

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4825978号
(P4825978)

(45) 発行日 平成23年11月30日(2011.11.30)

(24) 登録日 平成23年9月22日(2011.9.22)

(51) Int.Cl. F I
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A
 C 1 2 Q 1/02 (2006.01) C 1 2 Q 1/02

請求項の数 4 (全 17 頁)

(21) 出願番号	特願2006-550751 (P2006-550751)	(73) 特許権者	504147243 国立大学法人 岡山大学 岡山県岡山市北区津島中一丁目1番1号
(86) (22) 出願日	平成17年12月26日(2005.12.26)	(74) 代理人	100098464 弁理士 河村 洸
(86) 国際出願番号	PCT/JP2005/023758	(74) 代理人	100149630 弁理士 藤森 洋介
(87) 国際公開番号	W02006/070729	(74) 代理人	100154449 弁理士 谷 征史
(87) 国際公開日	平成18年7月6日(2006.7.6)	(72) 発明者	田中 紀章 岡山県岡山市鹿田町二丁目5番1号 岡山 大学大学院医歯薬学総合研究科内(医)
審査請求日	平成20年11月26日(2008.11.26)	(72) 発明者	小林 直哉 岡山県岡山市鹿田町二丁目5番1号 岡山 大学大学院医歯薬学総合研究科内(医)
(31) 優先権主張番号	特願2004-376737 (P2004-376737)		最終頁に続く
(32) 優先日	平成16年12月27日(2004.12.27)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2005-17478 (P2005-17478)		
(32) 優先日	平成17年1月25日(2005.1.25)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

(54) 【発明の名称】 インスリン産生細胞特異的プロモーターおよびその用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1で表わされる塩基配列の5 側に配列番号2で表わされる塩基配列を1~4個含有するポリヌクレオチドからなるプロモーター。

【請求項2】

請求項1記載のプロモーターを含むベクター。

【請求項3】

請求項1記載のプロモーターの3 側にレポーター遺伝子および/または抗生剤耐性遺伝子が連結されている請求項2記載のベクター。

【請求項4】

(a) 請求項1記載のプロモーターの3 側にレポーター遺伝子および抗生剤耐性遺伝子が連結されているベクターを、未分化細胞に導入する工程、

(b) (a) で得られたベクター含有未分化細胞をインスリン産生細胞に分化誘導する工程、

(c) レポーター遺伝子の発現により、インスリン産生細胞への分化を確認する工程、および

(d) 抗生剤耐性遺伝子に対応する抗生剤を添加することにより、インスリン産生細胞を選択する工程

を含むインスリン産生細胞の選択方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、新規なインスリン産生細胞特異的プロモーターおよびその用途に関する。

【背景技術】

【0002】

本邦では、糖尿病患者は増加の一途を辿っており、糖尿病が強く疑われる人が690万人、その可能性を否定できない人を含めると1,370万人である(1997年糖尿病実態調査)。現在わが国で、インスリン療法施行者は約41万人である。その内の腎不全などの重症合併症を有する5%の2万人がバイオ人工膵臓の治療対象となる。また、国民医療費の概況(厚生省実施1998年)によると、糖尿病患者の直接医療費が日本で1兆325億円である。また、世界の糖尿病人口は現在1億5千万人で、2010年にはその数は1.4倍になると予測されており市場は今後ますます増加する。

10

【0003】

インスリン投与療法では、厳格な監視下でも合併症(失明、四肢切断、腎不全など)の発症防止は極めて困難である。そこで、生きた細胞を利用した糖尿病治療は、廃絶した血糖降下の生理的システムを再び獲得させることができ、患者のQOLの著名な改善(飲食の制限、頻回な血糖測定、インスリン投与の副作用である低血糖の恐怖から解放)、長期合併症の予防ができる。本研究の成功は、糖尿病という慢性疾患の完全治癒を可能とし、さらにはかつて天然痘、ポリオなどの感染症に対して人類がなした撲滅宣言を糖尿病に対しても果たし得る大きな原動力となる。臓器移植に伴うドナー不足の問題がなく、万人がその恩恵を受けることができる。2000年にアルバータ大学から良好な膵島移植の成績が報告され、糖尿病治療に関して膵島移植は理想的な治療法であるとの認識が広まった。しかし提供元となる膵臓の絶対的不足が大きな課題となっており、移植用細胞源の候補として、ヒトES細胞、肝幹細胞、間葉系幹細胞などのヒト由来の未分化細胞からヒト細胞を分化誘導する研究が行われている(たとえば、モリトウら、DIABETES, VOL. 2003 May 52(5):1163-1168、ルメルスキー(Lumelsky)ら、Science, 2001 May 18;292(5520):1389-1394、ザルツマン(Zalzman)ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003 Jun. 10;100(12):7253-7258およびマシマら、J. Clin. Invest. 1996 Apr. 1;97(7):1647-1654参照)。これらの方法によって細胞が誘導される確率は、あまり高いものではなく、むしろその母集団となる未分化細胞から誘導された少数の細胞を選定する操作が重要となる。

20

30

【0004】

一般的に選別前の複数のバックグラウンドを持つ細胞集団(バルクの状態)から目的の集団を選別する場合、1)リングクローニング法、2)限界希釈法、3)単一細胞選別法、4)抗体を用いた細胞選別法、および5)プロモーターを用いた選別法などが用いられている。しかしながら、1)~3)の方法では、選別の過程において細胞を増殖させることを前提に選別を行なうものであり、ヒトES細胞、間葉系幹細胞などのヒト由来の未分化細胞は増殖能を持っているものの、分化誘導を行うと増殖能を失うためこのような方法を適用することができない。また、4)の方法では、選別対象とする細胞集団がその表面に特異的膜タンパク質(レセプター類)を発現していることを前提としている。したがって、そのような特異的レセプターを細胞表面に提示していないインスリン産生細胞には好適に使用することができない。

40

【0005】

一方、前記5)の方法は、目的タンパク質を発現する細胞を含む細胞集団に対して、目的タンパク質発現に関与するプロモーター領域とその下流にレポーター遺伝子とを含有するプラスミドをバルク細胞集団にトランスフェクションし、レポーター遺伝子発現陽性細胞をセルソーターや抗生剤耐性遺伝子などを用いて選別する方法である(たとえば、ソリア(Soria)ら、Diabetologia (2001) 44: 407-415参照)。この方法は、インスリン産生細胞の選別に適用可能であるが、天然のプロモーター配列をそのまま使用した場合、インスリン産生細胞非特異的転写活性部位により特異度が落ち、より厳密な細胞の選定を行なうことはできない。そのため、より目的タンパク質特異的な転写活性を有するプロモータ

