

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：25830137

研究課題名(和文)人工染色体ベクターを用いた巨大遺伝子のin vivo導入法の開発

研究課題名(英文) Development of a in vivo introduction method of large genes using the artificial chromosome vector

研究代表者

柏木 明子 (Kashiwagi, Akiko)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：90335521

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト人工染色体ベクター(HAC)は導入遺伝子サイズに制限がなく、巨大遺伝子デリバリーが可能である。しかし目的細胞へのHACの移入効率の低さが大きな課題である。HACの移入は微小核細胞融合法を基盤としているため、HACの目的細胞への移入効率の改善にはHACのみを含む微小核細胞(HAC-MC)の濃縮が有効と考えられる。本研究ではHAC-MCを濃縮する新規方法の確立に成功した。この濃縮方法はHACの目的細胞への移入効率の改善のみならず、HACの胚や個体へのin vivo導入法開発にも有用と思われる。

研究成果の概要(英文)：Human artificial chromosome (HAC) vectors have the ability to delivery a huge gene since there is no size limitation for the DNA to be introduced into them. However, the transfer efficiency of HAC to the target cells is low. The transfer method is based on the microcell-mediated chromosome transfer. Therefore, the concentration of the microcells containing only HAC (HAC-MC) is effective to improve the transfer efficiency. In this study, we successfully established a novel method to concentrate HAC-MC. This method might be also useful for the development of a novel in vivo introduction method of HAC to embryos and individuals.

研究分野：細胞工学

キーワード：人工染色体ベクター 濃縮

1. 研究開始当初の背景

ヒト人工染色体ベクター (HAC) とは、鳥取大学でヒト 21 番染色体を改変し開発された、内在遺伝子をもたず独立した染色体として細胞中に保持されるミニ染色体である。線状染色体であるため導入遺伝子サイズに制限がなく、メガベース単位の巨大遺伝子デリバリーが可能であるという他のベクターにはない優位性をもつため、現在までに再生医療研究、抗体医薬開発など多くの分野で利用されている。

しかしながら、HAC 研究全体に共通する課題は HAC の目的細胞への移入効率の低さである。HAC の目的細胞への移入は微小核細胞融合法を基盤にしている。したがって、HAC 移入効率を改善するためには、HAC のみを保持する微小核細胞 (HAC-MC) を濃縮することが有効な方法と考えられた。

これまでの申請者の実験より、HAC の保持するドナー A9 細胞 (マウス繊維芽細胞) から形成された微小核集団の形態解析 (FISH) を行なった結果、HAC は不要なドナー A9 細胞由来の染色体と同一微小核に共存しているものが多数みられた。現状のドナー A9 細胞は染色体サイズが HAC に近い上、染色体本数も 40 本と多いため HAC の濃縮は困難と思われた。

そこで新たなドナー細胞として全ての染色体が巨大であり、染色体数が 6 本のみと全哺乳類中最も染色体数が少ないことで知られるインドホエジカ繊維芽細胞 FM7 細胞に着目した。巨大な FM7 染色体と HAC はサイズ差を最大にできるため、不要な FM7 細胞由来染色体と HAC は同一の微小核細胞に含まれにくく、HAC のみを含む微小核細胞の効率的な分離に有効と思われた。申請者は微小核融合法を用いて FM7 細胞に HAC の移入を試みたところ、HAC が独立に 1 本移入した FM7 細胞 (FM7-HAC 細胞) の樹立に成功した。

また一般的にベクターの生体への導入方法とは *ex vivo* 法と *in vivo* 法に大別されるが、現在 HAC については *ex vivo* 導入法までしか確立していなかった。ES 細胞や一度体外に取り出した細胞に対して *in vitro* にて遺伝子導入したのち再び体内へ戻す *ex vivo* 導入法ではコストと時間がかかる上、操作も煩雑であるため将来的な HAC の普及に難点がある。今後はより簡便な直接体内に注入する *in vivo* 導入法の確立が望まれていた。

