

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19700370
 研究課題名（和文） 遺伝子改変技術を用いた簡便で安定なマーモセット ES 細胞の開発
 研究課題名（英文） Gene targeting in common marmoset embryonic stem cells

研究代表者
 塩澤 誠司（SHIOZAWA SEIJI）
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号：10447039

研究成果の概要：

コモンマーモセット胚性幹（cjES）細胞において、世界で初めてジーンターゲティングに成功した。この技術を用い、 β -actin 遺伝子の内在性プロモーター支配下で緑色蛍光タンパク（EGFP）を発現する細胞株を樹立した。この細胞から派生する全ての細胞は、恒常的に EGFP を発現するため、細胞移植実験の際にドナー細胞として有用である。

更に、Cre 組み換え酵素によるカセット置換（RMCE）によって、容易に EGFP 遺伝子を任意の外來遺伝子に置換し、発現させることが可能である。この細胞は、霊長類 ES 細胞の幹細胞生物学的解析において、極めて有用性の高いツールになると期待される。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	480,000	3,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：マーモセット、ES 細胞、ジーンターゲティング、RMCE

1. 研究開始当初の背景

再生医療はヒト胚性幹（ES）細胞の樹立を期に、その実現へ向け急速に進展している。最近では、体細胞に由来し、ES 細胞と同等の機能を有する人工多能性幹（iPS）細胞が樹立され、その実現に一層の期待が高まっている。

現在ではこれら多能性幹細胞を用いた移植医療を目指した基礎研究、及びこれに附随

した幹細胞生物学的研究が極めて盛んに行われており、多大な成果をあげている。しかし、これらの成果の殆どはマウスを用いたものであり、直ちにヒトへ外挿可能ではない。実際の臨床応用には、よりヒトに近縁な霊長類において ES 細胞を用いた移植医療の有効性及び安全性を検討する必要がある。しかし、現在実験動物として用いられている霊長類の多くは、げっ歯類実験動物と比較すると飼育に熟練を要し、繁殖効率も極めて低いこ

とから、実験動物としては扱い難い動物であるといえる。また広大な飼育スペースが必要であることが多く、多数の個体を維持、管理可能な実験動物施設も限られる。

コモンマーマセットは小型の実験用霊長類であり、その飼育の容易さや高い繁殖能力、ヒトに近い生理学的特性等から、ヒト疾患モデル動物としての可能性が注目されてきた。2005年にはこのコモンマーマセットからES細胞株が樹立され、再生医療の分野における応用が期待されている。

コモンマーマセットを含むサル ES細胞は、マウス ES細胞と比較して培養が難しく、遺伝子導入も困難であったため、ジーンターゲティングが行われた例は無かった。ジーンターゲティングは、任意の遺伝子座へ任意の変異導入が可能で、極めて応用性の高い技術である。この技術は、*in vitro*における遺伝子機能解析のみならず、ヒト遺伝性疾患モデルの作成には必須の技術であり、その技術開発が望まれてきた。

2. 研究の目的

(1) コモンマーマセット ES細胞株におけるジーンターゲティング技術の確立を目的とした。この目的のため、安定的な培養技術の開発、および遺伝子導入方法の確立を計画した。特に、マーマセット ES細胞はマウス ES細胞と比べ、増殖が遅く、また未分化状態の維持も難しいため、当初、未分化関連遺伝子を誘導的に発現させることで、安定的な培養系の構築を計画した。

(2) 研究開始時にヒト ES細胞において、増幅が容易な培養方法が報告された。この方法がコモンマーマセット ES細胞にも適用できることを見出し、比較的安定な培養が可能になった。このことから、培養系構築を省略し、予定を早めてジーンターゲティングを行った。標的遺伝子として、ハウスキーピング遺伝子である ACTB (actin) 遺伝子を選択し、この遺伝子座に組み換え酵素によって交換可能なトランスジーンを挿入を計画した。

3. 研究の方法

Washington 大学 GSC BLAST server (Callithrix jacchus 2.0.2) から、ヒト ACTB 遺伝子と高い相同性を有するゲノム DNA 配列データを取得した。この配列データを元に、ターゲティングベクターの相同領域を設計し、マーマセットゲノム DNA より

PCR によって相同領域を増幅、クローニングした。この相同領域を、loxP 及び loxPV で挟まれた、EGFP (緑色蛍光蛋白質) 遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子を含むバックボーン (pPV-IRES-EGFP-2A-Neo) へ挿入し、ターゲティングベクターとした。

