

「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、さらには自動化を目指すことを第一の目標に掲げている。平成 17 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。既存の顕微画像処理プログラムとリンクさせるソフト開発を行った。その結果、細胞位置登録機能を顕微鏡下で行っていたものを、コンピュータディスプレイ上での高精度細胞座標登録が可能となった。疾患関連遺伝子として、8 種類の糖尿病関連遺伝子について siRNA 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 細胞を樹立することに成功している。さらに、2 種類のノックダウン ES 細胞からインスリン分泌細胞への分化誘導にも成功した。また、糖尿病と同じ脂質代謝に関与する ABC トランスポーター ABCA3 遺伝子を単離・同定し、そのノックアウトマウスの樹立にも成功した。さらに、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ところ、高濃度の薬剤選択により、効率よく変異遺伝子座をホモに持つ細胞を選別できることを確認するとともに、挿入された遺伝子座間で至適濃度に大きな違いあることも確認できた。

今後は、ロボットの完成度の評価に基づき改良を加える。具体的には、ジョイスティックを高機能化させて、全ての操作をジョイスティックに集中させる。さらに、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、8 種類の糖尿病関連遺伝子をノックダウンさせた 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、キメラマウスの作出も試みて、発生の各段階における糖尿病関連遺伝子の発現を経時的に観察する。さらに、SHP および GK の遺伝子部位に GFP 遺伝子をヘテロにノックインした ES 細胞を作製し、それらを用いて、キメラマウスの作製およびノックアウトマウスの作製を行う。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安定に発現阻害された、かつ、様々なノックダウン率を有するES細胞を樹立する。さらに、ダブルノックダウンES細胞を樹立する。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

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、既存の顕微画像処理プログラムとリンクさせるソフト開発を行った。その結果、細胞位置登録機能を顕微鏡下で行っていたものを、コンピューターディスプレイ上での高精度細胞座標登録が可能となった。

(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。さらに、複数の遺伝子の同時導入も可能となり、その成功率も10%以上であった。

(3) 糖尿病関連遺伝子の発現機能阻害条件の検討およびノックダウンES細胞の樹立

平成16年度に、糖尿病関連遺伝子のうち、代表的な8種類の遺伝子について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、最適条件を決定している。そこで今年度は、昨年度に得られた阻害条件に基づき、siRNAを恒常的に発現するベクターを開発してES細胞へ導入し、安定に発現阻害する細胞を開発した。その結果、8種類全ての遺伝子について、様々なノックダウン率を有する新規なES細胞を樹立することができた。

(4) ノックダウンES細胞からインスリン分泌細胞への分化

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おり、我々も追実験に成功している。そこで、上記で得られたノックダウンES細胞

胞のうち2種類のノックダウン ES 細胞からを用いて、インスリン分泌細胞への分化誘導を行ったところ、どちらの場合でもインスリン分泌細胞へ分化誘導することができ、分化後においてもノックダウンを維持することができた。

(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理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、プラスチック製マイクロチップを製作する方法を確立し、それを利用したマイクロポンプを試作し評価に供せるようにした。まず、微細加工で製作したモールドを用いたマイクロ成型法によりプラスチック製チップの製作技術を確立した。これまでは、シリコンや石英をモールドに用いた方法が提案され実施されてきたが、これらの材料は非常にもろく数回利用すると破壊してしまうのが課題であった。我々は機械強度に優れたシリコンカーバイトをドライエッチングで加工する技術を有しており、これで製作したモールドを用いることにより繰り返し使用可能なモールドの製作に成功した。このモールドを用いて、プラスチック製のバルブレスディフューザーマイクロポンプを試作した。プラスチックポンプ本体を使い捨てとし、アクチュエータ部と一体化させてサイコロ大サイズにコンパクトすることができた。このポンプを用いて毎分 7.8 μl の送液に成功している。

