

令和 6年 2月

宮本人丸 学位論文審査要旨

主査 初 沢 清 隆
副主査 大 槻 明 広
同 香 月 康 宏

主論文

Rapid human genomic DNA cloning into mouse artificial chromosome via direct chromosome transfer from human iPSC and CRISPR/Cas9-mediated translocation

(ヒトiPS細胞を供与体とする染色体導入とCRISPR/Cas9による転座誘導を利用した、マウス人工染色体への迅速なヒト染色体クローニング)

(著者：宮本人丸、小林大晃、岸間菜々美、山崎匡太郎、濱道修生、宇野愛海、阿部智志、平向洋介、香月加奈子、冨塚一磨、香月康宏)

令和 6年 Nucleic Acids Research doi : 10.1093/nar/gkad1218

参考論文

1. Treatment of CHO cells with Taxol and reversine improves micronucleation and microcell-mediated chromosome transfer efficiency

(タキソールとリバーシン処理による微小核形成は染色体導入効率を改善する)

(著者：宇野愛海、里深博幸、宮本人丸、本間和久、鈴木輝彦、山崎匡太郎、伊東亮太、森脇崇、濱道修生、冨塚一磨、押村光雄、香月康宏)

令和 5年 Molecular Therapy Nucleic Acids 33巻 391頁～403頁

2. Phenotypic features of dystrophin gene knockout pigs harboring a human artificial chromosome containing the entire dystrophin gene

(ヒト人工染色体を介してジストロフィンを補完したジストロフィンノックアウトブタの表現型)

(著者：渡邊將人、宮本人丸、岡本一俊、中野和明、松成ひとみ、香月加奈子、長谷川航希、内倉鮎子、高柳就子、梅山一大、平向洋介、

Elisabeth Kemter、Nikolai Klymuik、黒目麻由子、Barbara Kessler、
Eckhard Wolf、香月康宏、長嶋比呂志)

令和 5年 Molecular Therapy Nucleic Acids 33巻 444頁～453頁

学位論文要旨

Rapid human genomic DNA cloning into mouse artificial chromosome via direct chromosome transfer from human iPSC and CRISPR/Cas9-mediated translocation

(ヒトiPS細胞を供与体とする染色体導入とCRISPR/Cas9による転座誘導を利用した、マウス人工染色体への迅速なヒト染色体クローニング)

プラスミドやBACを用いて作製される一般的なトランスジェニック (Tg) 動物に対し、人工染色体を介したヒト染色体断片の導入によって作製された動物はトランスクロモソミック (Tc) 動物と呼ばれる。Tg動物は1~300kb程度の外来DNAを保持するが、Tc動物は0.5~24Mbもの外来DNAを保持可能である。この外来DNAには遺伝子のみならず遺伝子の生理的制御に必要な配列が含まれており、ヒト遺伝子及び染色体の機能を個体レベルで再現する強力なツールとして利用される。また、ヒト染色体断片はマウス人工染色体 (MAC) に搭載されることで、個体内で安定して保持・次世代伝達される。一方で、ヒト染色体をMACへ搭載するためには、1) ヒト細胞とマウス細胞のハイブリッドを作製する、2) ハイブリッドから単一ヒト染色体を単離する、3) ヒト染色体をニワトリ細胞内に移して改変する、4) ヒト染色体をCHO細胞へと移してCre-loxPによる組換えによってMAC上に搭載する、という操作を必要とする。この操作は染色体導入と改変、スクリーニングを7回以上繰り返すものであり、これまで数年間におよぶ膨大な時間と労力をかけて達成されてきた。そこで筆者らは、ハイブリッド作製を必要としない、ヒトiPS細胞から任意細胞への直接染色体導入法と、Cre-loxP組換えを必要としないゲノム編集技術を利用した染色体改変方法の開発によって、3回の操作によってヒト染色体領域をMAC上にクローニングする方法の開発を試みた。

方法

ヒト胎児肺線維芽由来のiPS細胞 (HFL1-iPS) を染色体供与体とし、CRISPR/Cas9技術によって、HFL1-iPS細胞のヒト6番染色体長腕 (6q22.3) とヒト21番染色体長腕 (21q22.3) 領域に薬剤耐性遺伝子と蛍光遺伝子を挿入した。先行研究 (Uno, et al. 2023) にて見出された高効率微小核形成誘導剤であるPaclitaxelとReversineによる処理が、HFL1-iPS細胞に対しても微小核形成誘導可能であるか検証した。微小核形成誘導されたヒトiPS細胞をサイトカラシン処理下で遠心処理することで微小核細胞を取得し、マウス人工染色体 (MAC) を保持するCHO細胞とポリエチレングリコールによる細胞融合によって導入した。ヒト6番染色体またはヒト21番染色体とMACをCRISPR/Cas9によって同時切断し、転座を誘導した。転座

DNAを保持する細胞集団をPCRによって特定して希釈培養することを繰り返すことで、転座体をクローニングした。サンガーシーケンス解析とFISH解析によって、ヒト染色体とMACの転座を確認した。

結 果

標識されたHFL1-iPS細胞を供与体とする微小核細胞融合法によって、MACを保持するCHO細胞株へとヒト6番染色体とヒト21番染色体を導入することが可能であった。染色体導入効率は 1.0×10^{-6} ~ 1.6×10^{-5} であった。樹立された複数のクローンにおいて、単一のMAC及びヒト染色体が安定的に保持されていた。また、CHO細胞内でヒト染色体とMACの同時切断を誘導したところ、 1.5×10^{-4} ~ 1.5×10^{-3} の頻度で転座DNAの発生が確認された。転座DNAを保持するCHO細胞をクローン化したところ、ヒト染色体とMACの転座染色体を保持していた。

考 察

本研究では、初めてヒトiPS細胞を供与体として、ヒト6番及び21番染色体をCHO細胞へと直接導入した。従来正常ヒト細胞は、有限増殖性のために染色体標識株の樹立が困難であること、微小核形成効率が低いことが原因で供与体として利用されなかった。本研究では、正常に近いゲノムを持ちながら無限増殖能を持ち、遺伝子改変が容易なヒトiPS細胞株を利用し、さらに微小核形成条件を検証して染色体供与体化することが課題解決に繋がった。また従来はニワトリDT40細胞へとヒト染色体を移し、相同組換えによるloxP配列挿入とCHO細胞への移入を経てCre-loxP転座を誘導することで、MAC上にヒト染色体が搭載された。本研究では、CRISPR/Cas9による転座誘導を試み、その効率は低かったものの、1/15000程度の頻度の変異体を検出・クローニングする手法の採用によってヒト染色体を搭載するMACを取得可能であった。そのため、新規方法ではニワトリDT40細胞への移し換えやloxP挿入の手間が削減され、工程にかかる期間と労力を削減したと言える。

結 論

ヒトiPS細胞内の任意染色体を任意細胞へ直接導入する方法が樹立された。また、ゲノム編集技術によって1回の操作でMAC上にヒト染色体断片が搭載された。本研究によって、以前は数年以上かかったMACへのヒト染色体搭載操作がわずか半年で実施可能となった。本成果はヒト化モデル動物作製の迅速化にも貢献し、様々な分野への波及効果が見込める。