (Hernandez et al., *PNAS*, 2003)、単為発生胚では腫瘍化という暴走が起きにくいのだと考えられる。

単為発生胚由来ES細胞は各組織に分化できる (Horii et al., 2008)
GFP陽性細胞=単為発生胚由来ES細胞



単為発生胚由来ES細胞は、腫瘍化しにくい (Horii et al., 投稿準備中)



2. 研究の目的

本研究は、PgES 細胞の腫瘍形成頻度の高い株 (高腫瘍形成株) と低い株 (低腫瘍形成株) とを比較することで腫瘍形成の原因となるインプリント遺伝子を明らかにする。強制発現もしくは抑制実験により本当にその遺伝子が腫瘍の原因となるのか確認する。さらに、その遺伝子のエピゲノムを事前に検査あるいは制御することにより、分化させて移植しても腫瘍化しにくい安全な多能性幹細胞を

開発することを目的とする。特に、腫瘍形成遺伝子の正体を明らかにすることにより、PgES 細胞を使った移植医療の安全性を一層高めたいと考えている。

3. 研究の方法

PgES 細胞の樹立と分化後の腫瘍形成

マウス未受精卵を人為的に活性化させることにより、単為発生胚を作製する。具体的には、PMSG および hCG 投与により過排卵処理を行った雌マウスの卵管膨大部より未受精卵を回収し、塩化ストロンチウムと極体放出抑制のためサイトカラシン B を含んだ M16 培地で 6 時間処理を行い人為的に活性化させる。胚盤胞期まで培養を行った後、常法により ES 細胞を樹立する (Horii et al., *Stem Cells*, 2008)。これまでの研究から、ほとんどの単為発生胚由来 ES (PgES) 細胞は通常の ES 細胞、iPS 細胞と比較して腫瘍を形成しにくい (低腫瘍形成株)、樹立時のエピゲノムの変化により ES 細胞、iPS 細胞なりに腫瘍を形成する細胞株 (高腫瘍形成株) も得られると考えられる。そこで複数樹立した PgES 細胞を LIF 不含 ES 細胞用培地で十分に (12 日間を予定) 分化誘導させた後、ES 細胞と同系統のマウスの皮下に 1×10^6 細胞ずつ注入し腫瘍形成能を検定する。

原因遺伝子の同定

PgES 細胞の高腫瘍形成株と低腫瘍形成株の違いは腫瘍形成能を支配するインプリント遺伝子のエピゲノムが ES 細胞、iPS 細胞と異なるか同じであるかによると考えられる。そこで COBRA および Bisulfite sequencing により高腫瘍形成株において共通したエピゲノム変化を明らかにする。また、メチル化の違いは遺伝子発現に影響を与えていると考えられるので、定量的に遺伝子発現量を測定する (qReal-time RT-PCR)。

原因遺伝子の発現制御による腫瘍形成確認

網羅的エピゲノム解析により明らかとなったインプリント遺伝子を腫瘍形成の見られなかった ES 細胞株に強制発現あるいは siRNA の導入により腫瘍形成能が変化するか検討する。強制発現については、発現ベクター (pCAG vector) により行う。発現阻害については、正常 2 倍体 ES 細胞を用いて CRISPR/Cas 法により KO 株を樹立する。KO 細胞株自体および KO 細胞株由来の MEF を作製し、増殖速度を調べる。また、ES 細胞株を 12 日間の分化誘導の後、 1×10^6 細胞ずつマウスの皮下に注入する。1 ヶ月後、腫瘍形成頻度の違い、および腫瘍の良性/悪性の有無を確認する。

4. 研究成果

PgES 細胞の樹立と分化後の腫瘍形成

PgES細胞の樹立と分化後の腫瘍形成実験を行った。マウス未受精卵を人為的に活性化させることにより、単為発生胚よりES細胞 (PgES) を複数樹立した。樹立したPgES細胞をLIF不含ES細胞用培地で十分に (12日間) 分化誘導させた後、ES細胞と同系統のマウスの皮下に 1×10^6 の6乗細胞ずつ注入し、一ヶ月後に腫瘍形成能を検定した。コントロールとして、正常胚由来のES細胞でも腫瘍形成実験を行ったが、多くのPgES細胞由来組織では腫瘍が出来にくいことが分かった。

