

平成30年 9月

# 本間和久 学位論文審査要旨

主 査 久 郷 裕 之

副主査 岡 田 太

同 初 沢 清 隆

## 主論文

Development of a multiple-gene-loading method by combining multi-integration system-equipped mouse artificial chromosome vector and CRISPR-Cas9

(複数遺伝子搭載システムを備えたマウス人工染色体ベクターとCRISPR-Cas9の組み合わせによる複数遺伝子搭載方法の開発)

(著者：本間和久、阿部智志、遠藤猛、宇野愛海、押村光雄、大林徹也、香月康宏)

平成30年 PLOS ONE DOI : 10.1371/journal.pone.0193642

## 参考論文

1. Down syndrome-associated haematopoiesis abnormalities created by chromosome transfer and genome editing technologies

(ダウン症関連造血異常は染色体移入とゲノム編集技術によって生じる)

(著者：香月康宏、矢倉裕奈、阿部智志、尾崎充彦、梶谷尚世、香月加奈子、

嵩原昇子、本間和久、末森博文、山崎聡、佐久間哲史、土岐力、清水律子、中内啓光、山本卓、押村光雄)

平成26年 Scientific Reports DOI : 10.1038/srep06136

2. Transfer of a mouse artificial chromosome into spermatogonial stem cells generates transchromosomic mice

(精原幹細胞へのマウス人工染色体の移入はトランスクロモソミックマウスを作製する)

(著者：篠原隆司、香月加奈子、越後貫成美、森本裕子、的場章悟、平松敬、本間和久、鈴木輝彦、原孝彦、小倉淳郎、押村光雄、篠原（金津）美都、香月康宏)

平成29年 Stem Cell Reports 9巻 1180頁～1191頁

3. Modification of single-nucleotide polymorphism in a fully humanized CYP3A mouse by genome editing technology

(完全ヒト型化CYP3Aマウスにおけるゲノム編集技術による一塩基多型の改変)

(著者：阿部智志、小林カオル、大字亜沙美、佐久間哲史、香月加奈子、嵩原昇子、中村和臣、岡田あずさ、墳崎靖子、千田直人、本間和久、山本卓、伊川正人、千葉寛、押村光雄、香月康宏)

平成29年 Scientific Reports DOI : 10.1038/s41598-017-15033-0

# 学 位 論 文 要 旨

Development of a multiple-gene-loading method by combining multi-integration system-equipped mouse artificial chromosome vector and CRISPR-Cas9

(複数遺伝子搭載システムを備えたマウス人工染色体ベクターとCRISPR-Cas9の組み合わせによる複数遺伝子搭載方法の開発)

著者らは複数遺伝子搭載 (Multi-Integrase : MI) システムを備えたマウス人工染色体 (MI-MAC) ベクターを開発した。MI-MACは、人工染色体ベクターと複数遺伝子搭載能の両方の利点を有している。しかし、利用可能な薬剤耐性遺伝子 (Drug resistance gene : DRG) の数の制限により、複数遺伝子搭載は困難であった。この問題を解決するために、CRISPR-Cas9を用いてDRGを欠損させ、繰り返し利用することで複数搭載を行う方法を開発した。この方法を用い、実証例として5つの遺伝子搭載ベクター (Gene-Loading Vector : GLV) をMI-MAC上に搭載したところ、目的遺伝子が安定かつ機能的に発現した。さらに、MI-MACを他種細胞へ移入したところ、受容細胞においても遺伝子発現が観察された。したがって、CRISPR-Cas9と組み合わせることで、MI-MACはDRGに制限されない複数遺伝子導入ベクターとして利用できることが示された。本研究の成果は、様々な研究分野のボトルネックを解決することが期待できる。

## 方 法

実証のため、MI-MACに蛍光もしくは発光遺伝子が挿入されたGLVを5つ搭載した。MI-MACへの遺伝子搭載およびCRISPR-Cas9による遺伝子欠損は、全てChinese Hamster Ovary K1 (CHO K1) 細胞内で行った。MI-MACへのGLV搭載については、ジャンクションPCR解析およびFISH解析を用いて遺伝子解析を行った。さらに、蛍光観察およびLucアッセイによって、搭載遺伝子の機能的発現解析を行った。また、CRISPR-Cas9によるDRGの欠損については、Cel-1アッセイおよびシーケンス解析を行った。CHO K1細胞内において5つの遺伝子を搭載したMI-MACは、HT1080 (ヒト繊維肉腫) 細胞にMMCT法で移入した。MI-MACを保持したHT1080細胞の解析はCHO K1細胞と同様の方法によって実施した。

## 結 果

CRISPR-Cas9によるDRGs欠損を行う必要があるため、各DRGに対するguide RNA (gRNA)

をそれぞれ設計した。変異導入効率を検討したところ、十分な活性を有することが確認された。

MI-MACへ複数GLV搭載を行うために、GLV搭載とDRGの欠損を連続的かつ別々に行い、8回の遺伝子導入によって5つのGLV搭載を試みた。解析の結果、全てのGLVはMI-MAC上に搭載されており、安定的かつ機能的に発現していることが確認された。そこで、一度の染色体移入によって複数の目的遺伝子を導入可能であるか検討するために、5つのGLVを搭載したMI-MACをCHO K1細胞からHT1080細胞へ移入した。その結果、HT1080細胞においても全ての遺伝子が発現することが確認された。これらの結果から、8回の遺伝導入によって5つのGLVsをMI-MAC上に搭載できることを示した。

しかしながら、上記の方法では5つのGLVを搭載するために8回の遺伝子導入が必要である。そこで、1度の遺伝子導入で遺伝子搭載と遺伝子欠損を同時に行うように改良することで、5回の遺伝子導入で5つの遺伝子搭載を試みた。オリジナルの複数遺伝子搭載方法と同様の解析を行い、結果、全てのGLVがMI-MAC上に搭載され、安定的かつ機能的に発現することを示した。

## 考 察

本研究では、5つのGLVsを搭載するために、オリジナルの複数遺伝子搭載方法では8回の遺伝子導入が必要であったのに対し、改善型では5回で可能であることを報告した。しかし、MIシステムでは同時に複数のGLVsを搭載することも理論上可能であるため、より精錬させることで、3回の遺伝導入で5つのGLVsを搭載可能であると考えられる。

また、本研究ではGLVとしてプラスミドベクターを5つ搭載したが、大きなDNA断片を搭載したベクターを複数搭載可能であるか検討していない。しかし、これまでの研究でMIシステム上に大きなDNA断片が搭載可能であることが報告されていることから、複数遺伝子搭載方法を用いることで、巨大なDNA断片も複数搭載可能であると考えられる。

## 結 論

人工染色体ベクター、MIシステムおよびCRISPR-Cas9を組み合わせることによって複数GLVsを目的領域に搭載可能であることが示された。人工染色体上に複数遺伝子を搭載することで、複数遺伝子ヒト型化モデル、複数遺伝子モニタリングモデル、疾患モデル、リプログラミング、また、遺伝子発現誘導システムの開発などのボトルネックを解決することが期待できる。