

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：82406

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850226

研究課題名(和文)肝細胞特異的な外来遺伝子のゲノム挿入系の開発とその応用

研究課題名(英文)Development and its application of transgene integration system targeted to the genome of liver cells.

研究代表者

中村 伸吾 (NAKAMURA, Shingo)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・防衛医学研究センター) 講師

研究者番号：00505323

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ハイドロダイナミクス遺伝子導入法とpiggyBacトランスポゾン系を内包したCre-loxP系に基づく遺伝子発現切り替えシステムを用いてマウス肝臓特異的に外来の目的遺伝子を持続発現させることで達成できる、マウス生体肝臓における簡便で新たな遺伝子操作法の開発を試みた。この方法を用いて肝障害モデルマウスを作製し、肝細胞増殖因子を担持させた独自のバイオマテリアルの投与によってこのマウスを回復させられるかどうか調べた。以上の結果、マウス生体肝臓における簡便で新たな遺伝子操作法の可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to develop easy and novel technique for gene-based manipulation in murine liver that is achieved by hydrodynamics-based gene delivery system and Cre-loxP-mediated gene switching system containing piggyBac transposon system to continuously express gene of interest. With this technique, we demonstrated to create liver disease model mouse and investigate whether the mouse is recovered by administration of our original hepatocyte growth factor-loaded biomaterial. In conclusion, we succeeded to show possibility of the easy and novel technique for gene-based manipulation in murine liver.

研究分野：生体内遺伝子導入

キーワード：生体内遺伝子導入 遺伝子持続発現 非ウイルスベクター 遺伝子発現切り替え バイオマテリアル

1. 研究開始当初の背景

肝臓は重要な臓器であり、様々な方面から精力的に研究が行われている。肝臓への遺伝子導入を考えた時、トランスジェニック (Tg) 動物の作製手法を用いれば目的遺伝子 (gene of interest; GOI) を厳密に肝臓で持続発現させられるが、Tg 動物の作製には熟練した技術と時間が必要である。そこで、静脈を介したベクター-DNA の投与による遺伝子導入手法が多用されている。安全面の問題から非ウイルスベクター (プラスミド DNA; pDNA) が良く用いられているが、方法が簡便である反面、遺伝子導入効率の低さ、導入遺伝子の発現の弱さと発現持続期間の短さが大きな課題とされてきた。

1999年、裸のDNAを大量の緩衝液と共に血中に投じるハイドロダイナミクス遺伝子導入法 (Hydrodynamics-based gene delivery system; HGD) が報告された。これにより、肝臓への遺伝子導入効率は著しく向上した。しかし、導入された遺伝子の発現期間は一過的で、全身投与故に肝臓以外でも発現した。そこで、インテグラーゼやトランスポザゼをHGDに併用した導入遺伝子の持続発現の試みが、我々を含む幾つかのグループから報告された。それでもなお、肝臓特異的な遺伝子持続発現システムは開発の途上にあった。

したがって、簡便なHGDによって導入された外来遺伝子を肝臓に限定して持続発現させることが出来たならば、その手法は極めて有用なものになるであろうと考えられた。そして、その簡便な方法は、肝臓における遺伝子操作を基軸とする研究に大きなインパクトを与えるものと期待できた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、静脈経路で非ウイルスベクターを導入する従来のHGDのアプローチを取りながら、GOIをマウス肝臓特異的に持続発現させ、且つその遺伝子発現切り替え (gene switching) を可能とする、簡便で新たな生体内遺伝子操作法を開発しその応用事例を示すことである。肝臓特異的にGOIをgene switchingさせるシステムの根幹には、我々がこれまでに報告した Cre-*loxP*系を用いた活性の低い組織特異的プロモーターからGOIを強発現させることの出来るシステム (enhanced tissue-specific GOI expression system; ETSGE) を利用した。これに piggyBac トランスポゾン系 (piggyBac系) を組み合わせることで肝臓特異的な遺伝子持続発現が達成できると考えられた。

