

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22500426

研究課題名(和文)染色体を単位としたゲノム輸送システムの構築

研究課題名(英文)Construction of Genome moving system utilizing a chromosome as transfer unit

研究代表者

加藤 基伸 (KATO, Motonobu)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：00273904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：マイクロセル融合による染色体移入の効率を改善するため、膜融合活性を持つ麻疹ウイルスエンベロープタンパク質の利用を検討した。ポリエチレングリコール(PEG)による従来法と比較して、最大10倍の効率改善が認められた。移入効率は受容細胞におけるエンベロープタンパク質の受容体であるCD46の発現に依存することが明らかとなった。そこでCD46低発現である正常繊維芽細胞への染色体移入を目指して、受容体の指向性改変を試みた。エンベロープタンパク質に対しCD13ないしトランスフェリン受容体に対する一本鎖抗体を付加することにより、PEGでは困難であった正常繊維芽細胞への染色体移入が可能となった。

研究成果の概要(英文)：Microcell-mediated chromosome transfer allows moving a single chromosome from donor to recipient cells. A critical step determining the transfer efficiency is fusion of donor-derived microcells with recipient cells. We tested the fusogenic Hemmagglutinin (H) and Fusion (F) glycoproteins derived from an attenuated strain of Measles Virus (MV-Edm) for microcell fusion. Microcell hybrids were obtained with higher efficiency compared to the use of conventional fusogen Polyethylene Glycol. Yield of microcell hybrids was correlated with the level of cell surface expression in the recipient cells of CD46, which acts as receptor for MV. To achieve efficient fusion towards recipient cells such as fibroblasts with low level-expression of CD46, we tested the retargeting of microcells by adding scFv to the extracellular C-terminal end of the H protein. Addition of scFvs against CD13 and Transferrin receptor that are abundantly expressed in human fibroblasts improved chromosome transfer efficiency.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学・生体材料学

キーワード：微小核細胞 細胞融合 染色体導入 麻疹ウイルス エンベロープタンパク質 CD46 一本鎖抗体 リターゲティング

1. 研究開始当初の背景

真核生物は、細胞から細胞へ、さらに次世代へとゲノム DNA を確実に伝える戦略としてゲノムを分割し、遺伝子群の機能/輸送単位としての「染色体」を構築した。染色体は、いわば精巧な「天然のベクター」である。この仕組みを利用し、動物細胞を人為的に操作することによって、特定の染色体を供与細胞から受容細胞に「移す」手法が、マイクロセル融合法である。1980年代半ばに開発されて以来、がん抑制遺伝子、劣性遺伝病など疾患原因遺伝子の染色体マッピング、ポジショナルクローニングなど、ゲノム解析研究の進展に貢献してきた。また、ヒト染色体上に刻まれた「エピジェネティック・マーク」は、マウス細胞に移しても維持されることから、マイクロセル雑種細胞におけるクロマチン修飾状態と遺伝子発現(転写)の解析は、ゲノム刷り込み研究にも役立ってきた。さらに、ヒト染色体はマウス ES 細胞に移入でき、雑種個体(TransChromosomal; TC)も作製できる。この技術によって、ヒト抗体産生マウスによる抗体医薬の作製、21番染色体トリソミーに起因するヒトダウン症モデルマウスの作出、薬物代謝酵素(CYP-P450)クラスターをヒト型化したマウスによる毒性試験系の確立など、多くの成果が収められている。

マイクロセル融合法は、1) 供与細胞に「微小核」を形成させ、2) 供与細胞から「マイクロセル」を分取し、3) 「マイクロセル」と受容細胞とを細胞融合して、4) 標識染色体を保持する受容細胞を薬剤耐性コロニーとして単離する、というステップから成る。細胞融合剤として、ポリエチレングリコール(PEG)を用いるプロトコルが確立している。しかしPEGは、限られた種類の細胞に対してのみ有効であり、なおかつ目的とする「染色体移入細胞」が得られる効率は、受容細胞あたり 10^{-5} ~ 10^{-6} 程度である。「限られた指向性」と「低い効率」という制約が、染色体移入法のもつポテンシャルを十全に発揮することを阻んできた。

