

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659284

研究課題名（和文）

トランスポゾンによる長期遺伝子発現型初代培養細胞の創製と細胞治療への応用

研究課題名（英文）Long-term gene expression in primary cells by transposon and its application for cell therapy

研究代表者

橋田 充 (HASHIDA MITSURU)

京都大学・大学院薬学研究科・教授

研究者番号：20135594

研究成果の概要（和文）：

治療タンパク質を長期間発現する細胞を移植する遺伝子・細胞治療は、慢性疾患・先天性疾患に対して治療タンパク質を長期間補充する治療法として有効であると考えられる。本研究では、トランスポゾンなどを用いた目的タンパク質のゲノムへの組み込みを利用して目的タンパク質を長期間発現する初代培養間葉系幹細胞を構築し、細胞が分化した後も目的タンパク質を発現することを確認した。さらに、DNA 結合タンパク質を利用して目的遺伝子の組み込み位置を制御できる可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

Transplantation of cells expressing therapeutic protein is a promising way to supply such proteins for long time. Such gene-cell therapy would be a novel treatment for chronic or congenital disease. In this study, we could established primary mesenchymal stem cells with long-term expression of target protein by transformation using transposon. These cells kept expressing the target protein after differentiation. Moreover, we could show the possible method for controlling insertion site in transformation using DNA-binding protein.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・応用薬理学

キーワード：ドラッグデリバリー、細胞治療

1. 研究開始当初の背景

糖尿病などの慢性疾患・先天性疾患は、原因となるタンパク質が同定されている場合でも、根本的な治療法は確立されていない。このような疾患に対して治療タンパク質を継続的に補充できる遺伝子・細胞療法の開発

が期待されている。遺伝子治療法の確立には、標的部位において必要な時間、治療遺伝子を発現させる空間と時間の制御に基づくデリバリーシステムの開発が重要である。我々は、ドラッグデリバリーシステム（DDS）の概念に基づき、治療タンパク質をコードするプラスミド DNA を標的部位へ送達可能な非ウイ

ルス性キャリアを開発し、がんの DNA ワクチン療法や炎症治療に成功してきた。しかしながら、プラスミド DNA の送達では、目的タンパク質の一過性の発現しか得られない。そこで、我々は、遺伝子発現の長期化を目的に、トランスポゾンを用いて、培養細胞や、マウスの肝実質細胞に対して目的配列をゲノムへ組み込み、目的タンパク質の長期遺伝子発現が可能であることを確認した。

2. 研究の目的

本研究では、細胞をキャリアとして利用し、治療に必要なタンパク質を長期間分泌する細胞を構築し、治療タンパク質を長期間補充する治療法の確立、さらに安全な遺伝子組み込み法の確立を目的に、組み込み位置の制御法の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1) ベクターの構築

ヘルパーベクターとしてトランスポザーゼを発現するプラスミド DNA を構築した。ドナーベクターとして、まず、piggyBac トランスポゾンの両 IR 配列を含むベクターを構築し、IR 間に GFP, tdTOMATO, GLuc を挿入した各プラスミド DNA を構築した。組み込み位置の制御に関する研究では、ヘルパーベクターに UAS 配列を挿入したベクター、ターゲットベクターとして、luciferase 発現遺伝子のほかに Lex operator 配列ならびに attP 配列を挿入したベクターを構築した。

(2) 細胞株

UE7T13 細胞、HEK293 細胞、Hela 細胞を用いた。

(3) 初代培養間葉系幹細胞の培養

初代培養間葉系幹細胞の分離は、接着培養分離法を用いた。C57BL/6 (6 週齢) マウスより大腿骨を摘出し、DMEM で骨髄中の細胞を回収する。得られた骨髄細胞をディッシュに播種し、約 10 日間培養し得られた細胞を初代培養間葉系幹細胞とする。

(4) 間葉系幹細胞の分化誘導

Adipocyte への分化には、1 μ M dexamethasone, 5 μ g/ml insulin, 50 μ M indomethacin および 0.5 μ M 3-isobutyl-L-methylxanthine を含有した DMEM を用いた。また、osteoblast への分化には、0.1 μ M dexamethasone (Sigma), 50 μ g/ml ascorbic

acid (Sigma), and 10 mM β -glycerophosphate を含有する DMEM を用いた。また、分化の確認には、それぞれ、adipocyte には oil red 染色法を、osteoblast には alizarin red 染色法を用いた。

