

京都大学	博士（医学）	氏名	櫻井 健二
論文題目	Efficient integration of transgenes into a defined locus in human embryonic stem cells (ヒト ES 細胞の特定遺伝子座への効率的な遺伝子導入)		
(論文内容の要旨)			
<p>ヒト ES 細胞は、自己複製能と多分化能を持ち、薬剤スクリーニングや再生医療の材料として期待されている。ヒト ES 細胞への遺伝子導入は、ヒト ES 細胞を目的に応じて改変するために重要な技術である。ランダムインテグレーションは最も簡単で一般的な遺伝子導入方法だが、ヒト ES 細胞にランダムインテグレーションで遺伝子導入しても、サイレンシングを起こして目的とする遺伝子がうまく機能しない場合が多い。また、導入した遺伝子が挿入されるゲノムの部位によっては、その部位の本来の機能が阻害されたり、逆に活性が上昇したりするなどの、意図しない影響が出る可能性がある。</p> <p>本学位論文では、ヒト ES 細胞において常に転写が活性化されており、かつ XX 染色体型では片側のアリルが破壊されても表現型に異常が生じないと考えられるハイポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ 1 (HPRT) 遺伝子座にドッキングサイトを導入し、簡便かつ高効率に HPRT 遺伝子座に遺伝子を導入する方法について報告している。</p> <p>まず、女性に由来するヒト ES 細胞株 KhES-1 の HPRT 遺伝子座に LoxP-ネオマイシン耐性遺伝子-LoxP-開始メチオニンを欠くハイグロマイシン耐性遺伝子で構成されるドッキングサイトをエレクトロポレーションによりターゲティングした。G418 耐性クローン中におけるターゲティングされていたクローンの割合は、約 1.4% であった。一連の処置を施した後も、この ES 細胞は未分化マーカーの発現を維持していた。</p> <p>次に、ドッキングサイトを保持する ES 細胞に対して、遺伝子置換を行なった。遺伝子置換とは、HPRT 遺伝子座上のドッキングサイトに、Cre/LoxP の組換えを介して好みの遺伝子を挿入することを指す。最初に、EF1<math>\alpha</math> プロモーター-Kozak 配列-ATG コドン-LoxP を持つ pInsert ベクターを構築した。ドッキングサイトを保持する ES 細胞に対して、pInsert ベクターと Cre 発現ベクターを共に遺伝子導入すれば、Cre/LoxP の組換えにより、一部の細胞はネオマイシン耐性遺伝子が脱落するのに加え、pInsert ベクターがドッキングサイトに挿入される。そして、ドッキングサイトに正しく pInsert ベクターが挿入された細胞のみがハイグロマイシン耐性を獲得する。即ち、遺伝子導入後にハイグロマイシンで選択することで、pInsert ベクターがドッキングサイトに正しく挿入された細胞が取得できる。pInsert ベクターに好みの遺伝子を搭載しておけば、その遺伝子は HPRT 遺伝子座に挿入され、サイレンシングの影響を受けないと期待される。</p> <p>pInsert に CAG-EGFP を搭載した pInsert-Tif-C</p>			

<p>AG-EGFP を用いて遺伝子置換を行なったところ、ハイグロマイシン耐性クローンが出現し、調べた全てのクローンが予想通り EGFP を発現していた。また、胚様体を形成させたり、神経に分化させたりしても、EGFP の発現は維持されていた。更に、誘導的遺伝子発現システムである Tet-On システムに必要な rtTA と TRE の 2 つのカセットを pInsert ベクターに搭載した pInsert-C TOR を構築し、TRE 下流に EGFP を配置した pInsert-C TOR-EGFP を遺伝子置換した。この方法で得られたハイグロマイシン耐性クローンはドキシサイクリン濃度依存的な EGFP の発現誘導能を持ち、三胚葉への分化能も保持していた。</p> <p>このように、遺伝子置換を用いることで、サイレンシングを起こさず導入遺伝子を安定的に発現するヒト ES 細胞の作製が可能になった。</p>
(論文審査の結果の要旨)
<p>ヒト胚性幹 (ES) 細胞を遺伝子改変し、安定して導入遺伝子を発現させることは、医学や創薬研究に貢献する基礎となる。本研究で申請者は、ハウスキーピング遺伝子 <i>HPRT</i> の遺伝子座に任意の遺伝子を挿入し、安定的にその遺伝子が発現するクローンを高効率に取得する方法を確立した。</p> <p>相同組換えにより、LoxP-Neo<sup>r</sup>-LoxP-Hygro<sup>r</sup> (開始コドン欠損) からなるドッキングサイトが <i>HPRT</i> 遺伝子座に挿入されたヒト ES 細胞のクローンが作出された。このクローンのドッキングサイトに対し、EF1<math>\alpha</math> プロモーター-開始コドン-LoxP カセットを含む pInsert ベクターと Cre 発現ベクターを共導入することで、hygromycin 選択により、ドッキングサイト特異的な組換え体を高効率に取得する方法が見出された。EGFP 発現カセットが <i>HPRT</i> 遺伝子座に挿入されたクローンは全てが EGFP を発現し、神経細胞に分化させた後も発現は維持されていた。また、Tet-On システムに必要な 2 つの遺伝子カセットを <i>HPRT</i> 遺伝子座に挿入した場合は、doxycycline の濃度依存的な目的遺伝子の発現増強が観察された。</p> <p>以上の研究は、組換え遺伝子の安定した発現機構の解析に貢献するのみならず、ヒト ES 細胞を用いた細胞分化研究や新薬開発に貢献する手法を提供し、医学に寄与するところが多い。</p> <p>したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 23 年 12 月 28 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>
要旨公開可能日： 年 月 日以降