

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670088

研究課題名(和文)次世代リプログラミング法への挑戦～RNAiのみによって細胞を作る～

研究課題名(英文)A novel screening method to identify any defined RNAi combinations to induce cell reprogramming.

研究代表者

加藤 洋人(Kato, Hiroto)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教

研究者番号：60446549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、「RNAi導入のみによる細胞リプログラミング法を開発するための基盤整備」を進めることであった。具体的には、ヒト遺伝子を網羅的に標的としたshRNAレンチウイルス・ライブラリと並列型次世代シーケンス技術を融合させることによって、細胞リプログラミングに直結するshRNAの組合せを網羅的に探索することが出来るようなハイスループット・スクリーニング・プロトコルの基盤開発を目的とした。この挑戦的萌芽研究によって基盤の実験プロトコルが整備され、今後の研究開発に繋がる基礎的成果が得られたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to develop fundamental research protocols for a novel high-throughput screening method in order to identify any defined RNAi combinations to control cell lineages via novel RNAi-based reprogramming strategies. Particularly, to develop such a screening method, I combined whole-genomic shRNA lentivirus library and next-generation sequence technique. I developed and fine-tuned several complexed experimental protocols related to Lentivirus production, Lentivirus infection, cell culture, cell-sorting or cell-picking, and next-generation sequencing. I could establish some of the fundamental research protocols to be utilized in the high-throughput screening to search for defined RNAi combinations to induce lineage reprogramming.

研究分野：ゲノム病理学

キーワード：細胞分化 次世代シーケンス shRNAライブラリ

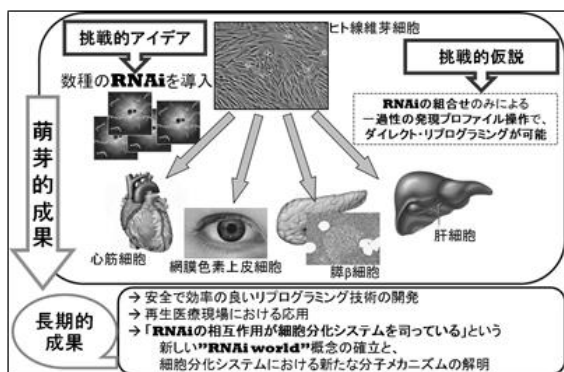
1. 研究開始当初の背景

iPS細胞などを基盤とした再生医療が開花しようとしているなかで、「より安全で高い効率のリプログラミング法」の開発が臨床的に強く必要とされており、研究者への期待も大きい。本研究の構想段階においては、RNAiという低分子かつ一過性の遺伝子制御システムのみを用いた細胞リプログラミング法の樹立に挑戦することで、染色体を壊さず内因遺伝子の発現コントロールのみによる細胞リネージ制御法を樹立したいと考えた。本研究によって基盤技術の整備が進められれば、その成果は、将来的に細胞癌化などの弊害が少ないより安全な細胞コントロール技術の確立に繋がる萌芽的基盤を基礎付けるものになることが期待された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「RNAi導入のみによる細胞リプログラミング法を開発するための基盤整備」を進めることであった。

数個の遺伝子を強制発現させることで、体細胞をiPS細胞やiHep細胞など別リネージの細胞へとリプログラミングすることが可能だということは、有名な事実である。しかし同時に、遺伝子導入による染色体の破壊あるいは持続する遺伝子発現の作用によって、細胞癌化などの弊害がありうるという点が問題となっている。本研究計画を着想した動機は、「より安全で導入効率の良いリプログラミング法を開発に挑戦したい」という思いであった。cDNA導入による遺伝子強制発現とは違い、RNAiによる遺伝子発現操作は一過性の作用に過ぎず、また導入された核酸が染色体に取り込まれることもない。したがって、RNAiのみによるリプログラミング法によって、細胞癌化などの問題点が緩和されることが期待される。遺伝子強制発現によるリプログラミング研究が主流ななかで、「RNAiの組合せのみによるリプログラミング法の基盤開発」という萌芽的研究テーマを進めることを目的とした。具体的には、ヒト遺伝子を網羅的に標的としたshRNAレンチウイルス・ライブラリと並列型次世代シーケンス技術を融合させることによって、細胞リプログラミングに直結するshRNAの組合せを網羅的に探索することが出来るようなプロトコルの開発を目的とした。