(6) タンパク質導入による遺伝子発現制御法の開発

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 ウィルス由来 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インテグレーションの高効率化と、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、マウス白血病ウィルス由来のインテグラーゼと TAT-PTD の融合タンパク質をコードするプラスミドを遺伝子工学的に作製した。しかしながら、得られた融合タンパク質は in vitro において蛍光オリゴ DNA を基質として活性測定を行ったが期待された活性は認められなかった。一方、転写因子 NeuroD2 は神経細胞分化を担う。この転写因子 NeuroD2 と TAT-PTD の融合タンパク質を作製し、融合タンパク質の導入による神経細胞分化制御を試みた。転写因子 NeuroD2 と TAT-PTD の融合タンパク質を大腸菌内で発現させ、融合タンパク質の精製し、細胞に添加した。予想に反し細胞内に導入される事が明らかになった。更に、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長が確認され、タンパク質導入による分化誘導が可能であることを明らかにした。

(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

糖尿病や肺サーファクタント欠損症をはじめとするさまざまな糖・脂質代謝疾患の

原因遺伝子を単離・同定すると同時に、単一あるいは複数の疾患原因遺伝子を破壊あるいは改変することにより、疾患モデル細胞を作成した細胞の機能解析を行ってきた。平成 17 年度は特に肺における脂質代謝に関与する ABC トランスポーター ABCA3 遺伝子の単離・同定、さらに日本人の患者において初めて遺伝子異常を発見した。またこれら変異 ABCA3 タンパクの細胞内局在・糖鎖修飾・ATP 結合能・ATP 加水分解能を検討し、遺伝子変異が分類出来る事を明らかにした。さらにターゲティングベクターとの相同性組み換えにより ES 細胞の ABCA3 遺伝子を欠損させ、ノックアウトマウスの樹立に成功した。一方、膵発生に関与する転写因子 PDX-1 の遺伝子を欠損させ GFP 遺伝子をノックインした ES 細胞の作製には成功したが、マウスの樹立には至っていない。平成 18 年以降の本事業を推進するにあたって、糖尿病の疾患モデル細胞の作製を継続しつつも、結果を残すためにはすでにノックアウトマウスの作製に成功している疾患モデル細胞に重点をおいて研究を進めることにより、細胞の機能を明らかにしていく。ABCA3 遺伝子以外にも、特に脳に強く発現し、脂質輸送に関与すると考えられる ABC トランスポーター ABCA2 遺伝子を破壊したノックアウトマウスの樹立にも成功していることから、ABCA2 及び ABCA3 の機能を解析すると同時に疾患との関わりについて検討する。

(8) 疾患モデル細胞からの体細胞核移植クローン技術および生殖幹細胞技術を用いた疾患モデル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の個体作出を目的として、核移植クローン動物作出、キメラ動物作出、および新規幹細胞の開発を行った。核移植クローン動物の作出では、神経幹細胞および造血幹細胞をドナーとしたクローンの作出を行い、その胚遺伝子発現パターンによりゲノム再プログラム化の指標を明らかにした。ES 細胞の核移植クローンでは、樹立後継代数の少ない ES 株を用いることにより初めて分娩期胎盤を得ることができた。ES 細胞クローンの残された障壁である、細胞周期の調節については、高密度培養および低血清により G0/G1 の細胞群を増加させることに成功した。RNAi をウイルスベクターで導入した ES 細胞からキメラ個体を作出することができた。今後、生殖系列への寄与を確認する。新規幹細胞として、ウサギの ES 細胞の樹立を試みた。ウサギは脂質代謝系など研究においてマウスよりも優れた人のモデルとなることが知られている。現在 4-19 継代数に至る 4 ラインを維持しており、胚様体形成などを確認した。また、レンチウイルスベクターによる遺伝子導入にも成功した。今後、キメラ形成能を確認する予定である。

(9) 新規ジーントラップ法による遺伝子マーキングおよび変異 ES 細胞の系統的作出とその解析法の確立

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。また、一方で ES 細胞に適用可能な RNA interference 技術の確立を目指す。これらによって、疾患モデル ES 細胞における網羅的

