

2022 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	染色体導入阻害因子の探索とヒト人工染色体の高効率導入法の開発 －低分子化合物スクリーニングによる染色体導入効率改善法の探索－
キーワード	① 染色体導入、② ヒト人工染色体、③ 微小核細胞融合法

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏名	ウノ ナルミ 宇野 愛海
配付時の所属先・職位等 (令和4年4月1日現在)	東京薬科大学生命科学部応用生命科学科生物学・助教
現在の所属先・職位等 (令和5年7月1日現在)	同上 (東京薬科大学生命科学部応用生命科学科生物学)・助教
プロフィール	2014年3月鳥取大学大学院博士(再生医科学)を取得しました。 ヒト人工染色体ベクターや微小核細胞融合法を中核とする染色体導入技術を用いて本邦独自の再生医療技術開発、創薬技術開発への貢献を目指しています。

1. 研究の概要

ヒト人工染色体(HAC)は、微小核融合法(MMCT法)により、哺乳類細胞から哺乳類細胞へ、あるいはモデル動物へ巨大な遺伝子・複数の遺伝子を導入できる画期的な運び手(ベクター)である。ゲノム合成分野において、本研究グループが世界に先駆けて開発を進めているHACベクターは、任意の遺伝子とその調節に関わる上流と下流を含めた数百万塩基対(メガベース: Mb)規模のゲノム配列を搭載できる革新的な技術として期待されている。しかしながら、MMCT法には染色体導入効率が低いという課題があった。MMCT法は、染色体供与細胞からの微小核細胞の取得、微小核細胞と染色体受容細胞との融合、染色体受容細胞内での導入染色体の保持、という3つのステップからなる。本研究では、染色体受容細胞内での導入染色体動態を解明し、MMCT効率の改善を試みた。MMCT効率関連経路として、オートファジー経路、エンドサイトーシス経路、P53経路、紡錘体チェックポイント経路を挙げ、ゲノム編集技術、遺伝子導入技術、低分子化合物スクリーニング技術を用いて、これらの経路を阻害あるいは促進した際のMMCT効率への影響について評価しました。結果として、初期エンドソームを制御するRab4A、Rab5Aを過剰発現した際にMMCT効率が上昇したことから、MMCT効率とエンドサイトーシス経路の関連性が示唆された。今後は、エンドサイトーシス経路に焦点を絞り、MMCT効率を顕著に改善する低分子化合物を探索する。本研究の将来展望として、HACベクターや高効率MMCT法を中核とする染色体工学技術を用いて、本邦独自のMb規模のゲノム操作を含む、新規医療・産業技術の確立に貢献する。

2. 研究の動機、目的

染色体工学技術の中核であるHACベクター及び、微小核細胞融合法(MMCT法)は、Mb規模のゲノム配列をヒトiPS細胞やマウスES細胞に導入可能な新規遺伝子導入手法である。従来の遺伝子導入ベクターである、プラスミドベクターやバクテリア人工染色体ベクター等は、遺伝子搭載サイズが30kb~200kb程度と限られており、プロモーターやエンハンサーなどの遺伝

子制御領域を含む長大な配列導入による生理的発現系の構築や、複数遺伝子のクラスター導入などの Mb 規模の遺伝子導入は実現可能性が低い。このことから HAC ベクターと MMCT 法に Mb 規模の遺伝子導入法は、モデル動物作製や遺伝子・細胞移植治療法において、技術革新をもたらしつつある。これまでに、私たちの研究グループでは 30Mb の 21 番染色体領域を導入したダウン症モデル動物作製や、2.4Mb のジストロフィン遺伝子導入による疾患 iPS 細胞の遺伝子修復を実現した (Y. Kazuki, N. Uno, et al., Engineering of human induced pluripotent stem cells via human artificial chromosome vectors for cell therapy and disease modeling. Mol Ther Nucleic Acids. 2021.)。問題点として、MMCT 法による染色体導入効率は $10^{-5} \sim 10^{-6}$ (1 実験あたり、10 万~100 万細胞個に 1 個程度) であり、非常に導入効率が低い。我々の研究グループでは、これまでに人工染色体を保持する微小核細胞を大量に取得するための手法開発や、微小核細胞と染色体受容細胞の融合効率を改善することで、MMCT 効率の改善が可能であると報告された (M. Katoh, et al., BMC Biotechnol. 2010.)。そこで本研究では、MMCT 法における染色体受容細胞内には、導入微小核細胞内の染色体が細胞内にて安定に保持されるようになることを阻害する経路があると仮説を立てた (図 1)。また、この経路に関する低分子化合物を用いて、MMCT 法による染色体導入効率の改善を試みた。



3. 研究の結果

本研究では、ヒト培養細胞株 (HeLa) に対して MMCT 法を用いて HAC ベクターを導入する際に、ゲノム編集技術や低分子化合物を用いて、MMCT 効率の改善効果が期待される候補経路を操作した。その結果得られた HAC ベクター導入コロニー数を MMCT 効率の指標として、候補経路による影響を評価した。