本研究計画の将来的な目標は、ヒト線維芽細胞などを心筋細胞、肝細胞、膵β細胞あるいは網膜色素上皮細胞などへダイレクト・リプログラミングすることが可能なRNAiの組合せを素早く同定することが出来るような、新しいハイスループット・スクリーニング法を開発・確立していくことである。

3. 研究の方法

以下の研究項目を進めた。

(1) ヒト遺伝子を網羅的に標的としたshRNAレンチウイルス・ライブラリの調整を進めた。具体的には、約15,000遺伝子を標的とした約85,000種のshRNAからなるレンチウイルス・プラスミド・ライブラリ

(Collecta社)を基盤として、プラスミドのトランスフェクション・プロトコルの最適化、レンチウイルス産生プロトコルの検討・最適化、レンチウイルスの精製・濃縮化プロトコルの検討などを進めた。本研究に供するに足るクオリティーのレンチウイルス・ライブラリの作成プロトコルが樹立された。

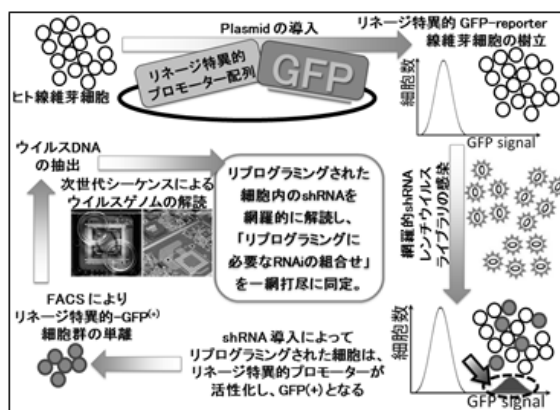
(2) ヒト線維芽細胞1個あたり3~5種類のshRNAが導入されるように、ウイルス感染についてのタイトレーションを検討した。レンチウイルス感染後の細胞について細胞1個ごとのウイルスコピー数をdigital PCR法で定量しながら検討を進めた。報告例では、わずか1~2因子の遺伝子導入でリプログラミングが可能だという報告例がある点、また、ここではランダムなshRNAの組合せによってリプログラミングを試みる点などを考慮して、線維芽細胞1個に3~5種のshRNAが導入されるウイルス・タイトレーションを決定した。例えば、本研究のshRNAレンチウイルス・ライブラリから4~5shRNAがランダムに選択された場合、ある特定の2因子が含まれる確率は $4.8 \sim 8.0 \times 10^{-7}$ であり、培養細胞実験の規模として十分可能な研究スケールである。

(3) 心筋、膵β細胞、肝細胞、網膜色素上皮細胞などについて、各細胞系統に特異的な活性を有する遺伝子プロモーターを探索し、それらをGFP reporterとして組み込んだプラスミドの構築を進めた。後のスクリーニングでGFP(+)を呈する細胞は、線維芽細胞から各リネージへとリプログラミングされた細胞と見做すことができる。

(4) shRNAレンチウイルス・ライブラリ感染後の培養条件下において、GFP(+)を呈した細胞のみを単離するプロトコルの整備を行った。具体的には、FACSあるいは1細胞単離装置を用いることで、細胞集団中からGFP(+)細胞の単離を行うための実験条件を検討し、確立した。

(5) 次世代シーケンス・プロトコルの整備を進めた。shRNAレンチウイルス・ライブラリの感染した細胞集団からゲノムDNAを抽出し、核酸バーコード領域を含むshRNA近

傍部位のみを PCR 増幅し、PCR 産物を次世代シーケンス解析に供するまでの一連のプロトコールについて条件検討を進め、確立させた。



4. 研究成果

以下の実験条件を検討し、さまざまな条件検討を加えながら、プロトコールの洗練化を行い、研究開発の基盤整備を進めることができた。

(1) 約 15,000 個のヒト遺伝子を網羅的に標的とした約 85,000 種の shRNA レンチウイルスからなる網羅的ライブラリの作成が完了した。ウイルス産生細胞へのプラスミド・トランスフェクション・プロトコールの最適化、レンチウイルス産生プロトコールの検討・最適化、レンチウイルスの精製プロトコールなどの条件検討を進め、その成果として、本研究に供するに足るクオリティーのレンチウイルス・ライブラリを大量に産生できる実験プロトコールが樹立された。

(2) ヒト線維芽細胞などのさまざまなヒト培養細胞株について、細胞 1 個あたり 3~5 種類の shRNA が導入されるように、レンチウイルス感染に関する感染タイトレーションを検討した。レンチウイルス感染後の細胞において、細胞 1 個ごとのウイルスコピー数を、ヒトゲノムおよびウイルスゲノムを各々標的とした digital PCR 法で定量・比較しながら検討を進めた。検討によって、感染させるウイルス濃度によって、感染細胞 1 個ごとにレンチウイルス 1 種あるいは 3 種以上程度のゲノム導入効率を得られるように感染効率をコントロールすることが可能であることが明らかになり、さらに、本研究計画に最適なウイルス完成条件を確立することが出来た。

(3) さまざまな遺伝子プロモーターを GFP reporter として組み込んだプラスミドの構築を進めた。文献等からのプロモーター配列の探索、増幅のためのプライマー配列の検討、プラスミド構築についての検討などを進めた。

(4) 網羅的 shRNA レンチウイルス・ライブラリを感染させた細胞群から、培養条件下で GFP(+) を呈した細胞を単離する実験条件

を確立した。FACS を用いた収集プロトコールおよび 1 細胞単離装置を用いる細胞回収プロトコールの双方を樹立することができ、細胞集団中から GFP(+) 細胞の単離を行うための複数の実験法を確立することができた。

(5) 網羅的 shRNA レンチウイルス感染細胞に対して、それらに感染・導入された shRNA 配列を包括的に同定するための次世代シーケンス・プロトコールを確立することができた。レンチウイルス感染細胞からのゲノム DNA の抽出、核酸バーコード領域を含む shRNA 部位の PCR 増幅、PCR 産物の次世代シーケンス解析、シーケンスデータから shRNA および標的遺伝子の解析パイプラインについて、方法を樹立させた。

上記のように実験条件の検討がなされ確立された実験プロトコールにしたがって、shRNA 感染細胞株 (RFP(+)) を培養条件下に観察し、特異的遺伝子の発現が上昇した分化誘導細胞 (GFP(+)) のみを単離し、次世代シーケンス解析に供するという一連の実験を試行した。特に shRNA レンチウイルス・ライブラリを感染させた細胞についての培養条件や分化誘導の検討にエフォートを要したが、明瞭な細胞分化誘導を引き起こすための培養条件および実験条件のさらなる検討が必要との結論に達した。細胞リネージの誘導に関する培養条件あるいは分化誘導法についてのプロトコール開発・洗練化は今後の継続的な研究課題と考える。

研究期間は終了したが、この挑戦的萌芽研究によって基盤の実験プロトコールが整備されたと言え、今後の研究開発に繋がる成果が得られたと考えられる。

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)

- ① 藤橋未希、加藤洋人、佐藤玲子、鈴木良平、貴志一樹、河村大輔、石川俊平：網羅的 shRNA ライブラリと次世代シーケンス技術を利用した新規胃癌治療標的遺伝子の探索：第 104 回日本病理学会総会 (2015 年 4 月 20 日、名古屋国際会議場、名古屋市)
- ② 藤橋未希、加藤洋人、佐藤玲子、鈴木良平、貴志一樹、河村大輔、石川俊平：次世代シーケンス技術と網羅的 shRNA ライブラリを利用した新規胃癌治療標的遺伝子スクリーニング法の樹立：日本人類遺伝学会第 60 回大会 (2015 年 10 月 14 日、京王プラザホテル、東京都新宿区)

[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：該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 洋人 (KATO, Hiroto)
東京医科歯科大学・難治疾患研究所・助教
研究者番号：60446549

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：