

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：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640062

研究課題名(和文)ハプロイドES細胞を用いたiPS細胞生成過程の制御因子の探索

研究課題名(英文)Screening for regulatory factors of iPS cell generation using haploid ES cells

研究代表者

堀江 恭二(Horie, Kyoji)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30333446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、遺伝子を網羅的に破壊し、その影響を調べることで、様々な遺伝子機能を効率的に同定する方法を樹立した。対象には、マウスES細胞を用いた。ES細胞やiPS細胞は、再生医療への応用の観点から大きな注目を集めているが、細胞系譜の決定因子を明らかにするためのモデル実験系としても有用である。本研究で樹立した手法は、生命科学の様々な分野で応用可能と考える。

研究成果の概要(英文)：We have established an experimental system to efficiently elucidate gene functions by introducing gene mutations in a genome-wide manner. We utilized mouse ES cells as a model system. ES cells and iPS cells are drawing attentions as a promising tool for regenerative medicine. Another useful aspect of ES cells and iPS cells is that they provide excellent experimental protocols for the investigation of cell lineage determination. The method established in the present study will be applicable in various fields of life science.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝学 ゲノム 再生医学 バイオテクノロジー 発生・分化

1. 研究開始当初の背景

iPS 細胞研究は、再生医療への応用の観点から大きな注目を集めているが、基礎的な生命科学の観点からも、細胞系譜の決定因子を明らかにするためのモデル系として重要である。例えば、iPS 細胞樹立の報告以来、組織特異的な転写因子を発現させることで、ある細胞系譜から別の細胞系譜への変換を誘導する direct reprogramming が進展した。このことは、iPS 細胞研究で得られた概念が、様々な細胞系譜へも適用可能なことを如実に表している。

このような観点から、本研究では、iPS 細胞の生成を制御する遺伝子を順遺伝学的手法で探索することを目指した。順遺伝学とは、多数の変異体の中から目的の表現型を示すものを特定し、その後、変異した遺伝子を同定する手法である。はじめに多数の変異体を作製する際には、研究者の恣意を介入させないため、予期せぬ遺伝子機能が見出されることが多く、breakthrough に繋がりがやすいのが特徴である。しかしながら、哺乳動物細胞では、各遺伝子が 2 コピー存在するために、順遺伝学自体が困難であった。最近報告されたマウス・ハプロイド ES 細胞は、この限界を越える可能性があるものとして注目される。ハプロイド ES 細胞は、未受精卵をストロンチウム等で刺激して細胞分裂を誘発し、1 倍体 (ハプロイド) のまま胚盤胞まで培養して培養皿上で株化したものである。研究代表者は、gene trap 法を用いて、2,000 株のヘテロ変異体 ES 細胞と、200 株のホモ変異体 ES 細胞を樹立した実績がある。Gene trap 法は、ベクターをゲノムヘランダムに挿入して遺伝子を破壊する順遺伝学的方法である。よって、ハプロイド ES 細胞に対して gene trap 法を適用してゲノムワイドに遺伝子変異を導入すれば、遺伝子機能を網羅的に破壊し、マウス細胞における順遺伝学が可能になると考えられる。

2. 研究の目的

上記の背景をもとに、本研究の当初計画では、ハプロイドゲノムを有すマウス ES 細胞を用いて、iPS 細胞の生成効率を高めるための標的遺伝子を同定することを計画した。まず、ハプロイド ES 細胞に対して、gene trap 法でゲノムワイドに遺伝子変異を導入後、分

化誘導を行う。次に、野生型の分化細胞が iPS 細胞化しない条件で、iPS 細胞への初期化を行い、得られた iPS 細胞で特異的に破壊された遺伝子を同定する。最終的には CRISPR/Cas9 システムにより候補遺伝子へ変異を導入し、表現型が再現される遺伝子を特定することを計画した。

ハプロイド細胞は、ヒトでも、慢性骨髄性白血病由来の細胞株 KBM7 が報告されている。また、KBM7 から iPS 細胞様の細胞株を樹立できることも報告されている。よって、本研究を KBM7 へ適用することで、将来的には、ヒト細胞での iPS 細胞生成過程を制御する遺伝子も単離できるとも考えた。

一方、本研究課題の採択後、CRISPR/Cas9 システムを用いて全遺伝子を破壊する方法が大きく進展した。この手法では、全遺伝子を網羅する guide RNA の発現ライブラリーを、Cas9 を発現する細胞へ導入する。ハプロイド細胞は、培養過程で自然にディプロイド化するので、一定の期間ごとに Hoechst33342 による生細胞ゲノム DNA の染色と FACS によるハプロイド細胞のソーティングが必要であるが、guide RNA の発現ライブラリーを用いると、そのような必要性は無く、簡便性では後者が優位である。しかしながら、guide RNA で両アレルが破壊される頻度には限界があるとも考えられるため、ハプロイド ES 細胞と CRISPR/Cas9 のいずれが適切かは不明であった。以下に示すように、本研究では、この両者を比較検討した。

