

「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 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、さらには自動化を目指すことを第一の目標に掲げている。平成16年度までの成果として、2号機を製作し実験者が細胞操作を行いやすいように、ジョイスティックを機能的なものとした。また、細胞位置座標登録等のデータ表示などを行うためのコンピューターディスプレイのハードおよびソフトを設計・製作し、実際にES細胞へのインジェクションを行い、完成度を評価した。疾患関連遺伝子として、糖尿病遺伝子に着目し代表的な8種類のcDNAをクローニングし、これらの遺伝子発現状態をEGFPあるいはDsRedを用いることで、ES細胞内における発現状態を安定的に可視化することができる形質転換体ES細胞の開発に成功している。さらに、これらの細胞にRNAi法による発現阻害条件を検討した。さらに、ES細胞からインスリン分泌細胞への分化誘導およびES細胞におけるRNAi効果に関する予備的実験結果も得ている。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細胞を樹立し、これを用いてキメラマウスを作製すると共に、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することができた。さらに、ES細胞においてRNAi法に用いる配列の選択方法を確認することができた。

今後は、ロボットの完成度の評価に基づき改良を加え、顕微鏡下で測定できる、インスリン検出ユニットを開発すると同時に、単一細胞操作支援ロボットを様々な研究分野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可視化マウスの作出、さらに、キメラマウスの作出も試みて、発生の各段階におけるPDX-1遺伝子発現を経時的に観察する。また、ES細胞に適用可能なRNA interference技術の確立を目指すと同時に、8種類の糖尿病関連遺伝子についてshRNAを恒常的に発現するベクターを開発し、8種類の遺伝子が安定に発現阻害された、新規なES細胞を樹立する。さらに、体細胞核移

植クローン技術および生殖幹細胞からの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機能評価

平成15年度に新たに開発した、単一細胞操作支援ロボット（2号機）を用いて、細胞操作条件や遺伝子導入条件および遺伝子導入簿の細胞操作条件等について様々な角度から検討し、ロボットを構成する各種要素技術の向上を目指した。その結果、実験者が細胞操作を行いやすいように、ジョイスティックを機能的なものとした。また、細胞位置座標登録等のデータ表示などを行うためのコンピューターディスプレイのハードおよびソフトを設計・製作し、実際にES細胞へのインジェクションを行い、完成度を評価した。

(2) 単一ES細胞の遺伝子改変のための要素技術の開発

250 nm単位の位置制御は十分可能になったが、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。さらに、ES細胞等の非常に小さい細胞への遺伝子導入には、遺伝子導入量の精密な制御が必要になるため、キャピラリーの形状等を十分検討した結果、ES細胞への外来遺伝子のインジェクション成功率が10%以上と、飛躍的に向上させることができた。

(3) 糖尿病関連遺伝子の発現機能阻害条件の検討

疾患関連遺伝子として糖尿病に着目し、その中の8種類の遺伝子についてcDNAのクローニングに成功した。さらに、これらの遺伝子発現状態をEGFPあるいはDsRedを用いることで、これら8種類のES細胞内における発現状態を安定的に可視化することができる形質転換体ES細胞の開発にも成功した。さらに、これらの細胞にsiRNAを用いて発現阻害条件を検討し、最適なsiRNA配列を決定することができた。

(4) ES細胞からインスリン産生細胞への分化

マウスES細胞からインスリン産生細胞への分化については、既にその方法が報告されていた。そこで、その方法を追試すると共に、分化効率を上昇させることを目的として、既に分化因子として知られているアクチビンおよびレチノイン酸の影響を調べた。また、インスリンを産生する細胞（MIN6細胞）との共培養の影響についても調べた。その結果、従来分化因子として知られていた濃度範囲においては、インスリン産生細胞への分化に影響を及ぼさなかった。また、MIN6細胞との共培養でも同様であり、今後複数の因子の複合効果について検討する必要があると考えられた。

(5) 糖尿病原因遺伝子を標的として改変した細胞の機能解析法の確立

糖尿病原因遺伝子を標的として改変した細胞の機能解析法の確立が目的である。そのために、培養皿上の細胞が分泌するインスリンなどの生体物質を含む培養液を直

接取り込み、抗体修飾ビーズを用いて固定・濃縮・分析を行うマイクロチップ及びそのシステムの開発を行う。本年度は、培養液を取り込むための流路形成、ビーズトラップ構造およびマイクロポンプの試作と駆動実験を行った。