遺伝子解析システムの構築を目指すことを目的とした。染色体組み込みによる遺伝子発現への影響を遮断できるインスレーター配列を持つジーントラップベクターを構築することができた。また、ホモ変異体 ES 細胞作出の有用性を既知遺伝子ノックアウト ES 細胞を用いて検討したところ、Cdx2 遺伝子変異をホモに持つ ES 細胞を用いて、その機能が TS 細胞の自己複製に必須であることを示すことにより、ホモ変異体 ES 細胞を用いた研究の有用性を証明した。さらに、ES 細胞で一定の効果を示す siRNA 配列選択および導入法の検討を行ったところ、Ui-Tei らの報告に基づいて選択された siRNA 配列が、ES 細胞において効率良く機能することを証明した。

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（東京農工大学工学部、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およびノックダウン ES 細胞の樹立
 - (4) ノックダウン ES 細胞からインスリン分泌細胞への分化
 - (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) タンパク質導入による遺伝子発現制御法の開発

「稲垣」グループ

- ①研究分担グループ長：稲垣 暢也（京都大学大学院医学研究科、教授）
- ②研究項目：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（理化学研究所バイオリソースセンター遺伝工学基盤技術室、室長）
- ②研究項目：疾患モデル細胞からの体細胞核移植クローン技術および生殖幹細胞技術を用いた疾患モデル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（理化学研究所発生・再生科学総合研究センター、チームリーダー）
- ②研究項目：新規ジーントラップ法による遺伝子マーキングおよび変異 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）

(1) 論文（原著論文）発表

- 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).
- Kenji Hashimoto, Mikako Saito, Hidetoshi Iida and Hideaki Matsuoka, "Evidence for the plasma membrane localization of a putative voltage-dependent Ca^{2+} channel, OsTPC1, in rice", *Plant Biotechnol.*, **22**(3), 235-239 (2005).
- Mikako Saito, Hiroaki Ochiwa, Ban Sato, Meiri Shibusawa, Aya Hayakawa, Terumi Yoda and Hideaki Matsuoka, "Knockdown of diabetes related genes in mouse ES cells and their differentiation into insulin-producing cells", *Transgenic Res.*, **14**(4), p.525, 111 (2005).
- Tomonori Shimakita, Yoshikazu Tashiro, Akira Katsuya, Mikako Saito and Hideaki Matsuoka, "Rapid separation and counting of viable microbial cells in food by nonculture method with bioplorer, a focusing-free microscopic apparatus with a novel cell separation unit", *J. Food Prot.*, **69**(1), (2006).
- Hideaki Matsuoka and Mikako Saito, "High throughput microinjection technology toward single-cell bioelectrochemistry", *Electrochemistry*, **74**(1), 12-18 (2006).
- Wang, Y., Yamada, K., Tanaka, Y., Ishikawa, K., and Inagaki, N. Expression of ABCA2 protein in human vestibular schwannoma and peripheral nerve. *J. Neurol. Sci.*, 232: 59-63, 2005.
- Ban, N., Sasaki, M., Sakai, H., Ueda, K., and Inagaki, N. Cloning of ABCA17, a novel, rodent sperm-specific ATP-binding cassette (ABC) transporter that regulates intracellular lipid metabolism. *Biochem. J.* 389: 577-585, 2005.
- Yorifuji, T., Nagashima, K., Kurokawa, K., Mamada, M., Kawai, M., Oishi, M., Akazawa, Y., Hosokawa, M., Yamada, Y., Inagaki, N., and Nakahata, T. The C42R mutation in the Kir6.2 (KCNJ11) gene as a cause of transient neonatal diabetes, childhood diabetes, or later-onset, apparently type 2 diabetes mellitus. *J. Clin. Endocr. Metab.* 90: 3174-3178, 2005.
- Tanaka, H., Miake, J., Notsu, T., Sonyama, K., Sasaki, N., Iitsuka, K., Kato, M., Taniguchi, S., Igawa, O., Yoshida, A., Shigemasa, C., Hoshikawa, Y., Kurata, Y., Kuniyasu, A., Nakayama, H., Inagaki, N., Nanba, E., Shiota, G., Morisaki, T., Ninomiya, H., Kitakaze, M., and Hisatome, I. Proteasomal degradation of Kir6.2 channel protein and its inhibition by a Na^+ channel blocker aprindine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331: 1001-1006, 2005.
- Yoneda, K., Kon, A., Demitsu, T., Inagaki, N., Sadahira, C., and Kubota, Y. Tunel positive keratinocytes in keratin disease. *J. Dermatol. Sci.* 40: 65-67, 2005.

