

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 29 日現在

機関番号：82508

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640108

研究課題名(和文) ヒト人工染色体を利用した安全なiPS細胞作製方法および完全分化細胞取得方法の確立

研究課題名(英文) Establishment of a method for safe iPS cell production and acquisition of fully differentiated cells using a human artificial chromosome

研究代表者

長谷川 嘉則 (Hasegawa, Yoshinori)

公益財団法人かずさDNA研究所・パイオ研究開発部・特任研究員

研究者番号：30387683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：HT1080細胞内に保有されている、自己脱落可能なヒト人工染色体(tet0-HAC)ベクターに、iPS細胞形成確認マーカーであるOct4プロモーター+RFP遺伝子、神経幹細胞マーカーのNestinプロモーター+GFP遺伝子を搭載した。MEFからiPS細胞の作製を行うときに、上記遺伝子を搭載したtet0-HACベクターの導入作業を行ったところ、tet0-HACベクター保有iPS細胞の取得に成功した。tet0-HACベクター保有iPS細胞は、RFP蛍光が観察されたものと、RFP蛍光が観察されないものがあった。tet0-HACベクターは、質の良いiPS細胞の選抜に利用できることが分かった。

研究成果の概要(英文)：First, I generated a tet0-HAC vector carrying Oct4 promoter-driven RFP gene and Nestin promoter-driven GFP gene in HT1080 cells. Next, I introduced the tet0-HAC into MEF cells, and the MEF cells were developed into iPS cells. As a results, I obtained iPS cells carrying the tet0-HAC. I observed RFP signals from the iPS cells.

研究分野：細胞工学

キーワード：再生医療 iPS細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) iPS 細胞研究において、ゲノムに傷を付けない安全な作製方法が確立されたため、未分化細胞の残存による移植後の腫瘍発生が大きな問題となっていた。

(2) 申請者のグループは、ヒトセントロメア領域に存在するアルフォイド DNA をヒト培養細胞の HT1080 細胞に導入する事によって、ヒト人工染色体 (Human artificial chromosome, HAC) を効率良く作製するという方法を世界で初めて確立した (Ikeno et al., Nat Biotechnol., 1997)。一旦作製された HAC は、細胞のもつ本来の染色体からは独立して存在し、細胞周期に応じて複製、分配されるため、長期間にわたり細胞を培養した場合においても安定に維持される。これらの HAC の特性を基にして、従来のベクター系が抱える問題を克服する HAC ベクターを開発した (Ikeno, Suzuki, Hasegawa, Okazaki, Nucleic Acid Research, 2009)。HAC ベクターは、「狙ったコピー数の遺伝子挿入が可能」、「ゲノム由来の調節領域を含めた巨大な遺伝子領域を挿入できる」などの有利な特性を持つ。さらに、申請者のグループは、アルフォイド DNA 繰り返し単位中に tet オペレーター配列 (tetO) を組み込んだ合成反復配列からの HAC (tetO-HAC) 形成にも成功した。tet リプレッサー (tetR) 融合タンパク質 tTS を tetO-HAC セントロメアへ直接結合させることによりヘテロクロマチン化を過剰に誘導すると、人工染色体上のセントロメア機能は破壊され、細胞増殖とともに人工染色体は急速に細胞から脱落することを確認した (Nakano et al., Dev., Cell, 2008)。申請者のグループは、この tetO-HAC の性質を利用して、ゲノムに傷を付けない安全な iPS 細胞作製方法の開発を進めている。tetO-HAC に遺伝子導入サイトとして loxP サイトを挿入して、この部位へ tTS 遺伝子の発現力セットを組み込み、自己完結型の脱落制御可能な人工染色体を作製した。研究開始時点において、この自己脱落制御可能な人工染色体へ山中 4 因子 (Oct4, SOX2, Klf4, c-Myc) の挿入を進めていた。iPS 細胞誘導後にこの人工染色体の脱落制御を行うことにより、ゲノムに傷を付けない安全な iPS 細胞作製が可能になる。

