

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： 疾患モデル細胞の高効率創製と機能解析

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

研究代表者

松岡 英明 (東京農工大学大学院工学府生命工学専攻 教授)

主たる共同研究者

稲垣 暢也 (京都大学大学院医学研究科 教授)

小倉 淳郎 ((独)理化学研究所バイオリソースセンター遺伝工学基盤技術室 室長)

丹羽 仁史 ((独)理化学研究所発生・再生科学総合研究センター 多能性幹細胞研究チーム チームリーダー)

3. 研究内容及び成果

3 - 1. 研究課題全体

遺伝子に原因を求められる病気の治療や創薬の研究において、標的遺伝子の発現を制御した疾患モデル動物を自由に作製することができれば非常に有用であるが、技術的には極めて困難であるとされている。この研究課題は、その難問に正面から取り組んだものである。

その成果は、フェムトインジェクション技術の開発とマウスをモデル動物とした糖尿病疾患モデルES細胞のライブラリー作成という形になり、成功を収めている。これを達成するために、糖尿病、ES細胞、個体作出、単一細胞解析の第一人者からなるチームを編成出来たことが、成功の要因と思われる。チーム型研究(CREST型)の典型的な成功例の1つといえる。糖尿病モデルES細胞ライブラリーとしては、一つの遺伝子がノックダウンされたES細胞8種、2つの遺伝子がノックダウンされたダブルノックダウンES細胞3種が作製できている。これだけのライブラリーを完成させたのは世界初であり、高く評価したい。ノックダウンには、RNAi法が使われており、作製されたノックダウンES細胞の品質、すなわち遺伝子発現特性の評価が不可欠である。そのために開発されたのが単一細胞操作支援ロボット(SMSR: Single-cell Manipulation Supporting Robot)である。このSMSRの技術開発によって、マイクロインジェクションの効率が飛躍的に向上し、研究が加速されている。現時点では、フェムトグラムの遺伝子のインジェクションが可能となり、フェムトインジェクションと称することを提唱している。この技術は植物細胞にも適用が可能で応用範囲の広いものであり、世界中の研究者に注目され、共同研究も始まっている。

3 - 2. グループ別

1) 松岡グループ

SMSRの開発と疾患モデル細胞ライブラリー作製及び単一細胞機能解析を担当。

研究開始当初SMSRの原型は出来ていたが、インジェクションの精度や細胞の位置決めなど多くの改良が必要であった。直径が20 μm 以下のES細胞にもハイスルーブットでインジェクション出来るマイクロインジェクション、細胞観察、顕微画像解析などが培養器での培養を挟みながら行えるSMSRを完成させ、研究の進捗に大きく貢献した。これによってES細胞へのインジェクションの成功率は、0~0.2% 5~10%と飛躍的に向上した。また注入量も遺伝子量としてfgレベルで半定量的に導入出来るようになり、siRNAやshRNA発現ベクターの導入量とターゲット遺伝子発現量の低減の量的関係が分かるようになってきている。さらには、細胞質と核に刺し分けることが可能となっており、核膜を通過出来ないものを直接核にインジェクションすることも可能である。現時点でES細胞に使用出来るマイクロインジェクション装置はこの機種だけであろう。このSMSRは、植物細胞にも応用出来る非常に応用範囲の広いものであり、理研(タバコ細胞)、生研機構

(鶏)、スウェーデンカロリンスカ研究所(共同実験)などで利用されている。

疾患モデル細胞の作製については、実際の疾患が遺伝子の完全な欠失よりも、発現率の低下したものの組み合わせによることが多いこともあり、選択された8種の遺伝子から、RNAi法によって8種のシングルノックダウンES細胞の作製に止まらず、3種のダブルノックダウンES細胞も作製している。これらの細胞はインスリン産生細胞まで分化培養させた場合でもノックダウン効果を維持しており、遺伝子の発現率は大部分のものが25%以下となっている。これだけのライブラリーを保持しているのは、このグループだけであろう。

2) 稲垣グループ

疾患原因遺伝子を標的として改変した細胞の作成と細胞機能解析を担当。

このグループは、これまでに糖尿病の成因に関する分子生物学的研究を行ってきており、特にインスリン分泌や脂質輸送にかかわる遺伝子の単離を行ってきた。また、その過程でカリウムチャンネルやカルシウムチャンネルのほか、多様な基質を輸送するABCトランスポーターなど、様々な膜輸送蛋白をコードする遺伝子を単離してきた。糖尿病関連遺伝子は遺伝子名が明示されているものだけで50種類にも及び、さらに新たな発見が加わりつつある。その中から、単一の遺伝子の改変で確実に糖尿病を発症する可能性が高いものとして、PDX-1, GK、他の遺伝子との組み合わせによって糖尿病を発症させる可能性の高いものとして、IRS-1, Kir6.2, IRS-2, SHP, HNF-1, HNF-1 の8種を選択した。この中から、PDX-1をノックアウトしたES細胞の作製を担当して、これの作製に成功している。その他のモデル細胞を作成する研究は、松岡グループが担当した。

稲垣グループでは、引き続き糖尿病や肺サーファクタント欠損症をはじめとするさまざまな糖・脂質代謝疾患の原因遺伝子を単離・同定すると同時に、単一あるいは複数の疾患原因遺伝子を破壊あるいは改変することにより、作成した疾患モデル細胞の機能解析を行っている。肺サーファクタントの研究においては、ABCトランスポーターABCA3遺伝子をヒト肺からクローニングし、ABCA3が肺胞型細胞のサーファクタント分泌ベシクル(ラメラ体)の限界膜上に存在することを明らかにし、ABCA3が肺サーファクタントの分泌に関与している可能性を世界に先駆けて提唱するという成果を挙げている。

3) 小倉グループ

疾患モデル細胞からの核移植クローン個体の作出およびその基礎技術開発を担当。

このグループの核移植クローン技術、キメラ胚作製技術、顕微授精技術は世界のトップクラスにあるものと考えられるが、実際に疾患モデルマウスの作製に応用するために、技術の安定化、新たな技術開発を行っている。この技術を用いて、キメラ法、核移植クローン法、受精卵導入法によって疾患モデルマウスを作製した。何れの方法においても、shRNAをゲノムに有する目的のマウスの作出に成功している。しかしながら、多くの動物は、導入したコンストラクトの発現が抑えられている可能性が高いことから、この発現抑制を解除する必要がある。小倉グループでは一部について成功し、疾患モデル動物としての有用性を検討する予定である。

技術開発の一つの目的であったマウスの核移植クローン技術については、始原生殖細胞、NKTリンパ球、造血幹細胞、神経幹細胞のクローンに初の成功を収めた。この成果は既に多くの論文に引用されており、クローン分野にインパクトを与えている。その他、新規幹細胞としてのGS細胞の樹立やshRNAのトランスジェニックマウスの作出、体細胞に遺伝子を導入してクローンマウスを作出するなど、本研究で開発した技術および成果は、今後、疾患モデル動物の作出に幅広く応用されると期待している。

4) 丹羽グループ

新規ジーントラップ法による遺伝子マーキングおよび変異ES細胞の系統的作出とその解析法の確立を担当。

この研究を開始した時点では、RNAi法をマウスのES細胞に適用した例はなかった。従って、siRNAあるいはshRNA発現ベクターの効果について詳しく調べるところから着手している。

