

News Release



2023年9月20日
京都大学 iPS 細胞研究所(CiRA)

rtTA 遺伝子の発現は Tet-On システムによる遺伝子発現の効率を高める —iPS 細胞から筋細胞への分化誘導の不均一性を改善—

ポイント

- テトラサイクリン応答型制御システム (Tet-On システム)^{注1)}を応用した従来の MyoD 遺伝子強制発現法^{注2)}では、細胞ごとの遺伝子発現が均一ではなく、ヒト iPS 細胞から筋細胞への分化誘導効率が低い。
- ヒト iPS 細胞に Tet-On システムを適用したときの遺伝子発現の不均一性は、rtTA 遺伝子^{注3)}発現の低下に起因することを示した。
- rtTA 遺伝子をピューロマイシン耐性遺伝子 (PuroR)^{注4)}と連結することで発現が向上し、筋細胞への高効率な分化誘導を実現する。

1. 要旨

大友淳氏(当時: CiRA 臨床応用研究部門 大学院生)、クヌート・ウォルツェン准教授 (CiRA 未来生命科学開拓部門)、櫻井英俊准教授 (CiRA 臨床応用研究部門)らの研究グループは、iPS 細胞における高効率な外来性遺伝子発現システムを改善することにより、ヒト iPS 細胞からの簡便かつ高効率な筋細胞分化誘導に成功しました。今回活用した遺伝子発現システムは筋細胞分化にとどまらず、転写因子の強制発現を主軸としたさまざまな細胞の分化誘導法に応用できることが期待されます。

この研究成果は 2023 年 8 月 19 日に科学誌「iScience」にオンライン公開されました。

2. 研究の背景

テトラサイクリン応答型制御システム(Tet-On システム)は、哺乳細胞に制御性の外来性遺伝子発現を可能とし、幅広い研究分野で活用されている遺伝子工学ツールです。

特にヒト iPS 細胞においては、マスター転写因子の強制発現を主軸とした細胞分化に応用されており、過去に本研究グループは Tet-On システムを MyoD 遺伝子強制発現に活用することで、任意のタイミングで、ヒト iPS 細胞から筋細胞分化誘導が可能な手法を報告しました ([CiRA ニュース 2013 年 4 月 24 日](#))。

しかしながら、上記の研究では MyoD 遺伝子を発現する細胞と発現しない細胞が含まれていたことから、MyoD 遺伝子発現が高い細胞を単離する工程に加え、単離してきた複数の細胞を維持する必要がありました。

そこで、本研究グループは Tet-On システムにおける遺伝子発現の不均一性の原因を明らかにし、克服することで、従来の手法よりも簡便な筋細胞分化誘導法の開発を目指して研究を行いました。

3. 研究結果

1) 従来の Tet-MyoD ヒト iPS (hiPS) 細胞における筋細胞分化誘導の評価

本研究グループは、これまでに Tet-On システムによって、筋細胞分化におけるマスター転写因子の MyoD 遺伝子発現を制御可能な Tet-MyoD ベクターを開発しました ([CiRA ニュース 2013 年 4 月 24 日](#))。Tet-MyoD ベクターは薬剤耐性遺伝子のネオマイシン耐性遺伝子(NeoR)^{注5)}と低分子化合物のドキシサイクリン (Dox)にตอบสนองし、MyoD 遺伝子と可視化のためのレポーター遺伝子 (mCherry)を発現するように設計しました(図1A)。このベクターをヒト iPS 細胞に導入後、抗生物質の G418^{注6)}を投与することで耐性のある Tet-MyoD hiPS 細胞を選択し、筋細胞分化効率の評価を行いました。その結果、Tet-MyoD ベクターが組み込まれた細胞のみを選択したにもかかわらず、Dox にตอบสนองして目的遺伝子が発現する細胞と発現しない細胞の両方が混在し、筋細胞への分化効率の低下につながる事がわかりました(図1B、C)。