3. 研究の方法

(1) ハプロイド ES 細胞への遺伝子破壊

ハプロイド ES 細胞を Hoechst33342 で染色後、FACS AriaII (BD BioSciences) にて、ploidy が 1n の領域を sorting した。Gene trap ベクターは、piggyBac を骨格としたものを、TransFast (Promega) を用いて導入した。Trap された遺伝子は、薬剤選択後のゲノム DNA において、linker-mediated PCR にてベクター挿入箇所の周辺ゲノム領域を増幅し、サンガー法にて塩基配列を決定することで同定した。

(2) CRISPR/Cas9 システムによる conditional な遺伝子破壊を行うためのベクターの構築とマウス ES 細胞の樹立

Cas9 は、Tol2 トランスポゾンベクターを用いて ES 細胞へ導入した。Cas9 のプロモーターには CAG を用い、その下流に、lox 配列で挟んだ mCherry を配置し、その下流に Cas9 と IRES-プラストサイジン耐性遺伝子を置いた。よって、プラストサイジンで選択することで安定細胞株を樹立し、さらに、mCherry のシグナルが高い clone を特定することで、その後の Cre による組換え後の Cas9 の発現も高くなることを期待した。このベクターを、Rosa26 遺伝子座へ ERT2-iCre-ERT2 を knock-in 済みの ES 細胞 (Horie et al. Nat Methods 2011) へ導入し、タモキシフェン依存性の Cre/lox システムの誘発と、それによる Cas9 の発現を可能にした。

(3) guide RNA ライブラリーの構築

Addgene より入手したレンチウイルスを骨格とする guide RNA ライブラリー (Koike-Yusa et al., Nat Biotech 2013) から、U6-guide RNA 領域を PCR にて増幅し、PGKpuro の薬剤選択カセットを有す piggyBac ベクターへ挿入した。ライブラリーの作製過程での guide RNA の complexity の変化は、各ライブラリーの guide RNA 領域を PCR で増幅して Illumina HiSeq でシーケンスすることで検討したが、大きな問題はなかった。(2) の ES 細胞へ piggyBac ライブラリーを導入し、タモキシフェンによる遺伝子破壊と分化抵抗性変異細胞の選択を行い、分化抵抗性細胞の集団を得た。piggyBac の導入は、まずは表現型を効率良く出させることを優先して、1 つの細胞あたりの導入コピー数が最大になる条件で行ったので、表現型の原因ではない guide RNA も選択されている可能性がある。そこで、分化抵抗性細胞の guide RNA 領域をレンチウイルスベクターへ移し換え、1 つの細胞あたりの導入コピー数が 1 であるとの確証を持てる条件で、再度、遺伝子破壊と分化抵抗性変異細胞の選択を行い、guide RNA 領域を Illumina HiSeq で同定した。

4. 研究成果

(1) ハプロイド ES 細胞における gene trap の効率の検証

ハプロイド ES 細胞へ gene trap ベクター

を導入し、遺伝子破壊を試みた。自然発生的なディプロイド化が生じる以前に遺伝子破壊を行う必要があるため、Hoechst33342 による生細胞ゲノム DNA の染色と FACS によるハプロイド細胞のソーティングを行ったところ、ソーティング後の細胞の生存率が顕著に低下した。再びディプロイド化が起きる前に gene trap ベクターを導入する必要があるのだが、生存率が低下した状態では、ベクターの導入効率が低く、それに加えて、もともと生存していた細胞も少ないため、ゲノムワイドに全遺伝子を破壊するのが困難であった。

(2) CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子破壊実験系の構築

ハプロイド ES 細胞に関する上記の問題点に鑑みて、代替法として、CRISPR/Cas9 システムによるゲノムワイドな遺伝子破壊を試みた。guide RNA ライブラリーの骨格には、piggyBac ベクターを用いた。piggyBac ベクターを用いた場合、ライブラリーがゲノムへ挿入する前にも、guide RNA がプラスミドから一過性に発現する。その際に遺伝子が破壊されてしまうと、細胞内へ挿入された guide RNA 配列と細胞に導入された変異との対応関係がつかなくなる。guide RNA ライブラリーを用いた遺伝子探索は、細胞へ安定的に導入された guide RNA 配列と、その細胞における変異とが 1 対 1 に対応することが、原因遺伝子を特定するための大原則である。そこで、piggyBac ベクターがゲノムへ挿入されたのちに Cas9 が発現するように、Cre/lox システムによって Cas9 をタモキシフェン依存性に発現させるベクターを構築し、あらかじめ、エストロゲン受容体-Cre 融合タンパクを発現させたマウス ES 細胞へ導入し、安定細胞株を樹立した。タモキシフェンによる Cas9 の制御を、以下の実験で検討した。まず、タモキシフェン添加前の Cre/loxP 間の組換え検出を PCR で試みた結果、PCR での検出感度以下であることを確認した。タモキシフェン投与前後での Cas9 の発現を免疫組織染色で調べ、タモキシフェンの制御が期待通りになされていることも確認した。タモキシフェンの投与前後での Cas9 の活性も、guide RNA を発現するレポーターベクターを transient transfection で導入することで確

かめた。以上より、タモキシフェン依存性に Cas9 の活性を制御できるマウス ES 細胞を樹立できたと考えた。

(3) guide RNA ライブラリーの導入による網羅的遺伝子破壊と、次世代シーケンサーを用いた変異遺伝子の同定

上記の ES 細胞へ、マウスのほぼ全ての遺伝子 (protein coding gene に限定) を網羅した guide RNA ライブラリーを導入した。導入後に、タモキシフェンを加えることで、網羅的に遺伝子が破壊されたと期待される細胞集団を調製した。まずは、ライブラリーによる遺伝子破壊が効果的に行われているかどうかを検証する必要があると考え、本申請で当初計画していたリプログラミング実験ではなく、より簡便な表現型解析実験として、分化誘導に抵抗性を示す変異体の同定を試みた。培地からの LIF を除去と、さらに未分化 ES 細胞に重要との報告がある pathway の阻害剤を加えたものの、2 通りの分化誘導を試みた。各々を、3 日間、もしくは 2 日間行い、分化抵抗性を示した細胞群を、繰り返し選択したのち、guide RNA 領域を PCR で増幅してレンチウイルスベクターの骨格へ移し換え、再度、同様の実験を行った。上記の様々な点でゲノム DNA を精製し、guide RNA 領域を PCR で増幅して Illumina HiSeq にて配列を同定したところ、p53 や Tcf3 といった、遺伝子破壊により分化抵抗性を示すことが知られている遺伝子群を上位に認めれたことから、実験系自体が有効に機能しているとの確証を得た。また、これまでに、分化抵抗性という観点で報告のない遺伝子も、guide RNA の read 数として上位に位置するものが多数存在した。これらの遺伝子は、ES 細胞の多能性を制御する新規の候補として注目される。

(4) 考察

今回の研究で樹立したタモキシフェン依存性の CRISPR/Cas9 システムは、通常の transient transfection による Cas9 の発現効果と同等以上のものであり、さらに、タモキシフェン投与前にのリークはほとんど認めなかったことから、極めて効率の良い実験系を構築できたと考えている。また、ハプロイド ES 細胞では、ハプロイド細胞を定期的

cell sorter で回収することが、網羅的遺伝子破壊という大規模な実験系を設定する上でのネックになったが、その点では、CRISPR/Cas9 は有効であった。しかしながら、CRISPR/Cas9 システムにおいて、次世代シーケンサーのデータから、表現型の原因を同定するのは、必ずしも容易ではないのが現実であった。大きな問題は、guide RNA の off-target 効果の評価である。今回のライブラリーでは、1 つの遺伝子に対して、guide RNA を 5 つ程度作製している。よって、当初は、ある遺伝子について、次世代シーケンサーにて複数の guide RNA を特定できれば、表現型の原因である可能性が高いと予想していた。しかしながら、そのようなものの中にも、RNAseq のデータからは、ES 細胞では発現無しと判定せざるをえないものも多数存在した。このような問題は、ハプロイド ES 細胞を用いた場合には生じないと思われる。よって、cell sorting による ES 細胞へのダメージを解消できれば、ハプロイド ES 細胞を用いた遺伝子破壊も、CRISPR/Cas9 にはない有効性が打ち出せると期待される。Hoechst33342 の濃度や投与時間を減らしたり、もしくは、Hoechst33342 は用いずに、サイズの小さな細胞を回収することで、ハプロイド ES 細胞の生存率が高いまま回収することが可能と思われる、今後の検討を要す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Masahiro Tokunaga, Chikara Kokubu, Yusuke Maeda, Jun Sese, Kyoji Horie, Nakaba Sugimoto, Taroh Kinoshita, Junji Takeda. Simulation and estimation of gene number in a biological pathway using almost compete saturation mutagenesis screening of haploid mouse cells. BMC Genomics, 査読有, 15:1016, 2014.

〔学会発表〕(計 4 件)

Junko Yoshida, Kyoji Horie. Live cell imaging for the analysis of cellular heterogeneity in mouse embryonic stem cell mutant clones identified by forward genetic screening. 12th Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. June 18-21, 2014, Vancouver,

Canada.

Junko Yoshida, Kyoji Horie. Rapid identification of homozygous mutant mouse embryonic stem cell clones showing differentiation resistant or differentiation prone phenotype. Global Controls in Stem Cells. November 5-7, 2014, Biopolis, Singapore.

堀江恭二、吉田純子. ホモ変異体マウス ES 細胞バンクを用いた包括的遺伝子機能解析 第37回日本分子生物学会年会 2014年11月25-27日 横浜

Junko Yoshida, Keiko Akagi, Chikara Kokubu, Junji Takeda, Kyoji Horie. Genome-wide comparative analyses of retroviral and DNA-type transposon vector integration sites. Conference on Transposition and Genome Engineering. November 17-20, 2015, Nara, Japan.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

該当無し

取得状況(計 0 件)

該当無し

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.narmed-u.ac.jp/~2phy/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀江 恭二 (HORIE, Kyoji)

奈良県立医科大学・第二生理学・教授

研究者番号：30333446

(2) 研究分担者

該当者無し

(3) 連携研究者

該当者無し