2. 研究の目的

導入 DNA のサイズに制限がなく自己脱落可能なヒト人工染色体 (tetO-HAC) ベクターに、初期化山中 4 因子、iPS 細胞形成確認マーカー (ES 細胞未分化マーカー) のプロモーター+GFP 遺伝子、組織特異的分化マーカーのプロモーター+RFP 遺伝子を搭載する。上記全ての遺伝子を搭載した tetO-HAC ベクターを体細胞に導入することによって、ゲノムに傷を付けない安全に iPS 細胞を作製後、GFP が発現

している細胞を選抜して質の高い iPS 細胞を単離する。その後、作製した iPS 細胞に分化誘導を行い、GFP が発現せずに RFP が発現している細胞を選抜することにより完全に分化した細胞だけを単離する。

3. 研究の方法

(1) 導入 DNA のサイズに制限がなく自己脱落可能なヒト人工染色体 (tetO-HAC) ベクターに、初期化山中 4 因子、iPS 細胞形成確認マーカー (ES 細胞未分化マーカー) のプロモーター+RFP (Red fluorescent protein) 遺伝子、組織特異的分化マーカー (神経幹細胞マーカー、Nestin 遺伝子) のプロモーター+GFP (Green fluorescent protein) 遺伝子を搭載する。

(2) 上記全ての遺伝子を搭載した tetO-HAC ベクターを申請者が開発したクロモソームトランスファー法でマウス MEF 細胞に導入する。クロモソームトランスファー法とは、蔗糖溶液遠心法により HAC を細胞染色体から単離して、市販の DNA トランスフェクション試薬を用いて単離した HAC を培養細胞に導入する方法である。この方法によって従来の方法では困難な細胞にも HAC 導入が可能になった (Suzuki, Itou, Hasegawa et al, Nucleic Acid Research, 2010)。

(3) ゲノムに傷を付けずに安全に iPS 細胞を作製後、GFP が発現している細胞を選抜して質の高い iPS 細胞を単離する。

(4) 作製した iPS 細胞に、ドーパミン作動性ニューロン分化キットを使用して、単離した iPS 細胞に対してドーパミン作動性ニューロンへの分化誘導を行う。その後、RFP が発現せずに GFP が発現している細胞を選抜することにより完全に分化した細胞だけを単離する。

(5) 選抜した神経幹細胞から、培地から Dox を除くことにより全遺伝子搭載 tetO-HAC ベクターを自己脱落させる。

4. 研究成果

(1) 本研究の作業開始後に、山中伸弥先生が顧問を務める iPS アカデミアジャパン株式会社からもセンダイウイルスベクターを用いた iPS 細胞作製キットが販売されることになり、高効率で安全な iPS 作製方法については、センダイウイルスベクターを使用することが懸命であると判断した。そこで、本研究では、iPS 細胞作製には、センダイウイルスベクターを用いることとして、iPS 細胞形成確認マーカーである Oct4 プロモーター+RFP 遺伝子と神経幹細胞マーカーの Nestin プロモーター+GFP 遺伝子を搭載した

tet0-HACベクターをiPS細胞作製時に同時にトランスフェクションすることとした。

(2) Oct4 遺伝子プロモーターに RFP 遺伝子をつなげた。Nestin 遺伝子プロモーターに GFP 遺伝子をつなげた。Oct4 プロモーター+RFP 遺伝子と Nestin プロモーター+GFP 遺伝子を一つのBACベクター上に入れ込み、tet0-HAC に挿入するための部位特異的組換えサイトである lox66 サイトを追加した。Crelox 部位特異的組換えを利用して、ヒト培養細胞 HT1080 細胞内に保有されている、tet0-HAC ベクターに、Oct4 プロモーター+RFP 遺伝子と Nestin プロモーター+GFP 遺伝子を搭載した(iPS-tet0-HAC)。FISH (fluorescence in situ hybridization) 観察により遺伝子を搭載した tet0-HAC は、ホストの細胞からは独立して安定に保たれていることを確認した。

