

平成 20年 3月

設楽真吾 学位論文審査要旨

主 査 佐 藤 建 三

副主査 難 波 栄 二

同 押 村 光 雄

主論文

Telomerase-mediated life-span extension of human primary fibroblasts by human artificial chromosome (HAC) vector

(ヒト人工染色体(HAC)ベクターによる、テロメラーゼによるヒト初代培養線維芽細胞の寿命延長)

(著者：設楽真吾、掛田実、永田恵子、平塚正治、佐野暁子、大澤加奈子、岡崎晃代、加藤基伸、香月康宏、押村光雄、富塚一磨)

平成20年 Biochemical and Biophysical Research Communications 掲載予定

学 位 論 文 要 旨

Telomerase-mediated life-span extension of human primary fibroblasts by human artificial chromosome (HAC) vector

(ヒト人工染色体(HAC)ベクターによる、テロメラーゼによるヒト初代培養線維芽細胞の寿命延長)

テロメラーゼによる細胞寿命延長は、悪性転換なしに正常細胞を増殖させることを可能にし、細胞医療に対して有用であると考えられている。現在のテロメラーゼによる細胞寿命延長は、レトロウイルスをはじめとした染色体組み込み型ベクターを用いてなされている。しかし、このようなベクターを使用することは、潜在的に遺伝子挿入による変異及び癌遺伝子の活性化の可能性があることが知られている。本研究において、筆者らは、染色体へ挿入されないHACベクターにhTERT発現カセットを導入し、さらに部位特異的組み換え機構を用いてhTERTを発現しないHACと発現するHACを構築した。これら2つのHACベクターを安定に保持するヒト正常線維芽細胞を樹立した。HACを安定に保持し、hTERTを発現しているヒト正常線維芽細胞と発現していない2種類の細胞を比較することで、細胞老化及び分裂寿命の変化を観察し、hTERT-HACが初代培養細胞の寿命制御に適用できるかを検証した。

方 法

21 Δ qHAC由来でhTERT発現カセットを持つ2種類のHAC (hTERT-HAC) を移入したHFL1ヒト正常線維芽細胞を樹立した。まず、hTERTが発現しないhTERT (OFF) カセットは以下の配列から構成されている、[Human ubiquitin C promoter (UbC) promoter、FRT配列に挟まれた転写・翻訳終結配列 (STOP sequence)、hTERT cDNA、IRES、GFP、ウシ成長ホルモン遺伝子由来ポリA付加配列 (BGHpA)]。また、hTERT発現カセットは、位置効果によるhTERT発現への影響を避けるため、トリβ-blobinに由来する二つのインスレーター配列の間に挿入されている。このカセットをCHO細胞内の21 Δ qHACのloxPサイトへ部位特異的に挿入し、hTERT (OFF)-HAC/CHO細胞を樹立した。さらにFlpe recombinase発現プラスミド (pOG44FLPe) を一過性に導入することで、部位特異的組換えによるFRT-STOP-FRT配列の除去を行い、CHO細胞内にhTERTを発現するhTERT (ON)-HACを構築した。hTERT (OFF)-およびhTERT (ON)-HACを微小核融合 (MMCT) 法によってHFL1細胞へ移入し、hTERT (ON) およびhTERT (OFF) の複数のHFL1クローンを取得した。テロメラーゼ活性はstretch PCR assayによって、SA-β-galactosidase活性はsenescent cell detection kitを用いてpH6.0で細胞をX-gal染

色することで検出した。また、これらの細胞をMMCT後120日まで継代培養し、その間の両群におけるpopulation doublings (PD) を記録した。

結 果

hTERT (OFF)-HAC/HFL1および未処理のHFL1細胞では想定どおりテロメラーゼ活性が認められなかったのに対して、hTERT (ON)-HAC/HFL1では7クローンのうち6クローンにおいてテロメラーゼ活性が検出された。

hTERT (OFF)では老化細胞特異的な巨大化した細胞質を持つ細胞が見られた。hTERT (ON)-およびhTERT (OFF)-HAC/HFL1クローンのSA- β -galactosidase染色の結果、老化マーカー陽性細胞率はhTERT (ON)で $22.65 \pm 3.14\%$ 、hTERT (OFF)で $79.27 \pm 10.51\%$ となり、両者には有意な差が認められた。

これらのクローンの継代培養の結果、hTERT (OFF)クローンはDay 70 (20-22 PD)までにすべての(7クローン)において細胞老化と増殖停止が認められた。一方、hTERT (ON)クローンでは6クローン中5クローンにおいてDay 120、30 PD以降も増殖を維持していることが認められた。Day 120において、hTERT (ON)のクローンはhTERT (OFF)のクローンに対して平均で8PD以上の差がついていることが明らかになった。

考 察

これらの結果から、hTERT (ON)HACから発現したhTERT遺伝子によって、HFL1細胞にテロメラーゼ活性が回復し、また、細胞形態とSA- β -galactosidaseの蓄積という点でHFL1細胞の細胞老化の進行が抑制されていることが示された。さらに、HFL1の細胞老化の抑制に伴い分裂寿命の延長が起こっていることが分かった。過去の研究と比較すると、hTERT-HACを用いることで、EPO-21 Δ pqHAC/HFL1の研究で得られた細胞数に対して、10倍以上の細胞を獲得することが出来た。これは、hTERT発現カセットを用いることで、臨床的に治療用遺伝子を産生するHACに対してさらに寿命延長という機能を追加できる可能性を示唆している。

結 論

hTERT-HACによって染色体外からhTERTを発現させることで、ヒト正常線維芽細胞の寿命を延長させることが出来ることを実証した。これはHACによる外来遺伝子の発現によりヒト初代培養細胞の分裂寿命を制御することが出来ることを示唆している。