

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

## I. 基本情報

事業名： (日本語) 再生医療実現拠点ネットワークプロジェクト  
幹細胞・再生医学イノベーション創出プログラム  
(英語) Research Center Network for Realization of Regenerative Medicine  
Stem Cell & Regenerative Medicine Research Fund program for Innovation

研究開発課題名： (日本語) ヒト多能性幹細胞を用いた局所的細胞運命制御技術の開発  
(英語) Development of local manipulation tool of human pluripotent stem cells

研究開発担当者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所多細胞システム形成研究センター  
所属 役職 氏名： 上級研究員 大串雅俊  
(英語) RIKEN, Center for Developmental Biology  
Senior Researcher, Masatoshi Ohgushi

実施期間： 平成 28 年 11 月 15 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人理化学研究所多細胞システム形成研究センター  
所属 役職 氏名： チームリーダー 永樂元次  
(英語) RIKEN, Center for Developmental Biology, Team Leader, Mototsugu Eiraku

## II. 成果の概要 (総括研究報告)

(日本語)

本課題では、光遺伝学を活用した局所的細胞運命操作法の確立を目指しており、本年度は主に Crispr-Cas9 システムを用いたゲノム編集によりノックイン細胞の作成と、必要マテリアルの調達及び調整を実施した。

ヒト ES 細胞株 KhES-1 (京大再生研より分与) を親株として、多能性状態を示すレポーターとして OCT3/4 遺伝子を、栄養外胚葉系譜への分化を示すレポーターとして GATA3 遺伝子を選び、遺伝子発現状況に応じて蛍光タンパク質を作る細胞を調整した。それぞれのマーカー遺伝子が 2A-tdTomato 配列との融合 mRNA として転写されるようにターゲティングベクターを設計し、そ

れぞれを構築した。これらをガイド RNA、Cas9 発現ベクターとともに KhES-1 細胞に導入、薬剤選択の後クローン株を複数個ピックアップし、ゲノム PCR 及びゲノムシーケンスにより正しくノックインされた株を得た。さらに、薬剤選択カセットを除去する 2nd クローニングを行い、OCT3/4 レポーター細胞、GATA3 レポーター細胞としてそれぞれ 3 株ずつを得た。OCT3/4 レポーター細胞に関しては、通常の維持培養条件下で一様な tdTomato 蛍光を発し、栄養外胚葉、外胚葉系譜へ分化に伴い蛍光が消失すること、GATA3 レポーター細胞に関しては、未分化状態では蛍光を発せず、栄養外胚葉への分化誘導に伴い段階的に蛍光強度が上昇することを、蛍光顕微鏡、フローサイトメーターにより定性的・定量的に確認できた。

平行して、遺伝子発現により細胞分化を誘導する手法の整備を進めた。栄養外胚葉分化のマスター因子 CDX2、BMP4 を薬剤刺激依存的に発現する実験系で、各々の発現誘導が GATA3 等の栄養外胚葉マーカー分子の発現上昇を誘起することを確認できた。

また、光遺伝学的手法の導入を進めた。本課題では Light-On システムという光遺伝学ツールを採用し、光刺激により分化促進因子を強制発現するというアプローチを行う。Light-On システムの導入と顕微鏡セットアップに関しては、今吉格准教授（京大生命科学研究科）の助言を仰いだ。

(英語)

This research project aims to develop an experimental platform to control cell fate at a single cell level by utilizing optogenetic tools and Crispr-Cas9-mediated genome editing technology.

For this end, we tried to establish the reporter cell lines by which we can visualize cellular differentiation. Pluripotency-associated *POU5F1*, a gene encoding OCT3/4, and trophoblast-associated *GATA3* were used as a marker for monitoring pluripotent state and trophoblast differentiation, respectively. For generating knock-in clones, we first designed and constructed appropriate targeting vectors and guide RNA expression vectors, and then introduced them into KhES-1 cells together with a Cas9 expression vector. Multiple clones were picked up after drug-selection, and among them, precisely edited clones in which each genomic locus was modified to generate a corresponding marker as a 2A-linked tdTomato-fusion proteins were selected. We performed 2nd cloning to select clones in which drug-resistant cassettes were removed by transfecting Cre recombinase vectors, and finally succeeded in establishing three independent clones for each genotype. For functional validation, we confirmed the correct correlation between these reporter expression and differentiation state by inducing directed trophoblast or neural differentiation.

In parallel, we checked cellular behaviors upon overexpression of differentiation-evoking molecules, CDX2 and BMP4. We employed a doxycycline-inducible Tet-On system to induce global CDX2/BMP4 expression under the ES cell culture condition, and confirmed that trophoblast-associated markers, such as GATA3, were elevated by doxycycline supplementation.

In addition, we tried to introduce Light-On system, an optogenetic tool that allows spatial control of gene expression at a high resolution. The construction of microscopic equipment and photo-controllable devices that were required for Light-On system is ongoing, with the kind help of Dr. Imayoshi (Kyoto University), an outstanding expert in optogenetics.

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 0件）  
該当無し

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Molecular elucidation of immortal trait of human embryonic stem cells, 口頭・ポスター発表,  
大串雅俊, 理研和光キャンパス鈴木梅太郎ホール, 2017/1/11, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み  
該当無し

(4) 特許出願  
該当無し