

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25640049

研究課題名(和文) マウス人工染色体を用いた新規モデル動物作製システムの開発

研究課題名(英文) Development of a novel model animal generation system using a mouse artificial chromosome

研究代表者

押村 光雄(Mitsuo, Oshimura)

鳥取大学・染色体工学研究センター・特任教授

研究者番号：20111619

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：従来のトランスジェニック技術によるヒト化モデル動物作製は予期しない遺伝子発現、系統維持の問題から多大な労力が費やされてきた。これらの課題を解決するために、本研究ではマウス個体において安定なマウス人工染色体(MAC)ベクターを用い、簡便なヒト化モデル動物作製を目指した。ヒト化マウス作製例として、MAC上にヒトPXR遺伝子およびマウスとラット両方の内在Pxr遺伝子に対応するshRNAの導入を行い、ヒト化モデル作製のためのノックイン・ノックダウン用MAC(KID-MAC)ベクターの構築に成功した。KID-MACベクターシステムはヒト化モデル動物作製のための有用なツールとなることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To generate humanized animal models using the conventional transgenic techniques, a great effort has been expended due to the unexpected gene expression and the maintenance of animals. To overcome these problems, in this study, we aimed to generate humanized animal models easily, using a mouse artificial chromosome (MAC) which is stably maintained in mice. As an example of the generation of humanized animal models, the human PXR gene and shRNA to endogenous Pxr gene of mouse and rat, were introduced into a single MAC vector. As a result, we succeeded the construction of KID-MAC vector for knock-in and knock-down to generate a humanized animal model. KID-MAC vector system will be expected to be a useful tool for the generation of humanized animal models.

研究分野：染色体工学

キーワード：染色体工学 人工染色体 モデル動物

1. 研究開始当初の背景

ヒト化モデル動物はヒトの遺伝子機能を知る上で重要なツールである。これまでヒト化モデル動物作製には宿主染色体のゲノムに目的遺伝子がランダムに挿入されるトランスジェニック技術が用いられてきた。技術革新によりジーンターゲットングの効率向上が目覚ましい現在においても、改変細胞樹立および動物系統維持の困難性、遺伝子導入サイズ、宿主染色体侵襲に起因する予測不能な遺伝子発現制御といった問題は有用なモデル動物作出の障壁となっている。

天然染色体由来ヒト人工染色体(HAC)ベクターは、宿主染色体とは独立に維持され、導入サイズに制限がないことで、上記の課題を解決するモデル動物作出のツールとして利用されてきた。しかしながら、HACベクターはマウス個体で組織間に保持率のばらつきがあることが課題であった。我々は、上記課題を克服するためにマウス天然染色体からマウス人工染色体(MAC)ベクターを構築することに成功し、マウスでの安定性を検証した結果、各組織でMACベクターが均一かつ高い保持率で維持されていることを確認した(Takiguchi et al, *ACS Synthetic Biology* 2012)。このMACベクターとノックダウン技術を併用することにより、これまでにない簡便なモデル動物作製システム開発が期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は生理的発現制御領域を含むヒト遺伝子ゲノム(ノックイン)、対応遺伝子の翻訳を阻害するshRNA(ノックダウン)を搭載したMACベクター(Knock-in & Knock-down; KID-MACベクター)を構築し、ES細胞に一本のKID-MACベクターを導入することでヒト型化モデル動物作製を実例として、簡便なモデル動物作製システム開発を行うことである。

3. 研究の方法

以下の3つのステップで研究を実施した。

(1) 複数遺伝子搭載可能MACベクターの構築
複数遺伝子を搭載するための組換えサイトが配備されたプラットフォーム(Yamaguchi et al, *Plos one* 2011)をマウス人工染色体(MAC)ベクターに搭載した(MI-MACベクターと呼ぶ)。

(2) MI-PXR-MACベクターの構築

MI-MACベクターに搭載するために発現制御領域を含むヒトPXR遺伝子をカバーするbacterial artificial chromosome(BAC)を大腸菌内で組換えシステムを用いて改変した。改変したBACを組換え酵素発現ベクターとリポフェクション法にてCHO(MI-MAC)細胞に共導入し、MI-MACベクター上に搭載した(MI-PXR-MACと呼ぶ)。

(3) KID-MACベクターの構築

培養細胞を用いた遺伝子導入実験により、マウスおよびラットPxrを共通にノックダウンするshRNAを選別し、MI-MACベクター上に搭載できるようにベクターを改変した。次にCHO(MI-PXR-MAC)細胞に上記shRNAベクターを組換え酵素発現ベクターとリポフェクション法にて共導入し、MI-PXR-MACベクターに搭載した(KID-MACと呼ぶ)。

4. 研究成果

(1) MI-MACベクターの構築

MI-MACベクター上のloxPサイトに複数遺伝子搭載用プラットフォームを導入した。次にMI-MAC上の複数遺伝子搭載部位が正確に機能するかを確認するために、遺伝子の搭載されていない空ベクターを各種サイトに導入することで各サイトが機能することをPCR法にて確認した。

