

「医療に向けた化学・生物系分子を利用したバイオ素子・システムの創製」
平成14年度採択研究代表者

松岡 英明

(東京農工大学工学部 教授)

「疾患モデル細胞の高効率創製と機能解析」

1. 研究実施の概要

本研究プロジェクトは、最終的に10の何乗個の遺伝子を改変した細胞を創製し、網羅的なデータ解析に基づいて、疾患モデル細胞という新しい概念を提示することを目的としている。そのために、最も技術的に困難である、マイクロインジェクションによる遺伝子改変技術を簡便迅速、さらには完全自動化を目指すことを第一の目標に掲げている。今年度の成果としてロボット2号機を制作し、実験者が細胞操作を行いやすいような装置として開発した。疾患関連遺伝子として糖尿病遺伝子に着目し、6種類のcDNAをクローニングした後、これらの遺伝子発現状態をEGFPあるいはDsRedを用いて可視化した。これらの細胞にRNAiによる発現阻害の予備的実験結果も得た。また、PDX-1の遺伝子部位にGFP遺伝子をヘテロにノックインすることによってPDX-1発現を可視化したES細胞を樹立すると共に、ジーントラップ法を確立するためのベクターを新たに構築した。今後は、ロボット2号機を用いて顕微鏡下で測定可能なインスリン検出ユニットを開発し、細胞機能評価を行うと同時に、単一細胞操作支援ロボットを様々な研究分野へ応用展開することで、細胞工学的応用技術の開発を目指す。一方、装置開発と平行して、糖尿病関連遺伝子であるPDX-1の遺伝子部位にGFP遺伝子をヘテロにノックインしたES細胞の情報に基づき、細胞レベルでの糖取り込み活性などを指標としたアッセイについて評価すると同時に、新たなアッセイ系の開発も試みる。また、このES細胞を用いることにより、インスリン分泌細胞への分化誘導を行うと同時に、PDX-1可視化マウスの樹立、さらに、キメラマウスの作成も試みて、発生各段階におけるPDX-1遺伝子発現を経時的に観察する。一方、ES細胞において、RNAiの効果が持続しないという問題が生じているため、分化した細胞とES細胞において、持続時間や配列依存性などについて比較検討し、ES細胞に適用可能なRNA interference技術の確立を目指す。体細胞核移植クローン技術および配偶子作出を経た顕微授精技術の開発を行い、実際に疾患モデル細胞への応用を進める。一連の解析結果により、疾患モデル細胞を作製し、細胞から個体までの各段階における解析が可能になると考えられる。

2. 研究実施内容

(1) ロボットを用いた細胞操作条件の最適化

既に開発済みのロボット1号機を用いて、細胞操作条件や遺伝子導入条件、遺伝子導入後の細胞操作条件等について検討し、操作性の向上を目指して、ハードおよびソフトを改良ないし新規開発した。なお、作業は中央精機グループとの共同で行った。その結果、従来のジョイスティックに加え、トラックボール（速度：低速3段階、方向：キャピラリー軸方向）とジョグダイヤル（速度：低速3段階、方向：キャピラリー軸方向）を、新たな刺入用キャピラリー微制御方式に組み込んだ（図1）。また、動物細胞への適応を考え、新たにピエゾ型マニピュレータを独自に開発した。さらに、破損したキャピラリーを迅速かつ精密に交換するために、キャピラリーワンタッチ交換方法を新たに開発し、細胞座標登録等のデータ表示などを行なうためのコンピューターディスプレイのハード及びソフトを設計・製作し、キャピラリーをワンタッチで交換できるような治具を新たに開発した。