2. 研究の目的

染色体は、真核細胞が進化の過程で構築した「ゲノム発現/輸送の単位」である。その利点を生かすべくわれわれのグループは染色体工学技術の開発を進め、内在遺伝子を含まず、外来遺伝子を搭載できる「ヒト人工染色体ベクター」を構築した。染色体ベクターは、幹細胞操作技術との組み合わせによって、遺伝子再生医療への展開が期待される。そこでヒト ES/iPS 細胞、造血幹細胞、間葉系幹細胞に対して染色体ベクター移入を試みたが成功には至っていない。従来法のもつ「限られた指向性」と「低い効率」の原因をある程度考察したうえで、細胞種に適した効率の高い染色体移入を可能にする技術を開発することが急務である。

そこで本研究では、マイクロセル融合法のス

テップのうち、改良が見込まれる点(マイクロセルおよび受容細胞との融合)について最適化を試みた。具体的には、エンベロープ型ウイルスの持つ膜融合タンパク質の利用について検討した。細胞融合能をもつ麻疹(はしか)ウイルスのエンベロープタンパク質遺伝子を染色体供与細胞に導入/発現させ、マイクロセルを調整し、受容細胞と融合させる系を構築し、さらにはエンベロープタンパク質に一本鎖抗体を付加し、受容細胞に対する指向性を制御する系を確立することを目指した。

3. 研究の方法

染色体ベクターとして、外来遺伝子受容サイト(loxP)を保持する HAC (Human Artificial chromosome) を用いた。HAC 上にはプラスタサイジン耐性遺伝子および GFP 遺伝子が標識してある。このため受容細胞への HAC 移入はプラスタサイジン耐性/GFP 陽性コロニーの出現により評価できる。HAC ベクターの供与細胞は CHO 細胞であり、マイクロセルが効率よく誘導できることを確認済みである。受容細胞として、ヒト正常線維芽細胞および、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞株について検討した。

従来マイクロセル融合に用いられてきた PEG には細胞毒性があり、受容細胞ごとに感受性が異なる。PEG 高感受性の細胞、とりわけヒト正常細胞に対するマイクロセル融合には、PEG に代わる融合剤が必須である。本研究では、高い細胞融合活性を持つ麻疹(はしか)ウイルス(Measles Virus; MV)のエンベロープタンパク質遺伝子を染色体供与細胞に導入/発現させ、マイクロセルを調整し、受容細胞と融合させる系の有効性を検証した。

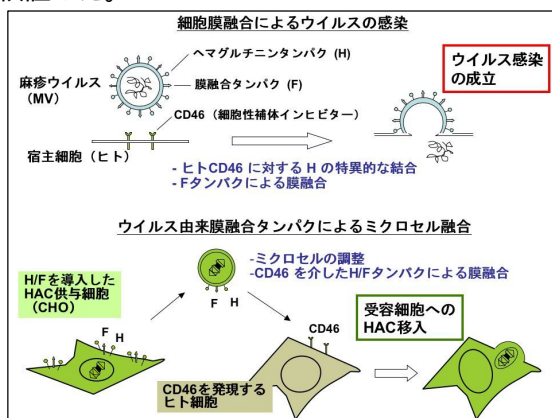
(1) CD46 を標的とした野生型 H タンパクによるマイクロセル融合の検証

エンベロープウイルスは、脂質二重膜の表面に提示したヘマグルチニン(H)タンパク質を介して宿主細胞に吸着し、膜融合(F)タンパク質の働きによりウイルスエンベロープと宿主細胞膜が融合し、ウイルスゲノムを宿主細胞に送り込む。重要なのは、H タンパクと宿主細胞表面のウイルス受容体との結合特異性が、感染の指向性(トロピズム)を厳密に制御する点である。MV (Edmonston ワクチン株)の H タンパク質は、CD46 (補体制御因子)を受容体とする。そこではじめに CD46 を高発現するがん細胞株 (HT1080) を受容細胞のモデルとして、ウイルスの融合装置はマイクロセル融合の効率を改良できるか検証した。

(2) マイクロセル融合の retargetting

MV の感染は、H タンパクの受容体認識部位に一本鎖抗体 (ScFv) を付加する遺伝子改変によって指向性を操作することができ、特定の膜抗原を提示する受容細胞への "retargetting" が可能である。はじめに、本

研究で標的とする受容細胞が CD46 を高発現するかフローサイトメーターにて検索した。発現が低い場合には、受容細胞が高発現する表面抗原に対応して H タンパク質を改変し、マイクロセル融合が”retargetting”できるかを検証した。



4. 研究成果

(1) MV エンベロープタンパク質による細胞融合の確認

受容細胞として用いるヒト繊維肉腫細胞株 HT1080 について、MV エンベロープタンパク質の受容体である CD46 の表面発現をフローサイトメーターにより確認した。HT1080 細胞に MV エンベロープタンパク質(H および F) の発現プラスミドを一過性に導入したところ、24 時間後には合胞体 (Syncytium) の形成が認められたことから、H/F タンパク質の HT1080 細胞における膜融合活性が確認された。

(2) MV エンベロープタンパク質を構成的に発現する HAC 供与 CHO 細胞株の樹立

HAC 供与 CHO 細胞に H および F タンパク質発現プラスミドと薬剤耐性マーカー遺伝子 (neo) を共導入し、G418 耐性 CHO 細胞を取得した。この G418 耐性 CHO 細胞を HT1080 細胞と共培養したところ合胞体の形成が認められたことから、CHO 細胞における H および F タンパク質の表面発現が示唆された。並行して抗 H タンパク質モノクローナル抗体を用いたフローサイト解析を行い、樹立した CHO 細胞株の表面に H タンパク質が発現していることを確認した。

(3) 麻疹ウイルスエンベロープタンパク質を介したマイクロセル融合

H/F 発現プラスミドを導入した HAC 供与 CHO 細胞からマイクロセルを調整し、培養ディッシュ上の HT1080 細胞に重層して 24 時間培養した。プラストサイジン添加培地で選択培養したところ、薬剤耐性コロニーが出現した。これらを単離して FISH 法により染色体を解析したところ、HAC の移入が確認された。

(4) 受容細胞表面の受容体発現量とマイクロセル融合効率との相関

HT1080 細胞以外のヒト細胞に対する HAC 移入の可能性を検討すべく、骨髄由来間葉系幹細胞株 (hiMSC) および胎児由来繊維芽細胞 (HFL1) に対する HAC 移入を試みた。PEG を用いた従来法を対照として、受容細胞あたりの薬剤耐性コロニー出現頻度を比較したところ、HT1080 で 10 倍、hiMSC で 5 倍、HFL1 で 2 倍であった。

細胞株ごとの HAC 移入効率の違いは、MV-H タンパク質受容体の発現量に起因する可能性がある。そこで各細胞における CD46 の表面発現をフローサイトメーターにより解析した。その結果、マイクロセル融合による薬剤耐性コロニー発現頻度が CD46 発現量に相関することが明らかとなった。

(5) 一本鎖抗体を付加したエンベロープタンパク質発現ベクターの構築

ヒト繊維芽細胞における発現量が高く、なおかつ一本鎖抗体 (ScFv) が入手可能な膜タンパク質を文献検索し、候補として CD13 およびトランスフェリン受容体 (TfR) に着目した。CD13 については文献記載のアミノ酸配列に基づき遺伝子合成を行い、該当する DNA 断片を H タンパク質の細胞外ドメイン C 末端に付加する発現プラスミドを構築した。HT1080 細胞に対し F タンパク質発現プラスミドと共導入したところ、合胞体が形成されたことから、一本鎖抗体の付加は H タンパク質の膜融合活性を損なわないことが明らかとなった。TfR については、CD46 反応活性を不活化するアミノ酸変異 (Y481A、R533A) を導入した変異型 H タンパク質を使用した。8 クローンの一本鎖抗体を付加した 8 種の H 発現プラスミドを構築し、F タンパク質発現プラスミドと共に HT1080 細胞に導入した。合胞体形成の度合いは、抗体クローン毎に異なったことから、反応性が最も高いクローンを選択して以後の実験に用いた。

(6) 一本鎖抗体を介したマイクロセル融合

CD13、TfR に対する一本鎖抗体を付加した H タンパク質発現プラスミドを、F タンパク質発現プラスミドおよび neo 遺伝子とともに HAC 供与 CHO に導入し、G418 耐性細胞を獲得した。これらの細胞からマイクロセルを調整し、HT1080 細胞と反応させた。プラストサイジン耐性コロニーの出現を指標として、HAC 移入を確認した TfR については、CD46 に対する反応性を不活化してあるので、一本鎖抗体の付加により反応指向性が改変可能であることが示された。一本鎖抗体の付加により、得られる耐性コロニー数は 10 倍程度増加したことから、指向性の改変によって反応性の改善が図れることが示された。