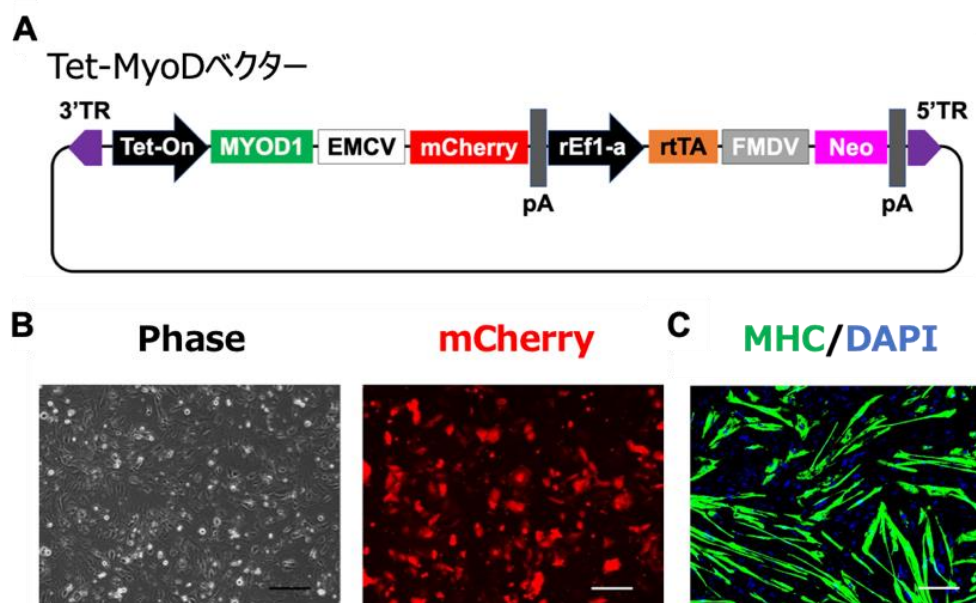


図 1 Tet-MyoD hiPS 細胞における遺伝子発現の不均一性

- A: Tet-MyoD ベクターの模式図。このベクターをヒト iPS 細胞に導入し、G418 選択することで、Tet-MyoD hiPS 細胞を作製した。
- B: Dox 投与 24 時間後の Tet-MyoD hiPS 細胞。赤色はレポーター遺伝子 mCherry の発現を示す。
- C: 免疫染色法で確認した、筋細胞分化誘導 7 日目の Tet-MyoD hiPS 細胞。MHC (緑色)は筋細胞を示す。

2) Dox 非応答性の細胞集団における rtTA 遺伝子発現の低下

次に、Dox に応答せず目的遺伝子を発現しない原因を調べました。Tet-MyoD hiPS 細胞に Dox を投与した 24 時間後、Dox 応答性と非応答性の細胞をセルソーター^{注7)}で分離しました(図2A)。分離したそれぞれの細胞集団の遺伝子発現について、定量的リアルタイム PCR 法により解析したところ、Dox 応答性の細胞集団と比べ、Dox 非応答性の細胞集団では rtTA 遺伝子発現が低下していることがわかりました(図 2B)。rtTA 遺伝子は Tet-On システムの機能の一部であり、Dox に応答することで目的遺伝子を発現させる役割を担います。このことから、Dox 非応答性の細胞集団の出現は rtTA 遺伝子発現の低下に起因していることが示唆されました。

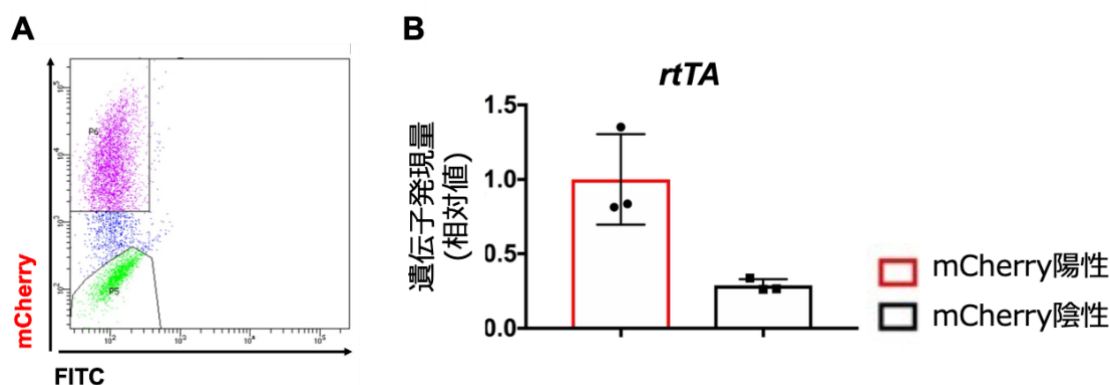


図 2 Dox 応答性の細胞集団における rtTA 遺伝子発現の低下確認

- A: Dox 投与 24 時間後、セルソーターを用いて mCherry 発現を解析した。縦軸は mCherry 発現の強度を示す。解析結果をもとに、mCherry 陽性と陰性の細胞集団を分離した。
- B: セルソーターで分離した mCherry 陽性および陰性の細胞集団における rtTA 遺伝子の発現量を、定量的リアルタイム PCR 法を用いて解析した。

