

飯田雄一 学位論文審査要旨

主 査 岡 田 太
副主査 汐 田 剛 史
同 押 村 光 雄

主論文

Bi-HAC vector system toward gene and cell therapy

(遺伝子および細胞治療に向けたbi-HACベクターシステム)

(著者：飯田雄一、香月康宏、林真広、上田泰次、長谷川護、Kouprina Natalay、
Larionov Vladimir、押村光雄)

平成26年 ACS Synthetic Biology 掲載予定

参考論文

1. Human artificial chromosome with a conditional centromere for gene delivery and gene expression
(遺伝子導入および遺伝子発現のためのセントロメア機能調節可能なヒト人工染色体)
(著者：飯田雄一、Kim Jung-Hyun、香月康宏、星谷英寿、滝口正人、林真広、
Erliandri Indri、Lee Hee-Sheung、Samoshkin Alex、舛本寛、
Earnshaw William C.、Kouprina Natalay、Larionov Vladimir、押村光雄)
平成22年 DNA Research 17巻 293頁～301頁
2. Refined human artificial chromosome vectors for gene therapy and animal transgenesis
(遺伝子治療および遺伝子組み換え動物作製のためのヒト人工染色体ベクター)
(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、辻咲織、江島文夫、豊田敦、榊佳之、Larionov Vladimir、
Kouprina Natalay、押村光雄)
平成23年 Gene Therapy 18巻 384頁～393頁
3. Integration-free and stable expression of FVIII using a human artificial chromosome
(ヒト人工染色体を用いた挿入がなく安定な第VIII因子の発現)
(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

Bi-HAC vector system towards gene and cell therapy

(遺伝子および細胞治療に向けたbi-HACベクターシステム)

従来のウイルスベクター、BAC/PACベクター等を用いた遺伝子導入法では、宿主染色体に遺伝子が挿入されることが知られており、遺伝子治療を行う上で細胞のがん化の危険性が懸念される。ヒト人工染色体 (HAC) ベクターは宿主染色体とは独立に維持され導入遺伝子は安定かつ長期間発現する利点がある。HACベクターの作製法は大きく分けて、ヒト染色体をベースに染色体改変を行う‘トップダウン法’とセントロメア配列を含むベクター導入により作製する‘ボトムアップ法’がある。本論文では、ヒト培養細胞で安定に保持されるトップダウン法により作製されたヒト21番染色体ベースの人工染色体ベクター (21HAC) とボトムアップ法により作製された任意に除去可能なヒト人工染色体ベクター (tet-0 HAC) を組み合わせた新規遺伝子発現を開発した。将来的には21HACベクターを遺伝子治療用に、tet-0 HACベクターを細胞リプログラミング用に応用することで、宿主染色体非挿入の遺伝子治療が期待される。

方法

異なる2種類のヒト人工染色体ベクターにそれぞれ蛍光遺伝子を搭載する。部位特異的組み換え機構Cre/loxP recombinationを用いて、CHO細胞内においてEGFP遺伝子を21HACへ、DsRed遺伝子をtet-0 HACへそれぞれvector transfectionを行い搭載した。PCR解析およびFISH解析にて蛍光遺伝子がそれぞれHACベクターに搭載されていることを確認した後に、微小核細胞融合法を用いてヒトHT1080細胞へそれぞれのHACベクターを導入した。また、2タイプのHACベクターを保持するHT1080細胞からtet-0 HACベクターの除去誘導を行った。

結果

PCR法により作製したEGFP遺伝子およびDsRed遺伝子が21HACおよびtet-0 HACベクターにそれぞれ搭載されていることを確認した (部位特異的組み換えによる遺伝子搭載確認)。さらに、FISH法によりそれぞれのHACベクターに蛍光遺伝子が搭載されていることを視覚的に確認した。微小核融合法によるHACベクター導入実験では、薬剤耐性コロニーが得られ2種類のHACベクターが保持されていることがFISH解析により確認できた。Tet-0 HACベクタ

ーはセントロメア配列にtet-operator配列を含んでおり、テットリプレッサー遺伝子導入によりセントロメア機能を調節できる。テットリプレッサー-tTS遺伝子導入後、FACS解析およびFISH解析によりtet-0 HACベクターが高効率で除去されていることを確認した。

考 察

Tet-0 HAC除去誘導に用いたテットリプレッサー遺伝子tTS導入には、プラスミドベクター、レトロウイルスベクター、センダイウイルスベクターをそれぞれ用いて実験を行った。

その結果、センダイウイルスベクターによるtTS導入時に最も高効率でtet-0 HACが除去可能であることが確認された。これは、遺伝子発現レベルに起因すると考えられ、センダイウイルスによるtTS遺伝子導入時の発現が最も高いことを示唆している。

結 論

本研究では、ヒト人工染色体ベクターを用いて宿主染色体非挿入型の遺伝子発現系の構築を行った。これまでに、作製法の異なる2種類の人工染色体ベクターを同一細胞に導入した例はなく、安定なトップダウンHACと除去可能ボトムアップHACを用いた遺伝子発現系は非常にユニークであり、搭載遺伝子の組み合わせによって遺伝子発現解析ツールとなり、治療用遺伝子、リプログラミング遺伝子を搭載することで従来にはない治療用ツールになると期待される。