

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25290037

研究課題名(和文) ラット多能性幹細胞を利用した臓器欠損モデルの作製と胚盤胞補完法による臓器再生

研究課題名(英文) The production of the organ deficient model using rat pluripotent stem cells, and organ regeneration by blastocyst complementation procedure

研究代表者

平林 真澄 (HIRABAYASHI, MASUMI)

生理学研究所・行動・代謝分子解析センター・准教授

研究者番号：20353435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：Pdx1遺伝子、あるいはSal11遺伝子を欠失させることでそれぞれ、膵臓、あるいは腎臓を欠損させたラットを作製した。Venus Tgラット由来ES細胞を用いて胚盤胞補完を行ったところ、ホモK0ラット個体内で強いVenus陽性を呈する膵臓ならびに腎臓が再生されていた。また、Foxn1遺伝子の欠失により胸腺・T細胞を欠損したラットを作製し、GFP Tgマウス由来ES細胞で補完したところ、GFP陽性を呈する胸腺の再生が認められた。以上、同種(ラット)あるいは異種(マウス)の幹細胞からK0ラット個体内で機能的に正常な目的臓器を作らせることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Pancreas- and kidney-deficient rats were prepared by knocking-out (K0) the Pdx1 gene and the Sal11 gene, respectively. By applying blastocyst complementation, both organs could be regenerated from rat ES cells in homozygous K0 rat individuals. Knocking-out the Foxn1 gene resulted in mutant rats lacking thymus and T-cell population. Interspecies blastocyst complementation with mouse ES cells gave birth to viable rat offspring carrying mouse thymus. Thus, allogenic or xenogenic stem cells successfully contributed to regeneration of target organs in the K0 models.

研究分野：発生工学

キーワード：胚性幹細胞 異種キメララット ノックアウトラット 胚盤胞補完法 臓器欠損 人工ヌクレアーゼ CRISPR/Cas9

1. 研究開始当初の背景

ラットは脳地図の解析も進み、ゲノム情報がほぼ解読された小型実験動物としてマウス同様に広く普及している。特に精神・神経系においては重要な基礎データがラットにおいて蓄積されており、ヒトに近い薬剤反応を期待できることから、薬理学・毒性学の疾患モデルとして重要である。さらに、マウスよりも大きく外科的な手術操作が容易であり、再生医療を見据えた臓器移植のモデル動物としても今後ますます多用されると期待される。しかしながら、ラット多能性幹細胞を利用した特定遺伝子機能の破壊（ノックアウト; KO）は未だ開発途上の技術であり、効率的な KO ラット作製技術の確立が望まれている。

GSK3 阻害剤、MEK 活性化阻害剤および FGF 受容体阻害剤の 3 種類のインヒビターセットを添加した培養液を用いればラットにおいて ES 細胞株が樹立できると報告された (Cell 135; 2008)。我々も同方法を適用して、高率でキメラ個体作製に貢献し、かつ生殖系列へ寄与する ES 細胞株を CAG/venus トランスジェニックラット由来の胚盤胞から樹立することに成功し (Mol Reprod Dev 77; 2010)、近交系ラット由来の ES 細胞樹立 (Transgenic Res 22; 2013) や生殖系列寄与するラット iPS 細胞の樹立 (PloS ONE 6; 2011) にも成功した。また、目的の遺伝子を安定かつ全身性に均一に発現させるノックインを行うため、ラット Rosa26 遺伝子座が利用できることを tdTomato 遺伝子のノックインによって実証した (Stem Cells Dev 21; 2012)。以上、本研究課題を遂行するための最低限の手技や環境などの基盤が整った。

2. 研究の目的

近年、多能性幹細胞を用いた「再生医療」に大きな期待が寄せられているが、多種多様な細胞の立体的な集合体である臓器の発生過程を試験管内で完全に再現することが困難なため、これまでに臓器そのものを再生させるところまでは到達していない。それを克服するためには動物個体を用いて臓器を再生し、移植臓器として提供する方法が有効である。しかしながら、「再生医療」が早期活用されることに対する期待は大きい一方、技術面や安全面での研究はまだ初期段階にとどまっている。本研究の目的は、ラット多能性幹細胞と遺伝子欠損動物を利用した臓器再生技術を確立することであり、動物個体に作った「空き」に多能性幹細胞由来の臓器を再生させ、移植臓器として提供するための新技術を開発する。今回の研究では申請者らが樹立したラット ES 細胞と iPS 細胞を利用し、遺伝子ターゲティング法、TALEN 法、あるいは CRISPR/Cas9 法による臓器欠損ラットの作製を行い、同種・異種間における胚盤胞補完法を利用した臓器欠損モデルでの臓

