

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：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25660259

研究課題名(和文)ウサギ半数体胚性幹細胞の樹立と実用化への基礎研究

研究課題名(英文)The application of rabbit haploid embryonic stem cell to genome editing technology

研究代表者

細井 美彦 (HOSOI, Yoshihiko)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：70192739

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)：従来法と比べゲノム編集技術の効果的なツールとして半数体ES細胞に着目し、マウス、ウサギ半数体胚およびES細胞の作出を試みた。本研究ではウサギにおいては半数体ES細胞の作出にまで至らなかったものの、マウス半数体ES細胞の作出が可能であった。ライブイメージング技術によって、半数体胚は低い発生能を有することを見出し、また半数体細胞特有の自発的な倍加現象はERK/MEKカスケードの阻害によって制御できることを示した。以上より、半数体ES細胞技術の開発が可能であるという結論が得られた。

研究成果の概要(英文)：Haploid Embryonic stem cell(ESC) is more effective tool than conventional diploid ESC for genome editing. However, little is known about laboratory animal of haploid ESC besides the mouse. In this study, we aimed to obtain mouse and rabbit haploid ESC, and thus we tried to elucidate the characteristics of rabbit haploid embryo by live cell imaging technology. As a result, it showed to accumulation of developmental delays in each cell period of the produced rabbit haploid embryos are affecting the 8-cell stage or later development. On the other hand, we identified a new culture condition for inhibition of spontaneous polyploidy in haploid ESC. These findings indicated that haploid ESC has potential for new effective tool of genome editing in producing of human diseases animal model.

研究分野：繁殖・発生工学

キーワード：半数体細胞 ゲノム編集 胚性幹細胞 ライブセルイメージング ウサギ

1. 研究開始当初の背景

近年、遺伝子改変技術の進歩により、疾患に関連した遺伝子を操作・編集することでその疾患の治療につながる知見が得られている。例えば、特定の遺伝子を欠損させたノックアウト動物を作成し、その表現系の解析から新規疾患関連遺伝子等の発見が可能となる。そのため、新規創薬研究や疾患のメカニズムを解明するための有効なツールとして遺伝子改変技術を応用した様々な研究が進められている。しかしながら、これまで作成されている疾患関連遺伝子を対象とした遺伝子改変動物の多くはマウスやラットなどのげっ歯類が主流となっており、代謝経路相違や外科的手術が困難などヒトを対象とした疾患研究には不十分である。ところが、げっ歯類以外の動物種では、未だに遺伝子改変技術を利用した個体作成が難しいことが知られている。そのため、げっ歯類以外の動物種においても安定的かつ効率的な遺伝子組換え技術の確立および疾患モデル動物の作成は必須である。

2. 研究の目的

本研究では、マウスおよびウサギ半数体胚由来胚盤胞期胚から胚性幹細胞 (ES 細胞) を樹立し、遺伝子改変動物の作製およびその技術の確立を目的としている。実験動物としてのウサギは、中型動物であることから外科的手術が小型実験動物よりも容易であり、またマウスよりも代謝系がヒトに類似していることから、ヒト代謝疾患のモデルとして安全性試験や新規創薬の薬効試験など広く利用されている。そのため、ヒト疾患を対象とした遺伝子改変ウサギモデルは、学術的にもまた産業的にも重要な知見となる。ところが未だにウサギを含めマウスおよびラットを除いた動物種における遺伝子改変技術は確立しておらず、早期の開発が望まれている。そのため、もしウサギにおいて半数体 ES 細胞の樹立が可能となれば、より効率的な遺伝子欠損・導入によるヒト疾患モデル個体の作成が可能になると考えられる。また、ウサギ

ES 細胞は、ヒトやサルなどの ES 細胞とコロニーの形態や未分化維持機構等において類似した性質を有しているため、本研究で得られた知見はヒトを含めた霊長類に応用できる可能性は高い。

そこで本研究では、マウス半数体 ES 細胞の樹立方法の確立とその特性解析、ウサギ半数体 ES 細胞の樹立を実施し、半数体 ES 細胞を用いた効率的な遺伝子改変動物の作製方法の提案を目的とした。

3. 研究の方法

本研究ではウサギを対象とした半数体 ES 細胞および遺伝子組換え動物の作成の試みが目的であるが、まず本研究を進めるにあたり、半数体 ES 細胞の樹立が安定的に行える技術を確立するため、すでに研究報告があるマウスをモデルに雌性半数体 ES 細胞の作成を試みた。マウス半数体 ES 細胞は、雌性および雄性単為発生胚より作成することが可能であり、得られた半数体 ES 細胞は 1 つの染色体セットしか有していないため、通常の 2 倍体 ES 細胞と比べ、ホモ個体を得るためのゲノム編集に掛かる時間を大幅に短縮することが可能である。本実験で実施した方法は、まずマウス未受精卵にストロンチウム処理をすることで単為発生に必要な活性化を行なった。その後、胚盤胞期胚までの発生した胚を用いて ES 細胞の樹立を実施した。得られた細胞は、ES 細胞としての性質を有しているか性質検定を行った。検定には、未分化性の検定として未分化関連遺伝子の発現を Realtime-PCR、Westernblot および蛍光免疫染色を用いて解析した。さらに、多分化能性の検定として、*in vitro* では胚葉体を介した自発的な分化細胞の誘導、*in vivo* では SCID マウス皮下へ移植することでテラトーマ形成能およびその多様性について組織切片を作成し多方面から評価を行った。また、半数体 ES 細胞は、培養過程においてその半数性が崩れ、染色体が倍加することが知られている。そのため、半数体 ES 細胞を半数体として維持することが難しく、これらの細胞を用いた遺伝子改変技術を難しくしている。そこで、マウス半数体 ES

細胞の維持を効率的に行える培養系の開発をおこなうため、いくつかの small molecule を用いた培養環境の改善を試みた。培養系の評価にはフローサイトメトリーを用いて半数体あるいは2倍体細胞の集団の割合を指標に、培養環境の最適条件を探索した。次に、本研究の目的であるウサギ半数体 ES 細胞を作成するために、マニピュレーション操作によってウサギ受精卵から雄性前核の除核を行い、一つの前核を有する半数体胚を得た。この胚の発生過程を、ライブセルイメージング技術を用いて3次元的に観察し、卵割時における半数体胚の染色体及び紡錘体の動態の多次元画像情報を得ることで、ウサギ半数体胚の情報を獲得し、ウサギ雌性半数体胚の作成と発生過程を詳細に観察した。

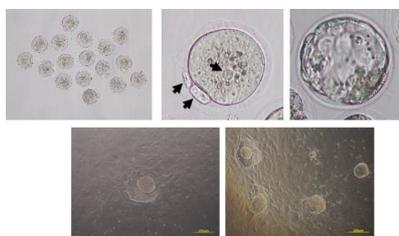
4. 研究成果

マウス半数体 ES 細胞の作出のため、雌性単為発生胚の作出を行った。単為発生活性化の評価については第二極体の放出を指標にした。引き続き培養を行った結果、胚盤胞期胚を10個(14%)獲得できた。得られた胚盤胞期胚をマウス線維芽細胞上で培養することで、内部細胞塊より細胞の進展が認められ、8株(80%)のES細胞の樹立が確認された(図1)。

図1: マウス半数体胚作出およびES細胞樹立

供試卵数	前核形成(%)*	2細胞期胚	胚盤胞期胚(%)	樹立数(%)
122	74(61)	72	10(14)	8(80)

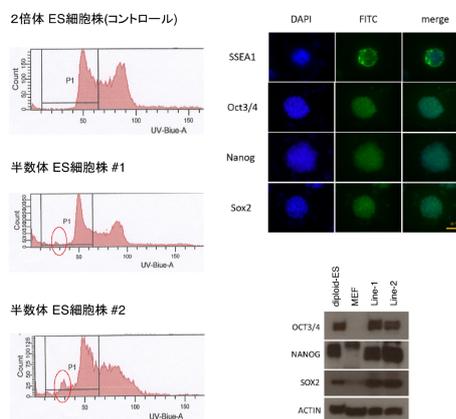
*前核形成数は第二極体の放出・雌性前核1個が確認できたものとす



次に得られたES細胞が、半数体であるかを評価するためHoechst33342染色を行い、フローサイトメトリーを用いて解析した。すると、8株得られたES細胞のうち、2株において半数体状態を示す細胞株を得ることができた。

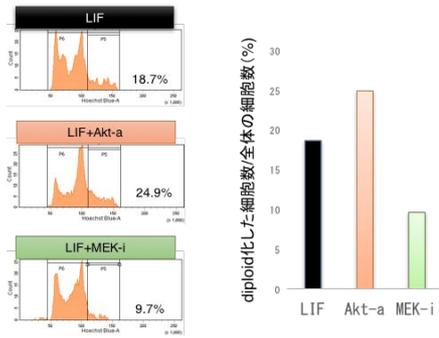
実際に得られた細胞株の核型解析を実施したところ、通常の数となる20本の染色体保有していたことから半数体であることが示された。これらの半数体ES細胞は、RealtimePCRおよびwesternblotによって未分化関連遺伝子であるOct4、Nanog、Sox2、Klf4遺伝子の発現が認められたことから、未分化状態を維持した細胞株であることが示された。また、蛍光免疫染色においても未分化な多能生幹細胞に特異的に発現しているとされているSSEA1の発現が認められた(図2)。

図2: マウス半数体ES細胞の特性解析



半数体ES細胞は、その培養過程において自然に倍加することから、半数体ES細胞を利用したゲノム編集技術の利用は難しいことが知られている。そこで次の実験として、培養環境の改善によるマウス半数体ES細胞の倍加制御を試みた。いくつかのsmall moleculeを用いて培養を行い、半数体ES細胞の状態変化を、フローサイトメトリーを用いて評価を行った。LIF単独での培養では、従来の報告通り、2倍体細胞の増加が示された。同様にAkt活性化剤を添加した培養環境においても同様の結果が示された。ところが、MEK/ERK阻害剤を添加した培養環境では顕著に倍加を制御し、半数体として維持することが可能であった(図3)。

