

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15671

研究課題名(和文)動物由来成分を排除可能なヒト人工染色体ベクター構築法の開発

研究課題名(英文)Construction of human artificial chromosome with animal-free chromosome engineering technology

研究代表者

宇野 愛海(Uno, Narumi)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：30733357

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):ヒト人工染色体(HAC)ベクターは遺伝子・細胞移植治療に用いる新規遺伝子導入ベクターとして臨床応用を期待されているが、ニワトリ細胞やチャイニーズハムスター細胞を用いて作出されたため、異種動物由来蛋白質の混入や未知ウイルスに感染する危険性があった。本研究において、ゲノム編集技術等を用いて、ヒト細胞内において、ヒト染色体全遺伝子領域を削除し、HACベクターを構築する新規染色体改変の開発を検討した。また、ヒトiPS細胞等から異なるヒト細胞株へ任意の染色体を移入する新規染色体導入法を確立した。本研究成果は、HACベクターの臨床応用のみならず、ヒトiPS細胞を用いた疾患治療研究にも大いに貢献しうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HACベクターは、搭載する遺伝子サイズに制限がなく、宿主染色体を傷つけずに、独立して保持され、長期間安定な遺伝子発現を示す。このことから、デュシェンヌ型筋ジストロフィー症の根治治療をはじめとして、様々な遺伝子・細胞移植治療への応用が期待されている。しかしながら、作製の際に異種動物細胞を使用していることから、医薬品の製造管理及び品質管理の基準(GMP: Good Manufacturing Practice)に関する省令に適していない。本研究成果である、異種動物細胞不使用のHACベクター運用技術は、HACベクターを用いた新規遺伝子・細胞移植治療の開発に向けた最大の課題を克服するものである。

研究成果の概要(英文): Human artificial chromosome (HAC) vector is an attractive tool as a novel gene delivery vectors for gene- and cell-therapy. However, there is a risk of contamination with animal-derived proteins or infection with unknown viruses because HAC vectors were constructed by using chicken cells and Chinese hamster cells. In this study, we investigated the development of a novel chromosome engineering technology to eliminate the entire human chromosome gene region and construct HAC vectors in human cells using genome editing technology. In addition, we established a novel chromosome transfer technique for transferring an arbitrary chromosome from human iPS cells to different human cell lines. The results of this research will contribute greatly not only to the clinical application of HAC vectors but also to the research on disease treatment using human iPS cells.

研究分野：再生医療

キーワード：ヒト人工染色体 微小核細胞融合法 ゲノム編集

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト人工染色体を用いた遺伝子・細胞移植治療実現に向け臨床応用を期待されている。しかしながら、従来のヒト人工染色体 (HAC) ベクターは、ニワトリ DT40 細胞や CHO 細胞を用いて作出されたため、異種動物由来蛋白質の混入や未知ウイルスに感染する危険性があった。HAC ベクター構築におけるこれら異種動物細胞の利点としては、DT40 細胞は高い相同組換え効率を示すため、染色体工学による HAC ベクターの作出・操作が容易であり、また、CHO 細胞は微小核細胞融合法 (MMCT) による広範な細胞株への HAC ベクター移入法が確立されている点が挙げられる。従って、ヒト細胞内において、高度な染色体改変技術を確認する、また、ヒト細胞から異なるヒト細胞へ染色体を移入する手法を確認することにより、異種動物細胞を用いない、新規染色体工学技術を確認できると考えられた。

### 2. 研究の目的

異種動物細胞を使用しない (Animal-free) HAC ベクターの構築・導入方法の開発を行う。

課題 1) ヒト正常細胞内においてゲノム編集技術によりヒト染色体からセントロメア配列を残し、遺伝子領域を削除し、Animal-free HAC を構築する。

課題 2) ヒト正常細胞 (iPS 細胞・間葉系幹細胞) から新規微小核細胞融合法により染色体を移し替える手法を開発する。

### 3. 研究の方法

(1) 課題 1 への取り組みとして、ヒト細胞内において、セントロメア、もしくはテロメア近傍を効率よく切断可能な CRISPR/Cas9 ベクターの構築を行う。任意の複数の標的候補配列に対して切断可能な CRISPR/Cas9 および、ターゲティングベクターを作製し、Cell assay により切断活性を検討する。ヒト iPS 細胞やヒト間葉系幹細胞などの正常ヒト細胞株に対して CRISPR/Cas9 に誘導される相同組換えにより、任意標的箇所に loxP などの配列特異的組換え配列もしくは人工テロメア配を挿入し、染色体改変を行い不要染色体領域を削除するための条件を検討する。

(2) 課題 2 への取り組みとして、ヒト iPS 細胞やヒト間葉系幹細胞などの正常ヒト細胞株からの MMCT 法による染色体導入方法の検討を実施する。複数の薬剤を併用し、高効率の微小核形成条件を検討する。

4) ヒト iPS 細胞などのヒト細胞株に対して、微小核細胞融合法を実施するために有効とみられる遺伝子改変を行う。

### 4. 研究成果

#### (1) 課題 1 に対する研究結果

Animal-free HAC を構築するため、Chr. 21q の遺伝子領域 28Mb 削除法の検討を行った。代表的ヒト培養細胞株 HEK293T 及び、ヒト不死化間葉系幹細胞 (hiMSC) 内において、Chr. 21q のセントロメア近傍もしくは、テロメア近傍を標的とする CRISPR/Cas9 発現プラスミドベクター 2 種を構築し、下記の条件にて、各種細胞株に導入し Chr. 21q の削除を試みた。NEPA21 エレクトロポレーターによるエレクトロポレーション法にて、遺伝子導入を行い、Chr. 21q 削除効率について、導入条件①: DNA 量 10 $\mu$ g、もしくは、導入条件②: DNA 量 20 $\mu$ g の 2 条件を比較した。導入後、48 時間後において、対象細胞から DNA を抽出し、Chr. 21q 削除が生じた染色体を検出するプライマーを用いて PCR 法にて評価した。

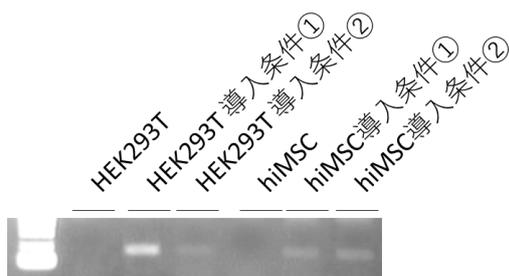


図1 HEK293T 細胞、もしくは hiMSC における Chr. 21q 削除法の検討

この結果は、Chr. 21q において、想定された通り 28Mb が削除されたことを示す (図 1)。また導入遺伝子量は 10 $\mu$ g/実験がより削除効率が良いと示唆された。従って、ヒト細胞内において、

CRISPR/Cas9 を用いて、全遺伝子領域を削除することは可能であろうと考えられた。次に、上記の CRISPR 配列を用いて、ヒト iPS 細胞内において、Chr. 21q が削除可能かを検証した。検証した。しかしながら、ヒト iPS 細胞においては、同様の手法では Chr. 21q 切断を示す結果を得られなかった。ヒト iPS 細胞においては、HEK293T や hiMSC と比較し、ゲノム編集効率が低いと推察された。課題解決に向けて、CRISPR/Cas9 を用いて相同組換えにより、ヒト iPS 細胞内において、Chr. 21q のセントロメア側、および、テロメア側に loxP 配列、蛍光マーカー(EGFP もしくは mCherry)、薬剤耐性マーカー(Neo 耐性遺伝子)を挿入し、Cre 発現により、Chr. 21q 削除が生じた場合に、Neo 耐性遺伝子が発現し、G418 選抜により、Chr. 21q 削除細胞株の取得を試みた(図 2)。

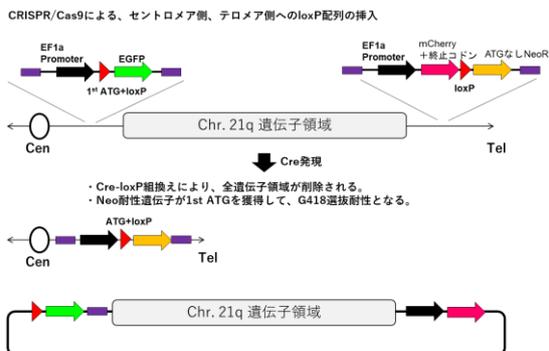
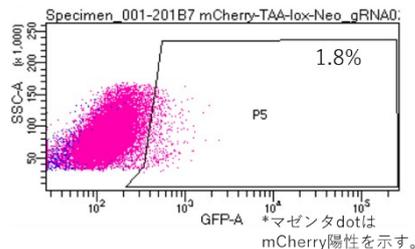


図 2 Cre-loxP システムを用いた、Chr. 21q 削除法の模式図

2 回のターゲティングを行い、mCherry 陽性かつ EGFP 陽性を指標として、セントロメア側及びテロメア側へ loxP 配列を挿入したヒト iPS 細胞クローンを取得した(図 3)。

相同組換えの生じた細胞を蛍光マーカー発現を指標としてフローサイトメトリーにより分取



Chr.21q セントロメア側及び、テロメア側へloxP配列及び蛍光マーカー等が挿入されたヒトiPS細胞



図 3 ヒト iPS 細胞におけるセントロメア側及びテロメア側への loxP 配列挿入細胞の取得結果

これらの結果として、図 4 において示すように、3 クローンにおいて、mCherry 蛍光陽性かつ EGFP 蛍光陽性であって、想定した位置にターゲティングがなされたことを示す PCR 解析結果が陽性となる、3 クローンを取得できた。今後は、このクローンに対して、Cre-loxP 組換えによる Chr. 21q 削除を行い、組換えの結果、Neo 耐性遺伝子が発現し、G418 耐性を示すヒト iPS 細胞クローンの取得を行う必要がある。さらに、Chr. 21p についても同様の手法で、遺伝子領域を削除することで、ヒト iPS 細胞内における HAC ベクターを構築することを試みる。

