

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24601016

研究課題名(和文)放射線障害評価に有用なレポーター細胞の開発と幹細胞技術を用いた評価系の確立

研究課題名(英文) Establishment of the reporter stem cell lines capable of evaluating the cell influence by radiation.

研究代表者

今井 貴雄 (IMAI, TAKAO)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：10383712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の染色体に存在する遺伝子に対して障害性を有する放射線(ガンマ線、X線など)について、その障害を評価し得るレポーター細胞の創出を本研究は目的とした。DNA組み換え技術により、p53遺伝子座を含むBAC DNA (RP11-89D11)上にオワンクラゲ由来蛍光蛋白質とホタル由来発光蛋白質の融合遺伝子(dVenusLuc2)を挿入置換したBACレポーター遺伝子の作成を完了した。また、近年発達してきたゲノム改変技術(CRISPR-CAS9法)により、H9 ES細胞由来神経幹細胞株の内在性p53遺伝子座にレポーター遺伝子dVenusLuc2が適切に挿入されている細胞を選別し、株化を達成した。

研究成果の概要(英文)：The present study was intended to generate the reporter stem cells capable of evaluating the cell influence by radiation (gamma ray, X-ray), which cause double strand break of chromosomal DNA. By DNA recombination technology, the fusion reporter gene (dVenusLuc2: Aequorea victoria-derived fluorescence protein and firefly-derived light-emitting protein) was inserted to the p53 locus on BAC DNA RP11-89D11. Thus, the generation of the p53 BAC reporter gene was completed. In addition, by using recently developed genome modification technique CRISPR-CAS9 method, the reporter gene dVenusLuc2 is properly inserted into the endogenous p53 locus of H9 ES cell-derived neural stem cell lines. We achieve the establishment of neural stem cell line that contain the fluorescent and luminescent reporter gene on their p53 genomic locus.

研究分野：分子生物学、幹細胞生物学

キーワード：幹細胞 神経幹細胞 ゲノム編集 p53 放射線 レポーター遺伝子

1. 研究開始当初の背景

人体は、約 60 兆個の細胞から構成されている。その発生過程においては、一個の受精卵が細胞分裂をすることで増殖し、細胞の運命決定(分化)がなされた後、細胞それぞれの成熟がなされ、機能を発現する細胞社会として、ヒトとしての生物個体を形成する。その形成される仕組みは、核に存在する DNA 配列による遺伝情報がもたらす「設計図」にあり、寸分違わず時空間的に遺伝子を発現することで遂行される。しかし、電離放射線、化学物質などの作用により細胞核の染色体に傷害が起こった場合、DNA 修復機構は働くが、修復が起こらなかった場合に遺伝子の変異が生じることにより、細胞は死に至る場合もあれば、癌化して個体の生命を脅かす場合も生じてくる。また、電離放射線による被爆を受けた妊婦から出生した子孫は精神遅滞・先天性水頭症を示す例も報告されている (Hall and Giaccia, 2006; Otake and Schull, 1993; Otake and Schull, 1984)。

この様に、低レベルの放射線暴露によって人体にもたらされる影響は、疫学調査・マウスなどの実験動物を用いた研究・癌生物学(医学)の分野でこれまでも多くの研究が成されてきた。電離放射線により白血病その他の発癌リスクが増加するなど、放射線暴露は癌発生の一つの原因である。癌生物学においては、近年の分子生物学の進展により Ras, Myc, Src などの多くの癌遺伝子とその変異が同定された。また、多くの癌抑制遺伝子とその変異も同定された。その中でも癌抑制遺伝子の代表格と言える遺伝子は、多くの癌細胞で変異が見つかっている p53 遺伝子である。この遺伝子は 393 アミノ酸からなる核内転写因子をコードしている。通常時は細胞内発現量が低く保たれているが、放射線暴露を始め、細胞ストレスに応答し発現量が増大し、転写活性化能だけでなく、DNA 修復能、細胞代謝調節能をも有することが知られている。さらに、細胞、特に染色体に多くのダメージが与えられると、p53 の活性化により細胞周期停止、および細胞死を誘導される。この様に、p53 は「生体危機管理分子(蛋白質)」とも言える生理機能を有する。本研究は、低レベル放射線暴露の人体への影響を、ヒト由来の細胞を用いて、定量・可視化するための細胞素材を作成することを目的としている。その目的のために、p53 遺伝子の発現量・活性化量を指標にすることが、電離放射線暴露の際に起こる DNA 傷害に伴って起こる細胞障害を推し量るのに最適であることに着目した。

研究代表者は、神経系組織の幹細胞(神経幹細胞と後述)に発現する遺伝子の一つである Musashi 遺伝子産物の機能研究、神経幹細胞の分離精製、胚性幹細胞(ES 細胞)・誘導性万能幹細胞(iPS 細胞)から神経幹細胞の誘