(7) HAC 供与 CHO 細胞におけるエンベロープタンパク質の一過性発現によるマイクロセル融合法の確立

前項までで、HAC 供与 CHO 細胞に対し H/F

タンパク質発現プラスミドを導入し、安定発現株を取得することで、融合活性を持つマイクロセルが調整できることを明らかにした。搭載遺伝子が異なる多種多様な HAC 供与 CHO 細胞に対し、その都度安定発現株を取得することは操作を煩雑化する。このため H/F 発現プラスミドの一過性導入でも同様の効果が得られれば、行程の簡略化という利点が見込まれる。しかしながら H/F 発現プラスミド導入からマイクロセル調整までには、コルセミド添加による微小核誘導などの行程により最短でも 4 日を要するため、導入したプラスミド量は減衰する。なおかつコルセミド添加は微小管形成を阻害するため合成されたタンパク質の細胞表面への輸送過程に影響を及ぼす可能性も懸念された。そこで H/F 発現プラスミドの一過性発現後に調整したマイクロセルが融合活性を持つか検討した。一過性導入であっても、安定発現株と同程度の HAC 移入活性をもつことが明らかとなった。

(8) 成果の位置づけおよび今後の展望

麻疹ウイルスエンベロープタンパク質を利用することで、従来の PEG では困難であったヒト正常繊維芽細胞に対する HAC 移入効率を向上することが可能となった。欠損遺伝子の補充による遺伝子細胞治療を目指す上で、患者由来繊維芽細胞に治療用 HAC を導入しその後 iPS 誘導することで機能補正した移植細胞を確保できる展望が開けたといえる。

ウイルスエンベロープタンパク質の利用によって、高い膜融合活性を保ちつつ、従来法の問題点であったポリエチレングリコールによる細胞障害性を克服することが可能になった。複数のステップから成る染色体移入において、膜融合活性を高めることで期待できる効率の向上はほぼ上限近くまで到達できたと考えられる。今後はマイクロセルと受容細胞との膜融合前後の行程 (HAC 供与細胞における微小核誘導の最適化、およびマイクロセルと受容細胞との融合後の HAC 動態の制御) に関する検討を進めることが重要となる。

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 2 件)

Narumi Uno, Katsuhiko Uno, Susi Zatti, Kana Ueda, Masaharu Hiratsuka, Motonobu Katoh, Mitsuo Oshimura. The transfer of human artificial chromosomes via cryopreserved microcells. Cytotechnology, 査読有, Vol.65, No.5, 2013, pp.803-809
DOI:10.1007/s10616-013-9548-4

Motonobu Katoh, Yasuhiro Kazuki, Kanako Kazuki, Naoyo Kajitani, Masato Takiguchi, Yuji Nakayama, Takafumi

Nakamura, Mitsuo Oshimura. Exploitation of the interaction of measles virus fusogenic envelope proteins with the surface receptor CD46 on human cells for microcell-mediated chromosome transfer. BMC Biotechnology, 査読有, Vol.10, 2010, pp.37-48
DOI:10.1186/1472-6750-10-37

[学会発表](計 3 件)

Motonobu Katoh, Narumi Uno, Kana Ueda, Masaharu Hiratsuka, Yuji Nakayama, Yasuhiro Kazuki, Takafumi Nakamura, Mitsuo Oshimura. Chromosome transfer via microcell fusion utilizing retargeted fusogenic envelope protein of Measles Virus. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜

高橋悠、加藤基伸、尾崎充彦、中山祐二、中村貴史、井上敏昭、押村光雄。麻疹ウイルスエンベロープタンパク質を利用したヒト人工染色体ベクターの in vivo 導入へ向けた試み。第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜

Motonobu Katoh, Yasuhiro Kazuki, Haruka Takahashi, Kanako Kazuki, Naoyo Kajitani, Masato Takiguchi, Yuji Nakayama, Takafumi Nakamura, Toshiaki Inoue, Mitsuo Oshimura. Chromosome transfer via microcell fusion utilizing fusogenic envelope proteins of Measles Virus. 第 33 回日本分子生物学会年会、2010 年 12 月 7 日、神戸ポートアイランド

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 基伸 (KATOH, Motonobu)
鳥取大学・医学部・助教
研究者番号：00273904

(2) 研究分担者

井上 敏昭 (INOUE, Toshiaki)
鳥取大学・医学部・准教授
研究者番号：80305573

(3) 連携研究者

()

研究者番号：