3. 研究の方法

(1) HGDによる肝臓特異的な導入遺伝子持続発現系の構築

まず、HGDによるマウス肝臓への遺伝子導入条件を検討した。我々は既にポリエチレン

イミン (PEI) 系試薬の併用が HGD の効率向上につながることを報告しており (Nakamura S et al., Biomed Res Int., 2013. doi: 10.1155/2013/928790.)。また、ICRマウスの肝臓における内側右葉の導入遺伝子の発現傾向が高いという検討結果を得ていた。しかし、PEI系試薬による導入遺伝子の調製は複雑であったため、簡便性を求めた検討を行った。具体的には、TransIT-EE Hydrodynamic Delivery Solution (TransIT-EE) (タカラバイオ) を使用して、強くユビキタなプロモーターである CAG プロモーターの制御下で緑色蛍光 (enhanced green fluorescent protein; EGFP) 遺伝子と発光遺伝子 (luciferase; luc) が IRES 配列を介して同時に発現する pDNA (pCEIL) を、HGD により数系統のマウス (ICR, Balb/cA, B6C3F1, C57BL/6N) へ遺伝子導入した。導入翌日に犠牲死させて肝臓を採材し、EGFP 蛍光による定性的解析と luc 活性による定量的解析を行い、導入遺伝子の発現について評価した。

次に、EGFP を有する piggyBac トランスポゾン (CAG プロモーター制御下で EGFP が発現する配列を挟み込む形で piggyBac terminal repeat が配置されている pDNA; pT-EGFP) と、肝臓特異的に piggyBac トランスポザゼを発現する pDNA (プレアルブミンプロモーターの制御下で piggyBac トランスポザゼが発現する pDNA; pTR/Trans) を構築した。両者が共導入された肝細胞は、ゲノム遺伝子内に EGFP が挿入されて持続的に EGFP 蛍光が観察されるようになるものと考えられた。そこで、マウス胎仔線維芽細胞 (NIH3T3 細胞) とヒト肝癌由来細胞 (HepG2 細胞) に対して FuGENE HD (プロメガ) を使用して共導入し、30 日間にわたって観察した。両ベクターの使用量比 (1:0.4) は、メーカーのプロトコルを参考にした (Transposagen Biopharmaceuticals, Inc.)。続いて HGD により ICR マウスへ pT-EGFP と pTR/Trans を共導入し、導入 30、60、90 日目にマウスを犠牲死させて主要臓器 (脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、膵臓、脾臓、小腸、腹筋) を採材して EGFP 蛍光を観察し、肝ゲノム挿入に基づくマウス肝臓特異的な GOI の持続発現の可能性を調べた。

(2) 肝臓での持続的 gene switching を用いた肝障害モデルマウスの作製

本実験では疾患誘発遺伝子として、ペプチド伸長因子を失活させて細胞を死滅させるジフテリア毒素 A 鎖 (diphtheria toxin A-chain; DT-A) をコードした piggyBac 系の pDNA (pT-CETD) を使用した。この pDNA は *loxP* 配列を内包しており、通常は CAG プロモーターの制御下で EGFP が発現しているが、Cre 酵素による *loxP* 配列の組換えによって EGFP が切り出されて DT-A が発現する。そして、この配列を挟み込む形で piggyBac terminal repeat が配置されている。したがって、

pT-CETDはpTR/Transと共にHGDによってICRマウスへ共導入されることで、マウス肝細胞ゲノムへ特異的に挿入されてEGFPを持続発現するようになり、その後、任意のタイミングで導入されたCre酵素発現ベクターの影響によってDT-A遺伝子を発現して肝細胞を死滅させる（gene switching）。そして、当該マウスは肝障害を呈するものと考えられた。

まず、pT-CETDの動作確認をNIH3T3細胞とHepG2細胞を使用して実施した。遺伝子導入は前項（1）と同様に行い、共導入30日目に今度はCAGプロモーターの制御下でCre酵素を発現するpDNA（pCAG/Cre）を導入して細胞を顕微鏡観察により評価した。

続いて、pT-CETD（10μg）とpTR/Trans（4μg）をHGDによってICRマウスへ導入した。共導入後30、60、90日目のマウスに対しpCAG/CreをHGDによって導入してgene switchingによるDT-A遺伝子の発現誘導を行った。我々のこれまでの基礎検討（若手研究（B）課題番号：22780274）に基づいてgene switchingによるDT-A遺伝子の発現誘導後の観察期間は21日目までとし、発現誘導後3、7、10、14、17、21日目に生化学検査（AST、ALT）を行った。最終検査終了後のマウスを犠牲死させて肝臓の病理標本を作製し、顕微鏡観察による評価を行った。

