

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19615

研究課題名(和文)臨床応用実現化のためのヒト人工染色体ベクターの構築

研究課題名(英文)Construction of human artificial chromosome towards practical use

研究代表者

宇野 愛海(Uno, Narumi)

鳥取大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30733357

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):ヒト人工染色体ベクター(Human artificial chromosome: HAC)は伴性劣勢遺伝病であるデュシェンヌ型筋ジストロフィーへの遺伝子・細胞移植療法の開発に向けて応用が期待されている。しかしながら、非ヒト細胞を用いない手法で作製し、目的細胞へ導入する新規技術の開発が必須である。本研究では、ゲノム編集技術CRISPR/Cas9を用いてモデル体細胞であるCHO/A9細胞においてヒト染色体改変法を開発した。一方で、ヒト細胞内での染色体改変法の開発やヒト細胞からの染色体導入法の開発について十分ではなく、さらなる検討が必要であると考えられた。

研究成果の概要(英文): Human artificial chromosome vector (HAC) is promising for the development of gene- and cell-therapy for Duchenne muscular dystrophy, which is a genetic disorder with an X-linked recessive inheritance pattern. However, HAC should be developed and introduced to target cells in a condition without animal cells. In this study, we developed a chromosome modification technology for human chromosome in CHO or A9 cells of the model cells of somatic cells with CRISPR/Cas9, called genome editing tool. On the other hand, the chromosome modification technology in human cells was examined and chemical compounds was screened towards the development of microcell-mediated chromosome transferring with human cells as a donor of a chromosome. Although these studies did not showed an expected results, further consideration should be required towards the achievements of the development of these technologies.

研究分野：染色体工学

キーワード：ヒト人工染色体 微小核細胞融合法

1. 研究開始当初の背景

伴性劣性遺伝病デュシェンヌ型筋ジストロフィー (DMD) は進行性筋委縮症であり、骨格筋や心筋の麻痺により、幼年期からの行動制限を受け、自立呼吸能の低下、心筋梗塞などにより若年で死亡する重篤な疾患である。投薬治療法の進歩により疾患患者の寿命は改善しているが、根治治療法は開発されていない。これまでに微小核細胞融合法を用いて、完全長 (2.4Mb) のジストロフィン (DYS) 遺伝子を搭載したヒト人工染色体 (Human Artificial Chromosome: HAC) ベクター (DYS-HAC) を患者由来 iPS 細胞や MAB 細胞への導入に成功している。しかし、臨床応用への問題点として、治療用細胞への HAC ベクター導入時の非ヒト由来タンパク質の混入、未知ウイルスへの感染の危険性が挙げられる。以下の技術課題を解決する必要がある。

2. 研究の目的

ヒト人工染色体を用いた遺伝子・細胞移植治療実現に向け、非ヒト由来蛋白質の混入や未知ウイルスに感染する危険性の少ないヒト人工染色体ベクターの構築・導入方法の開発を行う。1) 正常細胞内においてゲノム編集技術により完全長ジストロフィンゲノム保持人工染色体ベクターを構築する。2) ヒト正常細胞に微小核を形成させ、骨格筋の細胞移植治療が可能な中胚葉系血管芽細胞 (MAB 細胞) への染色体導入技術開発を行う。3) ジストロフィン保持人工染色体ベクター保持 MAB 細胞による疾患モデル動物への治療効果を検証する。

しかし、臨床応用への問題点として、治療用細胞への HAC ベクター導入時の異種動物由来タンパク質の混入、未知ウイルスへの感染の危険性が挙げられる。以下の技術課題を解決する必要がある。

課題 1: 微小核細胞融合法による染色体導入法は宿主細胞の細胞質中タンパク質を導入標的細胞に伝播する。

課題 2: 微小核細胞融合法による染色体導入法にはハムスター CHO 細胞を使用する。

課題 3: HAC ベクターの構築の過程においては相同組み換え効率の高いニワトリ DT40 細胞を HAC ベクターの中間宿主細胞として使用することが必須である。本研究ではこれら課題を解決するための必須技術を開発する。

3. 研究の方法

(1) CHO 細胞内において、CRISPR/Cas9 を用いたヒト 21 番染色体への遺伝子挿入法および人工テロメアを用いた染色体切断法 (テロメアトランケーション法) の開発を検討した。またこれらの改変したヒト染色体を微小核細胞融合法にて他細胞へと移し替えた。