1) オートファジー経路と MMCT 効率関連性の探索

微小核はオートファジー経路により除去されると報告 (R.V. Santiago, et al., Autophagic removal of micronuclei. Cell Cycle. 2012) されている。そこで、野生型 HeLa 細胞に対してゲノム編集技術 (CRISPR/Cas9) を用いてオートファジー経路主要因子である ATG7 をノックアウトすることでオートファジー経路を阻害したオートファジー経路阻害細胞株、及び、実験対照として ATG7 遺伝子を、ATG7 ノックアウト細胞株に再導入したオートファジー経路回復株を用いて、MMCT 効率について比較検討した。仮説として、オートファジー経路阻害細胞株では、MMCT 効率が野生型細胞株と比較し上昇し、オートファジー経路回復細胞株においては、野生型と同等程度となると期待された。しかしながら、オートファジー経路阻害細胞株では、MMCT 効率が野生型と比較し、約 1/2 程度に低下 ($p = 0.051$) し、オートファジー経路回復細胞株では、MMCT 効率はオートファジー経路阻害株と同等 (有意差なし) であった。従って、オートファジー経路は MMCT 効率には直接的な影響は少ないと示唆された。

2) P53 経路・紡錘体チェックポイント経路の探索

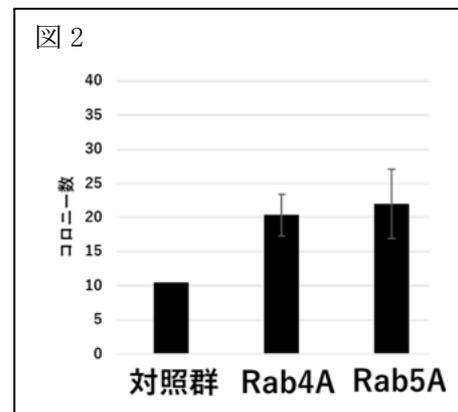
微小核細胞は、染色体供与細胞内での形成過程において DNA 損傷を生じうる。これにより、MMCT 法を得て染色体受容細胞に導入された際に染色体受容細胞内での DNA 損傷応答経路を活性化し、細胞死誘導や増殖抑制を生じる可能性がある。また、染色体受容細胞に導入された染

色体が分配異常染色体として紡錘体チェックポイントを活性化する可能性がある。これらの分子応答経路と MMCT 効率の関連性探索するために、P53 阻害剤 Pifithrin- α -HBr (PFT- α)、もしくは、紡錘体チェックポイント阻害剤 Reversine を微小核細胞と染色体受容細胞の融合時に培地中に一時的に投与し、経路を阻害することで MMCT 効率が上昇するかどうか検証した。結果として、PFT- α では MMCT 効率は 1/2 程度に、Reversine では、1/10 程度に低下した。一方で、これらの化合物は細胞毒性が強く、MMCT 効率には適当ではないと推察された。このことから、P53 経路、紡錘体チェックポイント経路については、これらの化合物を用いる手法とは異なる手法にて検討する必要がある。

3) エンドサイトーシス経路と MMCT 効率関連性探索

微小核細胞融合法は、麻疹由来膜融合結合・融合タンパクを用いており、細胞膜表面の受容体を介したエンドサイトーシス経路と MMCT 効率の関連性が想定された。エンドサイトーシス経路関連タンパクとして、Rab (Ras スーパーファミリー低分子量 G タンパク質の一部を構成するタンパク質ファミリー) が知られている。染色体受容細胞である HeLa 細胞に対して、種々の Rab タンパク質発現プラスミドベクターを遺伝子導入し、過剰発現させることで、各 Rab タンパク質が制御するエンドサイトーシス経路と MMCT 効率の関連性を探索した。その結果、Rab4A、Rab5A について過剰発現させた際に、MMCT 法により薬剤耐性遺伝子を保持する HAC を導入されたコロニー数の上昇傾向が観察された (図2)。この結果の再現性を検討する必要があるものの、エンドサイトーシス経路を活性化することにより MMCT 効率が改善される可能性が見出された。

これらの結果から本研究成果として、これまで未知であった染色体受容細胞内での微小核細胞の動態は、エンドサイトーシス経路と関連性していると示唆された。今後は、エンドサイトーシス経路阻害剤・促進剤を中心に探索を進めたい。



4. 研究者としてのこれからの展望

今後の研究計画として、本研究成果からスピントアウトし、MMCT 効率を改善する因子を用いた新規法開発を行います。また、その成果について特許申請や国際論文誌への発表を計画しています。私の将来研究目標として、本研究成果を含む染色体工学技術により、複数遺伝子・長大なゲノム情報の操作を容易にできるよう目指しています。昨今では様々な生物のゲノム解読がすすみ、複雑な遺伝情報がどのように高度な表現型や機能 (長寿命、光合成能、翼を用いた飛翔能、嗅覚・視覚の構造、食性等) をもたらすか、が明らかになってきています。このような長大な遺伝情報機能を生物間で移植する合成生物学的手法の開発が望まれています。私は、多様な生物資源を活用し、新規医療・産業技術を確立することで、社会変革を導くことができると期待しています。

5. 支援者 (寄付企業等や社会一般) 等へのメッセージ

この度、若手研究者奨励金を賜り、寄付企業、寄付者の皆様に心より感謝申し上げます。独自資金を獲得し独自研究計画を実施できる、という貴重な成功体験を得られたことは、私にとっては何事にも代えがたい成果です。この体験を胸に研究者として邁進し、本事業に寄付者として還元できるよう努めます。本研究奨励金の主旨である、特色ある多様な教育・研究の振興と次世代人材育成の理念と期待に応え、わが国の豊かな未来を築く一助となれば幸いです。