直鎖化したこのベクターを、マーマセット ES細胞株 (No.40 株) へリポフェクションによって導入し、G418 によるセレクション

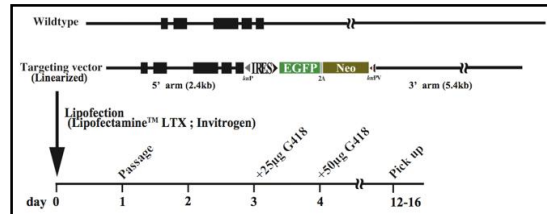


図 1

によって複数の耐性コロニーを得た (図 1)。これらのコロニーをそれぞれ増幅し、サザン解析によって遺伝型の解析を行った。相同組み換え体であると判定されたクローンの一部について、核型の解析及び未分化マーカーの発現を、染色あるいは RT-PCR によって解析した。

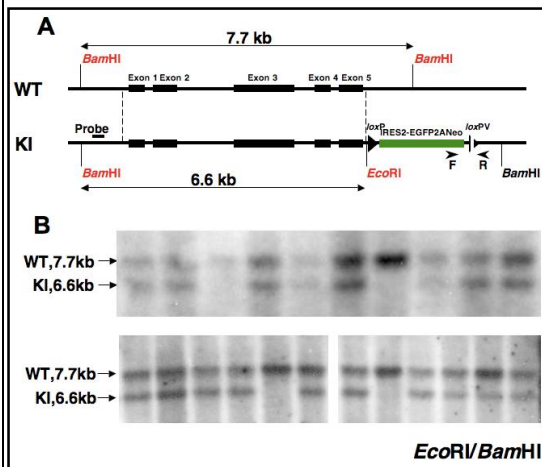


図 2

4. 研究成果

(1) サザン解析の結果から、合計 21 クローンの G418 耐性クローンのうち 17 クローンが相同組み換え体であると判定された (図 2B)。これらの相同組み換え体全てで EGFP の発現が認められた。本研究で使用したリポフェクション法は、特別な技術や機器を使用することなく行うことができる容易な方法で、再現性も高いため、有用である。

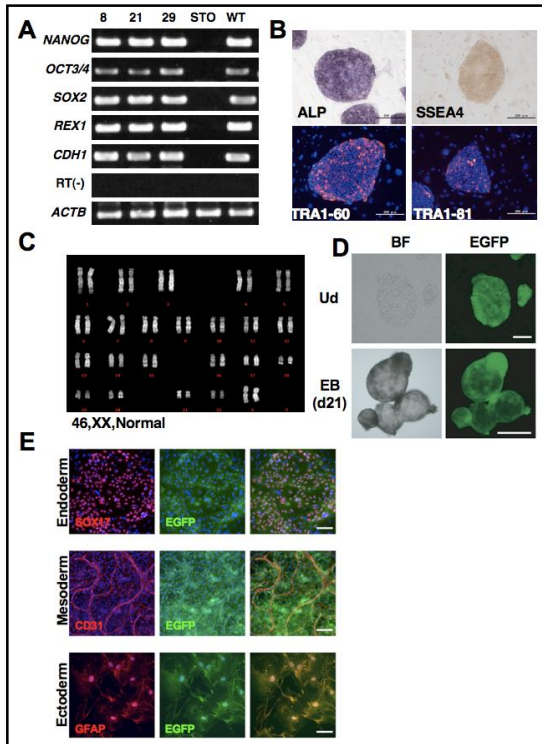


図 3

(2) 得られた ACTB+/EGFP ES 細胞株の解析を行った。一部のクローン (no.8, 21, 29) について未分化マーカーの発現を RT-PCR (図 3 A; *NANOG*, *OCT4*, *SOX2*, *REX1*, *CDH1*) で確認を行った。その結果、調べた全てのクローンにおいて、ES 細胞特異的遺伝子の発現が認められた。更に、クローン no.29 について、ES 細胞特異的な表面抗原に対する免疫染色 (SSEA-4, TRA1-60, TRA1-81) 及びアルカリフォスファターゼ (ALP) 酵素染色でその発現を調べた (図 3 B)。その結果、ACTB+/EGFP ES 細胞株は、今回調べた全ての未分化マーカーを発現していたことから、未分化状態を維持していると考えられる。核型解析により、正常核型を有する細胞株が得られたことが明らかとなった (図 3 C)。

この細胞を浮遊培養したところ、自発的に分化し、胚様体が形成された。この胚様体は、EGFP を安定的に発現しており、分化誘導後も全ての細胞において EGFP を発現することが明らかになった (図 3 D)。更に、分化誘導実験から、この細胞が三胚葉系への分化能を有することが確認された (図 3 E)。EGFP の発現は常に認められた。