セントロメア側への1st ATG+loxP及びEGFP挿入実験へのPCR解析

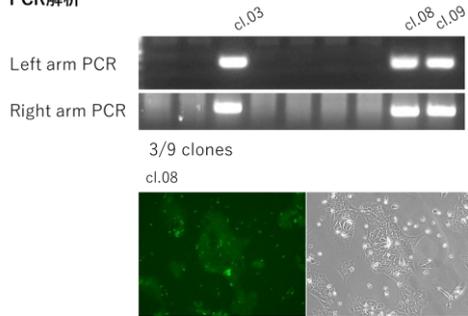


図4 フローサイトメトリーにより分取された mCherry 陽性、EGFP 陽性クローンに対する PCR 解析結果

(2) 課題2に対する研究結果

ヒト細胞から他のヒト細胞への染色体導入法の開発について検討した。微小核を形成しうる化合物として、コルセミド及び、MAS 溶液について hiMSC 及び、ヒト iPS 細胞に対して、微小核形成可能か評価した。

hiMSC については、コルセミド 0.1 $\mu$ g/mL、ヒト iPS 細胞については、分裂期停止試薬 (MAS) 0.1 $\mu$ g/mL を用いた際に、微小核形成が見られた (図5, 図6, 黄色矢印)。これらの条件を用いて、モデルヒト細胞株 HT1080 へ染色体導入を行ったところ、 $1 \times 10^{-6}$  程度の染色体導入効率が得られた。また、FISH 解析の結果、HT1080 細胞内において、hiMSC から移入された HAC ベクターもしくは hiPS 細胞から移入されたマウス人工染色体 (MAC) ベクターが、宿主染色体から独立して保持されていることが示された。これにより、ヒト細胞から異なるヒト細胞へと染色体移入を行う新規 MMCT 法が確立された。

今後は、更に染色体導入効率を高めるために、手法を改良する必要がある。

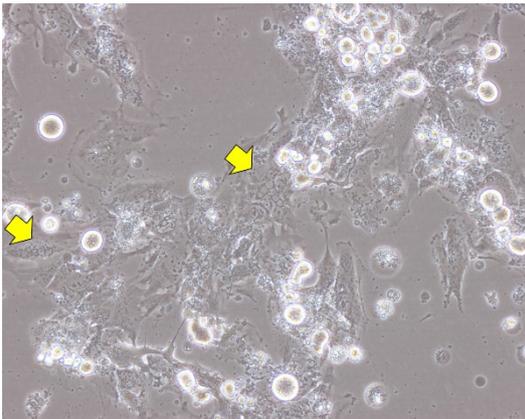


図5 コルセミド処理により微小核形成を示す hiMSC の顕微鏡像

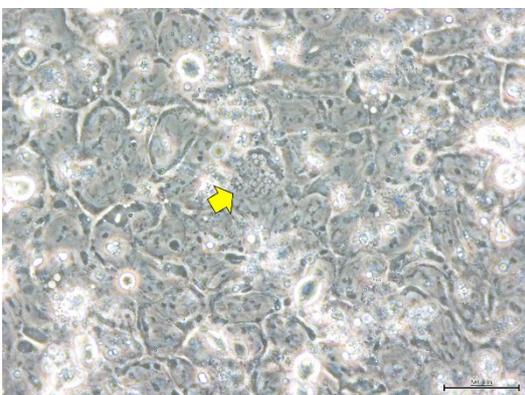


図6 MAS 処理により微小核形成を示す hiPS 細胞の顕微鏡像

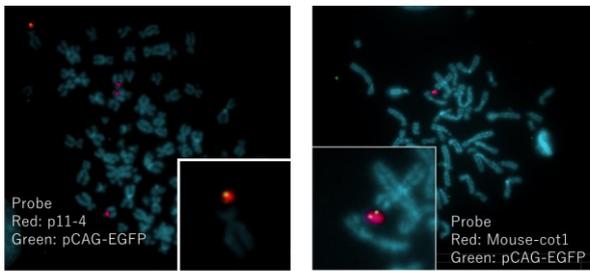


図7 hiMSC から HAC ベクターを導入された HT1080 細胞の FISH 解析像(左)、hiPS 細胞からマウス人工染色体ベクターを導入された HT1080 細胞の FISH 解析像(右)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宇野 愛海
2. 発表標題 麻疹ウイルス由来エンベロープタンパク質を用いたiPS細胞への染色体導入技術の開発
3. 学会等名 第18回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 外来染色体を含むヒト人工多能性幹細胞の製造方法	発明者 香月康宏、宇野愛海、押村光雄	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-191894	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 微小核細胞融合法による目的DNAを含むヒト細胞株の作製方法	発明者 香月康宏、宇野愛海、押村光雄	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2018-191994	出願年 2018年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------