もし HAC-MC の濃縮方法が確立できれば、HAC の目的細胞への移入効率の改善のみならず、HAC の生体への新規 *in vivo* 導入法の開発にもつながることが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、染色体数が哺乳類中最少であ

る FM7 細胞をドナー細胞として活用することにより、HAC-MC を濃縮するための新規方法の開発を目標とした。

3. 研究の方法

以下のステップで、本研究を実施した。

(1) FM7-HAC 細胞における微小核形成の至適条件検討

FM7-HAC 細胞に微小核形成阻害剤であるコルセミド、パクリタキセル、ノコダゾールをそれぞれ濃度、時間を振って培地に処理し、微小核形成率の最も高い条件を検討した。

(2) HAC-MC の新規純化法の開発

(1) で決定した条件で FM7-HAC 細胞より効率的に微小核形成させ、サイトカラシン処理および遠心分離により全微小核細胞を回収した。この全微小核細胞を無血清 DMEM 培地に懸濁し、全微小核細胞液とした。全微小核細胞液は、ろ過法、FACS 法、パーコール密度勾配遠心法、ろ過および FACS 法によって分画した。各分画は以下の通り作製した。

ろ過法

HAC は FM7 細胞染色体に比較しサイズが極小のため、HAC-MC も FM7 染色体を含む微小核細胞より著しく小さい可能性が考えられる。微小核細胞の直径サイズ差を利用して HAC-MC のみを分離するためにはろ過法が有効と考えられた。

全 FM7-HAC 細胞由来の全微小核細胞液を、フィルターポアサイズ 8, 5, 3, 2, 1, 0.6 μm のろ紙でろ過した。各ろ液を回収して分画とした。

FACS 法

HAC は FM7 細胞染色体に比較して染色体サイズが極小のため、その核酸量差を利用し、ヘキスト染色強度により FACS で全微小核から HAC-MC が分離されることが考えられた。

全 FM7-HAC 細胞由来の全微小核細胞液を 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のヘキスト染色液にて染色した後、FACS により、ヘキスト弱陽性分画とヘキスト強陽性分画とに分け、微小核細胞を分取した。

パーコール密度勾配遠心法

HAC は FM7 細胞染色体に比較しサイズが極小のため、HAC-MC と FM7 染色体を含む微小核細胞では密度に差が生じる可能性がある。密度の差を利用して HAC-MC のみを分離するためにはパーコール密度勾配遠心法が有効と考えられた。

パーコール液と FM7-HAC 細胞由来の全微小核細胞液の混合液について、パーコール液の割合、NaCl 濃度、遠心条件 (時間、速度) を振って、形成されるバンド本の多い条件を検討した。形成された各バンドを分画した。

ろ過および FACS 法

ろ過法と FACS 法を組み合わせると、FM7-HAC 細胞由来の全微小核細胞がより細かく分画されることが考えられた。

FM7-HAC 細胞由来の全微小核細胞液からまずフィルターポアサイズ 8,5,3 μm のろ紙によりろ過して HAC と FM7 細胞染色体が混在する微小核を除去した。続いてフィルターポアサイズ 1 μm のろ液をネガティブコントロールとして置き、デブリスの混入を除去した。2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ヘキスト染色液にて染色した後、FACS によりヘキスト染色強度により分画し微小核を分取した。

以上の方法で得られた各分画について標本を作製し、human COT1 プロブを用いた FISH 法にて HAC-MC の検出を行い、HAC-MC の濃縮について評価した。

(3) HAC-MC の濃縮による HAC 移入効率化可否の検討

(2) で確立した HAC-MC の新規濃縮方法によってフラスコ 30 枚分の FM7-HAC 微小核細胞から HAC-MC を濃縮した微小核群と、フラスコ 3 枚より得られた同数の非濃縮 FM7-HAC 由来の全微小核とを、それぞれ目的細胞である 1×10^7 個の HT1080 細胞へ微小核細胞融合法にて移入し、14 日間プラストサイジン S により選択培養を行なった後、形成コロニー数を算出した。目的細胞数に対する形成コロニー数の割合を HAC の目的細胞への移入効率として算出し、HAC-MC の濃縮による目的細胞への HAC 移入効率の改善の可否を検討した。