図3: 異なる培養環境がマウス半数体ES細胞の状態変化に及ぼす影響



以上のことから、MEK/ERK シグナルカスケードの阻害によって容易に半数体 ES 細胞の維持が可能であることが明らかとなり、半数体 ES 細胞の効率的な樹立方法の確立においても重要な知見であると考えられる。

次に実際にウサギ半数体 ES 細胞の樹立にあたり、ウサギ半数体胚の作成を試みた。しかしながら、8 細胞期胚までの発生は認められたが、それ以降の胚発生は停止したことから半数体胚盤胞期胚の獲得には至らなかった(表 1)。

表 1: ウサギ半数体胚の発生

	供試胚数	前核胚数 (%)	2細胞胚数 (%)	4細胞胚数 (%)	8細胞胚数 (%)	桑実胚数 (%)	胚盤胞胚数 (%)
n	6	6 (100)	6 (100)	6 (100)	3 (50)	0 (0)	0 (0)
2n	5	5 (100)	5 (100)	5 (100)	5 (100)	5 (100)	1 (20)

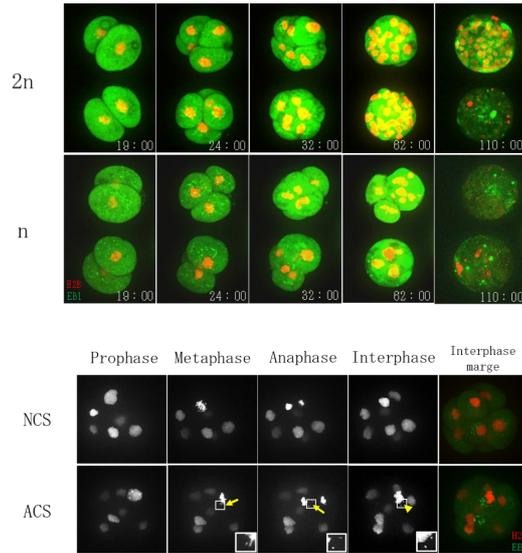
* 供試胚数を分母とする。 ** 前核形成数を分母とする。 実験回数=2

そこで、なぜウサギ半数体胚の獲得に至らなかったのか明らかにするために、ライブセルイメージング技術を用いて解析した。具体的にはウサギ半数体胚の卵割時における染色体及び紡錘体の動態の多次元画像情報を得ることで、ウサギ半数体胚の情報を収集した。分裂期の M 期染色体の体積を比較すると、半数体胚における核の体積が受精卵と比較して有意に減少していることが確認できた。また、ウサギ半数体胚の卵割過程を解析したところ、ウサギ半数体胚の発生が顕著に遅れ、8 細胞期以降で停止するものが多いことが確認された。さらに、2 細胞期及び 4 細胞期に要する時間を計測し、比較した結果、ウサギ半数体胚の 4 細胞期に要する時間が有意に増加していることが確認された。また、4 細胞期までの卵割における染色体分配異常 (Abnormal chromosome Segregation : ACS)

の観察を行ったが、ウサギ半数体胚及びウサギ 2 倍体胚において差は無く、染色体分配におけるゲノムの安定性は保たれていることが示された(図 4)。

図 4: 各細胞期に要する時間の比較と

ACS の観察画像



以上の結果から、作製されたウサギ半数体胚の各細胞期における発生遅延の蓄積が 8 細胞期以降の発生に影響していると考えられる。

本研究では、ウサギ半数体技術による遺伝子組換え動物の作成方法の提案を目的としていたが、マウスと異なり、ウサギにおける半数体胚の胚盤胞期胚までの発生は認められなかった。これはウサギ半数体胚発生における遺伝子発現調節機構の異常が原因であると考えられる。また、マウスをモデルとした半数体 ES 細胞の研究において、半数体 ES 細胞は自発的に倍加すること、またそれに対して、MEK/ERK シグナルカスケードを阻害することで、倍加を制御できることを明らかにした。このことは、ゲノム編集技術に利用可能な半数体 ES 細胞の効率的な培養方法の重要な知見となりうる。本研究によって得られた結果から、従来法では困難であった遺伝子組換えヒト疾患モデル動物の作出や創薬研

究に対して、半数体 ES 細胞を利用した新たなゲノム編集技術の提案ができると考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

第 15 回日本再生医療学会総会、「マウス半数体 ES 細胞の倍加抑制に関する研究」
竹原俊幸、寺村岳士、小野寺勇太、堀川知紗子、福田寛二、細井美彦. 2016 年 3 月 17-19 日、大阪国際会議場、大阪府大阪市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

近畿大学生物理工学部遺伝子工学科 発生遺伝子工学研究室

<http://www.waka.kindai.ac.jp/tea/gene/lab.hosoi/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細井美彦 (HOSOI, Yoshihiko)

近畿大学・生物理工学部・教授

研究者番号：70192739

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし