

香月加奈子 学位論文審査要旨

主査 岡田 太
副主査 畠 義郎
同 押村 光雄

主論文

Highly stable maintenance of a mouse artificial chromosome in human cells and mice

(ヒト細胞とマウスにおいて極めて安定に維持されるマウス人工染色体)

(著者：香月加奈子、嵩原昇子、宇野愛海、今岡奈津子、阿部智志、滝口正人、平松敬、押村光雄、
香月康宏)

平成 25 年 Biochemical and Biophysical Research Communications 442 巻 44 頁～50 頁

参考論文

1. Complete genetic correction of iPS cells from Duchenne muscular dystrophy

(デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者由来のiPS細胞における遺伝子の完全修復)

(著者：香月康宏、平塚正治、滝口正人、尾崎充彦、梶谷尚世、星谷英寿、平松敬、吉野とう子、
香月加奈子、石原千恵、嵩原昇子、檜垣克美、中川正人、高橋和利、山中伸弥、押村光雄)

平成22年 Molecular Therapy 18巻 386頁～393頁

2. Exploitation of the interaction of measles virus fusogenic envelope proteins with the surface receptor CD46 on human cells for microcell-mediated chromosome transfer

(微小核細胞融合法のためのヒト細胞上の細胞膜レセプターCD46と麻疹ウイルス融合タンパク質の相互作用の探索)

(著者：加藤基伸、香月康宏、香月加奈子、梶谷尚世、滝口正人、中山祐二、中村貴史、押村光雄)

平成22年 BMC Biotechnology DOI:10.1186/1472-6750-10-37 11pages

3. Refined human artificial chromosome vectors for gene therapy and animal transgenesis

(遺伝子治療と遺伝子改変動物作製のためのヒト人工染色体ベクターの改良)

(著者：香月康宏、星谷英寿、滝口正人、阿部智志、飯田雄一、尾崎充彦、加藤基伸、平塚正治、
白吉安昭、平松敬、上野悦也、梶谷尚世、吉野とう子、香月加奈子、石原千恵、嵩原昇子、
辻沙織、江島文夫、豊田敦、榊佳之、Vladimir Larionov、Natalay Kouprina、押村光雄)

平成23年 Gene Therapy 18巻 384頁～393頁

学 位 論 文 要 旨

Highly stable maintenance of a mouse artificial chromosome in human cells and mice (ヒト細胞とマウスにおいて極めて安定に維持されるマウス人工染色体)

これまでに搭載DNAサイズに制限がなく、複数のヒト遺伝子を導入することができ、齧歯類細胞・組織中で安定なmouse artificial chromosome (MAC) ベクターを開発してきた。本研究では、MACベクターの実用性を評価するために、1) MACベクターのヒト細胞における安定性、2) 世代・週齢を経たマウス個体におけるMACベクターの安定性、3) MACベクターを複数コピー有するマウス個体でコピー数に依存した目的遺伝子発現が観察されるかを検討した。

方 法

1) ヒト細胞での安定性を検討するため、MACベクターをHT1080細胞に微小核細胞融合法 (microcell-mediated chromosome transfer ;MMCT) にて導入し、Polymerase Chain Reaction (PCR) 解析、*in situ*ハイブリダイゼーション (FISH) 解析により、目的の導入クローンであることを確認した。この導入細胞を4ヶ月間にわたり培養し、MACベクターの安定性を評価した。

2) 異なる遺伝的背景、世代、週齢における導入MACベクターの安定性はGFPを指標としたフローサイトメトリー (FCM) により行った。

3) MACベクターを2コピー保持するマウス (ホモ個体) の骨髄と精巣からそれぞれ細胞を採取し、Hoechst33258染色により染色体解析を行った。

MACベクターを1~4コピー保持するマウスからは、血液細胞を採取後Hoechst33258染色により染色体解析を行った。各組織におけるゲノムコピー数の定量および遺伝子発現量は、定量PCR解析、定量reverse transcription (RT) -PCR解析により行った。

また血球細胞 (CD4、CD8、CD19) のGFP発現をFCMにより定量した。

結 果

1) MACベクターをヒトHT1080細胞に導入し、長期安定性を検討した結果、MACベクターは90%以上の割合で100 population doubling level (PDL) まで安定に維持された。また、MACベクターに搭載したGFP遺伝子は長期培養後にも安定発現することを確認した。

2) 遺伝的背景の異なる個体 (ICR系統およびB6系統) や老齢個体におけるMACベクターの

安定性を検討したところ、両系統において世代を経ても安定に維持され、週齢を重ねても極めて安定に維持されることが確かめられた。また、子孫伝達率を調べたところ、雌由来では50%程度だったのに対し、雄由来では20-30%程度であった。

3) MACベクターを2コピー保持するマウス個体において骨髄・精巢の染色体解析を行ったところ、骨髄細胞では正常な染色体数（40本）に加えて、2コピーのMACベクターが独立して導入されていた。一方、精巢由来の細胞では第一減数分裂時にMACベクターどうしが対合している像と、対合していない（独立して存在する）像が観察された。

さらに、MACベクターを1、2、4コピー保持するマウスにおいて各組織でのゲノムコピー数、遺伝子発現を調べたところ、コピー数依存的に遺伝子発現が増加した。また、FCMにより各種血球系細胞においてMACベクターに搭載したGFP遺伝子の発現を定量したところ、コピー数に依存した遺伝子発現の上昇が観察された。

考 察

従来作製されたマウスセントロメア構造を一部持つ人工染色体ベクター（mSATAC）はマウス細胞では安定であるものの、ヒト細胞では不安定であった。本研究のMACベクターはマウス個体、ヒト細胞の両方で安定に維持されることが明かとなった。MACベクターは正常マウス11番染色体から作製したものであり、天然のセントロメアを保有する。mSATACでは天然のセントロメア構造を持たないことから、天然のセントロメア配列が人工染色体の安定性に重要である可能性が示唆された。

MACベクターの子孫伝達率は雌由来では50%と高かったが雄由来では20-30%と低かった。第一、第二減数分裂時にはMACベクターは高頻度で保有されていたことから、この原因を調べるためには精子でのMACベクターの保有率を調べる必要があると考えられた。

MACベクターを1、2、4コピー保持するマウスにおいて、定量RT-PCRにより各組織でのGFP遺伝子発現に差が見られたが、この原因はCAGプロモーターの活性が各組織において異なる可能性が考えられた。

結 論

MACベクターはマウス個体およびヒト細胞で極めて安定に保持されることを明かにした。MACベクターは遺伝子サイズに制限無く搭載でき、かつ効率良く目的の細胞へ移入することが可能であることから、マウス個体やヒト細胞での遺伝子機能解析に有用であるだけでなく、ヒト型モデルマウスの作出に重要なツールとなることが期待される。さらに、哺乳類全般に利用できる共通の遺伝子導入ベクターとなりうる可能性が示唆された。