器再生、ならびに多能性幹細胞由来の再生臓器の移植を受けたラットにおける生理機能検証を行うこととした。

3. 研究の方法

(1) 胸腺発生関連遺伝子 *Foxn1* をノックアウトしたラットの表現型解析と胚盤胞補完法による胸腺再生

ヌードマウスの原因遺伝子で胸腺の発生に関わる *Foxn1* 遺伝子を CRISPR/Cas9 システムによってノックアウトしたときのラットの表現型を調べた。ゲノム上の *Foxn1* 遺伝子を認識するガイド RNA (20~50 ng/ μ l) と Cas9 mRNA (20 ng/ μ l) を等量混合し、Cr1j:WI ラット由来受精卵の雄性前核に顕微注入した。生存卵子から誕生した産仔が離乳した後、耳組織から採取したゲノム DNA を用いて標的遺伝子の欠失・挿入を解析するとともに、*Foxn1* 遺伝子ホモ欠失個体の被毛および胸腺の有無を調べた。また、CD3、CD45 および CD161 の抗体を用いた末梢血リンパ球の FACS 解析により、T 細胞、B 細胞ならびに NK 細胞を定量した。さらに、*Foxn1* 遺伝子ホモ欠失個体同士の交配により作製した胚盤胞の胞胚腔に、全身性に GFP を発現するマウスから樹立した ES 細胞 5 個を顕微注入し、異種幹細胞由来の胸腺再生を試みた。

(2) 腎発生関連遺伝子 *Sal11* をノックアウトしたラットの表現型解析と胚盤胞補完法による腎臓再生

腎臓形成は胎生中期において後腎間葉と尿管芽が相互作用することによって始まる。本研究では後腎間葉に発現する転写因子 *Sal11* 遺伝子に着目し、ジーンターゲティング法によって同遺伝子を KO したラットの表現型を解析した。*Sal11* 遺伝子の DNA 結合ドメインが局在する第 2、第 3 エクソンを KO し、同遺伝子の発現部位で赤色蛍光タンパク質の tdTomato が発現するよう、ターゲティングベクターを設計・構築した。WDB/Nips 系統由来のラット ES 細胞にエレクトロポレーションによって同ベクターを導入し、G418 での薬剤選抜、およびサザンブロット解析によって相同遺伝子組換え ES 細胞株を選抜した。そして組換え ES 細胞を Cr1j:WI の胚盤胞に注入し、レシピエントの子宮に移植することでキメラを作製した。キメラと Cr1j:WI との交配によって *Sal11* 遺伝子ヘテロ KO ラットを作製し、ヘテロ同士の交配によって得られた *Sal11* 遺伝子ホモ KO ならびにヘテロ KO ラットの表現型を調べた。さらに、*Sal11* 遺伝子ホモ KO 個体同士の交配により作製した胚盤胞の胞胚腔に、CAG/Venus-Tg ラットから樹立した ES 細胞 5 個を顕微注入し、ES 細胞由来の腎臓再生を試みた。

(3) 膵臓発生マスター遺伝子 *Pdx1* をノックアウトしたラットの表現型解析と胚盤胞補完法による膵臓再生

本研究では、膵臓発生に関わる *Pdx1* 遺伝子を TALEN 法によってノックアウトし、ラットの膵臓における表現型を調べた。ゲノム上の *Pdx1* 遺伝子を認識する mRNA (3~10 ng/ μ l) と Exo1 mRNA (3~10 ng/ μ l) を等量混合し、Cr1j:WI ラット由来受精卵の雄性前核に顕微注入した。生存卵子から誕生した産仔が離乳した後、耳組織から採取したゲノム DNA を用いて標的遺伝子の欠失・挿入を解析するとともに、*Pdx1* 遺伝子ホモ欠失個体の膵臓の有無を調べた。さらに、*Pdx1* 遺伝子ヘテロ KO 個体同士の交配により作製した胚盤胞の胞胚腔に、CAG/Venus-Tg ラットから樹立した ES 細胞 5 個を顕微注入し、ES 細胞由来の膵臓再生を試みた。