50

一領域を同定、使用する必要があり初期実験に時間を要する。また、特異度があってもプロモーター活性が微弱であった場合、レポーター遺伝子等、下流に挿入された配列を十分に発現できないという問題点がある。

【発明の開示】

【0006】

本発明の目的は、インスリン産生細胞の選択を効率よく行なうために、特異性が高く、転写活性の強い新規なプロモーターを提供することである。

【0007】

前記問題点に鑑み鋭意検討した結果、ヒトインスリンプロモーターの転写開始部位(+1)の上流-1から-363番目の5'フランキング領域(配列番号1、以下、-363/-1領域ともいう。)の5'側に、該-363/-1領域からTATAボックスを含む-31/-1領域を削除した-363/-32領域(配列番号2)を挿入することにより、インスリン産生細胞に特異性が高く、転写活性の強い新規プロモーターが得られることを見出し、本発明を完成した。

【0008】

すなわち、本発明は、a)配列番号1で表わされる塩基配列の5'側に配列番号2で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチド、またはb)前記a)のポリヌクレオチドの塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、インスリン産生細胞においてプロモーター活性を有するポリヌクレオチドからなるプロモーターに関する。

【0009】

本発明はまた、前記プロモーターを含むベクターに関する。

【0010】

前記ベクターにおいて、前記プロモーターの3'側にレポーター遺伝子および/または抗生剤耐性遺伝子が連結されていることが好ましい。

【0011】

本発明はさらに、(a)前記プロモーターの3'側にレポーター遺伝子および抗生剤耐性遺伝子が連結されているベクターを、未分化細胞に導入する工程、(b)(a)で得られたベクター含有未分化細胞をインスリン産生細胞に分化誘導する工程、(c)レポーター遺伝子の発現により、インスリン産生細胞への分化を確認する工程、および(d)抗生剤耐性遺伝子に対応する抗生剤を添加することにより、インスリン産生細胞を選択する工程を含むインスリン産生細胞の選択方法に関する。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】天然のヒトインスリンプロモーターの主要転写因子の結合部位を示す図である。

【図2】本発明のインスリン産生細胞の選別方法の一実施態様を示す図である。

【図3】本発明のインスリン産生細胞の選別方法の一実施態様を示す図である。

【図4】本発明のサブクローニングの一実施態様を示す図である。

【図5】電気泳動写真である。Mは分子量マーカーを示し、レーン1~6はそれぞれ、pGL3、phINS-363/-1・Luc、phINS-363/-1+(hINS-363/-32)×1~4・Lucの制限酵素HindIIIおよびKpnIによる処理物を示す。

【図6】低グルコース条件における、各プラスミドの各細胞におけるプロモーター活性を示すグラフである。

【図7】高グルコース条件における、各プラスミドの各細胞におけるプロモーター活性を示すグラフである。

【発明を実施するための最良の形態】

10

20

30

40

50

【0013】

本発明のプロモーターは、a) 配列番号1で表わされる塩基配列の5'側に配列番号2で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチド、またはb) 前記a)のポリヌクレオチドの塩基配列と相補的な塩基配列からなるポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、インスリン産生細胞においてプロモーター活性を有するポリヌクレオチドである。

【0014】

ここで、配列番号1の塩基配列は、天然のヒトインスリンプロモーターの転写開始部位(+1)の上流-1から-363番目までの5'フランキング領域(-363/-1領域)を示し、PDX1、NeuroD、NKX2.2、NKX6.1およびHNF4aといった転写因子の結合部位と、グルコース依存性転写活性を担うC1~A2領域を有する(図1)(Germanら、J. Biol. Chem., 1996、Barthov-Shifmanら、J. Biol. Chem., 2002、Watadaら、Proc. Natl. Acad. Sci., 2000、Harringtonら、J. Biol. Chem., 2001、Watadaら、J. Biol. Chem., 2000)。これらの転写因子またはその組み合わせは、膵臓細胞特異的である。また、配列番号2の塩基配列は、前記配列番号1の塩基配列からTATAボックスを除いた領域(-363/-32)である。

【0015】

本発明のプロモーターにはさらに配列番号2の塩基配列がタンデムに挿入されていることが好ましい。本発明のプロモーターに含まれる配列番号2で表される塩基配列の数は、特に制限されるものではないが、1~15が好ましく、1~4がより好ましく、2が最も好ましい。配列番号1で表わされる塩基配列のみでは、プロモーター活性が低く、効率的なインスリン細胞の選定を行なうことができない。また、配列番号2で表わされる塩基配列の数が16以上になると、ベクターに挿入した場合に全体の分子量が大きくなり過ぎ、細胞への導入効率が低下する傾向がある。

【0016】

本明細書において、「タンデムに挿入する」とは、同じ配列を同じ方向で繰り返し挿入することを意味する。

【0017】

本発明のプロモーターは、一般的にはPCRサブクローニング法などにより製造することができる。たとえば、ヒトゲノムを鋳型としPCRにより配列番号1の塩基配列を増幅し、適当なベクターに挿入する。つぎにこのベクターを鋳型として配列番号2の塩基配列を増幅する。配列番号1の塩基配列が挿入されたベクターの上流(5'側)に任意の数の配列番号2の塩基配列を挿入して目的のプロモーターを製造する方法があげられる。

【0018】

したがって、本発明のプロモーターは、前記配列番号1の塩基配列と配列番号2の塩基配列のほかに、これら塩基配列間に制限酵素切断部位などの付加的な塩基配列が挿入されていてもよい。また、配列番号1および2の塩基配列において、TATAボックスや、主要転写因子の結合部位以外においては、本発明のプロモーター活性を減少させるものではない限り、数個の塩基が欠失・置換または挿入されているものも、本発明のプロモーターに包含される。さらに、それらのTATAボックスや主要転写因子の結合部位においても、TATAボックス結合因子または転写因子の結合を妨げない限り、数個の塩基が欠失・置換または挿入されているものも、本発明のプロモーターに包含される。

【0019】

本発明において、「ストリンジェントな条件」とは、ハイブリッドの形成およびその後の洗浄における条件を意味し、ハイブリダイゼーションを、たとえば、高イオン濃度(たとえば、6×SSC(1.5M NaCl, 0.15M クエン酸三ナトリウムを含む溶液を10×SSCとする))、50%フォルムアミドを含む溶液中で45℃にてハイブリッドを形成させ、低イオン濃度下(例えば、2×SSC)で50℃にて洗浄するような条件や、高イオン濃度(例えば、6×SSC)溶液中で65℃にてハイブリッドを形成させ、低イオン濃度下(例えば、0.1×SSC)で65℃にて洗浄するような条件などを挙げ