原因遺伝子の同定

次に、PgES細胞の高腫瘍形成株と低腫瘍形成株を用いてインプリント遺伝子のDNAメチル化および発現解析を行った。メチル化解析をCOBRA およびBisulfite sequencingにより行ったところ、高腫瘍形成株では*Snrpn*, *Peg1*, *p57kip2*などの母方アレルで高メチル化される遺伝子において脱メチル化が見られた。また、遺伝子発現をreal-time RT-PCRにより調べたところ、本来ほとんど発現していないこれらの遺伝子の発現が高腫瘍形成株では上昇していた。特に*Snrpn*の相関が高かったため、本遺伝子について詳しく解析することにした。

原因遺伝子の発現制御による腫瘍形成確認

まず、pCAG vectorを用いた*Snrpn*強制発現細胞株の樹立を試みた。PgES細胞2ライン (PgES#1およびPgES#2)を用いて*Snrpn*強制発現細胞株を樹立した。これらを分化誘導後、マウス皮下に移植し、一ヶ月後に腫瘍形成を確認した。PGES#1では、コントロールと有為な差はみられなかったが、PgES#2では*Snrpn*を発現させることで腫瘍形成率が約3倍に増加した。

次に、CRISPR/Cas法により*Snrpn*-KO ES細胞株を樹立した。未分化状態ではコントロールとKO間で増殖速度の差は見られなかったが、これらのES細胞を用いてキメラ個体を作製し、それらから樹立したマウス胎仔繊維芽細胞 (MEF) では、*Snrpn*-KO細胞で顕著な増殖速度の減少が見られた。腫瘍形成実験では、*Snrpn*-KO由来細胞で腫瘍形成の低下が見られるが、まだ試行回数が少ないため、現在さらなる追試実験を行っている。

以上より、*Snrpn*遺伝子はES/iPS細胞移植後の腫瘍形成に関与していることが示唆された。また、*Snrpn*を始めとするインプリント遺伝子の脱メチル化があまり生じていない細胞株をスクリーニングすることで、移植しても腫瘍形成しにくい細胞株を得られることが示唆された。

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 4件)

1) Horii T, Arai Y, Yamazai M, Morita S, Kimura M, Itoh M, Abe Y, Hatada I. Validation of microinjection methods for generating knockout mice by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Scientific Reports*, 4:4513, 2014. 査読有
Doi: 10.1038/srep04513.

2) Horii T, Morita S, Kimura M, Kobayashi R, Tamura D, Takahashi R, Kimura H, Suetake I, Ohata H, Okamoto K, Tajima S, Ochiya T, Abe Y, Hatada I. Genome engineering of mammalian haploid embryonic stem cells using the Cas9/RNA system. *PeerJ*, 1: e230, 2013. 査読有
Doi: 10.7717/peerj.230.

3) Horii T, Tamura D, Morita S, Kimura M, Hatada I. Generation of an ICF Syndrome Model by Efficient Genome Editing of Human Induced Pluripotent Stem Cells Using the CRISPR System. *Int J Mol Sci*, 14: 19774-19781, 2013. 査読有
Doi: 10.3390/ijms141019774.

4) Morita S, Takahashi RU, Yamashita R, Toyoda A, Horii T, Kimura M, Fujiyama A, Nakai K, Tajima S, Matoba R, Ochiya T, Hatada I. Genome-Wide Analysis of DNA Methylation and Expression of MicroRNAs in Breast Cancer Cells. *Int J Mol Sci*. 13:8259-8272, 2012. 査読有
Doi: 10.3390/ijms13078259.