試作したビーズトラップ付きマイクロポンプの写真を示す。シリコンの深堀反応性イオンエッチング(DRIE)技術を利用

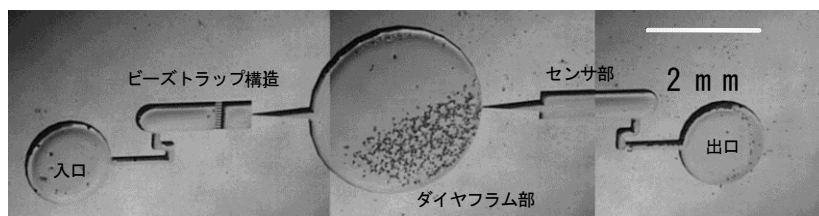


図 マイクロチップのシリコン構造部の全体写

して流路構造を形成した後にポリジメチルシロキサン(PDMS)シートを接着させた。PDMSシートをダイヤフラムとし、それを圧電振動子で変形させて送流させる。流路、ポンプ、入出口、ビーズトラップを含めた全サイズは2cm以下である。振動体を用いてダイヤフラムを周期振動させて液体の送流を行うことに成功した。マイクロポンプの流速は、圧電素子の駆動周波数と変位で nl/sec から $\mu\text{l/sec}$ まで調節可能であった。

今後は、分析のためのマイクロ電気化学センサとの一体化及び微量の薬液などの注入や排出を行うことができるバルブ構造の試作と集積化、ポンプ構造の駆動部も含めたシステムの小型化、培養皿と入出口との接続部のスマート化などについて試作検討を行う予定である。

(6) 遺伝子改変細胞の高効率作製法の開発

本研究ではタンパク質を細胞内に直接導入し、細胞内での遺伝子発現制御を行う新たな手法の開発を目的とする。タンパク質の細胞内導入にはHIVウイルス由来TATタンパク質のProtein Transduction Domain(PTD)を利用し、インテグラーゼタンパク質の導入による外来遺伝子の高効率な染色体への組み込みと、転写因子NeuroD2タンパク質の導入による神経細胞分化の誘導を試みた。

前者については、マウス白血病ウイルス由来のインテグラーゼとTAT-PTDの融合タンパク質を大腸菌内で発現し、精製を行った。現在in vitroにおいてオリゴDNAを基質として活性測定を行っている。一方、転写因子NeuroD2は神経細胞分化を担う。この転写因子とTAT-PTDの融合タンパク質を大腸菌内で発現させ、神経細胞分化の誘導を試みた。精製過程においてTAT-NeuroD2は不溶可し実験に十分量のタンパク質を得ることが出来なかった。一方、ネガティブコントロールとして用意したTAT配列を持たないNeuroD2も予想に反し細胞内に導入される事が確認された。更に、このNeuroD2を添加した神経前駆細胞であるN1E-115細胞では何も加えていない細胞に比べ、多くの細胞において神経突起の伸張が確認された。この結果からNeuroD2は細胞膜透過能を有し、更には神経細胞分化を誘導する可能性が示唆された。

(7) 疾患原因遺伝子を標的として改変した細胞の作製と細胞機能解析

転写因子のPDX-1は、マウスにおける遺伝子破壊により膵島の無形成異常が起きること、また遺伝子変異によりヒトにおいてもインスリン分泌不全がおこることが知られている。マウスの個体内におけるPDX-1陽性細胞の動態を観察し、採集する目的で、平成16年度には、pdx-1遺伝子部位にEGFP遺伝子をノックインしたES細胞細胞を用いてpdx-1遺伝子発現を可視化したノックインマウスの作製を試みた。キメラマウスは生まれたが、ノックインマウスの樹立に成功しなかったため、新たにターゲティングベクターを作製し、ES細胞を樹立、現在キメラマウスを作製中である。

一方、AMP-activated protein kinase (AMPK) は細胞内のAMPにより活性化されるプロテインキナーゼであることから、細胞内の代謝センサーとして機能している可能性があり、また脂質代謝酵素の調節因子でもあることから、生体における糖脂質代謝に深く関わっている可能性がある。平成16年度は、AMPKのconstitutive active formやdominant negative formの発現ベクターを作製し、膵β細胞でこれらを過剰発現させたトランスジェニックマウスを現在作製中である。

これまでにABCトランスポーターABCA3をヒト肺からクローニングし、ABCA3が肺サーファクタントの分泌に関与している可能性を提唱してきた。最近、ABCA3遺伝子異常により先天性のサーファクタン欠損症を引き起こすことが報告された (Shulenin et al. N. Eng. J. Med. 350: 1296-1303, 2004)。平成16年度には、これらの患者に認められる遺伝子異常の一部で、ABCA3蛋白の細胞内のソーティングに異常を来すことを明らかにした。

(8) 疾患モデル細胞からの核移植クローン個体の作出およびその基礎技術開発

疾患モデル細胞から直接疾患モデル動物を作出するための核移植クローンおよび多分化細胞株の樹立を行った。1) 核移植クローン：注入核移植法により再構築した遺伝子改変ES細胞 (PDX-1 +/-) のクローン胚の *in vitro* の発生は良好であり、50-70%を胚移植に用いることができた。胚移植後は 10-40%の胚が妊娠中期まで発生したものの、その後流産した。そこで核移植クローンの技術改善に資するデータを得るために、造血幹細胞、神経幹細胞、間葉系幹細胞およびNKT細胞を用いてクローンを行った。その結果、クローン特異的な2-cell 発生停止に関連する遺伝子を4つ同定することができた。またドナー細胞の未分化度とクローンの効率とは相関がないことが示され、特に NKT細胞での高効率が顕著であった。2) 生殖幹細胞株の樹立：新生仔マウスおよびウサギより採取した生殖細胞より生殖幹細胞株の樹立を試みた結果、マウスおよびウサギで雌雄ともにコロニーの樹立に成功した。特にウサギの雌由来細胞での増殖が顕著であった。これらの一部を細胞密度を調整することにより、サルなどのES細胞と類似した細胞コロニーを得ることができた。以上より、ES細胞を用いたクローンの系とともに、遺伝子改変を行った体細胞クローンおよび生殖幹細胞を用いる系による疾患モデル動物作出の基盤技術を開発することができた。

(9) ES細胞における効率的遺伝子ノックダウン法の開発

本年度は主にRNAiを用いたノックダウン法のマウスES細胞における最適化について検討を行うことを目的とし、RNAi法の効果に影響する因子として、1) 用いる配列の選択方法、2) 導入する細胞の種類、3) 導入方法、に着目して解析を進めた。その結果、1) 用いる配列の選択については、基本的には東京大学の程らが報告したルールに従えば、約60%で有意なノックダウン効果(20%以下に減少)をES細胞で与えることを確認した。2) 導入細胞の種類によるRNAiの効果の差異を、ES細胞とHeLa細胞を用いて比較検討したところ、ES細胞の方がより高い配列依存性を示すことを見いだした。3) 導入方法として、オリゴRNAを用いる方法と、short-heirpin(sh) RNAを発現させる方法を比較したところ、shRNAでノックダウン効果を持続させても、得られるノックダウン効果の程度には有意な影響を与えないことを明らかにした。

上記方法を用いて、転写因子NanogのマウスES細胞における機能的閾値は10%以下であることを確認した。

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機能評価
 - (2) 単一ES細胞の遺伝子改変のための要素技術の開発
 - (3) 糖尿病関連遺伝子の発現機能阻害条件の検討
 - (4) ES細胞からインスリン産生細胞への分化
 - (5) 糖尿病原因遺伝子を標的として改変した細胞の機能解析法の確立
 - (6) 遺伝子改変細胞の高効率作製法の開発

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製と細胞機能解析

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) 疾患モデル細胞からの核移植クローン個体の作出およびその基礎技術開発

