

平成25年12月

宇野愛海 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

The transfer of human artificial chromosomes via cryopreserved microcells

(凍結微小核細胞を用いたヒト人工染色体導入)

(著者：宇野愛海、宇野勝洋、Susi Zatti、上田佳奈、平塚正治、加藤基伸、押村光雄)

平成25年 Cytotechnology 65巻 803頁～809頁

参考論文

1. Integration-free iPS cells engineered using human artificial chromosome vectors

(ヒト人工染色体を用いた外来遺伝子の挿入のないiPS細胞作製)

(著者：平塚正治、宇野愛海、上田佳奈、黒崎創、今岡奈津子、香月加奈子、上野悦也、
赤倉祐太郎、加藤基伸、尾崎充彦、香月康宏、中川誠人、山中伸弥、押村光雄)

平成23年 PLoS ONE 6巻 e25961

2. Integration-free and stable expression of FVIII using a human artificial chromosome

(ヒト人工染色体を用いた外来遺伝子の挿入のないFVIII安定発現)

(著者：黒崎創、平塚正治、今岡奈津子、飯田雄一、宇野愛海、香月康宏、石原千恵、
矢倉裕奈、三室淳、坂田洋一、武谷浩之、押村光雄)

平成23年 Journal of Human Genetics 56巻 727頁～733頁

学位論文要旨

The transfer of human artificial chromosomes via cryopreserved microcells

(凍結微小核細胞を用いたヒト人工染色体導入)

微小核細胞融合法 (MMCT) は、染色体供与細胞から受容細胞へ単一の完全長染色体または巨大染色体断片の導入が可能な技術である。しかしながら、従来法の MMCT では染色体導入を行うためには微小核細胞精製後に直ちに受容細胞と融合しなければならず、微小核細胞の精製と受容細胞調製のタイミングは重要である。特に、初代培養細胞については受容細胞の調整が難しく、従来の煩雑な MMCT のプロセスを改善し、簡便化する必要があった。

そこで、本研究において、微小核細胞凍結保存方法を確立した。HT1080 細胞へ MMCT を行いヒト人工染色体の導入効率について検証し、また、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いた解析方法により、導入された染色体の安定性について染色体保持率により比較した。その結果、従来法あるいは凍結保存法の MMCT による染色体導入効率には有意な差はなかった。したがって、微小核細胞の凍結保存法により染色体導入効率や導入された染色体安定性を低下させることなく、染色体導入技術を簡便化することができた。

方法

ヒト人工染色体 (HAC) 保持 CHO4H6. 1M 株を、10% 胎仔血清を含む Ham's F-12 培地で培養した。HT1080 細胞を、10% 胎仔血清を含む Dulbecco's modified Eagle's 培地を用いて培養した。CHO4H6. 1M 株は細胞融合蛋白であるヘマグルニチン蛋白とフュージョン蛋白が発現している。

また、微小核細胞の凍結方法は下記のとおりである。40% 仔牛胎児血清、10% ジメチルスルホキシドを含む Dulbecco's modified Eagle's 培地を凍結保存溶液とし、これに精製微小核細胞を懸濁し、 -80°C に置き保存した。微小核細胞の解凍調整方法として、 37°C の恒温槽にて解凍し、Dulbecco's modified Eagle's 培地に懸濁し $2,000\times g$ で遠心し、微小核細胞を回収した。

微小核細胞の精製及び、微小核細胞融合については以下のとおりである。

CHO4H6. 1M を 1.2×10^7 個用意し、20% 仔牛胎児血清を含む Dulbecco's modified Eagle's 培地に $0.1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ のコルセミドを添加し、72 時間培養したのち、 $12,000\times g$ により遠心を行い、得られた微小核細胞をフィルターにて精製した。次に、精製した微小核細胞を即座に 2×10^6

個のHT1080細胞と24時間共培養し、染色体導入を行った。一方で同様に精製した微小核細胞を上記の微小核細胞凍結保存法を用いて二週間凍結保存した後に、上記と同様に染色体導入を行った。共培養後、HAC保持細胞を薬剤選択（8 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ のブラストサイジン添加）により選択培養を行い、薬剤耐性コロニー数を計測した。その後、薬剤耐性クローンを単離、培養し、FISH解析を行いHT1080細胞におけるHAC保持率を計測した。

結 果

従来法でのMMCTを行った場合、平均175コロニーを得た。一方で、凍結微小核細胞を用いたMMCT法を行った場合、平均164コロニーを得た。Student's t testを行ったところ、両実験間のP値は0.165であり有意差はなかった。また、各導入法において単離されたHAC保持HT1080細胞に対してFISH解析を行いHACの保持率を測定したところ、従来法により染色体導入を行った場合では、平均80%の保持率であり、一方で凍結微小核細胞法を用いたMMCTを行った場合、平均68%の保持率であった。Mann-Whitney u testを行ったところ、両実験間のP値は $P>0.05$ であり、有意差はなかった。

考 察

今回、凍結微小核細胞を用いたMMCT法が従来法と有意差のない染色体導入効率と受容細胞内での染色体安定性を示すことが確認された。微小核細胞の凍結保存が可能となったため、大量微小核細胞の調整や長距離の微小核細胞の輸送が可能となった。これにより他地域の研究者らと共同研究を活発に行うことが可能である。

しかし、凍結微小核細胞融合法の問題点として、HAC上の遺伝子へのDNA変異の発生頻度やエピジェネティックな遺伝子発現への凍結保存法の影響については未検証である。また、HACの受容細胞内での保持率が低い傾向があったことについては染色体の分配に関わる微小な影響が発生している可能性を否定できない。

結 論

今回開発された凍結微小核融合法を用いた大量微小核細胞の調整や長距離の微小核細胞輸送方法は今後、染色体工学技術の発展を支える重要な技術となりうると期待される。