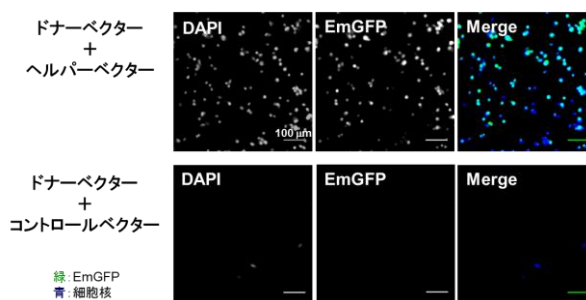
(5) タンパク質の発現の確認

蛍光タンパク質の発現は、培養細胞を固定後、蛍光顕微鏡で観察した。Gluc の発現は、培養細胞の上清またはマウス血清中の luciferase 活性を評価した。

4. 研究成果

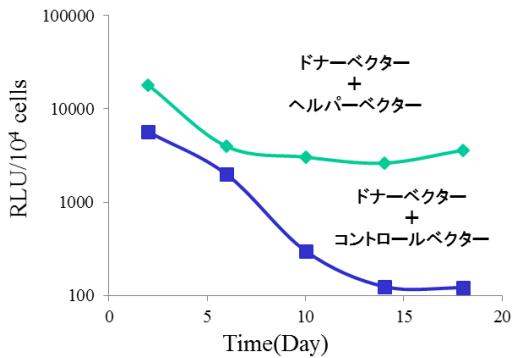
(1) トランスポゾンを用いた目的タンパク質の長期発現

まず、目的タンパク質を搭載したドナーベクターを用いて、目的タンパク質の長期発現が可能であることを確認した。目的タンパク質として、EmGFP およびブラストサイジンに対する薬剤耐性遺伝子を搭載するドナーベクターとトランスポザーゼを発現するヘルパーベクターまたは、発現しないコントロールベクターを UE7T13 細胞にトランスフェクションし、4 日後から 3 日間ブラストサイジン含有培地で培養した。蛍光顕微鏡で観察したところ、ヘルパーベクターをトランスフェクションしたディッシュには、細胞が存在し、そのほとんどの細胞に EmGFP の発現が認められたが、コントロールベクターをトランスフェクションしたディッシュには細胞はほとんどなかった。目的のタンパク質がゲノムに組み込まれていることが示唆された。



また、tdTOMATO および GLuc を搭載するドナーベクターについても、同様にヘルパーベクターまたはコントロールベクターと共に HEK293 細胞にトランスフェクションし、経日的に上清中の GLuc の発現を評価した。その結果、コントロールベクターとトランスフェクションしたディッシュは、徐々に発現量が減少し、10 日目にはほとんど発現が認められなかったが、ヘルパーベクターとトランスフェクションしたディッシュでは、少なくとも 22 日目まで発現が維持された。トラン

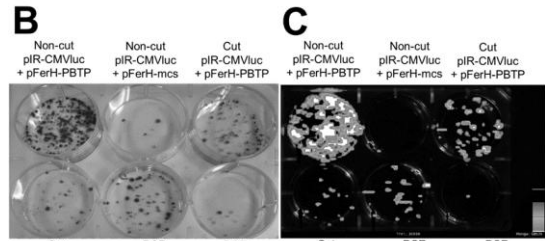
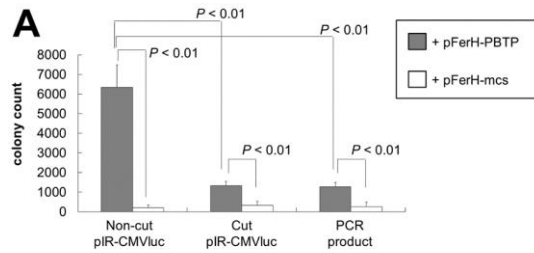
スフェクション直後は、ゲノムに組み込まれた目的配列からの発現だけでなく、ドナーベクター自身からの発現でも含まれているため、トランスフェクション2日目までの間は、ドナーベクター自身からの一過性の発現の低下が認められたと考えられる。