図1 単一細胞操作支援ロボット

（2）単一ES細胞の遺伝子改変のための要素技術の開発

500 nm単位の位置制御は十分可能であるが、ES細胞等20 μm前後の細胞にインジェクションする場合を想定し、技術開発を行った。具体的

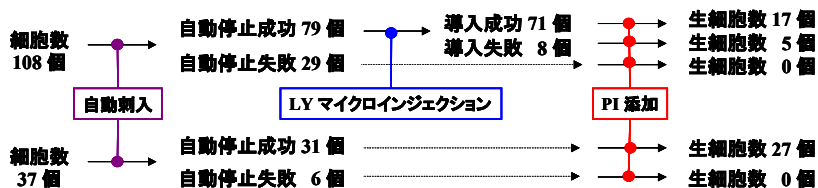


図2 自動刺入によるES細胞への電気泳動的マイクロインジェクション

には、位置制御性の向上と細胞の弾性を考慮したインジェクションモードを新たに開発した。この開発したシステムを用いて、ES細胞へのインジェクション成功率の向上を図ることができた（図2）。

(3) 糖尿病関連遺伝子の発現機能阻害条件の検討

マイクロインジェクション法を用いた疾患モデル細胞を開発する場合、複数の遺伝子導入可能であることが最大のメリットである。そこで、2種類の組み合わせで機能阻害することにより、糖尿病が起こることが十分予測される、IRS-1（Insulin Receptor Substrate-1）、PDX-1、SHP、IRS-2、GK（MODY2）、Kir6.2の6種類の糖尿病関連遺伝子を選んだ。

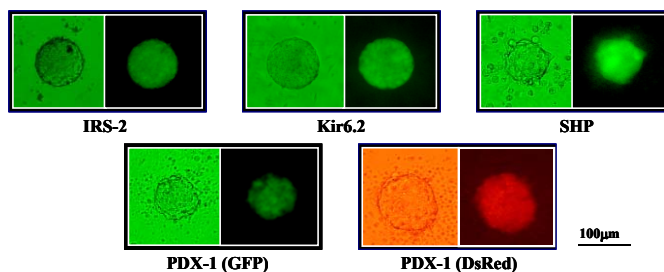


図3 糖尿病関連遺伝子発現の可視化

機能阻害実験の方法としてRNAi法を選んでいるため、まず、6種類の遺伝子のcDNAを

それぞれクローニングした。その結果、IRS-1(2,931 bp)、PDX-1(952 bp)、SHP(810 bp)、IRS-2(3,042 bp)、GK(1,555 bp)、Kir6.2(1,200 bp)のcDNAを得ることができた。そこで、これらの遺伝子発現状態を

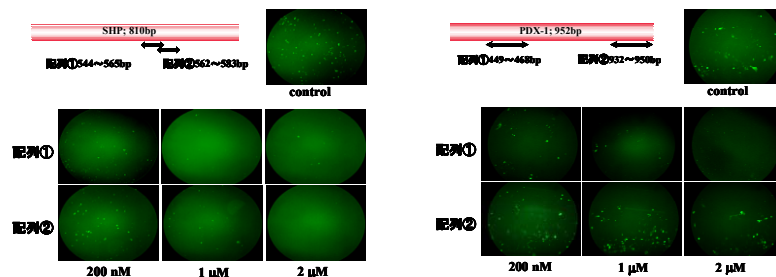


図4 siRNAによる発現阻害結果

EGFPおよびDsRedを用いて、6種類の遺伝子のES細胞内における発現状態を一過的に可視化することもできた(図3)。そこで、これらの細胞にRNAiによる発現阻害の予備実験を行ったところ、6種類全ての遺伝子について、発現阻害効果を確認できた。しかし、に示すように、ターゲット配列によって阻害効果を示さない場合も見られた一方、濃度依存的に遺伝子発現を抑制する場合も見られた(図4)。

(4) PDX-1ノックアウトES細胞の作製およびES細胞からβ細胞への分化

PDX-1は転写因子であり、その遺伝子を破壊することにより膵島の無形成異常が起きること、またその遺伝子変異によりインスリン分泌不全がおこることが知られている。そこで、平成15年度には、PDX-1の遺伝子部位にGFP遺伝子をヘテロにノックインすることによってPDX-1発現を可視化したES細胞を樹立し、現在、このES細胞を用いてキメラマウスを作製中である。また、ES細胞からインスリン分泌細胞へ分化することもできた(図5)。