(3) B6 マウスから調整した MEF に iPS 細胞作製用センダイウイルスベクターの処理を行った 24 時間後に、市販のトランスフェクションを用いて iPS-tet0-HAC の導入を試みた。その結果、iPS-tet0-HAC 保有 iPS 細胞の取得に成功した。iPS-tet0-HAC 保有 iPS 細胞は、RFP 蛍光が観察されたものと、RFP 蛍光が観察されないものがあった。tet0-HAC ベクターは、質の良い iPS 細胞の選抜に利用できることが分かった。

(4) 今後は、iPS-tet0-HAC 保有 iPS 細胞について、市販のドーパミン作動性ニューロン分化キット(コスモバイオ)を使用して、ドーパミン作動性ニューロンへの分化誘導を行う。その後、GFP 遺伝子の発現により、神経幹細胞のマーカ-Nestin 遺伝子の発現を確認する。FACS sorting を使用して、GFP 遺伝子が発現して、RFP が発現していない細胞、つまり、完全に神経幹細胞に分化した細胞を選り分ける。選抜した神経幹細胞へ、tTS 遺伝子(Tet リプレッサータンパク質と KRAB サイレンシングドメインを融合した遺伝子)を作用させることにより、iPS-tet0-HAC を自己脱落させる。

(5) 当初の計画に比べて、遅れが見られているが、最も困難なポイントである、iPS-tet0-HAC 保有 iPS 細胞の取得に成功した上、狙い通りに iPS 細胞形成確認マーカーである Oct4 プロモーター+RFP 遺伝子の発現が確認された。これ以降の作業は、失敗が起こる可能性は低いので、目標が達成されることはほぼ確実である。早期に作業を完了させる。

<引用文献>

Construction of YAC-based mammalian artificial chromosomes. Ikeno M et al. Nat Biotechnol. 1998 May;16(5):431-439.

Manipulating transgenes using a chromosome vector. Ikeno M, Suzuki N, Hasegawa Y, Okazaki T. Nucleic Acids Res. 2009 Apr;37(6):e44. doi: 10.1093/nar/gkp058. Epub 2009 Feb 17. PMID: 19223328

Inactivation of a human kinetochore by specific targeting of chromatin modifiers. Nakano M et al. Dev Cell. 2008 Apr;14(4):507-22. doi: 10.1016/j.devcel.2008.02.001. PMID: 18410728

Cell to cell transfer of the chromatin-packaged human beta-globin gene cluster. Suzuki N, Ito T, Hasegawa Y, Okazaki T, Ikeno M. Nucleic Acids Res. 2010 Mar;38(5):e33. doi: 10.1093/nar/gkp1168. Epub 2009 Dec 10. PMID: 20007595

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)

Evaluation of the effects of quercetin on damaged salivary secretion. Takahashi A, Inoue H, Mishima K, Ide F, Nakayama R, Hasaka A, Ryo K, Ito Y, Sakurai T, Hasegawa Y, Saito I. PLoS One. 2015 Jan 28;10(1):e0116008. doi: 10.1371/journal.pone.0116008. eCollection 2015. PMID: 25629520

Generating a transgenic mouse line stably expressing human MHC surface antigen from a HAC carrying multiple genomic BACs. Hasegawa Y, Ishikura T, Hasegawa T, Watanabe T, Suzuki J, Nakayama M, Okamura Y, Okazaki T, Koseki H, Ohara O, Ikeno M, Masumoto H. Chromosoma. 2015 Mar;124(1):107-18. doi: 10.1007/s00412-014-0488-3. Epub 2014 Oct 12. PMID: 25308419

[学会発表](計 1件)

岡村佳明, 霜島司, 中野めぐみ, 大関淳一郎, 長谷川嘉則, 池野正史, Earnshaw C William, Larionov Vladimir, 舩本寛, 脱落制御可能なヒト人工染色体(HAC)を用いた iPS 細胞の作製と細胞選抜への利用、日本分子生物学会、2013 年 12 月 5 日、神戸国際展示場(兵庫県)

[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

長谷川 嘉則 (HASEGAWA YOSHINORI)
公益財団法人かずさDNA研究所
バイオ研究開発部・特任研究員
研究者番号：30387683