4. 研究成果

(1) FM7-HAC 細胞における微小核形成の至適条件検討

すでに樹立済みであった人工染色体ベクターを保持する FM7 細胞 (FM7-HAC) を用いて、効率的に微小核形成できる条件を検討した結果、細胞培地に微小管脱重合阻害薬パクリタキセルを 0.03 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で 48 時間処理すると、約半数の FM7-HAC 細胞において微小核が効率的に形成されることを確認した。この条件を FM7-HAC 細胞における微小核形成の至適条件として決定した。

(2) HAC-MC の新規純化法の開発

ろ過法

回収した各ろ液について、human COT1 プロブを用いた FISH を行なった結果、全てのろ液について HAC-MC の濃縮は確認されなかった。またポアサイズ 3 μm 以下のろ液では同一微小核内に HAC と不要な FM7 細胞染色体が混在する微小核がほとんどなくなり、HAC-MC か FM7 細胞染色体のみを含む微小核だけが分離されることが明らかとなった。また、ポア

サイズ 1 μm 以下のろ液では微小核細胞自体がほとんど検出されず、デブリスを多く含むことが明らかとなった。

FACS 法

ヘキスト染色強度により分画し、微小核の分取を試みた結果、デブリスの混入のため分取効率が非常に悪く、全ての分画について微小核がほとんど分取されなかったため検討を中止した。

パーコール密度勾配遠心法

検討したすべての条件で、形成されたバンド数は 2 本以下であった。パーコール液と微小核細胞液 1 : 1 の混合液を用いて 25,000 rpm, 20, 60 min の超遠心分離を行なうと、密度 1.02 g/ml および 1.04 g/ml 付近にバンドが検出された。この 2 本のバンドについて FISH 解析を行なった結果、いずれのバンドについても FM7 細胞染色体と HAC が混在する複数の染色体を保持する微小核を多く含み、HAC-MC はほとんど検出されなかった。

ろ過および FACS 法

行なった全ての分画について FACS による微小核細胞が分取された。それらを用いて FISH 解析を行なった結果、ヘキスト弱陽性分画から分取された微小核細胞群では約 65% まで HAC-MC が濃縮されたことが明らかとなった。

以上の検討結果より、ろ過および FACS 法によりヘキスト弱陽性の微小核群を分取することで最も HAC-MC が濃縮された。この方法を HAC-MC の新規濃縮方法として決定した。

(3) HAC-MC の濃縮による HAC 移入効率化可否の検討

ろ過および FACS 法にて HAC-MC を濃縮した微小核群では、対照の非濃縮の全微小核と比較して数倍、目的細胞への移入効率が高いことが認められた。以上より、HAC-MC を濃縮することにより目的細胞への HAC 移入効率は改善されることが明らかとなった。

本研究により、ろ過法および FACS 法を用いて効率的に HAC-MC を濃縮する新規方法の開発に成功した。さらに、この濃縮方法によって HAC-MC を濃縮することにより、HAC の目的細胞への移入効率が改善されることも明らかとなった。目的細胞への HAC の移入効率が数倍程度の改善に留まった理由としては、濃縮過程で HAC-MC を損傷させている可能性が考えられた。今後はより損傷の少ない HAC-MC の濃縮条件の検討が必要であると思われる。

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 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

柏木明子、黒崎創、駱鴻、柴原壽行 トリ
トリコモナスの宿主マウス腸管プロテオーム
に及ぼす影響 第85回日本寄生虫学会
宮崎市民プラザ(宮崎県宮崎市)2016年3月
20日

Nakayama Y, Sunamura N, Adachi K,
Kashiwagi A, Inaoka D, Oshimura M, Kugoh
H, Nanba E. An integrated chromosomal
omics approach to decipher molecular
mechanism of CGG repeat expansion in
Fragile X syndrome. The 13th international
congress of human genetics. Kyoto, Japan.
2016年4月3日

〔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〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

柏木 明子 (KASHIWAGI AKIKO)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：90335521

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし