

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 10 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861473

研究課題名(和文)細胞機能解析によるヒトiPS細胞由来視細胞の移植適期同定

研究課題名(英文)Analysis of developmental stage of photoreceptors derived from human iPSC

## 研究代表者

本間 耕平 (Homma, Kohei)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：80462729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：視細胞が細胞死を引き起こす網膜色素変性や加齢黄斑変性症などの疾患において、ヒトiPS細胞を用いた細胞移植による治療が注目されている。しかし、ヒトiPS細胞から網膜細胞に分化させたときにどの発生段階の視細胞が移植に適しているのかは明らかではない。本研究では、ヒトiPS細胞ノックインラインを作製し、蛍光タンパク質で標識したヒト網膜視細胞を継時的に調べ、視細胞移植のために最適な発生段階を調べた。視細胞への分化は、Notchシグナル阻害によって促進し、この現象に関わるシグナルを調べることができた。

研究成果の概要(英文)：Retinal cell replacement therapy is a promising approach for the treatment of retinal degenerative diseases. To generate donor photoreceptors from human induced-pluripotent stem cells (iPSCs), we successfully inserted fluorescent reporter (E2-crimson) gene at the 3'-end of Crx (photoreceptor specific) gene in human iPSC genome by using CRISPR/Cas9 system. Crx gene and E2-crimson gene were connected with 2A peptide gene. After the translation of Crx-E2-crimson, 2A peptide is cleaved off and E2-crimson is released in the cytosol. Fluorescence of E2-crimson in Crx-expressing cells is detected by fluorescence-activated cell sorter and Crx positive cells are purified by the sorting. By using this gene expression monitoring system, we explored the Notch inhibition signaling during Crx upregulation by the treatment with DAPT, and the diversity of differentiation into rod photoreceptor from Crx-positive cells in vitro.

研究分野：神経科学

キーワード：ヒトiPS細胞 網膜色素変性 視細胞 細胞移植 CRISPR/Cas9 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

網膜色素変性や加齢黄斑変性症などの視細胞変性疾患において、視細胞移植の可能性が注目されている。マウスの実験系では、生後5日齢のマウス網膜視細胞をドナーにすることで宿主網膜への取り込みが劇的に改善されることが分かっているが、その要因については明らかではない。また、ヒトとマウスでは網膜の発生速度が異なるため、ヒト iPS 細胞から網膜細胞に分化させたときにどの発生段階の視細胞が移植に適しているのかは明らかではない。

申請者らはヒト視細胞を蛍光タンパク質で標識するため、視細胞に特異的な遺伝子のプロモーター（ヒト *Nrl* プロモーター：桿体視細胞；ヒト *Crx* プロモーター：錐体視細胞及び桿体視細胞）をクローニングし、視細胞に分化すると特定の蛍光タンパク質を発現する遺伝子ノックインベクターを作製した。そして、これらのベクターと TALEN (Transcription Activation-Like Effector Nucleases) を用いて、ヒト ES/iPS 細胞のノックインラインを確立した。この方法では、サイレンシングの影響を受けない特定の遺伝子領域 (AAVS1 サイト) に、目的遺伝子を選択的にかつ高効率に挿入することができる (Kaewkhaw R et al., Stem Cells, 2015)。

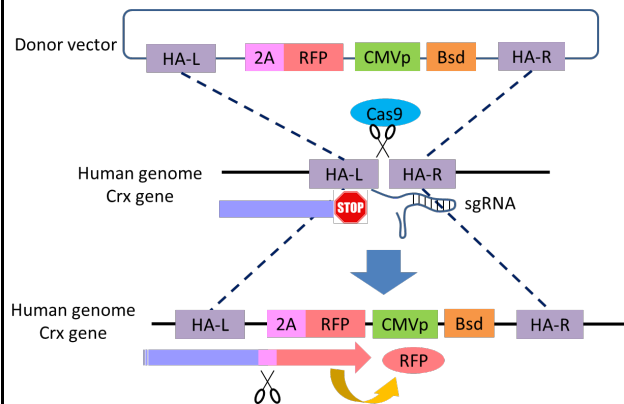
2. 研究の目的

そこで本研究では、マウスで用いられた実験データとヒト ES/iPS 細胞へのノックイン技術を生かして、蛍光タンパク質で標識されたヒト iPS 細胞由来視細胞の細胞機能解析を実施する。これによって、ヒトとマウスの視細胞の発達段階をそれぞれ生理学的、生化学的に比較することで、ヒトにおける移植に適した幼若視細胞の発達段階を同定することを目的とする。本研究により適切な時期の視細胞を明らかにすることで、効率的な視細胞分化シグナルや、移植時期に適した表面抗原、視細胞移植の効率を上げるための機構を探索して、ヒト視細胞の網膜移植に向けた技術基盤を構築することができる。

3. 研究の方法

本研究では、ヒト iPS 細胞を用いてフィーダーフリー維持培養系を立ち上げ、正常ヒト iPS 細胞分化培養を行った。ヒト視細胞の分化には長期間(120日)の培養が必要なので、申請者が実施している網膜3次元培養系 (Kaewkhaw R et al., Stem Cells, 2015) を基に、正常ヒト iPS 細胞分化培養が安定的に行える条件を決定した。条件決定後、各種ヒト視細胞関連遺伝子プロモーター蛍光タンパク質のノックイン iPS 細胞を CRISPR/Cas9 を用いて作製し (図1)、ゲノム PCR とサザンブロッティング法によりノックインが完成しているかを確認した。蛍光タンパク質がターゲットの視細胞をラベルしていることを抗体染色で確認し、

さらに、この分化した視細胞が、蛍光フローサイトメトリーにより分画することで、定量 PCR 法により視細胞の関連遺伝子発現を調べた。パッチクランプ計測法により、蛍光タンパク質陽性細胞の性質を調べた。



**図1 CRISPR/Cas9法を用いた *Crx* 遺伝子の3'末端側への蛍光タンパク質レポーター遺伝子のノックイン** single-guide RNA (sgRNA)によってCas9によるゲノムDNAの切断が起こる。この時ドナープラスミドが細胞内に存在することによって高効率に相同組換えが起こり、遺伝子ノックインが完了する。ノックインした細胞群は抗生物質耐性遺伝子 (*Bsd*) により選択することができる。

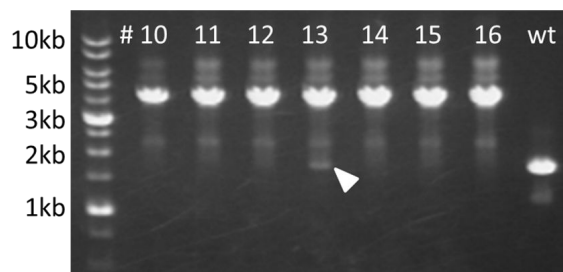
4. 研究成果

<平成26年度>ヒト iPS 細胞維持培養系を立ち上げ、遺伝子導入が行えることを確かめた。また CRISPR/Cas9 を用いてヒト iPS 細胞 *Crx* 遺伝子レポーターノックインラインを樹立した。ここでゲノム PCR によりノックインが完成しているかを確認した (図2)。先行研究により CRISPR/Cas9 はターゲット遺伝子以外の部分で DNA を切断し、遺伝子変異を引き起こす可能性が指摘されている。そこで、BLAST 検索により、4つのターゲット以外の候補遺伝子を見つけ、樹立されたノックインラインで変異が起こっていないことを確かめた。これらのノックインラインはヒト iPS 細胞の未分化マーカーである rBC2LCN で染色されることから未分化性が維持されていることが分かった。

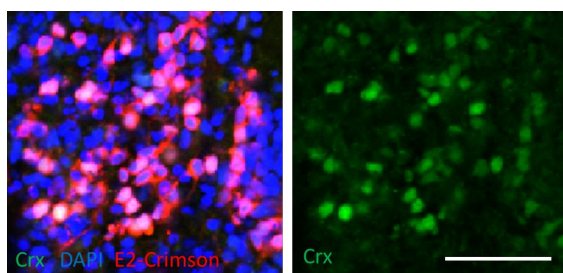
<平成27年度>ノックイン細胞株から網膜3次元培養系で網膜視細胞への分化誘導を開始し、蛍光タンパク質がターゲットの視細胞をラベルしていることを抗体染色で確認することができた (図3)。さらに、この蛍光フローメトリーにより分画することができ、定量 PCR 法によりノックインターゲット遺伝子である、*Crx* の発現を調べることができた (図4)。*Crx* の発現は、分化開始30日頃から確認することができ、90日以降さらに大きくなることが分かった。また、*Crx* の発現は蛍光タンパク質の

蛍光と相関していることを明らかにした(図5)。このことから、細胞内の遺伝子発現をある程度蛍光で定量出来ることが分かる。この視細胞への分化は、Notchシグナル阻害によって促進し、この現象には *Hes5* 遺伝子、*NeuroD1* 遺伝子が関与している可能性を示した。さらに、分化 294 日で各ノックインラインの比較を行うことによって、特に細胞が脆弱であり移植ドナー細胞の対象となる桿体視細胞への分化効率が異なることを示した。これらの細胞は、桿体視細胞の光応答に関連する遺伝子群を発現しており、パッチクランプ計測により蛍光タンパク質を発現している細胞の機能を調べることができた。(投稿準備中)