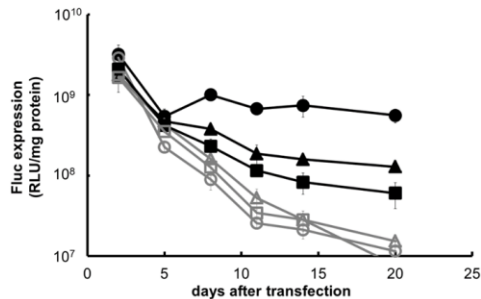
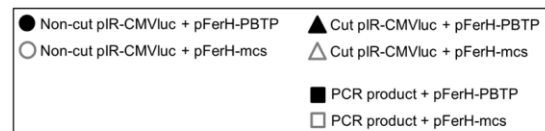
(2) トランスポゾンを用いた長期発現におけるベクターの形状の影響

トランスポゾンを用いた長期発現におけるベクターの形状の影響を評価するため、環状ドナーベクターと線状ドナーベクターを作製した。制限酵素 EcoRI によりトランスポゾン外側の一箇所を切断することで線状化した線状ドナーベクターと、環状ドナーベクターを鋳型としてそのほぼ全長を PCR にて増幅することで得た線状ドナーベクターの二種類を作製した。これらの線状ドナーベクターはアガロースゲル電気泳動で、環状ドナーベクターより移動度が小さいことを確認した。

トランスポゾンによる発現の長期化におけるドナーベクターの形状の影響を評価するために、ネオマイシン耐性遺伝子を搭載した環状または線状ドナーベクターとヘルパーベクターまたはコントロールベクターとともに HEK293 細胞にトランスフェクションし、抗生物質 G418 を含む培地で2週間の培養を行った。その結果、環状または線状の形状に関わらずヘルパーベクターと共にトランスフェクションした細胞では、コントロールベクターとともにトランスフェクションした細胞と比較し、有意に多くの G418 耐性コロニーを形成した。また、これらのコロニーはホタルルシフェラーゼを発現していることも確認された。しかしながら、ヘルパーベクターとトランスフェクションした場合のコロニーの数を環状ドナーベクターと線状ドナーベクターで比較すると、線状ドナーベクターの方が環状ドナーベクターに比べて G418 耐性コロニーの数は有意に少なかった。



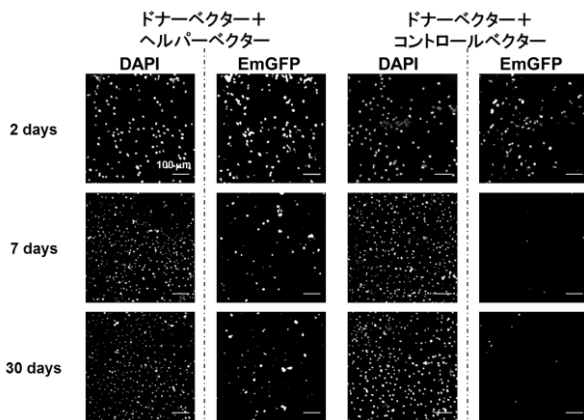
次に、同様に各ドナーベクターとヘルパーベクターまたはコントロールベクターをトランスフェクションした HEK293 細胞における luciferase の発現を評価した。トランスフェクション後、8-20 日後の luciferase 活性を比較すると、コントロールベクターとトランスフェクションした場合は、発現は優位に低かった。さらに、ヘルパーベクターとともに環状ドナーベクターまたは線状ドナーベクターをトランスフェクションした場合で比較すると、環状ドナーベクターの方が線状ドナーベクターより発現が有意に高かった。以上の結果より、環状ドナーベクターも線状ドナーベクターもトランスポザーゼにより目的遺伝子をゲノムへ組み込むことは可能であるが、組み込み効率は線状ドナーベクターに比べて環状ドナーベクターの方が高いことが明らかになった。