10

20

30

40

50

ることができる。洗浄ステップにおける塩濃度は、たとえば、温度を50に設定した場合、 $2 \times SSC$ （低ストリンジェンシーな条件）から $0.2 \times SSC$ （高ストリンジェンシーな条件）から選択することができる。洗浄ステップにおける温度は、たとえば、室温（低ストリンジェンシーな条件）から65（高ストリンジェンシーな条件）までの温度から選択することができる。また、もちろん塩濃度と温度の両方を変化させることもできる。

【0020】

ハイブリダイゼーションは、「モレキュラークローニング第3版」、「カレント・プロトコルズ・イン・モレキュラー・バイオロジー」、「DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)」などに記載されている方法に準じてコロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法又はサザンブロットハイブリダイゼーション法などを行なうことができる。

10

【0021】

ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ可能なポリヌクレオチドとしては、NCBI（ナショナル センター フォア バイオテクノロジー（National Center for Biotechnology））-BLAST（インフォメーション ベーシック ローカル アライメント サーチ ツール（Information Basic Local Alignment Search Tool））などの同源性検索ソフトウェアにより、デフォルト（初期設定）のパラメータを用いて計算したときに、配列番号1で表わされる塩基配列の5側に配列番号2で表わされる塩基配列を含有するポリヌクレオチドと少なくとも70%以上の同源性を有するポリヌクレオチド、好ましくは80%以上の同源性を有するポリヌクレオチド、さらに好ましくは95%以上の同源性を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。

20

【0022】

本発明のプロモーターを組み込むベクターとしては、プラスミドベクターが好ましく、元ベクターの何らかのプロモーターが制限酵素処理で切り出されるものであれば、どのようなものでも使用することができる。また、外来遺伝子を挿入するための制限酵素部位を複数有しているものが好ましい。そのようなベクターとしては、レポーター遺伝子を含有し、その上流にプロモーターをもたず、複数の制限酵素認識部位を有する、もともと任意のプロモーターのレポーターアッセイ用に調製されているベクター、たとえば、pGL2 ベーシック ベクター（Basic vector）（プロメガ社製）、pGL3 ベーシック ベクター（プロメガ社製）、pGL4 ベーシック ベクター（プロメガ社製）などが市販されており、好適に使用できる。

30

【0023】

また、本発明のプロモーターを含有するベクターは、本発明のプロモーターの活性を評価するために、本発明のプロモーターの3側下流にレポーター遺伝子が連結されたものであることが好ましく、細胞へのトランスフェクションを考慮すると、最終的なベクターサイズが10Kbp程度以下であることが好ましい。

【0024】

プロモーターの活性を評価する方法としては、一般的に最も現在使われている方法がルシフェラーゼアッセイ法である。もちろん、従来より使用されている他のレポーターアッセイを使用することもできる。ルシフェラーゼアッセイ法はきわめて微細な活性をも測定でき、かつ簡単な方法であるため活性の評価という目的において好ましい。

40

【0025】

このようなレポーター遺伝子としては、該遺伝子産物の検出方法が知られているものであれば特に限定はなく、たとえば、ルシフェラーゼ遺伝子およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）遺伝子などの酵素遺伝子、緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子および赤色蛍光タンパク質（DS-RED）遺伝子などの蛍光タンパク質遺伝子などを使用することができる。

【0026】

また、本発明のプロモーターは、インスリン産生細胞において特異的に機能するため、

50

インスリン産生細胞を選別するためには、3 側下流に抗生剤耐性遺伝子を連結して使用することができ、さらにレポーター遺伝子と抗生剤耐性遺伝子を共に連結して使用することが好ましい。

【0027】

本発明に使用される抗生剤耐性遺伝子としては、ハイグロマイシン耐性遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、ゼオシン耐性遺伝子、ブラヂィスチジン耐性遺伝子などが有用であり、細胞種および選別のデザインにより適切なものを適宜選択することができる。その他、本発明のベクターには、異なる選別を行なうためにさらに他のプロモーターによる他の耐性遺伝子を連結することも可能である。

【0028】

さらには、本発明のプロモーターの下流にレポーター遺伝子と抗生剤耐性遺伝子とを共に連結する場合、GFPとハイグロマイシン耐性遺伝子融合遺伝子(GFP-HygroR融合)またはREDとハイグロマイシン耐性遺伝子融合遺伝子(DS-RED-HygroR融合)などのレポーター遺伝子と抗生剤耐性遺伝子の融合物を連結することもできる。このような融合物を使用することにより、インスリン産生細胞への分化誘導の程度をレポーター遺伝子で確認し、また抗生剤を加えることによって発色しない細胞を削除することができる。この際のレポーター遺伝子としては、蛍光顕微鏡で容易に検出でき、色の認識がし易いことから、緑色蛍光タンパク質または赤色蛍光タンパク質をコードする遺伝子が好ましい。

【0029】

このようなレポーター遺伝子や抗生剤耐性遺伝子、またはレポーター遺伝子と抗生剤耐性遺伝子との融合遺伝子(以下、融合遺伝子ともいう)の本発明のプロモーターへの連結方法としては、当該分野で既知の様々な方法を使用することができる。たとえば、前述したようなレポーターアッセイ用ベクターを使用して本発明のプロモーターを作製した場合、該ベクターに存在するレポーター遺伝子と、連結したいレポーター遺伝子や抗生剤耐性遺伝子、または融合遺伝子を入れ替えることができる。具体的には、前述のpGL3ベシックベクターでは、Nco1およびXba1という、2つの制限酵素でルシフェラーゼ遺伝子を切り出すことができ、そこへNco1およびXba1切断部位をそれぞれ付加したプライマーペアにより目的遺伝子のORFをPCRで増幅し当該制限酵素処理した挿入断片をライゲーションすれば遺伝子に入れ替えができる。

【0030】

得られたベクターを細胞内に導入する方法としては、リポフェクション法、エレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法などを使用することができる。作製したベクターのサイズが10kbpを超える場合や、目的細胞がES細胞、間葉系幹細胞、骨髄細胞などリポフェクション法で入りにくい細胞の場合には、エレクトロポレーション法が好ましい。