4. 研究成果

(1) 胚盤胞補完法によるラット体内でのマウス胸腺の再生

ガイド RNA/Cas9 mRNA を顕微注入した後の生存卵子 158 個から 50 匹 (32%) の産仔が生まれ、うち 5 匹 (10%) は *Foxn1* 遺伝子の Δ 44 bp 欠失、 Δ 60 bp 欠失、+4 bp 挿入のいずれかの変異を片側アレルに、あるいは 2 つの変異をキメラかモザイクの状態を持っていた (表 1)。

表 1. CRISPR/Cas9 法による *Foxn1* 遺伝子 KO ラット作製

Cas9/gRNA (ng/ μ l)	前核期卵				出生数 (%)	変異体数 (%)
	注入数	生存卵 (%)	分割卵 (%)	移植数		
50/20	115	87 (76)	87 (100)	87	23 (26)	4 (17)
20/20	80	71 (89)	71 (100)	71	27 (38)	1 (4)
	185	187 (85)	158 (100)	158	50 (32)	5 (10)

F0 の交配により得られた Δ 44 bp / Δ 44 bp、 Δ 60 bp / Δ 60 bp、あるいは Δ 44 bp / Δ 60 bp のいずれかの *Foxn1* 遺伝子ホモ欠失個体は胸腺が欠損していた (図 1-b)。しかし完全な無

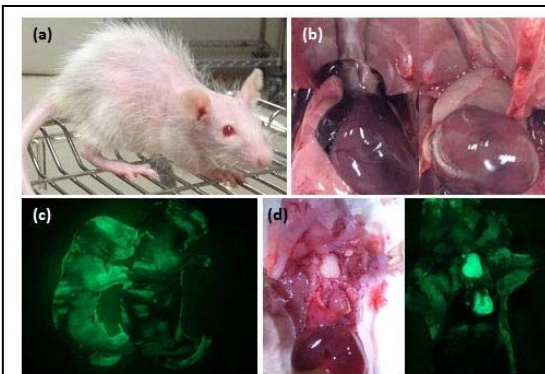


図 1: CRISPR/Cas9 法により作製した *Foxn1* 遺伝子 KO ラット (4 週齢) と胚盤胞補完法により再生させたマウス胸腺 (0 日齢)。

毛 (ヌード) ではなく (図 1-a)、それらの分娩能力ならびに哺育能力は正常だった。同ホモ欠失個体の末梢リンパからは T 細胞が著しく減少していた一方、B 細胞や NK 細胞の量は野生型ラットと同程度だった。ホモ KO ラッ

ト同士の交配により作製した胚盤胞の胞胚腔に、GFP マウス由来 ES 細胞を顕微注入して得られたキメラ産仔 (図 1-c) は、ホモ KO ラットであるにもかかわらず、強い GFP 陽性を示す胸腺が存在し (図 1-d)、末梢血の解析により CD3 陽性の細胞集団が認められた。つまり、ラット体内で再生された胸腺が機能し、ラット T 細胞の分化を誘導したと考えられる。以上、幹細胞補完による臓器再生のための有用モデル動物となる *Foxn1* 遺伝子ノックアウトラットを CRISPR/Cas9 システムによって作出できた。さらに、胸腺欠損ラット体内にマウス ES 細胞由来胸腺の再生に成功し、再生胸腺が正常に機能し得ることが示唆された。

(2) *Sall1*-KO ラット体内での腎臓再生

60 個の G418 薬剤耐性 ES 細胞株から 2 株の相同遺伝子組換え ES 細胞株が得られた。そのうち 1 株の組換え ES 細胞から 7 匹のオス

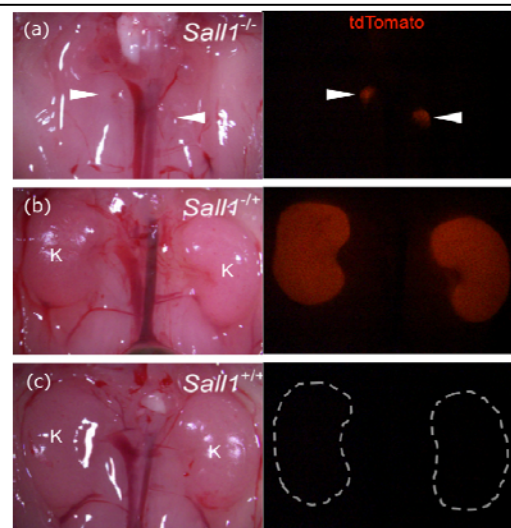


図 2: 遺伝子ターゲティング法により作製した *Sall1* 遺伝子 KO ラットの腎臓欠損。K: 腎臓

キメラを作製でき、うち 5 匹で相同遺伝子組換え ES 細胞の生殖細胞への寄与が認められ

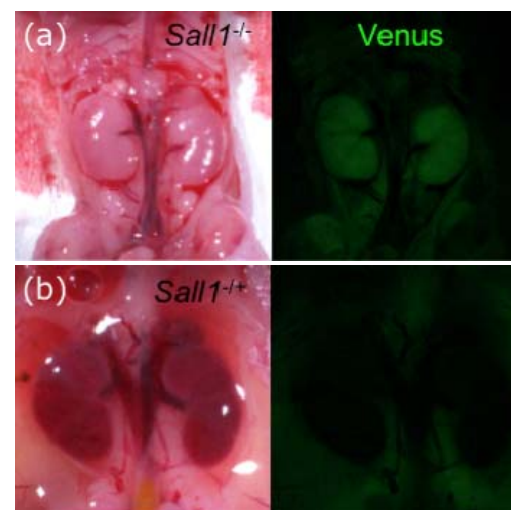


図 3: *Sall1* 遺伝子 KO ラットに胚盤胞補完法により再生させた CAG/Venus-ES 細胞由来の腎臓。

た。G2 世代の *Sa111* 遺伝子ホモ KO ラットは胎生 21.5 日の開腹で腎臓欠損であることがわかり(図 2-a、矢頭は痕跡)、出生させても授乳できないことから 1 日で死亡してしまった。G2 世代 *Sa111* 遺伝子ヘテロ KO ラットを胎生 21.5 日目まで開腹したとき、腎臓に tdTomato の赤色蛍光が認められた(図 2-b)。

ホモ KO ラット同士の交配により作製した胚盤胞の胞胚腔に、CAG/Venus-Tg ラット由来 ES 細胞を顕微注入して得られたキメラ産仔(0 日齢)は、ホモ KO ラットであるにもかかわらず、強い Venus 陽性を示す腎臓が存在した(図 3-a 右)。以上、ジーンターゲット法で *Sa111* 遺伝子の KO により腎臓欠損ラットの作出に成功し、ES 細胞を用いた胚盤胞補充による腎臓再生に成功した。

(3) *Pdx1*-KO ラット体内での膵臓再生

合計 262 個の前核期受精卵に *Pdx1* および Exo1 の mRNA 溶液を顕微注入し、生存卵子 236 個をレシピエント 9 匹に移植した(表 2)。108

mRNA濃度 (ng/μl)	注入卵数	生存卵数 (%)	分割卵数 (%)	移植卵数	出生数 (%)	変異体数 (%)
3	162	149(92)	147(99)	149	75(50)	4(5)
10	100	87(87)	83(95)	87	33(38)	3(9)
	262	236(90)	230(97)	236	108(46)	7(6)

匹の出産仔の内、102 匹が生存し、耳組織から抽出した DNA のシーケンス解析をした結果、7 匹の個体でシングルアレルに 2bp~9bp 欠失変異を持っていたことがわかった。

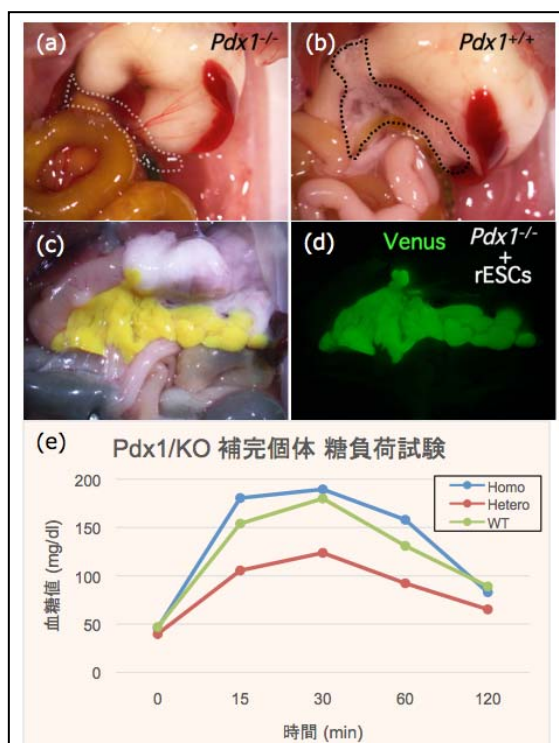


図4: *Pdx1*遺伝子KOによる膵臓欠損ラットと胚盤胞補充法により再生させたCAG/Venus-ES細胞由来の膵臓および補完個体の糖負荷試験。

これらヘテロ個体同士を交配させることでホモ欠失個体を作製したところ、生後衰弱死(2日目)する個体が観察され、それらを開腹し膵臓を確認したところ欠損個体であり、遺伝子型解析の結果、*Pdx1* 遺伝子のホモ欠失個体(図 4-a)であった。*Pdx1* 遺伝子ヘテロラット同士の交配により作製した胚盤胞の胞胚腔に、CAG/Venus-Tg ラット由来 ES 細胞を顕微注入して胚盤胞補充したところ、得られたキメラ産仔は、ホモ KO ラットであるにもかかわらず、強い Venus 陽性を示す膵臓が存在した(図 4-c, d)。補完個体は、性成熟後に糖負荷試験を行ったところ、*Pdx1* 遺伝子ホモノックアウトで ES 細胞によって補完された個体は、野生型ラットと同様の血糖値推移を示し(図 4-e)、補完された膵臓が機能していることが示唆された。

上記(1)~(3)の成果の他、CAG/Venus トランスジェニックラット由来の単為発生胚盤胞から 4 ラインの pES 細胞株を樹立することにも成功した。それらの未分化能は ALP 活性および幹細胞マーカー遺伝子発現により証明でき、キメララット産仔の解析から多分化能や生殖寄与能も備えていた。

さらに、核を可視化できるノックインラットを作製することにも成功した。その卵子をホストに用いればドナー核が PCC を起こすだけの時間を待った後に卵子側の核を確実に除去することができ、このようにして作出したクローン胚盤胞から未分化性、多分化性、生殖系列寄与の各能力を備えた ntES 細胞株を樹立することができた。

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 9 件)

- Goto T, 他 4 名, 5 番目. Hypomorphic phenotype of *Foxn1* gene-modified rats by CRISPR/Cas9 system. *Transgenic Res* (in press) (2016). 査読有 doi:10.1007/s11248-016-9941-9.
- Kaneko R, 他 8 名, 8 番目. Transgenic rat model of childhood-onset dermatitis by overexpressing telomerase reverse transcriptase (TERT). *Transgenic Res* (in press) (2016). 査読有 doi:10.1007/s11248-016-9939-3.
- Hara H, 他 8 名, 9 番目. Rat blastocysts from nuclear injection and time-lagged enucleation and their commitment to embryonic stem cells. *Cell Reprogram* 28: 108-115. (2016). 査読有 doi:10.1089/cell.2015.0084.
- Goto T, 他 6 名, 7 番目. Knock-in of a histone H2B-tdTomato reporter into the *Rosa26* locus allows visualization of cell nuclei in rats. *Mol Reprod Dev* 82

- 916-917. (2015). 査読有
doi:10.1002/mrd.22584.
- ⑤ Uenoyama Y, 他 15 名, 13 番目. Lack of pulse and surge modes and glutamatergic stimulation of LH release in Kiss1 knockout rats. *J Neuroendocrinol* 27: 187-197. (2015). 査読有
doi:10.1111/jne.12257.
- ⑥ Hayama T, 他 17 名, 17 番目. Generation of mouse functional oocytes in rat by xeno-ectopic transplantation of primordial germ cells. *Biol Reprod* 91: 89. (2014). 査読有
doi: 10.1095/biolreprod.114.121640
- ⑦ Hirabayashi M, 他 5 名. Effect of leukemia inhibitory factor and forskolin on establishment of rat embryonic stem cell lines. *J Reprod Dev* 60: 78-82. (2014). 査読有
doi:10.1262/jrd.2013-109.
- ⑧ Hirabayashi M, 他 9 名. Derivation of embryonic stem cell lines from parthenogenetically developing rat blastocysts. *Stem Cells Dev* 23: 107-114. (2014). 査読有
doi:10.1089/scd.2013.0200.
- ⑨ Hirabayashi M, 他 6 名. A retrospective analysis of germline competence in rat embryonic stem cell lines. *Transgenic Res.* 22: 411-416. (2013). 査読有
doi: 10.1007/s11248-012-9638-7

