

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790696

研究課題名(和文) ヒト人工染色体を利用したダイレクトリプログラミングによる高機能肝細胞誘導法の開発

研究課題名(英文) Induction of high quality induced hepatocytes utilizing the human artificial chromosome

研究代表者

鈴木 輝彦 (SUZUKI, Teruhiko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・生体分子先端研究分野・主席研究員

研究者番号：70621027

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、複数の遺伝子導入用ベクターを同一の遺伝子受容部位へ同時に導入する手法 Simultaneous/sequential Integration of Multivector system (SIM system)を開発した。本手法により、最大3つのプラスミドベクターを同時にヒト人工染色体(HAC)の遺伝子受容部位へ導入することが可能となった。この方法を用いることにより細胞のリプログラミングや分化段階の解析などに必要な複数の遺伝子を効率的に HACに導入し利用することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：To enable highly efficient loading of multiple gene expression units to the human artificial chromosome (HAC), I developed Simultaneous/sequential Integration of Multivector system (SIM system). This system allows for simultaneous integration of maximum three gene-loading vectors carrying genes of interest by co-transfecting recombinase/integrase expression vectors. This system is useful to construct the HACs for cell reprogramming and monitoring of cell differentiation.

研究分野：染色体工学

キーワード：染色体 ヒト人工染色体 リプログラミング

1. 研究開始当初の背景

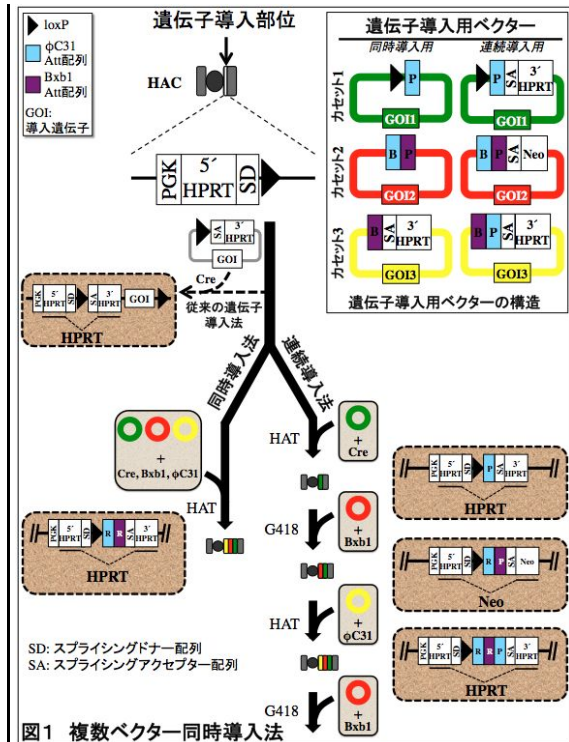
ダイレクトリプログラミング法は体細胞に様々な組み合わせの遺伝子を過剰発現させることで様々な細胞種に直接分化転換させる手法であり、再生医療などへの応用が期待されている。しかし、ダイレクトリプログラミングを最適化するシステムの開発は遅れており、均質/高機能な分化転換細胞を再現性よく誘導する手法は確立されていない。

2. 研究の目的

ヒト人工染色体 (HAC) は搭載する遺伝子サイズに制限がなく、再現性良く安定に導入遺伝子を発現させることが可能であり、また任意に除去することも可能であることから、細胞のリプログラミングのように多数の遺伝子の導入や導入遺伝子群の除去が必要な研究で非常に有効である。しかし、汎用される HAC には遺伝子導入部位が一カ所しかないため、多数の遺伝子を HAC に搭載するには導入遺伝子全てを組み込んだ巨大な遺伝子導入用ベクターを構築する必要があった。このため HAC に多数の遺伝子を搭載することは技術的な難易度が高く、多くの時間と労力が必要であった。そこで本研究では均質で高機能なダイレクトリプログラミング細胞を誘導する方法を確立するため、HAC に多数の遺伝子を迅速に搭載するシステムの開発を行った。

3. 研究の方法

複数ベクター同時導入法を開発するため、Cre リコンビナーゼ及び C31, Bxb1 インテグラーゼの認識配列を組み合わせた遺伝子導入用ベクター群の構築を行った。(図1参照) また、複数ベクター同時導入が実際に可能であるか検証するため、蛍光タンパク質である EGFP, Venus, TdTomato の発現ユニットを遺伝子導入用ベクターに挿入したベクターを作製した。HAC を保持する HPRT 欠損 CHO 細胞への遺伝子導入には Lipofectamine LTX (Life Technologies) を利用した。



4. 研究成果

多数の遺伝子を効率的に HAC に導入するため、複数の遺伝子導入用ベクターを同一の遺伝子受容部位へ同時に導入する手法 Simultaneous/sequential Integration of Multivector system (SIM system) を開発した。(図1参照) 本手法では、Cre リコンビナーゼや C31, Bxb1 インテグラーゼなどの組換え酵素を発現するベクターと、これらリコンビナーゼ/インテグラーゼの認識配列などから成る遺伝子導入カセットを持つ遺伝子導入用ベクターを HAC 保持細胞に共導入することで、最大3つのベクターを同時に HAC の遺伝子受容部位へ導入することが可能である。