3) rtTA 遺伝子発現ベクターの追加導入による Dox 応答性細胞の増加

rtTA 遺伝子の発現低下が Dox 非応答性の細胞が存在する直接的な原因かどうかを明らかにするために、Tet-MyoD hiPS 細胞に rtTA 遺伝子を発現するベクターを追加しました。その結果、rtTA 遺伝子発現ベクターが追加された Tet-MyoD hiPS 細胞では Dox 応答性の細胞の割合が増加し(図 3A)、筋細胞分化の改善も確認されました(図 3B)。以上から、Dox 非応答性の細胞は rtTA 遺伝子発現の低下に起因することが判明しました。また、Tet-MyoD hiPS 細胞に rtTA 遺伝子発現ベクターを追加導入することで、Dox 応答性の細胞を増やし、筋細胞への分化誘導の効率を向上させる手法の開発に成功しました。

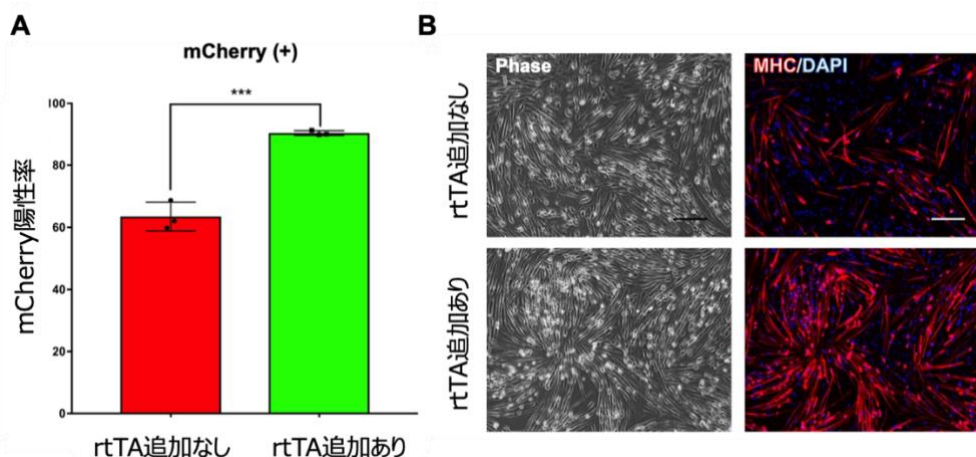


図3 rtTA 遺伝子発現ベクターの追加による遺伝子発現の不均一性と筋分化への誘導効率の改善

A: FACS 解析結果による、rtTA 遺伝子発現ベクターを追加導入した細胞との mCherry 陽性率の比較。赤は rtTA 追加なし、緑は rtTA 追加あり、を示す。

B: 免疫染色法によって確認した、筋細胞分化誘導 7 日目の細胞。MHC(赤色)は筋細胞を示す。上段は rtTA 追加なし、下段は rtTA 追加あり、を示す。

4) Tet-MyoD ベクターにおける PuroR の有用性の検証

最後に、研究グループは Tet-MyoD ベクターの構成に着目しました。Tet-MyoD ベクターは MyoD 遺伝子と同期して mCherry 遺伝子を発現し、rtTA 遺伝子に NeoR をつないだ融合遺伝子を発現します。しかし、このような同期した複数遺伝子の発現は、目的遺伝子を単体で発現させたときに比べ、その機能が低下することが知られています。また、NeoR と比較して、もう一つの薬剤耐性遺伝子であるピューロマイシン耐性遺伝子 (PuroR) を採用したベクターのほうが、目的遺伝子をより高く発現することも報告されていました。