この細胞は、移植実験の際に、その移植細胞の挙動を EGFP の蛍光を観察することで、生きたまま追跡可能であるため、有用である。

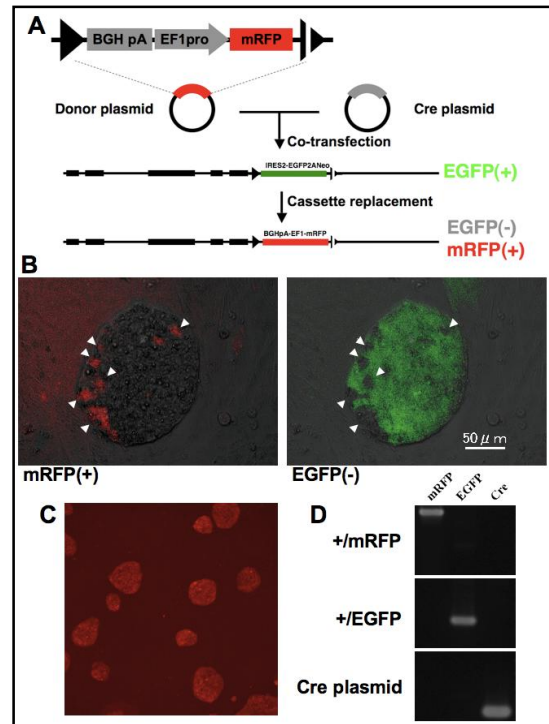


図 4

(3) ACTB+/EGFP ES 細胞株はヘテロな lox 配列を有するため、Cre 組み換え酵素によって、EGFP 遺伝子を任意の遺伝子に交換可能である (RMCE; Recombinase mediated cassette exchange)。これを証明するため、mRFP 遺伝子を発現するドナーベクターを構築し、Cre 発現ベクターと共にリポフェクションによりこの細胞へ導入した (図 4 A)。その結果、mRFP を発現し、代わりに EGFP の発現が失われた細胞を含むコロニーが得られた (図 4 B; 矢印)。このことから、この細胞を用いた RMCE が有効であることが示された。更に、このコロニーをピックアップし、mRFP 陽性細胞を純化することに成功した (図 4 C)。この細胞の遺伝型を確認したところ、mRFP のフラグメントが挿入され、代わりに EGFP のフラグメントが消失していることが示され、DNA レベルでカセットの置換が確認された (図 4 D)。Cre 発現ベクターのインテグレーションは確認されなかった。この方法によって、様々な機能性分子を、ACTB 遺伝子の内在性プロモーターによって安定的且つユビキタスに発現させることが可能であるため、霊長類 ES 細胞における幹細胞生物学的解析において有用なツールとなることが期待される。

(4) まとめ及び今後の展望

cjES 細胞におけるジーンターゲティングに初めて成功した。

この技術を用いれば、ゲノム上の任意の配列に任意の変異を導入することができ、極めて多岐にわたる応用が可能である。

ジーンターゲティングにより、*ACTB* 遺伝子内在性プロモーター支配下で EGFP を恒常的に発現する細胞株の樹立に成功した。

この細胞から分化した細胞は、その全てで EGFP を発現するため、細胞移植実験の際に、その挙動を生きのまま観察可能であるため、再生医療の前臨床試験に広く使用されると期待される。

Cre 組み換え酵素によって、トランスジーンを容易に *ACTB* 遺伝子座へ導入可能な細胞株の樹立に成功した。

この技術を用いれば、様々なトランスジーンを高効率で導入可能であり、その発現も保証されるため、cjES 細胞における遺伝子機能研究に広く使用可能である。

コモンマーモセットは、ヒト疾患モデルとして極めて高い有用性を持つ実験動物であり、本研究において確立された技術、及び細胞は、コモンマーモセットを使用する前臨床研究、特に再生医療の有効性及び安全性の試験において広く使用されることが期待される。

また、この細胞からの個体作製は未だ成功していないが、遺伝子改変コモンマーモセットを作出する上でも重要な技術であり、更なる研究が必要である。

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)

[学会発表](計1件)

塩澤誠司、マーモセット ES 細胞における標的遺伝子組み換え技術の確立、第 31 回日本分子生物学会大会 / 第 81 回日本生化学会大会 合同大会、2008 年 12 月 11 日、神戸ポートアイランド

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

塩澤 誠司 (SHIOZAWA SEIJI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：10447039

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者