【0031】

本発明のプロモーターは、インスリン産生細胞において特異的に機能するため、インスリン産生細胞の選定に使用することができる。その方法としては、たとえば、配列番号1で表わされる塩基配列の5 側に配列番号2で表わされる塩基配列をn個含有する本発明のプロモーター： $p h I N S - 3 6 3 / - 1 + (h I N S - 3 6 3 / - 3 2) \times n$ の上流にハイグロマイシン耐性遺伝子を融合させた緑色蛍光タンパク質(GFP)をコードする遺伝子を連結したプラスミドベクター： $p h I N S - 3 6 3 / - 1 + (h I N S - 3 6 3 / - 3 2) \times n \cdot G F P - H y g r o R$ を構築する。ヒトES細胞または間葉系幹細胞などの未分化細胞を培養増殖させ、至適量の前記プラスミドをエレクトロポレーションにより導入する。培養液を交換したのち分化誘導を行なう。前記プラスミドが導入されたインスリン産生細胞は蛍光顕微鏡下で緑色に発色するため、経時的に観察し緑色細胞の割合および蛍光強度が最大になった時点でハイグロマイシンを培養液中に添加し、GFP陽性細胞の選定を行い、インスリン産生細胞を得ることができる(図2)。

【0032】

10

20

30

40

50

プラスミドの導入が達成されなかった未分化細胞がインスリン産生細胞に分化誘導された場合は、インスリン産生細胞であってもGFP-HygroRが発現せず、これを選別できないことになる。したがって、インスリン産生細胞に分化誘導された細胞を効率よく得るため、分化誘導に供する細胞をプロモーター含有プラスミドが導入されている細胞のみに限定することが好ましい。その方法としては、プラスミド:phINS-363/-1+(hINS-363/-32)×n・GFP-HygroRに、SV40プロモータードライブ型ネオマイシン耐性遺伝子カセットを挿入し、プラスミド:phINS-363/-1+(hINS-363/-32)×n・GFP-HygroR/SV40・Neoを使用することができる。このプラスミドを使用することにより、インスリン産生細胞への分化誘導前にプラスミドを導入した細胞をネオマイシン処理により選別することができる(図3)。もちろん使用する抗生剤耐性遺伝子は、ハイグロマイシンやネオマイシン以外の前述の抗生剤耐性遺伝子などに適宜変更することができ、レポーター遺伝子も、GFP以外の前述の遺伝子などに適宜変更することができる。

10

【0033】

プラスミドを導入する至適量は、 $2 \times 10^7 \sim 5 \times 10^7$ 個の細胞に対してプラスミド $2 \mu\text{g} \sim 20 \mu\text{g}$ が好ましい。分化誘導は、高グルコース濃度で行なうことが好ましく、培養期間は2~6週間が好ましい。

【0034】

本発明を以下の実施例によりさらに詳述するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

20

【実施例1】

【0035】

(A) ヒトインスリンプロモーターの-363/-1領域の調製

ヒトインスリンプロモーターの転写開始部位(+1)の上流-1から-363番目までの5'フランキング領域(配列番号1)を、ヒト正常肺線維芽細胞株(NHLF)より精製したヒトゲノム100ngを鋳型とし、反応条件(94℃、15秒、62.5℃、30秒、68℃、1分)×35サイクルで、PCR産物1(以下、XhoI/-363/-1/HindIIIとも言う)として得た。プライマーとしては、5'側にXhoI切断部位を組み込んだフォワードプライマー1(配列番号3)と、3'側にHindIII切断部位を組み込んだリバープライマー1(配列番号4)をヒトインスリンプロモーターの-363/-1領域の

30

両端に設定した。PCR反応液の組成を表1に示す。

フォワードプライマー1:

5' - TATCTCGAGACAGCAGCGCAAAGAGCCCCGCCCTGCAG - 3 (配列番号3)

リバープライマー1:

5' - ATAAAGCTTTGAGGGCTGCTGGGCCCCCGCTGGCTTTATA - 3 (配列番号4)

【0036】

【表 1】

表 1

成分	容量	最終濃度
10×PCR 緩衝液(KOD-plus-添付の緩衝液)	5 μ l	1×
2mM dNTPs	5 μ l	各0.2mM
25mM MgSO ₄	2 μ l	1mM
プライマー混合物(各10 μ M)	1.5 μ l	各0.3 μ M
ヒトゲノムDNA 100ng	1 μ l	DNA100ng
DNA ポリメラーゼ (商品名:KOD-plus-、東洋紡績株式会社製)	1 μ l	1.0unit
蒸留水	反応液全量を 50 μ lとする量	

10

【0037】

(B) 前記PCR産物1のルシフェラーゼ構築物へのサブクローニング

前記(A)で得られたPCR産物1(XhoI/-363/-1/HindIII)の全量を制限酵素XhoIおよびHindIII各10Uにて37で16時間処理した。ルシフェラーゼ発現プラスミドであるpGL3ベシックベクター(プロメガ社製)5 μ gを同じ2種の制限酵素各15Uにて37で3時間処理し、クイックライゲーションキット(Quick ligation kit)(M2200S:ニューイングランドバイオラボ(New England Biolab)社製)を用いてライゲーションを行なった(図4)。ライゲーションは、50ngのベクターDNAに対しモル比で3倍量のインサートDNAを混和し、核酸不含水で希釈し10 μ lとしたのち、キットに付属の2×クイックライゲーション緩衝液と1 μ lのクイックT4DNAリガーゼを加えて、室温で5分間インキュベートして行なった。得られたライゲーション産物のうち1 μ lを、溶解後30分間氷上においた100 μ lのコンピテントセル(DH5a、東洋紡績株式会社製)に添加し、37で45秒処理したのち、2分間氷上に静置し、ついでLB培地を900 μ l添加し、37で1時間振とう培養後、100 μ g/mlアンピシリン含有LB寒天培地に播種した。37で14時間培養し、多数のコロニーを得た。複数のコロニーをピックアップし、同様の培地で小スケール培養を行なった後、ミニプレップキット(miniprep kit)(キアゲン(Qiagen)社製)を用いて、そのプロトコールにしたがってプラスミドを精製した。得られたプラスミドをXhoIおよびHindIIIで処理し、目的配列がインサートとして切り出されることをエチジウムブロマイド含有1%アガロースゲルにて電気泳動後確認し(図5、レーン2)、目的のプラスミド1(以下、phINS-363/-1・Lucとも言う。)を得た。