そこで、従来の Tet-MyoD ベクターを基盤に 3 つの変更を加えた、異なる 4 つの構成(①:もともと開発した構成で NeoR と mCherry を採用 ②:mCherry を除いて NeoR のみを採用 ③:NeoR を PuroR に変更して mCherry を採用 ④:PuroR のみを採用)のベクターを作製し、機能が変化するかどうかを検証しました (図 4A)。その結果、PuroR を導入したヒト iPS 細胞において、rtTA 遺伝子発現と筋細胞分化誘導効率の顕著な改善がみられました(図4B、C、①と③の比較および②と④の比較)。また、分化誘導効率のよい PuroR を採用したベクター2種において mCherry による影響を比較すると、mCherry を除いて MyoD 遺伝子を単体で発現させた構成において、わずかに筋細胞への分化誘導効率の改善傾向がみられました(図4C、③と④の比較)。

以上より、Tet-MyoD ベクターにおいて、rtTA 遺伝子と連結する薬剤耐性遺伝子を NeoR から PuroR に変更し、MyoD 遺伝子を単体で発現させることにより、rtTA 遺伝子発現ベクターを追加導入することなく、目的遺伝子の発現を大幅に改善できることがわかりました。この改善により、従来手法では必要不可欠だった目的遺伝子を発現する hiPS 細胞を単離してくる工程を省略することができるようになり、より簡便かつ高効率に筋細胞への分化誘導を行う手法の開発に成功しました。