(2) A9 細胞内において、ヒト 8 番染色体への CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子挿入法を検討した。

(3) ヒト細胞に微小核形成を誘導する可能

性がある薬剤として、コルセミドとヘスペラジンの濃度検討を行い、微小核形成誘導を試みた。

(4) 先に CHO/A9 細胞で確立した手法を基盤として、ヒト細胞株での CRISPR/Cas9 を用いて、不死化間葉系幹細胞株中においてヒト 7 番染色体を、ヒト iPS 細胞株中において、ヒト X 染色体の染色体切断を試みた。

4. 研究成果

(1) CHO 細胞中において、ヒト 21 番染色体に対して、CRISPR/Cas9 を用いて、DNA 二重鎖切断を誘導し、EGFP 及びプラスタジン耐性遺伝子を保持する相同組み換えベクターを導入した。結果として、獲得したクローンの PCR 解析の結果、17% のクローンにおいて目的通りの遺伝子挿入が確認された (図 1)。FISH 法により染色体解析を行い、遺伝子挿入位置を検証した結果、目的通りに緑色で示される相同組み換えベクターが赤色で示されるヒト 21 番染色体上のセントロメア近傍染色体領域に挿入されていることが示された。(図 2)

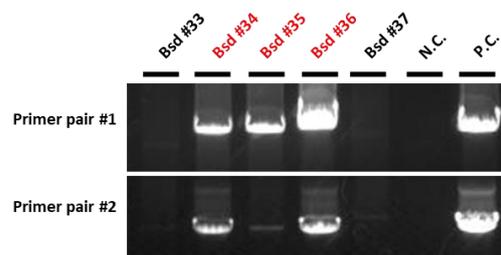


図 1 CHO 細胞における遺伝子挿入についての PCR 解析結果

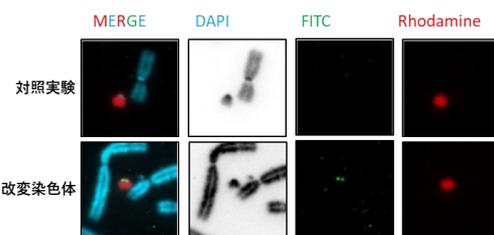


図 2 CHO 細胞における遺伝子挿入についての FISH 解析結果

一方で、CHO 細胞中において、ヒト 21 番染色体に対して、CRISPR/Cas9 を用いて、DNA 二重鎖切断を誘導し、ヒスチジノール耐性遺伝子及び 1 kbp の人工テロメアを保持する相同組み換えベクターを導入した。結果として、獲得したクローンの PCR 解析の結果、7% のクローンにおいて目的通りの染色体切断が確認された (図 3)。FISH 法により染色体解析を行い、遺伝子挿入位置を検証した結果、目的通りに緑色で示される相同組み換えベクターが赤色で示されるヒト 21 番染色体上のセントロメア近傍染色体領域に挿入され、かつ染色体が切断されていることが示され

た。(図4)

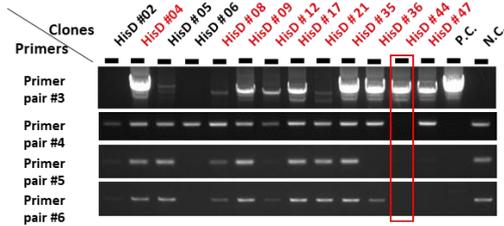


図3 CHO細胞における染色体切断についてのPCR解析結果

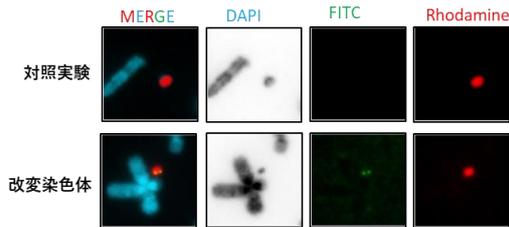


図4 CHO細胞における染色体切断についてのFISH解析結果

改変した上述二種の改変した染色体についてそれぞれをCHO細胞から微小核細胞融合法を用いて他細胞に導入した。PCR法、FISH解析の結果、目的通りそれぞれ改変された染色体が導入されたことが示された(図5・6)。