（3）独自のバイオマテリアルLHPPsによる肝障害治療システムの検討

独自のバイオマテリアル（low-molecular-weight heparin/protamine particles; LHPPs）が肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor; HGF）の生理活性を保護するデリバリーキャリアとして使用出来ることは既にわかっていた。また、HGFが肝再生に寄与することは周知のことである。そこで、前項（2）で作製した肝障害モデルマウスに対し、HGFを担持させたLHPPsを点滴投与した。HGFの使用量は、これまでの我々の増殖因子を用いた再生医療研究の実験結果を基に10μgとし、これをLHPPs 10mgを含んだ1mLの生理的食塩水（大塚製薬）に加えた溶液をおよそ10分かけて投与した。点滴投与後3、7、14、21、28日目に生化学検査（AST、ALT）を行い、最終検査終了後に犠牲死させて肝臓の病理標本を作製して病理像を調べた。

4. 研究成果

（1）HGDによる肝臓特異的な導入遺伝子持続発現系の構築

TransIT-EEを用いたHGDと既に報告したPEI系試薬を用いたHGDは、何れもPBSを用いる通常のHGDよりも高い遺伝子発現効果を示した（図1）。TransIT-EE使用時とPEI使用時における遺伝子発現率には有意差はみられなかったものの、TransIT-EE使用時の方が総じて高い傾向があった。

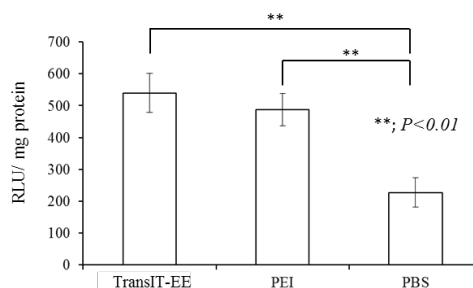


図1：HGDによる遺伝子発現の違い

TransIT-EEを用いたHGDにおけるGOI発現のマウス系統間の差、肝臓のローブ（葉）間の差について検討したところ、ICRマウスにおける内側右葉で高い遺伝子発現を確認した（図2）。そこで以後は、HGDにTransIT-EEを用いることとし、ICRマウスの内側右葉を実験対象として使用した。

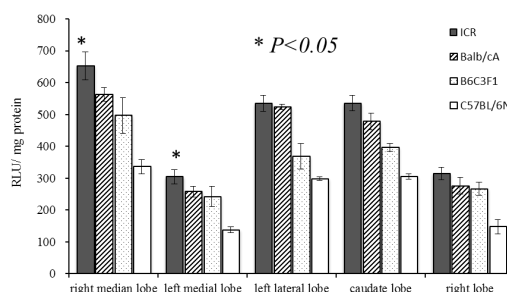


図2：HGDによるマウス系統と肝臓ローブの違いによる遺伝子発現の差

次に、pT-EGFPとpTR/Transを用いて肝細胞特異的な導入遺伝子の持続発現を調べた結果、EGFP蛍光はHepG2細胞でのみ導入後30日目でも確認する事が出来た。そして、HGDによってICRマウスへ導入した結果、導入90日目でも肝臓に局限されたEGFP蛍光を確認することができた。piggyBac系を使用しない場合は導入遺伝子の発現は一過的なものであり、30日目には確認出来なかった。以上の結果、導入したGOIの発現期間の大幅な延長が達成されたと考えられた。

（2）肝臓での持続的gene switchingを用いた肝障害モデルマウスの作製

pT-CETDとpTR/Transを培養細胞に共導入した結果、HepG2細胞でのみEGFP蛍光が確認出来た。そして、pCAG/Creを導入した結果、細胞は死滅した。即ち、gene switchingが作動することが確認出来た。この時、EGFP蛍光が観察されたままのHepG2細胞も存在した。次に、HGDによってICRマウスへ導入した結果、導入後90日目においてもEGFP蛍光は確認出来た。その割合は導入後30日目>60日目>90日目の順であった。そして、pCAG/Creを導入した結果、HGD後30日目のマウスはAST値及びALT値の異常（上昇）が確認できた。病理標本からは、肝細胞死滅に起因する

と思われる肝臓の線維化所見が一部で観察できた。一方、HGD 後 60 日目のマウスでは、生化学検査値の異常傾向は低くなり、病理標本でも特徴的な異常所見はほぼ皆無であった。さらに、HGD 後 90 日目のマウスでは、生化学検査値の異常と病理標本像における異常はほぼ観察出来なかった。

