

機関番号：32409

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21700492

研究課題名 (和文) 高効率に標的遺伝子組み換え可能なヒト万能細胞の創製

研究課題名 (英文) Development of human pluripotent stem cells with high gene targeting efficiency

研究代表者

鈴木 啓一郎 (SUZUKI KEIICHIRO)

埼玉医科大学・医学部・客員講師

研究者番号：70433654

研究成果の概要 (和文)：遺伝子ターゲティング効率が高いヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞を作製するために、DNA ライゲース遺伝子群 (*LIG1*, *LIG3*) 及び *KU80* 遺伝子をノックアウトしたヒト iPS 細胞ヘテロ変異株を樹立した。*LIG1* と *LIG3* のヘテロ変異では一本鎖 DNA 切断誘導剤に対する感受性の傾向が見られたが、*KU80* ヘテロ変異体には二本鎖 DNA 切断誘導剤感受性は見られなかった。さらに、*HPRT* 遺伝子座における遺伝子ターゲティングの頻度は、正常 iPS 細胞と *KU80* ヘテロ細胞とで差は見られなかった。

研究成果の概要 (英文)：We used helper-dependent adenoviral vectors to knock-out *KU80*, *LIG1* and *LIG3* genes by homologous recombination in human induced pluripotent cells (hPSCs). Unlike heterozygous mutants of *LIG1* and *LIG3*, which showed a tendency for sensitivities to a reagent causing DNA single-strand break, the *KU80* heterozygous hiPSCs did not show any obvious phenotypes. Furthermore, increase in gene targeting efficiency was not observed in these heterozygous mutants.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：(分科) 人間医工学、(細目) 医用生体工学・生体材料学

キーワード：遺伝子ターゲティング、ヒト iPS 細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒト胚性幹 (ES) 細胞やヒト人工多能性幹 (iPS) 細胞は、再生医療や創薬研究への応用が期待されている。

(2) しかしながら、これらの細胞では、相同組換えにより染色体上の特定の標的遺伝子を自由に改変する遺伝子ターゲティング

の効率が非常に低く、このため遺伝子ノックアウト細胞の作製や分化誘導技術の開発が遅れているのが現状である。

(3) 哺乳動物細胞において遺伝子ターゲティング効率の低い原因として、細胞が有する相同組換え活性が低くゲノムサイズが巨大なため、代わりに相同配列に依存しない染色体中へのランダムな組み込み (random integration) 経路がよく働くからであると考えられている。

2. 研究の目的

(1) ヒト大腸がん細胞株の *KU70* ヘテロ変異体では、アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを用いた遺伝子ターゲティング効率が上昇すると、最近報告された。そこで、染色体中へのランダムな組み込み経路で重要な役割を果たす事が予想される DNA ライゲース遺伝子群 (*LIG1*, *LIG3*) 及び *KU80* 遺伝子をノックアウトしたヒト iPS 細胞ヘテロ変異株を樹立することにより、ランダムな組み込み経路におけるこれら遺伝子の役割を明らかにする。

(2) DNA ライゲース遺伝子ノックアウトや *KU* ノックアウトによりランダムな組み込み経路が阻害される事で、相対的に遺伝子ターゲティング効率の高いヒト iPS 細胞の樹立が期待される。

3. 研究の方法

(1) 相同組換え効率の低いヒト iPS 細胞における遺伝子ノックアウトには、申請者らがヒト ES 細胞で確立したヘルパー依存型ウイルスベクター を利用した高効率相同組換え法を用いた。

(2) これら 3 種のヘテロ変異株については、

RNA とタンパクのレベルでの遺伝子発現レベルを調べた。また、これら 3 種のヘテロ変異株の増殖速度や DNA 修復能を解析するために、etoposide (二本鎖 DNA 切断誘導剤) と camptothecin (一本鎖 DNA 切断誘導剤) に対する感受性を測定した。

(3) また、*KU80* と複合体を形成し、同様の機能を持つ *KU70* のヘテロ変異体ヒト大腸がん細胞で、テロメア長が短縮するとの報告があるため、*KU80*ヘテロ変異体 iPS 細胞においてテロメア長を測定した。

(4) エレクトロポレーション、AAV ベクター、ヘルパー依存型ウイルスベクターベクターを用いた *HPRT* 遺伝子座における遺伝子ターゲティングの頻度を測定し、正常 iPS 細胞と *KU80*ヘテロ細胞とで比較した。

4. 研究成果

(1) ヘルパー依存型アデノウイルスベクターを用いることで、薬剤耐性コロニーの 34-81%という高頻度でヘテロ変異細胞株を得た。

(2) *KU80*, *LIG1*, *LIG3* 遺伝子座のヘテロ変異株については、RNA とタンパクのレベルで、発現が約半分に減っていることを確認した。これら 3 種のヘテロ変異株の増殖速度については、野生型 iPS 細胞に比べて違いはなかった。次に、遺伝子機能からの予想通り、*LIG1* と *LIG3* のヘテロ変異では camptothecin に対する感受性が見られたが、*KU80*ヘテロ変異体には etoposide 感受性は見られなかった。また、テロメア長を測定したところ、*KU80*ヘテロヒト iPS 細胞においては、テロメア長の短縮は見られなかった。

(3) エレクトロポレーション、AAV ベクター、ヘルパー依存型ウイルスベクターベクターを用いた *HPRT* 遺伝子座における遺伝子ターゲティングの頻度を、正常 iPS 細胞と *KU80* ヘテロ細胞とで比較したが、その頻度に差は見られなかった。

(4) 以上の結果により、*KU80* の hiPS 細胞における機能は体細胞とは異なることが示唆された。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

① 三谷幸之介、Establishment Of Human iPS Cell Lines Heterozygous For Genes In The Non-Homologous End-Joining Pathway By Using Helper-Dependent Adenoviral Vectors、American Society for Gene and Cell Therapy、2011年 5月 19日、米国 シアトル

② 鈴木啓一郎、Highly efficient transient gene expression and gene targeting in human embryonic and induced pluripotent stem cells with helper-dependent adenoviral vectors、International Society for Stem Cell Research、2009年 7月 10日、スペイン バルセロナ

③ 鈴木啓一郎、Highly efficient transient gene expression and gene targeting in human pluripotent stem cells

with helper-dependent adenoviral vectors、第7回幹細胞シンポジウム、2009年 5月 16日、東京

[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

鈴木 啓一郎 (SUZUKI KEIICHIRO)

埼玉医科大学・医学部・客員講師

研究者番号：21700492

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：