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) ES細胞における効率的遺伝子ノックダウン法の開発

4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Kenji Hashimoto, Mikako Saito, Hideaki Matsuoka, Kazuko Iida and Hidetoshi Iida, “Functional analysis of a rice putative voltage-dependent Ca^{2+} channel, OsTPC1, expressed in yeast cells lacking its homologous gene *CCHI*”, *Plant Cell Physiol.*, **45**(4), 496-500 (2004).
- Tomonori Shinya, Kazunari Hanai, Mikako Saito and Hideaki Matsuoka, “Isolation of a novel isozyme of tobacco BY-2 chitinase induced by a fungal elicitor”, *Plant Biotechnol.*, **21**(2), 155-158 (2004).
- Tomonori Shinya, Shinobu Gondo, Hiroshi Iijima, Kazunari Hanai, Hideaki Matsuoka and Mikako Saito, “Cell-lytic activity of tobacco BY-2 induced by a fungal elicitor from *Alternaria alternata* attributed to the expression of a class I β -1,3-glucanase gene”, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**(6), 1265-1272 (2004).
- Mikako Saito, Tomonori Shinya, Kazunari Hanai, Tetsuya Katagi and Hideaki Matsuoka, “A novel chitinase isozyme in tobacco BY-2 cells induced by the autoclaved *Alternaria alternata* culture medium”, *Plant Sci.*, **167**(4), 811-817 (2004).
- Mikako Saito, Ayako Saga and Hideaki Matsuoka, “Production of a cloned mouse by nuclear transfer from a fetal fibroblast cell of a mouse closed colony strain”, *Exp. Anim.*, **53**(5), 467-469 (2004).
- Hideaki Matsuoka, Tamu Komazaki, Yoshiko Mukai, Meiri Shibusawa, Hirotohi Akane, Akihiko Chaki, Norio Uetake and Mikako Saito, “High throughput easy microinjection with a single-cell manipulation supporting robot”, *J. Biotechnol.*, **116**(2), 185-194 (2005).
- H. Kaji, M. Kanada, D. Oyamatsu, T. Matsue and M. Nishizawa, “A microelectrochemical approach to induce local cell adhesion and growth on substrate”, *Langmuir*, **20**, 16-19 (2004).
- K. Takoh, A. Takahashi, T. Matsue and M. Nishizawa, “A porous membrane-based microelectroanalytical technique for evaluating locally stimulated culture cells”, *Anal. Chim. Acta*, **522**, 45-49 (2004).
- H. Kaji, K. Tsukidate, T. Matsue and M. Nishizawa, “In situ control of cellular growth and migration on substrate using microelectrodes”, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**(46), 15026-15027 (2004).
- Y. Takii, H. Kaji, T. Matsue and M. Nishizawa, “Microstamp-based micromachining for modulation of growth of cultured neuronal cells”, *JSME Int. J. Series C*, **47**, 956-961 (2004).

- 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.
- Yoshida, I., Ban, N. and Inagaki, N., Expression of ABCA3, a causative gene for fatal surfactant deficiency, is up-regulated by glucocorticoid in lung alveolar type II cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 323: 547-555, 2004.
- Nagata, K., Yamamoto, A., Ban, N., Tamaka, A. R., Matsuo, M., Kioka, N., Inagaki, N. and Ueda, K., Human ABCA3, a product of a responsible gene for *abca3* for fatal surfactant deficiency in newborns, exhibits unique ATP hydrolysis activity and generates intracellular multilamellar vesicles. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324: 262-268, 2004.
- Wulf, G. G., Modlich, S., Inagaki, N., Reinhardt, D., Schroers, R., Griesinger, F. and Trümper, L., ABC transporter ABCA3 is expressed in acute myeloid leukemia blast cells and participates in vesicular transport. *Haematologica* 89: 1395-1397, 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*, 39: 79-83, 2004.
- Kanatsu Shinohara, M., Inoue, M., Lee, J., Yoshimoto, M., Ogonuki, N., Miki, H., Baba, S., Kato, T., Kazuki, Y., Toyokuni, S., Oshimura, M., Heike, T., Nakahata, T., Ishino, F., Ogura, A. and Shinohara, T.: Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell*, 119: 1001-1012, 2004.
- Miki, H., Inoue, K., Ogonuki, N., Mochida, K., Nagashima, H., Baba, T. and Ogura, A.: Cytoplasmic asters are required for progression past the first cell cycle in cloned mouse embryos. *Biology of Reproduction*, 71: 2022-2028, 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. *Journal of Reproduction and Development*, 50: 131-137, 2004.

- Miki, H., Inoue, K., Kohda, T., Honda, A., Ogonuki, N., Yuzuriha, M., Mise, N., Matsui, Y., Baba, T., Abe, K., Ishino, F. and Ogura, A.: Birth of mice produced by germ cell nuclear transfer. *Genesis*, 41: 81-86, 2005.
- Mochida, K., Wakayama, T., Takano, K., Noguchi, Y., Yamamoto, Y., Suzuki, O., Matsuda, J. and Ogura, A.: Birth of offspring after transfer of mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) embryos cryopreserved by vitrification. *Molecular Reproduction Development*, 70: 464-470, 2005.
- Masui, S., Shimosato, D., Toyooka, Y., Yagi, R., Takahashi, K. and Niwa, H.: An efficient system to establish multiple embryonic stem cell lines carrying an inducible expression unit. *Nucleic Acids Res.*, 33, e43, 2005.

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：5件（CREST研究期間累積件数：7件）