研究の成果としては、用いる配列の選択に、程(東京大学)らが報告したルールに従うと、ES細胞の場合で約60%の有意なノックダウン効果(20%以下に減少)を与えうることを確認した。また、ES細胞とHela細胞を用いたRNAiの効果は、ES細胞の方がより高い配列依存性を示すことを見出している。導入の方法として、オリゴRNAとshRNAを発現させる方法の比較を行い、shRNAでノックダウン効果を持続させても、得られるノックダウン効果には有意な差が認められないことを確認している。ES細胞においてノックダウン法とノックアウト法の比較を、転写因子Sox2を用いて行っており、Sox2 ノックアウトはほぼ100%の効果を示すが、siRNAは50%以上のノックダウン効率を達成出来ず、表現型の変化も誘導出来なかった。shRNA クローンの表現型にはクローン間のバラツキが大きく、殆ど変化のないものからノックアウトに近い効率を示すものも認められた。Sox2のケースでは、ノックアウトの表現型をノックダウンで模倣することが困難であることを明らかにしている。これらの成果は、RNAi法利用に際しての重要な知見となっている。

4. 事後評価結果

4 - 1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

論文 (原著)		口頭 (ポスター)		講演		その他 (著作など)		特許出願	
国際	国内	国際	国内	国際	国内	国際	国内	国際	国内
113	0	33	118	21	49	11	39	2	6

各グループが満遍なく多くの論文・口頭発表を行っており、招待講演も多い。この分野をリードしていることは明かである。

この研究で作製したSMSRは、この分野では世界のトップをいくものであり、ES細胞にも対応出来る適用範囲の広さ、フェムトグラムの遺伝子を注入出来る精度、細胞位置情報のデータベース、優れた操作性などの特徴を備えており、他の追隨を許していない。出来るだけ早く本格的な市販を開始して、この分野の発展に寄与することを期待したい。

疾患モデル細胞の分野は、世界的に競争の激しい分野であるが、RNAiを用いて作製した糖尿病モデルES細胞のライブラリー(現時点で11種)を作製し培養によってインスリン産生細胞まで分化させて、ノックダウン効果の確認までに行っていることは優れた成果である。これだけのライブラリーを有しているのは、世界でもこのチームだけである。このモデル細胞を作製する過程で検討され、得られた遺伝子変異ES細胞の系統的作製技術やクローン個体の作出技術は、今後この分野で利用されていくものとなると思われ、大きな貢献となるであろう。

疾患モデルES細胞からマウス個体の作出までは成功しており、目的の遺伝子が導入されていることも確認されている。残念ながら、サイレンシング(遺伝子不活性化)の壁があり、まだこの壁の解除には成功しておらず、疾患モデル個体とすることはできていないが、この問題を解決して疾患モデル個体の作出へと研究を進めて欲しい。

4 - 2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

この研究の過程で生み出された技術などは、それぞれ科学的・技術的に非常にインパクトの高いものである。SMSRは、多くの細胞生物化学の研究者が利用可能であり、これによって従来難しかった小さな細胞

への遺伝子導入が可能となった。RNAiや各種遺伝子の機能解析に応用可能であり、研究の精度向上やスピードアップに大きく貢献するであろう。加えて、細胞内へ蛋白質や薬剤などを容易に導入することが可能となるため、大きな波及効果が期待出来る。

糖尿病疾患モデルES細胞のライブラリーを作製出来たことと、そのための技術やES細胞からマウス個体作出までの種々の技術を解析・研究して、転写因子の分化への関与や多くの体細胞からクローン作製効率を比較するなど、今後のこの分野での研究に有用な技術を数多く開発しており、大きな貢献があった。

4 - 3 . その他の特記事項(受賞歴など)

受賞 小倉 淳郎 (平成17年 日本繁殖生物学会学会賞)

平成16年 カロリンスカ研究所(スエーデン)にてWorkshop on SMSR を開催

SMSRに関する共同研究

理化学研究所「タバコ培養細胞BY-2における細胞内タンパク輸送の分子機構解析」

農業・生物系特定産業技術研究機構「鶏始原生殖細胞を利用した新規医薬品・食品生産技術に関するアセス調査 - 高効率マイクロインジェクションを可能にする細胞ナノテクノロジー領域」

広島県産業科学研究所「カイコ卵へのインジェクションシステム」

松岡教授を企画責任者とする「次世代型バイオリソースの開発」(文部科学省特別教育研究経費(特別研究推進 H19-23年度)採択