20

30

【0038】

(C) ヒトインスリンプロモーターの-363/-32領域の調製

(B)で得られたプラスミド:phINS-363/-1・Luc50ngを鋳型とし、ヒトインスリンプロモーター領域-363/-32を(1)制限酵素SmaI切断部位を付加したフォアワードプライマー2(配列番号5)およびXhoI切断部位を付加したリバースプライマー2(配列番号6)、(2)制限酵素NheI切断部位を付加したフォアワードプライマー3(配列番号7)およびSmaI切断部位を付加したリバースプライマー3(配列番号8)、(3)制限酵素MluI切断部位を付加したフォアワードプライマー4(配列番号9)およびNheI切断部位を付加したリバースプライマー4(配列番号10)、(4)制限酵素KpnI切断部位を付加したフォアワードプライマー5(配列番号11)およびMluI切断部位を付加したリバースプライマー5(配列番号12)を使用し、(A)と同様の方法でPCRによる増幅を行ない、制限酵素切断部位を有する-363/-32領域をPCR産物2~5として4種類(以下、それぞれ、SmaI/-363/-32/XhoI、NheI/

40

50

- 3 6 3 / - 3 2 / Sma I、Mlu I / - 3 6 3 / - 3 2 / Nhe I および Kpn I / - 3 6 3 / - 3 2 / Mlu I ともいう。) 得た。

フォワードプライマー 2 :

5 - TATCCCGGGACAGCAGCGCAAAGAGCCCCG - 3 (配列番号 5)

リバースプライマー 2 :

5 - ATACTCGAGTCTCAGAGCCCATCTCCCCTACCTG - 3 (配列番号 6)

フォワードプライマー 3 :

5 - ATAGCTAGCACAGCAGCGCAAAGAGCCCCG - 3 (配列番号 7)

リバースプライマー 3 :

5 - ATACCCGGGTCTCAGAGCCCATCTCCCCTACCTGTCAACCC - 3 (配列番号 8)

10

フォワードプライマー 4 :

5 - TATACGCGTACAGCAGCGCAAAGAGCCCCG - 3 (配列番号 9)

リバースプライマー 4 :

5 - ATAGCTAGCTCTCAGAGCCCATCTCCCCTACCTGTCAAC - 3 (配列番号 10)

フォワードプライマー 5 :

5 - TATGGTACCACAGCAGCGCAAAGAGCCCCG - 3 (配列番号 11)

リバースプライマー 5 :

5 - ATAACGCGTTCTCAGAGCCCATCTCCCCTACCTGTC - 3 (配列番号 12)

【0039】

(D) プロモーターの作製

20

(B) で得られたプラスミド 1 : phINS - 3 6 3 / - 1 · Luc と、(C) で得られた PCR 産物 2 : Sma I / - 3 6 3 / - 3 2 / Xho I とを、制限酵素 Sma I および Xho I にて処理したのち、以下 (B) と同様の方法にて、ライゲーションを施行し、phINS - 3 6 3 / - 1 · Luc の Sma I および Xho I 部位に - 3 6 3 / - 3 2 領域が 1 つ組み込まれた目的のプラスミド 2 (phINS (- 3 6 3 / - 3 2) × 1 · Luc とも言う。) を得た。この方法を繰り返し、phINS - 3 6 3 / - 1 · Luc の Nhe I および Sma I 部位、Mlu I および Nhe I 部位、Kpn I および Mlu I 部位に、(C) で得られた PCR 産物 3 ~ 5 を組み込み、それぞれ、プラスミド 3 ~ 5 (phINS - 3 6 3 / - 1 + (hINS - 3 6 3 / - 3 2) × 2 ~ 4 · Luc とも言う。) を作製した。

【0040】

30

(E) 各プロモーターの確認

各プラスミド : phINS - 3 6 3 / - 1 + (hINS - 3 6 3 / - 3 2) × 1 ~ 4 · Luc をそれぞれの長さの挿入断片を一度に切り出せる制限酵素 : HindIII および Kpn I にて処理。目的配列がインサートとして切り出されることをエチジウムブロマイド含有 1 % アガロースゲルにて電気泳動により確認した (図 5、レーン 3 ~ 6)。

【実施例 2】

【0041】

プロモーター活性測定

各プロモーターの活性を評価するために、レポーターアッセイを以下の通り実施した。

(A) 各細胞へのプラスミドの導入

40

表 3 の各プラスミド 1 ~ 6 (6 μg) と、内部標準としてサイトメガロウイルスプロモーターの下流に - ガラクトシダーゼを連結したプラスミド : pCMV - gal (6 μg) との計 12 μg を、それぞれ 1.5 ml キャップ付き小チューブ (エッペンドルフ社製) 内で混合し、これにリポフェクション専用培養液 Opti-men (ギブコ (Gibco) BRL 社製) を添加し、総量を 300 μl とした。陰性対照としては、pCMV - gal (6 μg) と pGL3 ベーシックベクター (6 μg) とを混合したものを使用した。一方で 1.4 ml クリアチューブ (ファルコン (Falcon) 社製) 内にリポフェクション試薬 : リポフェクション (Lipofectin) (インビトロゲン (Invitrogen) 社製) を 21 μl 入れ、これに Opti-men を加え総量を 300 μl とした。45 分静置したのち、小チューブ内の各プラスミドを培地ごとクリアチューブに加え、リポフェクション試薬と混和し、さらに 15 分静置

50

した。血清含培養液（2 mMまたは16 mMのL-グルコース添加ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM））を2.4 ml添加して総量を3.0 mlとし、よく混和してリポフェクション用調製液を作成した。

【0042】

リポフェクションの24時間前に播いていた表2記載の各細胞（細胞培養用6ウェルプレートに各ウェル40万細胞個ずつ）から培養液を除いたのち、前記で得られたリポフェクション用調製液を各ウェルに1.0 mlずつ計3ウェルに添加し（実験を三重で行なうため）、CO₂インキュベータに入れ、リポフェクションを行なった。5時間静置したのち培養液を更新した（2 ml）。本実験を行なうのにpCMV g a l +各種プラスミドで計7種類の組み合わせがあり、各細胞に対して計24ウェル（6ウェルプレートで4枚）が必要であり、さらに、実験を低グルコース濃度（2 mM）および高グルコース濃度（16 mM）に分けるためこの倍、すなわち総計48ウェル（6ウェルプレートで8枚）を使用した。

10

【0043】

試験細胞とその由来を表2に示す。

【0044】

【表2】

表 2

細胞名	由来	
1)MIN6	マウスインスリン産生細胞株	内胚葉(β細胞)
2)α TC1	マウスグルカゴン産生細胞株	内胚葉(α細胞)
3)MIAPACA2	ヒト膵臓癌細胞株	内胚葉(膵島以外の膵臓由来)
4)肝細胞	ヒト正常肝細胞	内胚葉
5)HepG2	ヒト肝細胞癌細胞株	内胚葉
6)TE-1	ヒト食道癌細胞株	内胚葉
7)LOVO	ヒト結腸癌細胞株	内胚葉
8)A549	ヒト肺癌細胞株	内胚葉
9)MCF7	ヒト乳癌細胞株	外胚葉
10)293T	ヒト胎児腎芽細胞株	中胚葉

20

30

【0045】

試験プラスミドを表3に示す。

【0046】

【表 3】

表 3

番号	プラスミド
1	phINS-363/-1・Luc
2	phINS-363/-1+(hINS-363/-32)×1・Luc
3	phINS-363/-1+(hINS-363/-32)×2・Luc
4	phINS-363/-1+(hINS-363/-32)×3・Luc
5	phINS-363/-1+(hINS-363/-32)×4・Luc
6	phINS-1373/-1・Luc

10

【0047】

(B) ルシフェラーゼアッセイ

リポフェクション工程終了から36時間後、各ウェルの培養液を除き、これにレポーター細胞融解緩衝液(プロメガ社製)を400 μ lずつ添加し5分間静置したのちスクレーパーを用いて、完全に細胞を剥がした。各ウェルより内容物をエッペンドルフ社製キャップ付き1.5mlチューブに移し、軽く遠心して不溶解物を底に落とした。この上清100 μ lとBright-Glo ルシフェラーゼアッセイ基質(プロメガ社製)100 μ lを混和し、ルミノメーターを用いて発光量(RLU)を測定した。

20

【0048】

-gal値測定のために、同上清30 μ lを190 μ lの-gal溶液(1mM MgCl₂、45mM -メルカプトエタノール、0.88mg/ml ONPG、67mM リン酸ナトリウム、pH 7.5)と混和し、10分後プレートリーダーにてOD=405nm値を測定した。各ウェルのRLU/-gal値を測定し、陰性対照として用いたpGL3+pCMV-galの3ウェルのRLU/-gal値の平均値を求め、この値を倍率(fold value)1.0としたときの各ウェルのRLU/-gal値を算出した。各組み合わせでの誘導倍率(Fold Induction): Luc(RLU)/-gal値からその平均、SDを計算。解析を行なった。

30

【0049】

結果を図6および7に示す。

【0050】

プラスミド2~6は、内胚葉以外の他胚葉由来のヒト細胞においては活性が認められなかった(MCF7および293T)。また内胚葉由来膵癌細胞(MIAPACA2)および細胞由来グルカゴン産生細胞(TC1)を含め、細胞を除く他の内胚葉由来細胞においても同様になんら活性は認められなかった。細胞由来でインスリン産生細胞であるMIN6においては、低グルコース条件において、プラスミド1では4.3倍のプロモーター活性を示し、プラスミド2~5では漸増した(74.4~102.8倍)(図6)。さらに、高グルコース条件においては、これらの活性はさらに増強された(図7)。

40

【産業上の利用可能性】

【0051】

本発明のプロモーターは、インスリン産生細胞に非常に強い特異性を示し、転写活性が高いため、たとえば、本発明のプロモーターの下流に、ルシフェラーゼ、GFPなどのレポーター遺伝子や抗生剤耐性遺伝子などを連結させた配列を含むベクターを使用することにより、効率のよいインスリン産生細胞の選択方法を提供できる。

【0052】

50

さらに、本発明のプロモーターは、グルコース濃度応答性であり、高濃度グルコース条件下で培養することでより厳格にインスリンプロモーター活性を持つ細胞集団を選別することができる。

【配列表フリーテキスト】

【0053】

配列番号3：ヒトインスリンプロモーターの - 363 / - 1 領域の 5 側にXhoI制限部位を組み込んだフォワードプライマー

配列番号4：ヒトインスリンプロモーターの - 363 / - 1 領域の 3 側にHindIII制限部位を組み込んだリバースプライマー

配列番号5：ヒトインスリンプロモーターの - 363 / - 32 領域の 5 側にSma I 制限部位を組み込んだフォワードプライマー

10

配列番号6：ヒトインスリンプロモーターの - 363 / - 32 領域の 3 側にXho I 制限部位を組み込んだリバースプライマー

配列番号7：ヒトインスリンプロモーターの - 363 / - 32 領域の 5 側にNhe I 制限部位を組み込んだフォワードプライマー

配列番号8：ヒトインスリンプロモーターの - 363 / - 32 領域の 3 側にSma I 制限部位を組み込んだリバースプライマー

配列番号9：ヒトインスリンプロモーターの - 363 / - 32 領域の 5 側にMlu I 制限部位を組み込んだフォワードプライマー

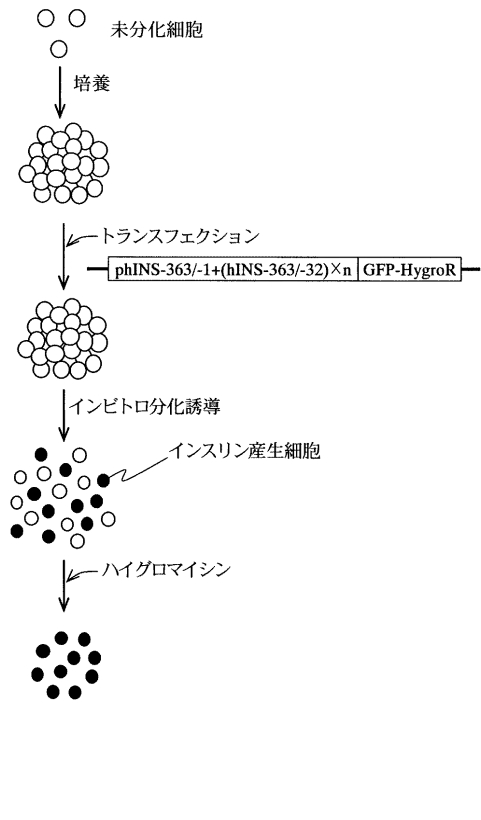
配列番号10：ヒトインスリンプロモーターの - 363 / - 32 領域の 3 側にNhe I 制限部位を組み込んだリバースプライマー

