

論文内容の要旨

申請者氏名 Jonathan Jun-Yong Lim

近年、再生医療研究において、移植用臓器の不足を補うために様々な研究が行われている。その中でも臓器を欠損する遺伝型の受精卵に多能性幹細胞を注入する胚盤胞補完法が、動物モデルで移植可能な多能性幹細胞由来の臓器を作る方法として確立され注目されている。この方法で臓器を作るには、臓器欠損モデル動物が必要不可欠であるが、これまでに用いられている臓器欠損モデルは、遺伝子欠損の表現型によるもので、臓器欠損個体は致死になるため、ヘテロ同士の交配が必要となり、遺伝子欠損胚は得られる胚の4分の1と効率が悪く、多数のヘテロ欠損動物を維持しなければならず、動物維持だけのために労力も時間もコストも多大なものとなる。ほかにも、臓器特異的な細胞毒性蛋白質の発現誘導が行われているが、コンディショナルによる制御が不十分で目的とする細胞の一部が生き残ったり、臓器により細胞毒性が異なったり、隣接する細胞に対する毒性も配慮したりしなければならない。このため、既存の臓器欠損モデルには様々なデメリットがあった。そこで、ゲノム編集技術であるCRISPR/Cas9システムでは、ガイドRNA(gRNA)が任意のDNA配列を識別し、Cas9タンパク質をリクルートして2本鎖DNAを切断するという性質に着目し、gRNAの認識配列が多数になればDNAの修復機構が追いつかず、細胞が障害されるのではないかと予想した。

そこで、本研究では、マウスやラット、ブタ、ヒトなどで共通してゲノム中に多数存在する配列を標的としたsgRNA (sgRNA^{ms})を設計し、Cas9と組み合わせることによって、臓器欠損モデルを作製できるかを検討した。まず、sgRNA^{ms}とCas9の組合せで、細胞にどのような変化が起こるかを確かめるために、恒常性発現のsgRNA^{ms}と、薬剤誘導型Cas9のトランスジーンをHEK293Tに導入した。樹立した細胞で、薬剤によりCas9の発現を誘導すると、2本鎖DNA切断が起こった箇所に集積する γ H2AXが核内に蓄積されることが確かめられ、アポトーシスの増加、細胞増殖の低下、細胞形態の変化を認めた。次に、sgRNA^{ms}とCas9の組合せで、臓器欠損モデルを作製できるかを確かめるために、安定的に全身性発現が可能なRosa26領域に恒常性発現のsgRNA^{ms}をノックインしたマウス(*Rosa26_{ms}*)と、胸腺形成の鍵となる*Foxn1*遺伝子のプロモーターでCas9が発現するマウス(*Foxn1^{Cas9}*)を樹立した。これらのマウスを掛け合わせて誕生した両方のトランスジーンを持つマウス(*Foxn1^{Cas9};Rosa26_{ms}*)では、胸腺が欠損していることが確かめられた。さらに、*Foxn1^{Cas9};Rosa26_{ms}*の受精卵にラットの多能性幹細胞であるES細胞を注入することによって、胸腺が形成されることが確かめられた。これらの事から、sgRNA^{ms}とCas9の組合せにより、胚盤胞補完法に適用できる新たな臓器欠損モデル作出法として開発することができた。

やむを得ない事由[図書出版、学術雑誌等への掲載、特許・実用新案出願、個人情報等の保護、その他 ()]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Jonathan Jun-Yong Lim

動物の体内で多能性幹細胞由来の臓器を作る胚盤胞補完法は、移植用のドナー臓器を作る方法として、注目されている。この胚盤胞補完法では、本来欠損する受精卵の臓器が、個体発生の過程で多能性幹細胞によって補完されるために、多能性幹細胞に由来する臓器を作る事ができる。すなわち、この方法で臓器を作るには、臓器欠損モデル動物が必要不可欠である。しかし、これまでに使われている臓器欠損モデルには、様々なデメリットもあつたことから、申請者は、新たな臓器欠損モデル作出法の確立を本研究にて行った。申請者は、CRISPR/Cas9 システムにより、ゲノム上の多くの箇所を 2 本鎖 DNA 切断を引き起こして細胞障害を誘導しようと考え、繰返し配列をターゲットに、2つの多標的 sgRNA (sgRNA^{ms}) を設計した。

申請者は、ヒトの培養細胞株 HEK293T 細胞を用い、設計した sgRNA^{ms} と Cas9 を同時に発現した細胞では、2 本鎖 DNA の切断が引き起こされていることを確かめた。また、多標的 2 本鎖 DNA 切断を引き起こす本システムでは、2 本鎖 DNA の切断の後、細胞増殖の低下、アポトーシス細胞の増加が起こり、老化細胞に類似した細胞の形態変化を確かめ、申請者は、*in vitro* の実験で、本システムにより細胞障害が誘導されることを明らかにした。

さらに、申請者は、2 種類の sgRNA^{ms} マウスの系統と、胸腺上皮で Cas9 が発現するマウス系統を樹立し、それぞれを交配させて胸腺上皮細胞で sgRNA^{ms} と Cas9 が同時発現するマウスを作製することで、胸腺欠失モデルマウスを誕生させることに成功した。すなわち、本システムは、*in vivo* においても細胞障害を引き起し、臓器欠失の表現型をもたらすことが示された。申請者は、このようにして作製した胸腺欠損モデルと、ラットの ES 細胞を組合わせた異種間キメラ動物を作製し、ラットの胸腺が形成されることを確かめ、本法が胚盤胞補完法に適用できることを示した。

本研究にて開発した本システムは、sgRNA^{ms} のマウス系統はホモで系統維持できるため、これまでの遺伝子ノックアウトモデルに比べ、必要な動物数を半減させることができ、sgRNA^{ms} と Cas9 が同時発現していない細胞へは悪影響を及ぼさない。このため、今後、本法は他の臓器欠損モデルへの適用が期待される。

以上のように、本論文は、発生生物学や再生医療研究への適用により生命科学の分野への貢献が期待されるもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。

やむを得ない事由 [図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ()] により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】