

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「ゲノムスケールの DNA 設計・合成による細胞制御技術の創出」  
研究課題「ヒト／マウス人工染色体を用いたゲノムライティングと応用」

## 研究終了報告書

研究期間 2018年10月～2024年03月

研究代表者：香月 康宏  
(鳥取大学 染色体工学研究センター  
教授)

## § 1 研究実施の概要

### (1)実施概要

独自の HAC/MAC 技術を用いて、各研究グループが連携して3つのプロジェクトを実施した。

#### [1]基盤技術開発プロジェクト(香月/鈴木/水谷):

- HAC/MAC 保持ヒト細胞株パネルを作製し、複数同時遺伝子導入法(SIM 法)を用いて、簡便に複数の遺伝子導入が可能であるシステムを開発した(ユーザーは染色体導入不要)。
- DT40 細胞(simHDR 法)、CHO 細胞(SIM2 法)、マウス ES 細胞(トラフィックライト法)において効率的な複数遺伝子搭載法を開発した。
- 麻疹ウイルスエンベロープタンパク質を用いた微小核細胞融合法をヒト iPS 細胞に適応することで各種染色体ベクターのヒト iPS 細胞への導入に成功した。
- コルセミドに代わる新規化合物 2 種類を用いることで、染色体導入の効率化に成功した。
- 新規化合物 2 種類とウイルスエンベロープタンパク質を活用することで、ヒト iPS 細胞に保持された任意の染色体をヒト iPS 細胞やマウス ES 細胞に、A9 細胞等の異種細胞を介さず、直接導入することに成功した。
- 部位特異的組換え部位・酵素を使用することなく、MAC 上に特定のヒト染色体領域をクローニングする迅速染色体クローニング法を確立した。
- 人工染色体を可視化し、異種間核移植を介する方法および微小核細胞を介する方法により、ES 細胞を介さず TC マウスを作製することに世界で初めて成功した。

#### [2]ゲノム動作原理解明プロジェクト(香月/鈴木/冨塚/大関):

- 独自の染色体導入技術により、ヒト 21 番染色体導入マウス(TcMAC21)およびラット(TcHSA21rat)を作製し、ダウン症候群の表現型を示すモデル動物の作製に成功した。特に TcHSA21rat はダウン症モデルマウスで見られない表現型(小脳小葉の異常等)が観察されており、世界初のモデル動物として注目されている(Trends in Genetics 2022, Vol.38, No.11)。
- ゲノム領域がクローニングされた既存の細菌人工染色体(BAC)や PCR 断片、RA-RCR 断片を複数活用することにより、ヒト 21 番染色体について 1Mb の領域を MAC 上に搭載し、マウス Y 染色体について 3 つの遺伝子領域について MAC 上に搭載し、「染色体合成」のプロトコルを確立した。
- 迅速なコンソミックマウス作製法の開発に成功した。本手法により、Y 染色体について B6 系統 Y と 129 系統 Y を入れ換えることで、性行動の差が観察された。129 系統由来の Y 染色体上に上記性行動に関わる遺伝子が存在することが示唆された。
- ヒト 21 番染色体をターゲットにして、ボトムアップ法/トップダウン法により、最小化ゲノムの構築を進め、必須・非必須ゲノム領域マップの作成、新規必須遺伝子の同定に成功した。哺乳類におけるミニマルゲノムの構築は、合成生物学における重要な課題と位置づけられた。
- 合成ヒトセントロメア DNA を持つ HAC(大関さきがけ研究にて構築)を他種動物細胞に導入し、異種セントロメアの動作原理を解明する手がかりを得た。

#### [3]産業・医療応用プロジェクト(香月/冨塚):

- 完全長のヒト抗体遺伝子座を保持する人工染色体(Ig-NAC)上でヒト重鎖 D 領域をミニマル化(約 43kb⇒約 8kb)すること、および RA-RCR 法および OGAB 法を用いてカニクイザル重鎖 D 領域の合成 DNA(約 43kb)への置換に成功した。上記の多様性が拡張されたヒト抗体産生マウスにより、これまで解析が困難であったヒト免疫グロブリン遺伝子座の動作原理に関する新規知見を得ることに貢献し、新規な抗体医薬品創出に有用と考えられる。
- ヒト HLA 領域について、RA-RCR 法によりデザインした合成 HLA-A 領域を保持する MAC を構築し、ヒト iPS 細胞内で細胞表面発現を確認した。また、BAC による複数遺伝子搭載法により HLA クラス I 領域を保持する MAC を構築し、マウス個体内で細胞表面発現を確認した。HLA 領域のゲノム動作原理解明および創薬研究に活用できる有用なツールになると考えられる。

## (2)顕著な成果

### <優れた基礎研究としての成果>

#### 1. 遺伝子搭載用部位を保持する HAC/MAC を導入したヒト細胞株パネルの作製

概要:HAC/MAC 技術による遺伝子発現系は従来の Tg 技術と比較して有用性は高いが、HAC/MAC を目的細胞へと導入するための染色体導入法(MMCT 法)は大型機器の導入や手技習熟が必要であることから、HAC/MAC 技術の普及の妨げとなっていた。そこで、研究に広く用いられる種々の細胞株に遺伝子搭載用部位を保持する HAC/MAC を導入したヒト細胞株パネルを作製した。さらに、これらの HAC/MAC を保持するヒト細胞株に対して、複数同時遺伝子導入法(SIM 法)を用いて簡便に複数の遺伝子導入が可能であること等を実証した。

#### 2. 新規化合物 2 種類によるヒト染色体直接導入法の開発

概要:染色体導入法(MMCT)には主に A9 細胞、CHO 細胞等しか染色体供与細胞として活用できないことから、MMCTを汎用的技術とすることへの課題があった。従来のコルセミドに代わる化合物 2 種類を用いることで、ヒト iPS 細胞に保持された人工染色体あるいは正常ヒト染色体をヒト iPS 細胞やマウス ES 細胞に、A9 細胞等の異種細胞を介さず、直接導入することが世界で初めて可能となった。本技術により疾患原因となる個人の染色体や異種の染色体を容易に取り出すことができるため、疾患発症メカニズムの解明や異種ゲノム動作原理の解明に繋がることが期待される。

#### 3. 染色体蛍光ラベルによる TC マウス作製の効率化

概要:外来染色体導入(TC)マウスを作製するためには、MMCT によるマウス ES 細胞への外来染色体の導入、キメラマウスの作製を経て、交配という手順が必須であり、時間とコストがかかることが課題であった。本研究では外来染色体を保持する CHO 細胞から、異種核移植や微小核細胞を介して、蛍光ラベルした外来染色体をマイクロマニピュレーターで分取し移植することで、外来染色体を保持する TC マウスを迅速に作製することに世界で初めて成功した。本技術では ES 細胞を介さずに迅速に TC マウスが作製できるため、産業利用可能なヒト化モデル動物の作製や異種ゲノム動作原理解明のための TC マウス作製の効率化・汎用化に繋がることを期待される。

### <科学技術イノベーションに大きく寄与する成果>

#### 1. HAC/MAC 技術と RA-RCR 技術の融合によるデザイン細胞の創成

概要:合成 DNA によるデザイン細胞・動物の作製技術の開発には長鎖 DNA を細胞に導入し、目的の染色体として再構築する必要がある。上記課題解決のため、我々のチームで開発した HAC/MAC 技術と立教大学末次チームの開発した DNA 連結・増幅法である RA-RCR 技術とを融合することで、長鎖 DNA を保持する HAC/MAC の構築技術の開発に成功した。このような長鎖合成 DNA と HAC/MAC によるデザイン細胞の創成は学術研究から先端医療および産業に至る非常に幅広い領域に波及効果をもたらすことが期待される。

#### 2. ダウン症候群の種々の症状を呈する新規ダウン症候群モデルラットの作製

概要:独自の染色体工学技術により世界で初めてダウン症候群モデルラット「TcHSA21rat」の作製に成功した。これまでマウスにおいて不安定であったヒト 21 番染色体は「TcHSA21rat」の各組織で極めて安定に保持されることを明らかにした。「TcHSA21rat」ではダウン症様の種々の症状が観察され、特に小脳についてはこれまでモデルマウスでは認められなかった小脳小葉の分岐形成が低下していた。本研究成果はダウン症候群の様々な症状に対応する原因遺伝子の解明等のための有用な研究資材となることが期待される (2022 年 1 月 JST プレスリリース)。

#### 3. ヒト重鎖 D 領域改変によるヒト免疫グロブリン多様性拡張技術の確立

概要:ゲノム合成の対象として意義深い巨大遺伝子、ヒト免疫グロブリン(Ig)遺伝子座のデザイ

ン・合成により、種の壁を越えた多様性拡張に取り組んだ。具体的には抗原結合能への寄与の大きい重鎖CDR3領域のコアを成すヒト重鎖D領域をミニマル化すること、および合成DNAによるカニクイザル重鎖D領域に置換することに成功した。本成果は様々な種が進化の過程で獲得した抗体の多様性をヒトIgフレームワークに移植するためのプラットフォームとなり、新興再興感染症等に対する治療用抗体の取得にも活用されることが期待される。

#### <代表的な論文>

##### 1. ヒトiPS細胞への染色体導入法の開発と応用

Kazuki Y. et al., Engineering of human induced pluripotent stem cells via human artificial chromosome vectors for cell therapy and disease modeling. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2020;23:629-639.

概要:麻疹ウイルスエンベロープタンパク質を用いた微小核細胞融合法をヒトiPS細胞に適応することで各種染色体ベクターのヒトiPS細胞への導入に成功した。具体的には、1)ジストロフィン遺伝子を搭載したHACベクターを筋ジストロフィー患者由来iPS細胞に導入し、遺伝子修復を行った。2)ヒト21番染色体を正常ヒトiPS細胞に導入することで、ダウン症候群モデルiPS細胞を作成した。3)MACベクターを正常ヒトiPS細胞に導入し、複数の目的遺伝子をMACベクター上に搭載する系を確立した。

##### 2. ダウン症候群の種々の症状を呈する新規ダウン症候群モデルマウスの作製

Kazuki Y. et al., A non-mosaic transchromosomal mouse model of down syndrome carrying the long arm of human chromosome 21. *elife*. 2020; 9:e56223.

概要:独自の染色体工学技術により新たなダウン症候群モデルマウス「TcMAC21 マウス」の作製に成功した。ヒト21番染色体長腕領域約30Mbを搭載したMACベクターは「TcMAC21 マウス」の各組織で極めて安定に保持され、ヒト21番上の遺伝子の約93%がトリソミーであり、ダウン症候群で見られる種々の症状を呈した。本研究成果はダウン症候群の様々な症状に対応する原因遺伝子の解明や種々の症状改善のための治療法、治療薬開発にとって極めて有用な研究資材となることが期待される。

##### 3. ヒト抗体レパトアを再現し、効率的ヒト抗体取得が可能な完全ヒト抗体産生マウスの作製

Satofuka H. et al., Efficient human-like antibody repertoire and hybridoma production in trans-chromosomal mice carrying megabase-sized human immunoglobulin loci. *Nat Commun*. 2022;13(1):1841.

概要:これまでに抗体医薬創出のために、染色体導入技術を用いてヒト抗体産生マウスが作製されていたが、ヒト抗体遺伝子を含むヒト染色体の安定性は完全でなく、その安定化により、さらに高性能なヒト抗体産生マウスの作製が可能であると考えられた。本研究では独自の染色体工学技術を用いて、ヒト抗体遺伝子3.5Mb全長を安定に保持するマウスの作製に成功し、このマウスがヒトに類似した多様な抗体レパトアを再現していることを明らかにした。免疫することにより、抗原特異的な抗体が効率よく取得できることから、本ヒト抗体産生マウスは安全性の高いヒト抗体医薬品の創出に役立つことが期待される (JST ニュース 2022 年 7 月号)。

## §2 研究実施体制

### (1)研究チームの体制について

#### ① 「香月」グループ

研究代表者:香月康宏 (国立大学法人鳥取大学・染色体工学研究センター 教授)

研究項目

- ・ DT40 細胞を用いた同時・連続相同組換え法の開発

- ・ ミクロセル高効率誘導薬剤探索
- ・ HAC/MAC 保持ミクロセルの濃縮
- ・ 新規 TC マウス作製法の開発
- ・ ヒト 21 番染色体「完全合成」
- ・ マウス Y 染色体/ヒト 21 番染色体「最小化合成」
- ・ 日本人 HLA ハプロタイプ全合成

② 「冨塚」グループ

主たる共同研究者: 冨塚一磨 (学校法人東京薬科大学・生命科学部 教授)

研究項目

- ・ ヒト抗体重鎖遺伝子 D 領域置換とマウスへの導入
- ・ ヒト 21 番染色体「最小化合成」

③ 「鈴木」グループ

主たる共同研究者: 鈴木輝彦 (公益財団法人東京都医学総合研究所 主席研究員)

研究項目

- ・ CHO 細胞を用いた改良型 SIM 法の開発
- ・ ES 細胞を用いた迅速相同組換え法の開発
- ・ ヒト 21 番染色体「最小化合成」

④ 「水谷」グループ

主たる共同研究者: 水谷英二 (国立大学法人筑波大学・医学医療系 特任准教授)

研究項目

- ・ 新規 TC マウス作製法の開発

⑤ 「大関」グループ

主たる共同研究者: 大関 淳一郎 (大学共同利用機関法人自然科学研究機構・生命創成探究センター 特任助教)

研究項目

- ・ 合成セントロメアを用いた染色体動作原理の解明と応用

(2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

ゲノム合成 CREST/さががけ内の連携として、CREST 立教大・末次チーム、CREST 東京工業大学・相澤グループ(白髭チーム)、CREST 広島大学・田原グループ(太田チーム)、さががけ理研・白井博士、さががけ EBML・松田博士、さががけ東京理科大学・近藤博士、さががけ北海道大学・真栄城正寿博士との共同研究を進めてきた。また、ヒト 21 番長腕導入マウス・全長導入ラットの作製と解析においては、Johns Hopkins 大学・Roger Reeves 博士と国際共同研究を進め、ハイインパクトジャーナルに成果を発表してきた。ゲノム合成 CREST/さががけ以外では染色体工学技術を基盤として、アカデミア 58 件、企業 37 件の共同研究を進めてきた。