20

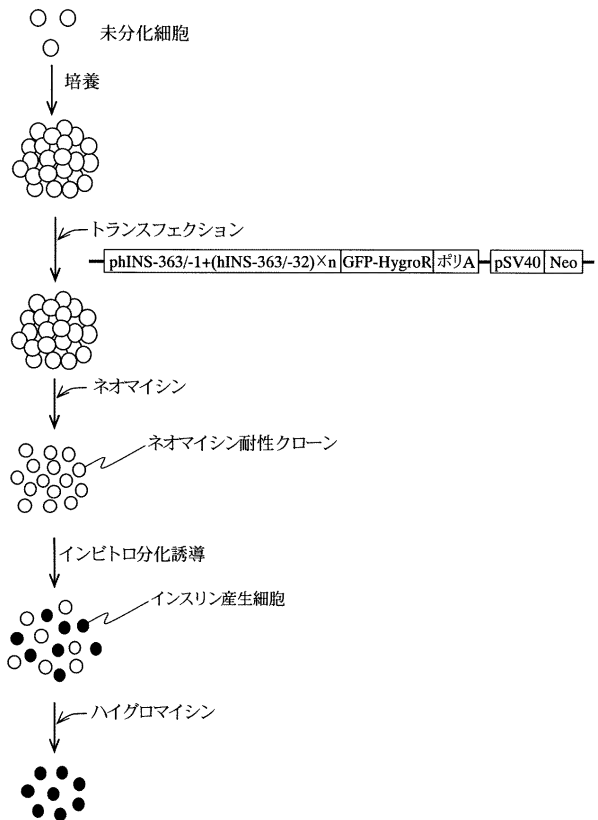
配列番号11：ヒトインスリンプロモーターの - 363 / - 32 領域の 5 側にKpn I 制限部位を組み込んだフォワードプライマー