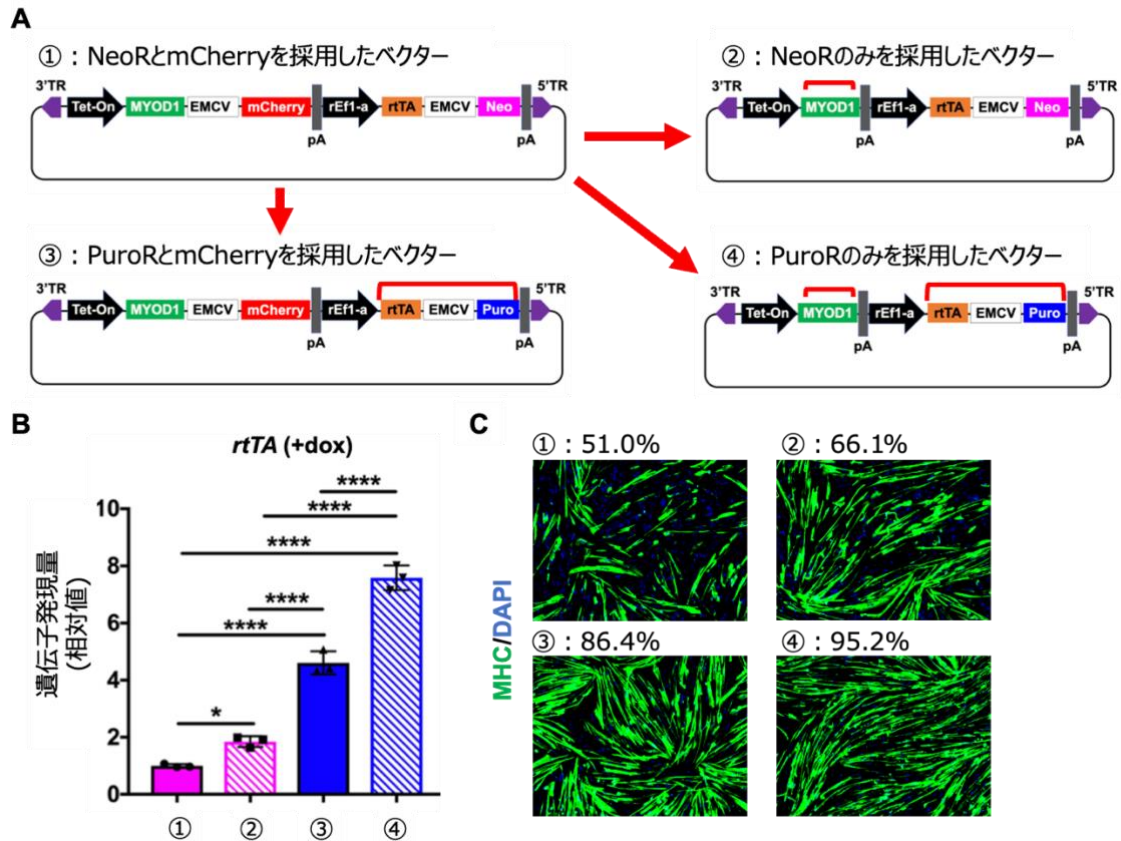


図 4 Tet-MyoD ベクターの構成による機能の比較

- A: ①を基盤として新たな構成の3種の Tet-MyoD ベクターを作製した。赤線は②、③、④に加えた主な変更点を示す。
- B: 定量的リアルタイム PCR 法による Dox 投与 24 時間後の rtTA 遺伝子発現量。グラフの左から①、②、③、④の構成をもつ Tet-MyoD hiPS 細胞の解析結果を示す。
- C: 筋細胞への分化誘導 7 日目の免疫染色の結果。MHC(緑色)は筋細胞を示す。数値は免疫染画像をもとに算出した筋細胞分化誘導効率を示す。

4. まとめと展望

本研究では、Tet-MyoD hiPS 細胞から Dox 応答性と非応答性の細胞を分離したことで、Tet-On システムにおける遺伝子発現が rtTA 遺伝子発現に依存することを明らかにしました。また、rtTA 遺伝子と連結していた薬剤耐性遺伝子を NeoR から PuroR に変更するという単純な方法で、rtTA 遺伝子発現を改善し、目的遺伝子の発現を均一にできることを示しました。Tet-On システムは、これまでに幅広い研究分野で活用されており、特にヒト iPS 細胞では MyoD 遺伝子を含めた細胞種特異的なマスター転写因子の発

現を主軸とした細胞分化誘導法に多く応用されています。このことから、今回新たに見出した Tet-On システムの知見とヒト iPS 細胞から筋細胞への分化誘導法は、MyoD 遺伝子以外のマスター転写因子を活用した細胞分化誘導法の開発にも貢献することが期待されます。

5. 論文名と著者

○ 論文名

“Uniform transgene activation in Tet-On systems depends on sustained rtTA expression”

○ ジャーナル名

iScience

○ 著者

Jun Otomo¹, Knut Woltjen^{1*}, Hidetoshi Sakurai^{1*}

*: 責任著者

○ 著者の所属機関

1. 京都大学 iPS 細胞研究所 (CiRA)

6. 本研究への支援

本研究は、以下の支援を受けて実施されました。

- 国立研究開発法人 日本医療研究開発機構 (AMED) (JP17bm0804005、JP22bm0104001)

7. 用語説明

注 1) テトラサイクリン応答型制御システム (Tet-On システム)

テトラサイクリン応答性プロモーターに組み込まれた遺伝子発現を制御するシステム。このシステムが導入された細胞に低分子化合物のドキシサイクリン (Dox) を投与することで、目的遺伝子を強制発現させることができる。任意のタイミングで細胞に目的遺伝子を発現させられることから、汎用性の高い遺伝子工学ツールとなっている。

注 2) MyoD 遺伝子強制発現法

筋細胞分化のマスター転写因子である MyoD 遺伝子を強制的に細胞に発現させることで、筋細胞を作製する手法。これにより、ヒト iPS 細胞から約 1 週間で筋細胞を誘導することができる。

注 3) rtTA 遺伝子

Tet-On システムの機能の一部。低分子化合物のドキシサイクリン (Dox) と複合体を形成し、テトラサイクリン応答性プロモーターに結合することで、プロモーターを活性化させ、プロモーター下の遺伝子を発現させる。

注 4) ピューロマイシン耐性遺伝子 (PuroR)

遺伝子発現ベクターに搭載する代表的な薬剤選択マーカーの一つ。この遺伝子を発現する細胞は、抗生物質のピューロマイシンに耐性があるので、遺伝子発現ベクターが導入された細胞のみを選択的に培養することが可能となる。

注 5) ネオマイシン耐性遺伝子 (NeoR)

遺伝子発現ベクターに搭載する代表的な薬剤選択マーカーの一つ。この遺伝子を発現する細胞は、抗生物質の G418 に耐性があるので、遺伝子発現ベクターが導入された細胞のみを選択的に培養することが可能となる。

注 6) G418

薬剤選択に用いられる抗生物質の一つ。ネオマイシン耐性遺伝子(NeoR)を発現する細胞は G418 に耐性をもつ。

注 7) セルソーター

細胞で発現している mCherry などの蛍光シグナルを検出することで、特定の細胞集団の割合を算出したり、蛍光シグナルを指標に特定の細胞集団を分離することができる装置。