インスリン染色

位相差像

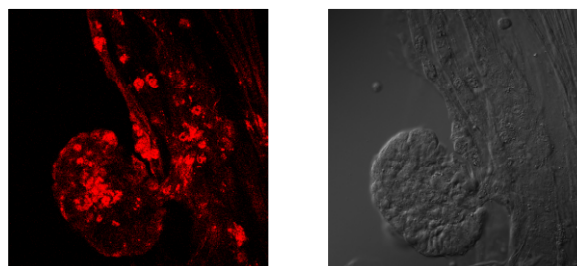


図5 ES細胞から分化したインスリン分泌細胞

(5) ES細胞、体細胞および生殖細胞を用いた核移植クローン効率の比較検討

疾患モデル細胞からの核移植クローン個体の作出のための基礎技術を開発するためには、体細胞核移植クローン技術の効率を実用レベルにしなくてはならない。そこで、平成15年度には、クローン作製におけるドナー細胞の違いの比較およびクローンマウス産子の遺伝子発現パターンについて解析した。その結果、卵丘細胞、セルトリ細胞、胎仔線維芽細胞、尾部線維芽細胞、胎仔生殖細胞、リンパ球系細胞、成体幹細胞、ES細胞をドナー細胞として用いた場合について、クローンマウスを作製することができた。産子率は、ドナー細胞としてセルトリ細胞、リンパ球系細胞を用いた場合が最も高く、10%程であったのに対して、これ以外の細胞で

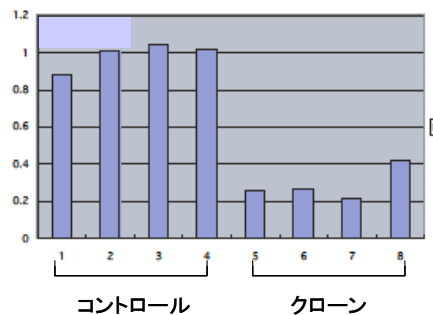


図6 クローンマウス産子の遺伝子発現パターン解析

は数%であった。また、クローンマウス産子の遺伝子発現パターン解析では、卵丘細胞クローンおよびセルトリ細胞クローン産子に共通して、2倍以上に増加する遺伝子（肝臓、腎臓、脳）および半分以下に減少する遺伝子（肝臓、腎臓、脳）を特定することができた（図6）。

（6）マウスES細胞における系統的遺伝子発現抑制技術の開発

ホモ変異体ES細胞の作出を可能とするジーントラップ法を確立し、これによって系統的な変異ES細胞の創製を可能にすることを究極の目的としている。今年度は、薬剤選別する場合の濃度を高濃度にするこ
とで、ホモ変異体を選択できるか検討した。その結果、ピューロマイシンの濃度を 10^{-7} の濃度で薬剤選別した結果、ホモ変異体を得ることができた。また、このES細胞を胚盤胞へ注入しキメラ胚を作製したところ、胚全体に均一遺伝子導入がされたキメラ胚を得ることができた（図7）。

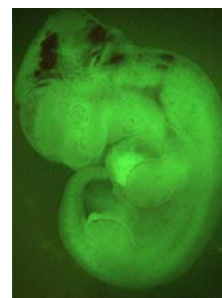


図7 キメラ胚の解析

3. 研究実施体制

松岡グループ

①研究分担グループ長：松岡英明（東京農工大学・教授）

②研究項目：

- (1) ロボットを用いた細胞操作条件の最適化
- (2) 疾患原因遺伝子に関する既往の知見の収集と機能発現機構の考察
- (3) 単一ES細胞の遺伝子改変のための要素技術の開発
- (4) クローンマウスおよび未成熟マウスの各部組織からの疾患モデル細胞の収集と機能解析

稲垣グループ

①研究分担グループ長：稲垣暢也（秋田大学・教授）

②研究項目：

- (1) 疾患原因遺伝子を標的として改変した細胞の作成と細胞機能解析

小倉グループ

①研究分担グループ長：小倉淳郎（理化学研究所・室長）

②研究項目：

- (1) クローン作製におけるドナー細胞の違いの比較
- (2) クローンマウス産子の正常・異常判定及び遺伝子発現パターン解析
- (3) クローンマウス及び未成熟マウスの各部組織からの疾患モデル細胞の収集

丹羽グループ

①研究分担グループ長：丹羽仁史（理化学研究所・グループリーダー）

②研究項目：

- (1) 新規ジーンとラップ法による遺伝子マーキング

(2) 変異ES細胞の系統的作出とその解析法の確立

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

- Mikako Saito, Hideaki Matsuoka and Kunihiro Kasamo, “Isolation of H⁺-translocating ATPase in tonoplast of *Tradescantia virginiana* L. leaf cells”, *J. Biotechnol.*, **100**(3), 221-229 (2003).
- Mikako Saito, Shigetoshi Horikiri and Hideaki Matsuoka, “Dielectrophoretic selection of viable single-cells of rice and tobacco”, *Electrochemistry*, **71**(6), 446-448 (2003).
- Mikako Saito, Yoshiko Mukai, Tamu Komazaki, Ki-Bong Oh, Yoko Nishizawa, Masamitsu Tomiyama, Naoto Shibuya and Hideaki Matsuoka, “Expression of rice chitinase gene triggered by the direct injection of Ca²⁺”, *J. Biotechnol.*, **105**(1/2), 41-49 (2003).
- Hideaki Matsuoka, Kanenari Oishi, Masaaki Watanabe, Ikuko Kozono, Mikako Saito and Shizunobu Igimi, “Viable cell detection by the combined use of fluorescent glucose and fluorescent glycine”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **67**(11), 2459-2462 (2003).
- Tanaka, Y., Yamada, K., Zhou, C.-J., Ban, N., Shioda, S., and Inagaki, N. Temporal and spatial profiles of ABCA2-expressing oligodendrocytes in the developing rat brain. *J. Comp. Neurol.* 455: 353-367, 2003.
- Zheng, Y.-J., Furukawa, T., Tajimi, K., and Inagaki, N. Cl⁻ channel blockers inhibit transition of quiescent (G₀) fibroblasts into the cell cycle. *J. Cell Physiol.* 194: 376-383, 2003.
- Yuan, H., Yamada, K., and Inagaki, N. Multiminute oscillations in mouse substantia nigra pars reticulata neurons *in vitro*. *Neurosci. Lett.* 355: 136-140, 2004.
- Yuan, H., Yamada, K., and Inagaki, N. Glucose sensitivity in mouse substantia nigra pars reticulata neurons *in vitro*. *Neurosci. Lett.* 355: 173-176, 2004.
- Yoneda, K., Furukawa, T., Zheng, Y.-J., Momoi, T., Izawa, I., Inagaki, M., Manabe, T., and Inagaki, N. An autocrine/paracrine loop linking keratin 14 aggregates to TNF α -mediated cytotoxicity in a keratinocyte model of *epidermolysis bullosa simplex*. *J. Biol. Chem.* 279: 7296-7303, 2004.
- Inoue K, Ogonuki N, Mochida K, Yamamoto Y, Takano K, Kohda T, Ishino F, and Ogura A: Effects of Donor Cell Type and Genotype on the Efficiency of Mouse Somatic Cell Cloning. *Biol. Reprod.*, 69: 1394-1400, 2003.
- Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Ogura A, Toyokuni S, and