導、脳腫瘍幹細胞に存在する幹細胞に関する研究をこれまでにを行い、成果を得てきた。体を構成する細胞は、成体においても恒常的に幹細胞システムを用いて再生を繰り返しており、とりわけ発生期においては、受精卵と発生初期の細胞は全ての細胞に分化することができる万能「幹細胞」が存在する。

また、発生が進み神経組織の発生が成される時期になると、万能「幹細胞」の子孫細胞に神経「幹細胞」が生じ、増殖し、神経系組織を構成する細胞群に分化する。研究代表者と連携研究者・河瀬は、180kb 鎖長 Bacteria artificial chromosome (BAC; バクテリア人工染色体)の Musashi1 遺伝子座に緑色蛍光蛋白質 GFP(オワンクラゲ由来)と生体発光蛋白質 Luciferase(ホタル由来)の融合蛋白質を発現する遺伝子を相同組換え法により挿入する技術により、前述の Musashi1 遺伝子が神経「幹細胞」に特異的に強く発現することを mRNA 転写レベルで明らかとしたが、本研究においてこの相同組換え技術を利用する。このような、分子生物学、幹細胞生物学の視点から、電離放射線被曝による細胞障害の度合を報ずる p53「レポーター遺伝子」を染色体に取り込んだ「レポーター細胞」の創出を着案する経緯となった。

2. 研究の目的

低レベル放射線暴露の人体への影響を緊急・簡便に評価できる系として、放射線障害を指標可能なヒト由来培養細胞を遺伝子組み換え技術を用いて開発することを目的としている。本研究での対象は、胚性幹細胞・神経幹細胞といった胎児期に存在する幹細胞であり、試験管内で培養可能な細胞である。蛍光蛋白質・生体発光蛋白質を発現するレポーター遺伝子を最新の遺伝子組み換え技術を用いてこれらの幹細胞に組み込みを行った細胞の取得を目的とし、低レベル放射線の暴露があった場合の細胞障害度について、視覚的・定量的な評価を可能にすることを将来的な目的とする。

3. 研究の方法

p53 遺伝子座にレポーター遺伝子が挿入された細胞を得る方法として以下の2種類の方法で行った。

p53 遺伝子座を含む BAC DNA (RP11-89D11)に GFP/Luc 融合遺伝子を相同組み換え技術を用いて挿入した改変 BAC DNA,

p53 BAC:GFP/Luc[ATG type] ;

p53 遺伝子の開始メチオニンの位置に GFP/Luc 融合遺伝子を挿入した改変 BAC DNA

p53 BAC:GFP/Luc[Stop type] ;

p53 遺伝子の Stop コドンの位置に GFP/Luc 挿入置換をした改変 BAC DNA

を電気穿孔法により、ヒト ES 細胞由来神経幹細胞 (EnstemA NP) 株、ヒト iPS 細胞それぞれに導入し安定保持株の選別をネオマイシン耐性選択によって行った。

前者は p53 の転写活性のみを指標出来るが、後者は p53 と GFP/Luc が融合遺伝子として発現されるため、転写の調節のみならず、蛋白質分解調節などの存在量調節、p53 遺伝子の 3'-非翻訳領域による翻訳調節を加味したレポーター遺伝子である。

細胞内在性の p53 遺伝子座にレポーター遺伝子を挿入すべく、2014 年度から実用化が進んできた CRISPR/Cas9 法を用いたゲノム改変技術を適用した。

4. 研究成果

p53 遺伝子座を含む BAC (RP11-89D11) 上の p53 遺伝子ストップコドンに dVenusLuc2 で挿入置換した BAC レポーター遺伝子を作成した。この BAC レポーター遺伝子を ES 由来神経幹細胞株に導入すると本来の p53 遺伝子座とは異なる染色体上に保持されるトランスジェニック細胞が得られるが、より正確な細胞障害シグナルを得ることを目的とするため、細胞内在性の p53 遺伝子座にレポーター遺伝子を挿入可能な技術を模索していたところ、Feng Zhang らによって CRISPR-CAS9 を用いたゲノム改変法技術が開発され、この技術を用いて本研究の作業を行う方針とした (上記の方法)。H9 ES 由来神経幹細胞株の p53 遺伝子座のストップコドンに dVenusLuc2 (ストップコドン有) に置換する相同組み換え挿入を可能にするドナー DNA、同じくストップコドンに 2A ペプチド-NLS tag BFP (ストップコドン有) に置

換する相同組み換え挿入を可能にするドナー DNA を構築した。さらに、Cas9 を発現するためのプロモーターの選択、至適なガイド RNA の特異性を検証するための条件検討、また、電気穿孔法の遺伝子導入条件の検討を行った。これらドナー DNA と、ガイド RNA、Cas9 蛋白質を発現する plasmid ベクターを電気穿孔法により神経幹細胞株に導入し、レポーター遺伝子が適切に挿入されている細胞を選別し、株化を達成した。

今後この株化細胞を用いて、可能であるならば ^{137}Cs による γ 線の低線量暴露を行い、p53 レポーター遺伝子の発現動向を指標として細胞の増殖性、神経分化に与える影響について調べることを次の展望的課題として行っていきたいと考えている。

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 7件)

Kawase S., Kuwako K., Imai T., Renault-Mihara F., Yaguchi K., Itoharu S., Okano H. Regulatory factor x transcription factors control musashi1 transcription in mouse neural stem/progenitor cells. **Stem Cells Dev.** (査読有), 23, 2250-2261, 2014

Nishimoto Y., Nakagawa S., Hirose T., Okano HJ., Takao M., Shibata S., Suyama S., Kuwako K., Imai T., Murayama S., Suzuki N., Okano H. The long non-coding RNA nuclear-enriched abundant transcript 1_2 induces paraspeckle formation in the motor neuron during the early phase of amyotrophic lateral sclerosis. **Mol Brain.** (査読有), 6, 31-48, 2013

Nishimoto Y., Okano HJ, Imai T., Poole AJ., Suzuki N., Keirstead HS and Okano H. Cellular toxicity induced by the 26-kDa fragment and amyotrophic lateral sclerosis-associated mutant forms of TAR DNA-binding protein 43 in human embryonic stem cell-derived motor neurons **Neurology and Clinical Neuroscience** 1, (査読有), 24–31, 2013.

Takahashi T., Suzuki H., Imai T., Shibata S., Tabuchi Y., Tsuchimoto K., Okano H., Hibi T. Musashi-1 Post-Transcriptionally Enhances Phosphotyrosine-Binding Domain-Containing m-Numb Protein Expression in Regenerating Gastric Mucosa. **PLoS One.**, (査読有), 8(1):e53540, 2013

Muto J., Imai T., Ogawa D, Nishimoto Y., Okada Y., Mabuchi Y., Kawase T., Iwanami A., Mischel PS., Saya H., Yoshida K., Matsuzaki Y., Okano H. RNA-binding protein Musashi1 modulates glioma cell growth through the post-transcriptional regulation of Notch and PI3 kinase/Akt signaling pathways. **PLoS One.**, (査読有), 7(3):e33431, 2012

Kawahara H, Imai T., Okano H. MicroRNAs in Neural Stem Cells and Neurogenesis. **Front Neurosci.**, (査読有), 6: 1-13, 2012.

今井貴雄、岡野栄之：RNA結合タンパク質による遺伝子制御と神経発生・神経機能」細胞工学6月号特集「神経細胞特異的な翻訳制御：鍵を握るRNA結合タンパク

質/mRNA輸送/non-coding RNA」編者：武井延之, (査読無), Vol.31 (6), 668-674, 2012

〔学会発表〕(計 4件)

今井貴雄, 河原裕憲, 西本祥仁, 岡野栄之.神経幹細胞に発現する RNA 結合蛋白質 Musashi1 の翻訳調節機構. 第14回日本再生医療学会総会, 2015年3月19日、横浜(パシフィコ横浜) 1P-01-050

今井 貴雄, 武藤 淳, 河瀬 聡, 芝田 晋介, 岡野 栄之 Musashi1 post-transcriptionally regulates the gene expression in neural stem/progenitor cells and glioma. 第35回日本分子生物学会年会 (The 35th Annual meeting of the Molecular Biology Society of Japan), 2012年12月11日(火)~14日(金), 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡, 発表日 2012年12月13日, 3P-0575

Takao Imai, Jun Muto, Satoshi Kawase, Shinsuke Shibata and Hideyuki Okano. Musashi1 Post-Transcriptionally Regulates The Gene Expression In Neural Stem/Progenitor Cells And Glioma. APRU-BMAP 2012/FIRST 2012 (The 4th Biennial Symposium on Brain and Mind Research in the Asia-Pacific (BMAP 2012)/The FIRST Program) ‘Strategic Exploitation of Neuro-Genetics for Emergence of the Mind’ Symposium (FIRST 2012). August 29-31, North Hall, Mita Campus, Keio University, Tokyo, Japan P-28

Takao Imai, Jun Muto, Satoshi Kawase,
Shinsuke Shibata and Hideyuki Okano-
MUSASHI1
POST-TRANSCRIPTIONALLY
REGULATES THE GENE
EXPRESSION IN NEURAL
STEM/PROGENITOR CELLS AND
GLIOMA. International Society for
Stem Cell Research (ISSCR) 10th
Annual Meeting in Yokohama, Japan,
June 13-16, 2012 / Pacifico Yokohama
Conference Center / T-1099, June 14,
2012

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

今井 貴雄 (IMAI, Takao)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：10383712

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

河瀬 聡 (KAWAE, Satoshi)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号：80468496

西本 祥仁 (NISHIMOTO, Yoshinori)
慶應義塾大学・医学部・特任助教
研究者番号：30398622