[学会発表] (計 13 件)

- ① 原 弘真, 平林 真澄, 他. ドナー核注入後に時間を置いて除核する方法で作製したラットクローン胚盤胞. 第 108 回日本繁殖生物学会, 2015. 9. 19. 宮崎大学木花キャンパス (宮崎県・宮崎市).
- ② 後藤 哲平, 原 弘真, 平林 真澄, 他. 臓器再生に向けた CRISPR/Cas9 法による腎臓欠損ラットの作出. 第 108 回日本繁殖生物学会, 2015. 9. 17. 宮崎大学木花キャンパス (宮崎県・宮崎市).
- ③ Hara H, Hirabayashi M, 他. Rat blastocysts resulting from somatic cell nuclear injection and time-lagged enucleation. The 48th Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, 2015. 6. 20. Puerto Rico (U. S. A.).
- ④ 後藤 哲平, 原 弘真, 平林 真澄, 他. CRISPR/Cas9 法により作出した FoxN1 遺伝子ノックアウトラットの解析. 第 62 回日本実験動物学会, 2015. 5. 29. 京都テルサ (京都府・京都市).
- ⑤ Nakamura S, Hirabayashi M, 他. The role of kisspeptin for defeminization/masculinization of sexual behaviors in rats. The 3rd Meeting of World Congress on Reproductive Biology, 2014. 9. 3.

Edinburgh (Scotland).

- ⑥ 中村 翔, 平林 真澄, 他. ラット性行動の発現制御におけるキスペプチンの役割. 第 107 回日本繁殖生物学会, 2014. 8. 13. 帯広畜産大学 (北海道・帯広市).
- ⑦ 香月 康宏, 平林 真澄, 他. 染色体工学技術とゲノム編集技術によるヒト化薬物代謝モデル動物の作製. 第 61 回日本実験動物学会, 2014. 5. 16. 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市).
- ⑧ Hirabayashi M, 他. Effect of leukemia inhibitory factor and forskolin on establishment of rat embryonic stem cell lines. The 40th IETS Annual Conference, 2014. 1. 12. Rino (U. S. A.).
- ⑨ Goto T, Hirabayashi M, 他. DNA methylation status of imprinted genes in rat ICM cells, rat ES cells and mouse ES cells. The 64th AALAS National Meeting, 2013. 10. 29. Baltimore (U. S. A.).
- ⑩ Hirabayashi M, 他. Successful derivation of rat embryonic stem cell lines from parthenogenetically developing blastocysts. The 64th AALAS National Meeting, 2013. 10. 29. Baltimore (U. S. A.).
- ⑪ 平林 真澄, 他. フォルスコリンの 2i 培地への添加はラット ES 細胞株の樹立に有効か?. 第 106 回日本繁殖生物学会, 2013. 9. 12. 東京農工大学農学部府中キャンパス (東京都・府中市).
- ⑫ 後藤 哲平, 平林 真澄, 他. ラットの内部細胞塊および胚性幹細胞におけるインプリント遺伝子の DNA メチル化解析. 第 60 回日本実験動物学会, 2013. 5. 16. つくば国際会議場 (茨城県・つくば市).
- ⑬ 平林 真澄, 他. 単為発生胚に由来するラット ES 細胞株の樹立. 第 60 回日本実験動物学会, 2013. 5. 15. つくば国際会議場 (茨城県・つくば市).

[その他]

ホームページ等
<http://www.nips.ac.jp/mamtg/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平林 真澄 (HIRABAYASHI, MASUMI)
生理学研究所・行動・代謝分子解析センター・准教授
研究者番号: 20353435

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

原 弘真 (HARA, HIROMASA)
自治医科大学・分子病態治療研究センター・助教

研究者番号：50751244