(2) MI-PXR-MACベクターの構築

MI-MAC上のMIサイトにヒトPXR遺伝子を導入するためにヒトPXRを含むBACの改変を行い、目的の改変BACを獲得した。次に改変

BAC を CHO (MI-MAC) 細胞に導入し、薬剤耐性クローンを PCR 解析および FISH 解析した結果、ヒト PXR 遺伝子が MI-MAC 上に搭載できていることを確認した。

(3) KID-MAC ベクターの構築

遺伝子配列データベースからマウスおよびラット Pxr を共通にノックダウンする shRNA を 5 つ選別した。ヒト繊維肉腫 (HT1080) 細胞株に shRNA の標的であるマウスおよびラット Pxr 遺伝子発現ベクターを候補の shRNA 発現ベクターとリポフェクションにより共導入し、ノックダウンの効率をリアルタイム PCR で検証した結果、2 つの候補 shRNA を選別した。一方、ヒト PXR 発現ベクターと候補 shRNA 発現ベクターの共導入も実施し、ヒト PXR 遺伝子発現に影響がないことも確認した。これらの shRNA 候補を MI-MAC 上に搭載できるようにベクターを構築した (shRNA 候補ベクターと呼ぶ)。

次に構築した MI-PXR-MAC (ヒト PXR 遺伝子が搭載された MI-MAC ベクター) を保持する CHO 細胞に、上記で構築した shRNA 候補ベクター (マウスおよびラットの Pxr の発現を抑制し、ヒト PXR の発現に影響を及ぼさない shRNA) をリポフェクション法にて導入した。薬剤耐性コロニー 100 クローン程度をピックアップし、PCR 法にて組換えサイトの両端の配列を増幅することにより、目的プラスミドベクターの挿入を確認した。その結果、候補クローンを 2 クローン獲得された。今後はマウス ES 細胞、ラット ES 細胞に導入することで、個体を作製し、機能解析を行う予定である。

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Yoshimura Y, Nakamura K, Endo T,

Kajitani N, Kazuki K, Kazuki Y, Kugoh H, Oshimura M, Ohbayashi T. Mouse embryonic stem cells with a multi-integrase mouse artificial chromosome for transchromosomal mouse generation. *Transgenic Res.* 2015 Aug;24(4):717-27. doi: 10.1007/s11248-015-9884-6. Epub 2015 Jun 9. 査読有

(2) Oshimura M, Uno N, Kazuki Y, Katoh M, Inoue T. A pathway from chromosome transfer to engineering resulting in human and mouse artificial chromosomes for a variety of applications to bio-medical challenges. *Chromosome Res.* 2015 Feb;23(1):111-33. doi: 10.1007/s10577-014-9459-z. 査読有

(3) Kazuki K, Takehara S, Uno N, Imaoka N, Abe S, Takiguchi M, Hiramatsu K, Oshimura M, Kazuki Y. () Highly stable maintenance of a mouse artificial chromosome in human cells and mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Dec;442(1-2):44-50. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.10.171. Epub 2013 Nov 9. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

(1) 押村光雄 (2016 年 3 月 26 日) 人工染色体技術による創薬研究への応用、日本薬学会第 136 年会、パシフィコ横浜 (横浜市)

(2) Oshimura M. (2015 年 9 月 3 日) Human and mouse artificial chromosomes for bio-medical changes. (招待講演) Future of Biomedicine 2015, Vladivostock (Russia)

(3) 宇野愛海、香月加奈子、高原昇子、今岡奈津子、阿部智志、滝口正人、平松敬、香月康宏、押村光雄 (2014 年 5 月 16 日)

ヒト細胞とマウス個体において極めて安定に維持されるマウス人工染色体、第 61 回日本実験動物学会総会、札幌コンベンションセンター（札幌市）

- (4) Oshimura M. New vectors for gene delivery: Human and Mouse Artificial Chromosomes (2013 年 8 月 12 日) 117th OMICS Group conference Genetic Engineering & Genomically modified organisms, Raleigh-North Carolina (USA)

〔図書〕(計 3 件)

- (1) 香月康宏、押村光雄：「進化するゲノム編集技術」(株)NTS 第 1 編-第 1 章「第 5 節 人工染色体技術とゲノム編集技術の融合による遺伝子改変技術」p.49-58 (2015)
- (2) 香月康宏、押村光雄：遺伝子改変法 HAC/MAC---ES・iPS 細胞実験スタンダード、中辻憲夫 監修・末盛博文 編集、実験医学別冊（羊土社） p300-315 (2014)
- (3) 香月康宏、押村光雄：安全遺伝子導入のためのヒトおよびマウス人工染色体ベクター---In vitro 毒性・動態評価の最前線、小島肇夫 監修、シーエムシー出版、p174-182 (2013)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

押村 光雄 (OSHIMURA Mitsuo)
鳥取大学・染色体工学研究センター・特任教授
研究者番号：2011619