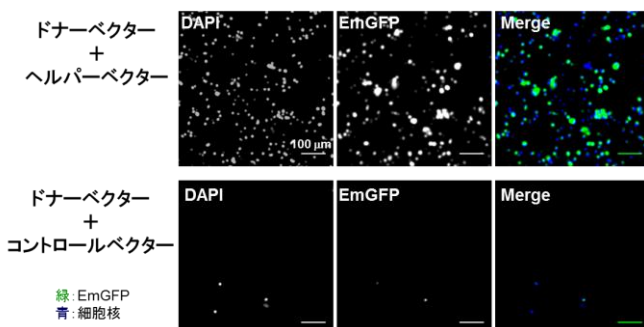
(3) 目的タンパク質を長期発現する初代培養間葉系幹細胞の構築

マウス初代培養間葉系幹細胞に、EmGFP とブラストサイジン耐性遺伝子を搭載した

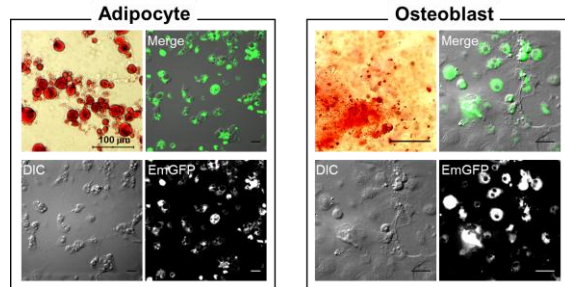
ドナーベクターと、トランスポザーゼを発現するヘルパーベクターまたはトランスポザーゼを発現しないコントロールベクターとの組み合わせでトランスフェクションし、経日的に EmGFP の発現を確認した。ヘルパーベクターとトランスフェクションしたディッシュでは少なくとも 30 日後にも EmGFP を発現する細胞が観察されたが、コントロールベクターとトランスフェクションしたディッシュでは、2 日後は EmGFP を発現する細胞が観察されたが、7 日後には EmGFP を発現する細胞はほとんど観察されなかった。したがって、ヘルパーベクターとトランスフェクションしたディッシュではトランスポゾンにより EmGFP のゲノムへの組み込みが増強されたことが示唆された。2 日目と比較すると、7 日目、30 日目の EmGFP 発現細胞の数が減少して、7 日目と 30 日目では一定になっているが、これは、ドナーベクター自身からの EmGFP の一過性の発現が消失し、7 日目以降はゲノムに組み込まれた EmGFP が観察されたと考えられる。30 日後の細胞核を DAPI で染色した画像と比較すると、ゲノムに組み込まれた細胞はディッシュ上の細胞の一部だけであることも確認された。



そこで、トランスフェクションして 4 日後から 7 日間ブラストサイジン含有培地で培養することにより薬剤耐性遺伝子が組み込まれた細胞だけを選別し、EmGFP の蛍光を観察したところ、ほとんどの細胞に EmGFP が発現していた。



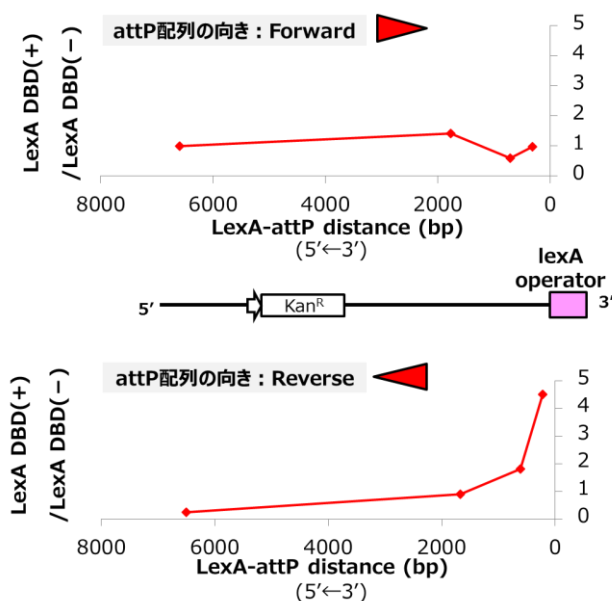
次に、EmGFP および薬剤耐性遺伝子がゲノムに組み込まれた初代培養間葉系幹細胞だけを選別した後、分化誘導用の培地を用いて adipocyte または osteoblast へ分化させたところ、それぞれ目的の細胞に分化し、さらに分化した細胞において蛍光タンパク質の発現が維持されていることが確認された。