- Shinohara T: Long-Term Proliferation in Culture and Germline Transmission of Mouse Male Germline Stem Cells. *Biol. Reprod.*, 69: 612-616, 2003.
- Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Ogura A, Toyokuni K, Kogishi T, Honjo T, and Shinohara T: Allogeneic offspring produced by male germ line stem cell transplantation into infertile mouse testis. *Biol. Reprod.*, 68: 167-173, 2003.
 - Kanatsu-Shinohara M, Ogonuki N, Inoue K, Ogura A, Toyokuni S, and Shinohara T: Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreserved male germline stem cells. *Hum. Reprod.*, 18: 2660-2667, 2003.
 - Ogonuki N, Mochida K, Inoue K, Matsuda J, Yamamoto Y, Takano K, and Ogura A: Fertilization of Oocytes and Birth of Normal Pups Following intracytoplasmic Injection with Spermatids in *Mastomys (Praomys coucha)*. *Biol. Reprod.*, 68: 1821-1827, 2003.
 - Ogonuki N, Tsuchiya H, Hirose Y, Okada H, Ogura A, and Sankai T: Pregnancy by the tubal transfer of embryos developed after injection of round spermatids into oocyte cytoplasm of the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *Hum. Reprod.*, 18: 1273-1280, 2003.
 - Ogura A, Ogonuki N, Inoue K, and Mochida K: New microinsemination techniques for laboratory animals. *Theriogenology*, 59: 87-94, 2003.
 - Fulka-Jr J, Miyashita N, Nagai T, and Ogura A: Do cloned mammals skip a reprogramming step? *Nat Biotechnol*, 22: 25-26, 2004.
 - Inoue K, Ogonuki N, Yamamoto Y, Takano K, Miki H, Mochida K, and Ogura A: Tissue-specific distribution of donor mitochondrial DNA in cloned mice produced by somatic cell nuclear transfer. *Genesis*, (in press), 2004.
 - Kai M, Irie M, Okutsu T, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Yokoyama M, Migishima R, Muguruma K, Fujimura H, Kohda T, Ogura A, Kaneko-Ishino T, and Ishino F: The Novel Dominant Mutation *Dspd* Leads to a Severe Spermiogenesis Defect in Mice. *Biol. Reprod.*, 70: 1213-1221, 2004.
 - Miki H, Lee J, Inoue K, Ogonuki N, Noguchi Y, Mochida K, Kohda T, Nagashima H, Ishino F, and Ogura A: Microinsemination with first-wave round spermatids from immature male mice. *J. Reprod. Dev.*, 50: 131-137, 2004.
 - Ohgane J, Wakayama T, Senda S, Yamazaki Y, Inoue K, Ogura A, Marh J, Tanaka S, Yanagimachi R, and Shiota K: The *Sall3* locus is an epigenetic hotspot of aberrant DNA methylation associated with placentomegaly of cloned mice. *Genes Cells*, 9: 253-60, 2004.
 - Tateishi, S., Niwa, H., Miyazaki, J.-I., Fujimoto, S., Inoue, H. and Yamaizumi, M. :Enhanced genomic instability and defective postreplication

repair in RAD18-knockout mouse embryonic stem cells, *Mol. Cell. Biol.*, 23, 474-481, 2003.

- Tokuzawa, Y., Kaiho, E., Maruyama, M., Takahashi, K., Mitsui, K., Maeda, M., Niwa, H. and Yamanaka, S. :Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for ES cell self-renewal and mouse development. *Mol. Cell. Biol.*, 23, 2699-2708, 2003.
- Shimosaki, K., Nakashima, K., Niwa, H. and Taga, T. :Involvement of Oct3/4 in the enhancement of neuronal differentiation of ES cells in neurogenesis-inducing cultures. *Development*, 130, 2505-2512, 2003.
- Ishida, C., Ura, K., Hirao, A., Sasaki, H., Toyoda, A., Sakaki, Y., Niwa, H., Li, E., Kaneda, Y. :Genomic organization and promoter analysis of the *Dnmt3b* gene. *Gene*. 22:310, 151-9, 2003.
- Hatano, N., Mori, Y., Oh-hora, M., Kosugi, A., Fujikawa, T., Nakai, N., Niwa, H., Miyazaki, J., Hamaoka, T., Ogata, M :Essential role for ERK2 mitogen-activated protein kinase in placental development. *Genes Cells.*, 8, 847-56, 2003.

(2) 特許出願

平成14年度特許出願件数：2件（CREST研究期間累積件数：2件）