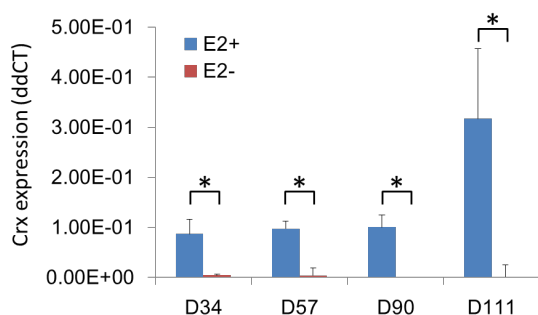
今回の実験結果から、ヒト iPS 細胞由来の視細胞の分化段階について定量的に調べる方法を確立することができた。今後このノックインラインを用いて、細胞の分化段階が実際の移植の効率にどのように影響するかを調べることが出来る。



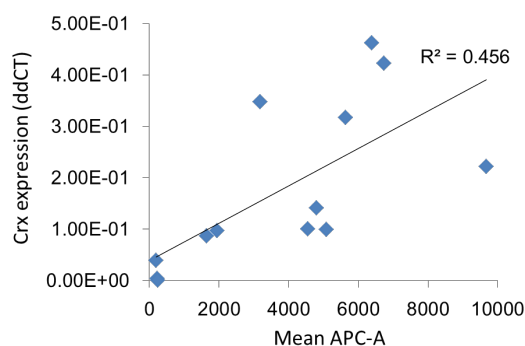
**図2 ノックインラインのジェノタイプング** コントロール(WT)のラインと比較してノックインライン群では遺伝子が挿入されたためにバンドが上方にシフトしていることが分かる。



**図3 Crx 陽性細胞の蛍光タンパク質標識と免疫染色** ほぼすべての E2-Crimson 陽性細胞が Crx を発現していることが分かった。



**図4 E2-crimson 陽性細胞の Crx 遺伝子発現** 分化後 30 日 (D30) 頃から Crx 遺伝子発現が観察され、分化 90 日 (D90) 以降、発現が増加していることが分かる。



**図5 E2-crimson 蛍光強度と Crx 遺伝子発現の関係** 様々な分化日数での E2-Crimson 陽性細胞の蛍光強度と Crx 遺伝子発現を調べると正の相関関係が得られた。

#### 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 2 件)

Kaewkhaw R, Kaya KD, Brooks M, Homma K, Zou J, Chaitankar V, Rao M, Swaroop A.

“Transcriptome Dynamics of Developing Photoreceptors in Three-Dimensional Retina Cultures Recapitulates Temporal Sequence of Human Cone and Rod Differentiation Revealing Cell Surface Markers and Gene Networks.” *Stem Cells*. 2015 Jul 31. doi: 10.1002/stem.2122. (査読有)

Kaewkhaw R, Swaroop M, Homma K, Nakamura J, Brooks M, Kaya KD, Chaitankar V, Michael S, Tawa G, Zou J, Rao M, Zheng W, Cogliati T, Swaroop A. “Treatment Paradigms for Retinal and Macular Diseases Using 3-D Retina Cultures Derived From Human Reporter Pluripotent Stem Cell Lines.” *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016 Apr 1;57(5):ORSF11-ORSF111. doi: 10.1167/iovs.15-17639. (査読有)

[学会発表](計 5 件)

1. Homma K, Kaneda M, “Visualization of photoreceptors derived from human iPSC by using CRISPR/Cas9 system” Society for Neuroscience 2015, Chicago, 2015/10/17-21 (poster)

2. 本間 耕平, 金田 誠; “Generation of human iPSC lines with photoreceptor-gene reporter by using CRISPR/Cas9 system”, 第 38 回日本分子生物

学会年会，神戸，2015年12月1-4日（ポスター，査読有）

3. 本間 耕平，“視細胞関連遺伝子レポーターノックインヒトiPS細胞を用いた視細胞分化段階の同定” Retina Research Meeting，東京，2015年10月31日（口頭，査読無）

4. 本間 耕平，金田 誠，“CRISPR/Cas9システムによるヒトiPS細胞ノックインライン作製と分化視細胞の可視化”，視覚科学フォーラム，福島，2015年8月19日（口頭，査読無）

5. 本間 耕平，金田 誠，“CRISPR/Cas9システムによる視細胞関連遺伝子レポーターノックインヒトiPS細胞ラインの作製”第38回日本神経科学大会 神戸，2015年7月28-31日（ポスター，査読無）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

本間 耕平 (HOMMA, Kohei)

日本医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：80462729