配列番号12：ヒトインスリンプロモーターの - 363 / - 32 領域の 3 側にMlu I 制限部位を組み込んだリバースプライマー

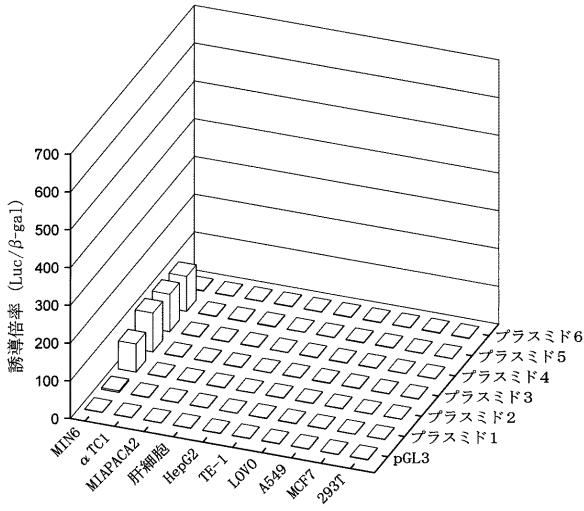
【図2】



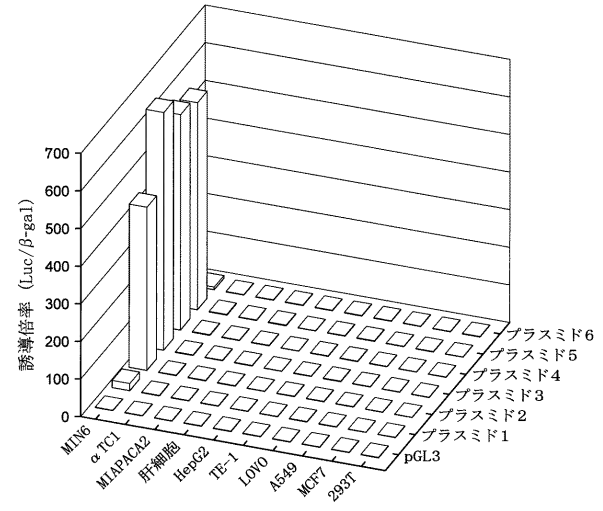
【図3】



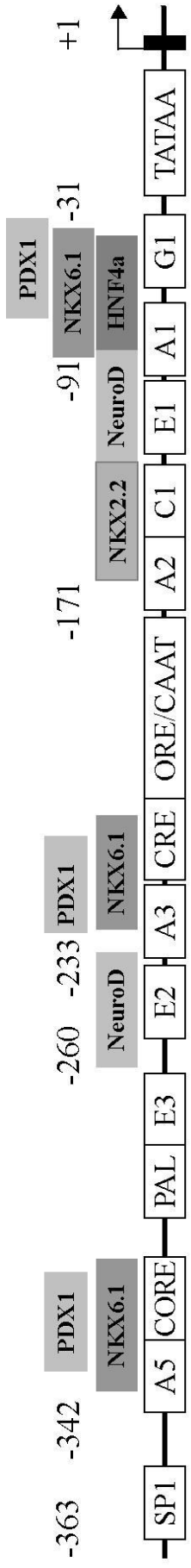
【図6】



【図7】

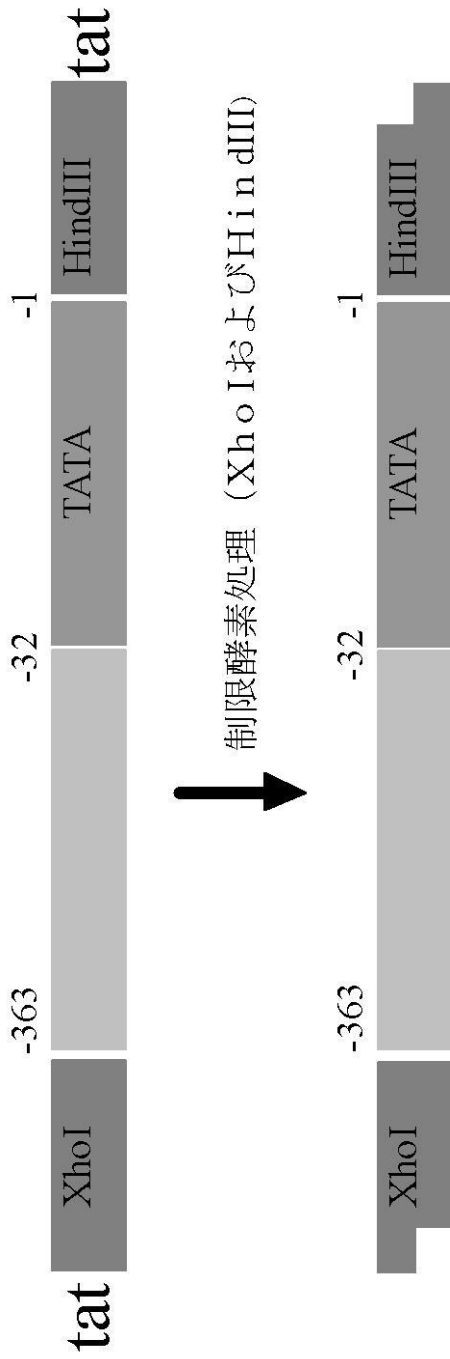


【 図 1 】

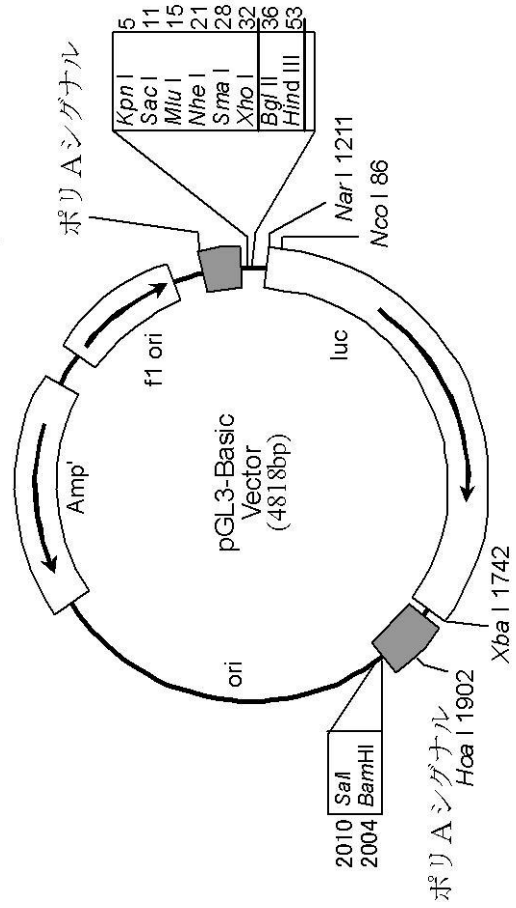


グルコース応答エレメント

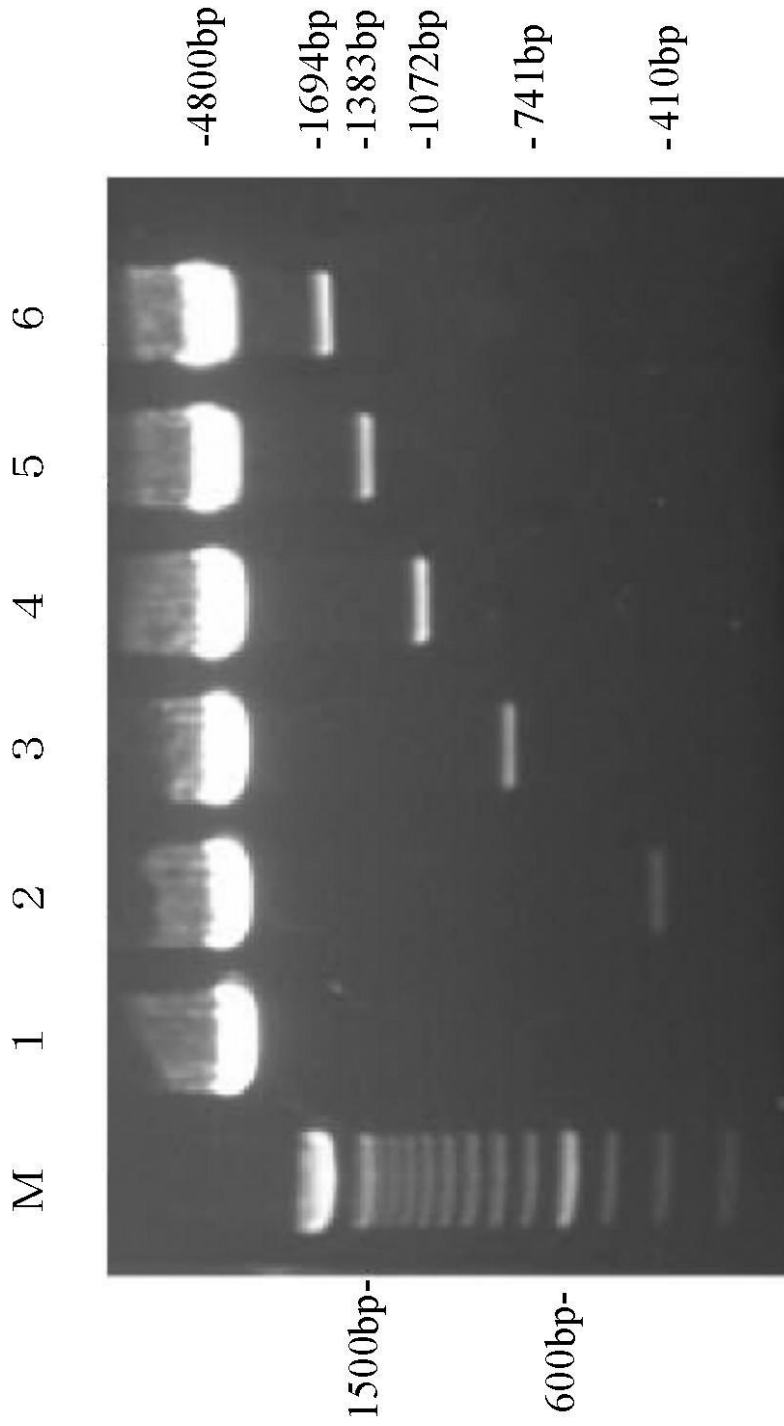
【図4】



ベクターのサブクローニング



【 図 5 】



【 配列表 】

0004825978000001.app

フロントページの続き

(72)発明者 深沢 拓也

岡山県岡山市鹿田町二丁目5番1号 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科内(医)

審査官 上條 肇

(56)参考文献 Diabetologia, 2001年, 第44巻, 407-415ページ
J Biol Chem., 1996年, 第271巻, 1909-1915ページ
Diabetes, 1995年, 第44巻, 1002-1004ページ
Plant Cell., 1989年, 第1巻, 141-150ページ
Transgenic Res., 2004年12月3日, 第13巻, 559-566ページ
Transgenic Res., 1997年, 第6巻, 143 - 156ページ
Exp Cell Res., 2006年, 第312巻, 3404 - 3412ページ

(58)調査した分野(Int.Cl., D B名)

C12N 15/09
CA/REGISTRY(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq
PubMed
Science Direct