[学会発表](計 11件)

1) 堀居拓郎、森田純代、木村美香、小林遼平、田村大樹、木村博信、末武勲、田嶋正二、安部由美子、畑田出穂「CRISPR/Cas法により樹立したTetトリプルノックアウトES細胞の特性」第36回日本分子生物学会年会、神戸、2014年11月25-27日

2) 堀居 拓郎, 山崎 美帆, 荒井 勇二, 森田 純代, 木村 美香, 伊藤 理廣, 安部 由美子, 畑田 出穂「CRISPR/Casによるノックアウトマウス作製法の最適化とダブルニッキング法」第3回ゲノム編集研究会年会、広島、2014年10月6-7日

3) 堀居 拓郎, 山崎 美帆, 荒井 勇二, 森田 純代, 木村 美香, 伊藤 理廣, 安部 由美子, 畑田 出穂「CRISPR/Cas法によるTet1ノックアウトマウス作製の最適条件」第107回日本

繁殖生物学会年会、帯広、2014年8月21-14日

4) 堀居拓郎、森田純代、木村美香、小林遼平、田村大樹、高橋陵宇、木村博信、末武勲、大畑広和、岡本康司、田嶋正二、落谷孝広、安部由美子、畑田出穂「半数体 ES 細胞と CRISPR/Cas を用いた高効率ゲノム編集」第 8 回日本エピジェネティクス研究会年会、東京、2014年5月25-27日

5) 堀居拓郎、森田純代、木村美香、小林遼平、田村大樹、高橋陵宇、木村博信、末武勲、大畑広和、岡本康司、田嶋正二、落谷孝広、安部由美子、畑田出穂「半数体 ES 細胞と CRISPR/Cas を用いた高効率ゲノム編集」第 35 回日本分子生物学会年会、神戸、2013年12月3日

6) 堀居拓郎、森田純代、木村美香、小林遼平、田村大樹、高橋陵宇、木村博信、末武勲、大畑広和、岡本康司、田嶋正二、落谷孝広、安部由美子、畑田出穂「半数体 ES 細胞と CRISPR/Cas を用いた高効率ゲノム編集」第 3 回ゲノム編集研究会年会、東広島、2013年10月26-27日

7) 堀居拓郎、森田純代、木村美香、高橋陵宇、木村博信、末武勲、田嶋正二、落谷孝広、畑田出穂「CRISPR/Cas と半数体 ES 細胞を用いたトリプルロックアウトおよび大規模染色体欠失の作製」第 106 回日本繁殖生物学会年会、東京、2013年9月12-14日

8) 堀居拓郎、小林遼平、田村大樹、森田純代、木村美香、畑田出穂「半数体胚由来 2 倍体 ES 細胞(hddES)の再生医療への利用の可能性」第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会、奈良、2013年5月30-31日

9) 堀居拓郎、柳澤永吉、森田純代、木村美香、畑田出穂「Risk of Epigenetic Changes is Increased by Low Oxygen in ART Embryo Cultures」第 35 回日本分子生物学会年会、博多、2012年12月11-14日

10) 堀居拓郎、柳澤永吉、森田純代、木村美香、畑田出穂「初期胚の低酸素培養は初期胚や胎盤に DNA メチル化異常を引き起こす」第 105 回日本繁殖生物学会年会、つくば、2012年9月6-8日

11) 堀居拓郎、柳澤永吉、森田純代、木村美香、畑田出穂「低酸素培養は初期胚にエピジェネティック異常を引き起こす」第 6 回日本エピジェネティクス研究会年会、東京、2012

年5月14-15日

〔図書〕(計 1 件)

Horii T and Hatada I: Epigenetic Instability in Embryonic Stem Cells. in Pluripotent Stem Cells (eds. Bhartiya, D. and Lenka, N.), InTech, pp. 301-316 (2013).

〔その他〕

ホームページ等

<http://epigenome.dept.showa.gunma-u.ac.jp/~hatada/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀居拓郎 (HORII, Takuro)

群馬大学・生体調節研究所・助教

研究者番号：00361387

(2) 研究分担者

畑田出穂 (HATADA, Izuhō)

群馬大学・生体調節研究所・教授

研究者番号：50212147