(3) 独自のバイオマテリアル LHPPs による肝障害治療システムの検討

本実験では、前項(2)の肝障害モデルマウスのうち HGD 後 30 日目のマウスを使用した。このマウスに対し、HGF/LHPPs 複合体を投与したところ、点滴投与しない場合と比べて AST 値及び ALT 値の異常(上昇)傾向が総じて小さくなった。しかし、病理標本像では線維化を含む異常所見が観察された。

(4) まとめ

本研究の成果は、HGD で導入した GOI の遺伝子発現期間を大幅に延長させ、gene switching システムによってマウス生体肝臓特異的に遺伝子操作が行えたという事に集約される。その一方で、幾つかの課題も生じた。

例えば、gene switching による肝障害モデルマウスの作製実験では、HGD 後 90 日目ではその効果が得にくいことが示された。これは、gene switching の効果がゲノム挿入後の時期により異なることを示している。その理由はおそらくタンパク質の発現量に起因していると考えられたが、本実験ではタンパク質の定量実験までは行えておらず、今後その詳細を解明したい。

トランスポゾン系ではトランポザーゼの過剰使用がその効率を低下させる現象が知られている(overproduction inhibition)。piggyBac 系では、細胞の種類に依存した形での当該現象の出現が示唆されており、本実験系でも、今後この点を調べる必要がある。

独自のバイオマテリアル LHPPs による肝障害治療システムの検討では、有意な治療効果が確認出来なかった。その原因は、血中投与による薬剤(本実験では HGF)の失活、投与量の不足、*in vitro* 系では確認出来ていた LHPPs の肝指向性が生体内では弱かったなどの理由が考えられる。生化学検査値の改善はみられたことから、本戦略が間違っているとも言えず、今後の課題として引き続き検討したい。

本研究の成果は、HGD によって、遺伝子を基軸とする肝臓の *in vivo* マニピュレーションシステムが構築出来得ることを示唆している。今回生じた課題の検討や生体肝臓への遺伝子導入系の高効率化を図るなどして、本成果を非ウイルスベクターによる肝再生研究の基盤技術へと繋げて行きたい。

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 15 件、主要なものを抜粋)

Sato M, Koriyama M, Watanabe S, Ohtsuka M, Sakurai T, Inada E, Saitoh I, Nakamura S, Miyoshi K. Direct injection of CRISPR/Cas9-related mRNA into cytoplasm of parthenogenetically activated porcine oocytes causes frequent mosaicism for indel mutations. *Int J Mol Sci.* 16(8); 17838-17856, 2015. 査読有. DOI: 10.3390/ijms160817838.

Sato M, Kagoshima A, Saitoh I, Inada E, Miyoshi K, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S. Generation of -1,3-galactosyltransferase-deficient porcine embryonic fibroblasts by CRISPR/Cas9-mediated knock-in of a small mutated sequence and a targeted toxin-based selection system. *Reprod Domest Anim.* 50(5); 872-880, 2015. 査読有. DOI: 10.1111/rda.12565.

Takikawa M, Nakamura S, Ishihara M, Takabayashi Y, Fujita M, Hattori H, Kushibiki T, Ishihara M. Improved angiogenesis and healing in crush syndrome by fibroblast growth factor-2 containing low-molecular-weight heparin (Fragmin)/ protamine nanoparticles. *J Surg Res.* 196(2); 247-257, 2015. 査読有. DOI: 10.1016/j.jss.2015.03.022.

Nakamura S, Maehara T, Watanabe S, Ishihara M, Sato M. Liver lobe and strain difference in gene expression after hydrodynamics-based gene delivery in mice. *Anim Biotechnol.* 26(1); 51-57, 2015. 査読有. DOI: 10.1080/10495398.2014.886583.

Sato M, Inada E, Saitoh I, Matsumoto Y, Ohtsuka M, Miura H, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S. A combination of targeted toxin technology and the piggyBac mediated gene transfer system enables efficient isolation of stable transfectants in nonhuman mammalian cells. *Biotechnol J.* 10(1); 143-153, 2015. 査読有. DOI: 10.1002/biot.201400283.

Watanabe S, Haraguchi S, Nakamura S, Sakurai T, Mugikura S, Kajiwara K, Kimura M, Sato M. Novel Cancer

Vaccination System Based on Human Endo- β -N-Acetyl Glucosaminidase Gene Delivery. *J Glycobiol.* 3(1); 1-8, 2014. 査読有. DOI: 10.4172/2168-958X.1000106.