(4) DNA 結合タンパク質を利用したドナーベクターの動態制御と組み込み位置制御法の確立

安全な遺伝子組み込み技術の開発を目的に、DNA 結合タンパク質を利用してドナーベクターを特定の配列の近くに送達し、組み込み位置を制御する方法を考えました。ところが、トランスポゾンで試したところ、DNA 結合タンパク質が組み込みを阻害してしまう可能性を示唆する結果が得られた。そこで、トランスポゾンと同様にゲノム DNA へ目的遺伝子を挿入可能な phiC31 インテグラーゼを利用した組み込み位置制御の可能性を検討した。ここでは、組み込み効率を評価するために、ドナーベクターに目的遺伝子を搭載し、ゲノム DNA の代わりにターゲットベクターを作製し、ターゲットベクターに目的遺伝子がどこに組み込まれたかを評価する。まず、2 種類の DNA 結合タンパク質、UAS に結合する GAL4 および LexA operator に結合する LexA、を両端にもつタンパク質を発現させ、ターゲットとなるベクターに Lex operator の配列を配し、ドナーベクターに UAS 配列を配すると、GAL4 および LexA を両端に持つタンパク質が、ドナーベクターとターゲットベクターを結合させるため、ドナーベクターからターゲットベクターに目的遺伝子が挿入されやすくなると思った。phiC31 インテグラーゼの場合は、attP 配列にのみ目的遺伝子が組み込まれることが知られているため、attP 配列と LexA operator との距離がそれぞれ異なるターゲットベクターを作製した。目的遺伝子にブラストサイジン耐性遺伝子を搭載したドナーベクターと、各ターゲットベクターを Hela 細胞にトランスフェクションし、これらの細胞から抽出した DNA を大腸菌に形質転換し、ドナーベクター由来のブラスト

サイジンおよびターゲットベクター由来のカナマイシンの両方に耐性をもつ大腸菌を選別した。大腸菌から抽出した pDNA について、ターゲットベクターのどの位置に組み込まれたかを調べた。縦軸に、すべての組み込みに占める各位置への組み込みの割合、横軸に LexA operator からの距離を示す。結果、attP の向きが左向き (5→3) と右向き (3→5) では違う傾向が認められ、右向きの場合は、Lex operator からの距離が近いほど組み込み位置の選択性が高くなった。左向きの場合にはその傾向が認められず、もう少し詳細な検討が必要であると考えている。



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 1 件)

(1) Hideyuki Nakanishi, Yuriko Higuchi, Shigeru Kawakami, Fumiyoshi Yamashita and Mitsuru Hashida, Comparison of piggyBac transposition efficiency between linear and circular donor vectors in mammalian cells. Journal of Biotechnology 査読有 Vol.154、No.4、2011、pp205-208

[学会発表] (計 4 件)

(1) 中西秀之、樋口ゆり子、川上 茂、山下富義、橋田 充、哺乳類細胞における piggyBac トランスポゾンを用いた遺伝子組込みに対してベクターの設計並びに投与量が与える影響、第 35 回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 (福岡県) 2012 年 12 月 11-14 日

(2) 中西秀之、樋口ゆり子、川上 茂、山下富義、橋田 充、配列選択的 DNA 結合蛋

白質を用いた位置選択的遺伝子組込み型ベクターの開発、第 28 回日本 DDS 学会学術集会、札幌コンベンションセンター (北海道) 2012 年 7 月 4-5 日

(3) Hideyuki Nakanishi, Yuriko Higuchi, Shigeru Kawakami, Fumiyoshi Yamashita, Mitsuru Hashida, Development of piggyBac transposon-based vector system for long-term gene expression. The 6th Seoul-Kyoto-Osaka Joint Symposium on Pharmaceutical Sciences for Young Scientists, Seoul (Korea) 2011 年 6 月 2-4 日

(4) 橋田 充、薬物治療とドラッグデリバリーシステム、薬工連携セミナー、立命館大学びわこくさつキャンパス (滋賀県) 2012 年 6 月 1 日

[図書] (計 1 件)

(1) 樋口 ゆり子、橋田 充、メディカルドゥ、ナノバイオ技術と最新創薬応用研究第 5 章ナノバイオ技術を応用した薬物・細胞動態の制御と評価、2012 年、pp163-168

[その他]

ホームページ

http://dds.pharm.kyoto-u.ac.jp/Dds_Home/index.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋田 充 (HASHIDA MITSURU)
京都大学・大学院薬学研究科・教授
研究者番号：20135594

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

樋口 ゆり子 (HIGUCHI YURIKO)
京都大学・大学院薬学研究科・助教
研究者番号：40402797
橋田 泰彦 (HASHIDA YASUHIKO)
京都大学・物質-細胞統合システム拠点・
特定研究員
研究者番号：30512462