- Yamada, K. and Inagaki, N. Neuroprotection by K_{ATP} channels. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 38: 945–949, 2005.
- Tamura, H., Takahashi, T., Ban, N., Torisu, H., Ninomiya, H., Takada, G., and Inagaki, N. Niemann–Pick type C disease: Novel mutations and characterization of concomitant acid sphingomyelinase deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 87: 113–121, 2006.
- Yoneda, K., Demitsu, T., Kon, A., Sadahira, C., Moriue, T., Katsuura, J., Matsuoka, Y., Takai, I., Noda, M., Inagaki, N., and Kubota, Y. Ubiquitination of molluscum body and its implications for pathophysiology. *Br. J. Dermatol.* 154: 786–789, 2006.
- Inoue K, Wakao H, Ogonuki N, Miki H, Seino K, Nambu–Wakao R, Noda S, Miyoshi H, Koseki H, Taniguchi M, and Ogura A. Generation of cloned mice by direct nuclear transfer from natural killer T cells. *Curr Biol*, 15: 1114–1118, 2005.
- Kohda T, Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Naruse M, Kaneko–Ishino T, Ogura A, Ishino F: Variation in gene expression and aberrantly regulated 1 chromosome regions in cloned mice. *Biol Reprod* 73:1302–1311, 2005.
- Ogura A, Ogonuki N, Miki H, and Inoue K Microinsemination and nuclear transfer using male germ cells. *Int Rev Cytol*, 246: 189–229, 2005.
- Kanatsu Shinohara, M., Miki, H., Inoue, K., Ogonuki, N., Toyokuni, S., Ogura, A., and Shinohara, T. Long-term culture of mouse male germline stem cells under serum- or feeder-free conditions. *Biol Reprod*, 72: 985–991, 2005.
- Kanatsu–Shinohara M, Miki H, Inoue K, Ogonuki N, Toyokuni S, Ogura A, and Shinohara T Germline niche transplantation restores fertility in infertile mice. *Hum Reprod*, 20: 2376–2382, 2005.
- Kanatsu–Shinohara M, Ogonuki N, Iwano T, Lee J, Kazuki Y, Inoue K, Miki H, Takehashi M, Toyokuni S, Shinkai Y, Oshimura M, Ishino F, Ogura A, Shinohara T Genetic and epigenetic properties of mouse male germline stem cells during long-term culture. *Development*, 132: 4155–63, 2005.
- Ogonuki N, Inoue K, Miki H, Mochida K, Hatori M, Okada H, Takeiri S, Shimozawa N, Nagashima H, Sanakai T, and Ogura A Differential development of rabbit embryos following microinsemination with sperm and spermatids *Mol Reprod Dev*, 72: 411–417, 2005.
- Yamagata K, Yamazaki T, Yamashita M, Hara Y, Ogonuki N, and Ogura A Noninvasive visualization of molecular events in the mammalian zygote. *Genesis*, 43: 71–79, 2005.
- Inoue K, Ogonuki N, Miki H, Hirose M, Noda S, Kim J–M, Aoki F, Miyoshi H, Ogura A. Inefficient reprogramming of the hematopoietic stem cell genome following nuclear transfer. *J Cell Sci* (in press) 2006.
- Miki H, Ogonuki N, Inoue K, Baba T, Ogura A. Improvement of cumulus-free oocyte

maturation in vitro and its application to microinsemination with primary spermatocytes in mice. J Reprod Dev (in press) 2006.

- Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Miki H, Ogonuki N, Toyokuni S, Ogura A, Shinohara T. Anchorage-independent growth of mouse male germline stem cells in vitro. Biol Reprod. (in press).
- Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R. and Rossant, J.: Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation. Cell, 123, 917-929, 2005.

(2) 特許出願

H17 年度出願件数：1 件（CREST 研究期間累積件数：8 件）