Sato M, Miyoshi K, Nagao Y, Nishi Y, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S. The combinational use of CRISPR/Cas9-based gene editing and targeted toxin technology enables efficient biallelic knockout of the α -1,3-galactosyltransferase gene in porcine embryonic fibroblasts. *Xenotransplantation.* 21(3); 291-300, 2014. 査読有. DOI: 10.1111/xen.12089.

Nakamura S, Sato M, Hattori H, Shimizu M, Fujita M, Maehara T, Ishihara M. Therapeutic Angiogenesis for Limb Ischemia Using Angiogenic Growth Factors and Carriers. *Curr Tissue Eng.* 4(1); 57-63, 2015. 査読有. DOI: 10.2174/2211542004666150605000901.

Ishihara M, Hattori H, Nakamura S. A review on biomedical applications of chitosan-based biomaterials. *Int J Pharm Bio Sci.* 6(3); 162-178, 2015. 査読有. <http://www.ijpbs.net/cms/php/upload/4512.pdf>.

Sato M, Inada E, Saitoh I, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S. Site-targeted non-viral gene delivery by direct DNA injection into the pancreatic parenchyma and subsequent in vivo electroporation in mice. *Biotechnol J.* 8(11); 1355-1361, 2013. 査読有. DOI: 10.1002/biot.201300169.

〔学会発表〕(計 19 件、主要なものを抜粋)

佐藤正宏, 中村伸吾 (7 人中 番目). zygote injection に依らない生殖細胞、胚を標的とした遺伝子導入による CRISPR/Cas9 genome editing の可能性. BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会、第 88 回日本生化学会大会 合同大会). 2015 年 12 月 1 日. 神戸国際会議場他 (兵庫県・神戸市).

中村伸吾. GAG/プロタミンナノ粒子の医療応用. 第 23 回プロテオグライカンフォーラム. 2015 年 1 月 24 日. 東京医科歯科大学 (東京都・文京区).

渡部 聡, 中村伸吾 (6 人中 番目). EndoGalC と targeted toxin 法の組み合

わせを用いた CRISPR 系でノックアウトされた遺伝子改変細胞濃縮法の開発. 第 37 回日本分子生物学会. 2014 年 11 月 26 日. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市).

佐藤正宏, 中村伸吾 (9 人中 番目). 標的細胞破壊法と piggyBac の組み合わせは遺伝子導入安定株の効率的取得を可能とする. 第 37 回日本分子生物学会. 2014 年 11 月 26 日. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市).

佐藤正宏, 中村伸吾 (7 人中 番目). プタにおける CRISPR/Cas9, targeted toxin 法を用いた multiple constructs の標的遺伝子導入システムの開発. 第 107 回日本繁殖生物学会大会. 2014 年 8 月 21 日. 帯広畜産大学 (北海道・帯広市).

中村伸吾, 石原雅之. 多糖類で簡便に作成したナノサイズドラッグデリバリーキャリアの安定性. 第 33 回日本糖質学会. 2014 年 8 月 10 日. 名古屋大学 (愛知県・名古屋市).

中村伸吾 (5 人中 番目). ハイドロダイナミクスに基づく生体内遺伝子導入における外来遺伝子発現のマウス系統差および肝臓ローブ間の差. 第 36 回日本分子生物学会年会. 2013 年 12 月 3 日. 神戸国際会議場他 (兵庫県・神戸市).

渡部 聡, 中村伸吾 (7 人中 番目). 膜結合型 C-type レクチンである Dgcr2 タンパクは I 型 BMP 受容体と結合しシグナル伝達制御に関与する. 第 36 回日本分子生物学会年会. 2013 年 12 月 4 日. 神戸国際会議場他 (兵庫県・神戸市).

中村伸吾 (8 人中 番目). 多糖類を用いたマウス生体組織へのタンパク質・遺伝子運搬システムの検討. 第 32 回日本糖質学会年会. 2013 年 8 月 5 日. 大阪国際交流センター (大阪市・天王寺区).

〔図書〕(計 1 件)

Ishihara M, Takikawa M, Hattori H, Fijita M, Ishihara M, Nakamura S. One Central Press. *Nanomedicine.* pp.137-155, 2014.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 伸吾 (NAKAMURA Shingo)

防衛医科大学校・防衛医学研究センター・講師

研究者番号: 00505323