本法の有効性を確認するため EGFP, Venus, TdTomato の3色の蛍光タンパク質発現ユニットを遺伝子導入用ベクターに各々組み込み、リコンビナーゼ/インテグラーゼ発現ベクターと共に HAC を保持する CHO 細胞に導入した。その結果、3色の蛍光を発する細胞クローンが得られ、PCR 法および FISH 法によって3種類の蛍光タンパク質発現ベクターが

HAC 上に組換え導入されていることが確認された。またこの HAC を NIH3T3 細胞に導入することで 3 色の蛍光を発するクローンが得られたことから、本手法を用いて構築した HAC は他の細胞へ移入させることが可能で様々な解析に利用できることが証明された。また遺伝子導入カセットを変更することで、遺伝子導入用ベクターを 1 つずつ連続に HAC へ搭載することも可能であった。さらに FLP リコンビナーゼの認識配列である FRT を loxP 配列の後ろに配置することで、同時導入法により 3 つの遺伝子導入用ベクターの搭載を行った後、FLP リコンビナーゼを用いてさらに遺伝子導入を続けることが可能であり、4 つ以上の遺伝子導入用ベクターを迅速に HAC へ搭載することができることを示した。(Suzuki, T. et al., *PLoS One* (2014))

次に実際に本手法を用いて、線維芽細胞から iHep を誘導するのに必要な Foxa3, Hnf4 と、肝細胞への分化を可視化するために必要なアルブミンプロモーターによって発現制御される EGFP 発現ユニットを搭載した HAC を作製した。構築した HAC は CHO 細胞において iHep 誘導遺伝子の発現を示すことがウェスタンブロット法により確認された。現在までに最大 3 コピーの iHep 誘導遺伝子群を搭載した HAC を構築することに成功したが、これまでのところこれらの HAC では iHep の誘導は確認されなかった。このことから iHep 誘導遺伝子群の発現量は 3 コピーでは十分でない可能性が考えられる。しかし iHep 誘導遺伝子群を高いレベルで恒常的に発現する HAC をクローニングすることは細胞毒性などの問題により困難である可能性も考えられる。そこで今後は iHep 誘導因子をドキシサイクリン依存的に発現させるシステムに変更して iHep 誘導因子のコピー数の検討を行うと共に、その他の肝発生関連遺伝子群の追加導入についても検討を行い、iHep 誘導可能

な HAC を完成させたい。また、HAC の利用における大きな課題の一つである標的細胞への人工染色体導入効率についても改良法の開発を進めており、これらの技術を組み合わせて均質で高機能な iHep を高効率に誘導できる方法を確立させる予定である。

最近の研究では 8 種類のリプログラミング遺伝子を薬剤誘導性に発現させることで造血幹細胞を誘導することも可能であることが報告されており、肝細胞様細胞以外にも様々な細胞が複数の誘導遺伝子を組み合わせることで作製できることが示されている。しかしウイルスベクターなど一般的なベクター系では、多数の導入遺伝子を適切なレベルで発現させ、再現性良く均質なリプログラミング細胞を調製することは困難であると考えられる。一方で複数ベクター同時導入法を用いれば多くの誘導遺伝子群全てを搭載した HAC を容易に構築することが可能であり、これを用いれば全ての導入遺伝子を再現性良く一定のレベルで発現させて均質で高機能なリプログラミング細胞を誘導することができるようになると考えられる。また細胞をリプログラミングした後、HAC を除去すれば外来性遺伝子を全て排除することも出来ることから、本手法は再生医療用リプログラミング細胞の誘導など様々な研究に利用されると期待される。

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 1 件)

Teruhiko Suzuki, Yasuhiro Kazuki, Mitsuo Oshimura, and Takahiko Hara: A novel system for simultaneous or sequential integration of multiple gene-loading vectors into a defined site of a human artificial chromosome. *PLoS One*. 9(10): e110404, 2014 (査読有)

〔学会発表〕(計 4 件)

Development of a new method for the simultaneous integration of multiple vectors into human/mouse artificial chromosome. Teruhiko Suzuki, Manami Kawaguchi, Mitsuo Oshimura, Takahiko Hara. 第 12 回 幹細胞シンポジウム, 2014.5.30-2014.5.31, 九州大学・百年講堂 (福岡県・福岡市)

リコンビナーゼ/インテグラーゼを利用してヒト人工染色体に複数ベクターを同時導入する方法の開発. 鈴木輝彦, 押村光雄, 原孝彦. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013.12.3-5, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

ダイレクトリプログラミングにより作出した iHep クローンの遺伝子発現解析. 高橋彩実, 鈴木輝彦, 原孝彦. 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013.12.3-5, 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸市)

iPS 細胞とヒト/マウス人工染色体を用いた成人発症 II 型シトルリン血症遺伝子治療モデルの開発. 鈴木輝彦, 宇野愛海, 香月康宏, 黒田英志, 牛飼美晴, 平塚正治, 佐伯武頼, 押村光雄. 第 11 回日本再生医療学会総会, 2012.6.12-14, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木輝彦 (SUZUKI, Teruhiko)
公益財団法人東京都医学総合研究所
生体分子先端研究分野・主席研究員
研究者番号: 70621027

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者