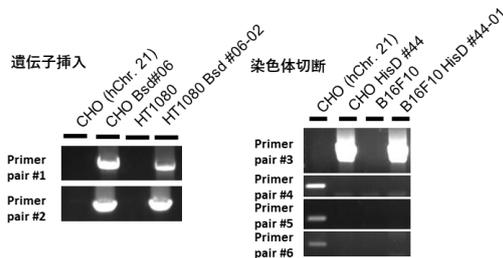


図5 他細胞における改変染色体のPCR解析結果

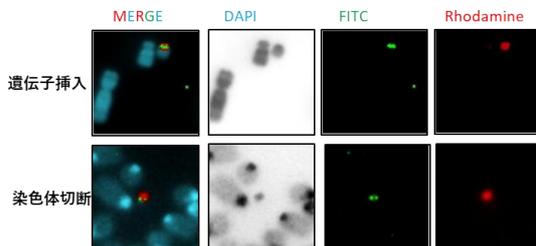


図6 他細胞における改変染色体のFISH解析結果

(2) A9細胞中において、ヒト21番染色体に対して、CRISPR/Cas9を用いて、DNA二重鎖切断を誘導し、EGFP及びG418耐性遺伝子を保持する相同組み換えベクターを導入した。結果として、目的通りの遺伝子挿入が確認された。FISH法により染色体解析を行い、遺伝子挿入位置を検証した結果、目的通りに緑色で示される相同組み換えベクターが赤

色で示されるヒト21番染色体上のセントロメア近傍染色体領域に挿入されていることが示された。(図7)

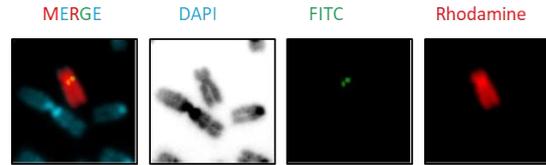


図7 A9細胞における遺伝子挿入についてのFISH解析結果

(3) ヒト細胞に微小核形成を誘導する可能性がある薬剤として、コルセミドとヘスペラジンの濃度検討を行い、微小核形成誘導を試みた。しかしながら、いずれの検討した濃度においても無処理の対照と比較し、有意な微小核形成像を得られなかった。今後さらに別種の化合物をスクリーニングする必要がある。

(4) 先にCHO/A9細胞で確立した手法を基盤として、ヒト細胞株でのCRISPR/Cas9を用いて、不死化間葉系幹細胞株中においてヒト7番染色体を、ヒトiPS細胞株中において、ヒトX染色体の染色体切断を試みた。しかしながら、これらのヒト細胞株内における染色体改変の成功例は得られなかった。今後さらに検討を重ねる必要がある。

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)

1. Uno Narumi、Abe Satoshi、Oshimura Mitsuo、Kazuki Yasuhiro (2018 Feb) Combinations of chromosome transfer and genome editing for the development of cell/animal models of human disease and humanized animal models J Hum Genet. Volume63:145-156. 査読有
2. Uno Narumi、Hiramatsu Kei、Uno Katsuhiro、Komoto Shinya、Kazuki Yasuhiro、Oshimura Mitsuo (2017 Oct) CRISPR/Cas9-induced transgene insertion and telomere-associated truncation of a single human chromosome for chromosome engineering in CHO and A9 cells Scientific Reports volume7:12739. 査読有

[学会発表] (計3件)

1. 宇野 愛海、宇野 勝洋、古本 真也、末松 拓郎、香月 康宏、押村 光雄 CHO細胞中におけるCRISPR/Cas9を用いた染色体改変技術の開発

Development of a novel chromosome engineering technique with CRISPR/Cas9 in CHO cells (2016年9月広島) 日本ゲノム編集学会第一回大会

2. Narumi Uno, Katsuhiko Uno, Shinya Komoto, Yasuhiro Kazuki and Mitsuo Oshimura CHO-intermediated Chromosome Engineering (CHOiCE) technique using CRIPSR/Cas9 (2016 April Kyoto) ICHG2016 [The 13th International Congress of Human Genetics]
3. Shinya Komoto, Narumi Uno, Katsuhiko Uno, Teruhiko Suzuki, Masaharu Hiratsuka, Mitsuhiko Osaki, Yasuhiro Kazuki, and Mitsuo Oshimura Development of a safeguard system for an ideal gene- and cell- therapy vector (2016 April Kyoto) ICHG2016 [The 13th International Congress of Human Genetics]

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇野 愛海 (UNO, Narumi)
鳥取大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：30733357