

厚生労働科学研究研究費補助金
ヒトゲノム・再生医療等研究事業

新規ヒト人工染色体ベクター開発と応用に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 押 村 光 雄

平成15(2003)年3月

目 次

I.	総括研究報告書	
	新規ヒト人工染色体ベクター開発と応用に関する研究	1
	押村 光雄	
II.	分担研究報告書	
1.	HAC ベクターの構築とクローニング系の確立に関する研究	6
	押村 光雄	
2.	HAC ベクターおよび受容細胞の高度精製法の確立に関する研究	9
	西川 光郎	
3.	遺伝子治療用ヒト人工染色体ベクター開発に関する研究	12
	富塚 一磨	
4.	欠損遺伝子病 (SCID) に対する遺伝子治療に関する研究	13
	栗政 明弘	
5.	欠損型遺伝病 (DMD) に対する遺伝子治療の試みに関する研究	15
	花岡 和則	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	18

新規ヒト人工染色体ベクター開発と応用に関する研究

主任研究者 押村 光雄 鳥取大学・医学部・教授

研究要旨

ヒト 21 番染色体から染色体工学の手法により長腕および短腕遠位を削除したヒト人工染色体 (Human Artificial Chromosome) の構築を進めている。この HAC にクローニングサイトとして loxP 配列を付与し、Cre 酵素を利用した部位特異的組換えを用いて環状 DNA インサートを挿入する系の確立を進めている。Ex vivo での HAC による付加的遺伝子治療の対象として造血幹細胞を選び、これを未分化状態で維持・増幅するために、s-IL6R, IL-6 融合タンパク質 (FP6) を CHO 細胞で発現・精製する系を確立した。FP6 の利用により従来法と比べ造血幹細胞を未分化状態で培養可能なことが示された。ホルモン補充療法への適用に向けた HAC ベクターの性能評価のため、ヒトエリスロポエチン遺伝子発現ユニットを用いた検討を進めた。欠損型遺伝病に対する HAC による遺伝子治療のモデルとして、SCID の原因遺伝子である DNA-PKcs をテトラサイクリン応答性に発現制御する系の確立を進めた。

一方で HAC ベクターへの転座型クローニング系の確立を進めた。欠損型遺伝病であるデュシャンヌ型筋ジストロフィー (DMD) の原因遺伝子ジストロフィンを含むヒト X 染色体断片をヒト 14 番染色体由来 HAC (SC20) に転座させた。DMD の遺伝子治療ならびに DMD モデルマウス作成のための基礎的な実験系が確立できた。

分担研究者

押村光雄・鳥取大学医学部・教授
栗政明弘・鳥取大学大学院
医学系研究科・助教授
西川光郎・キリンビール (株)
医薬探索研究所・主任研究員
富塚一磨・キリンビール (株)
医薬探索研究所・主任研究員
花岡和則・北里大学理学部・教授

の組み換え DNA 操作技術で扱える範囲を超え、取り扱いが困難であることから、性能的に満足すべき基本ベクターすら未だに作製されていない状況にある。そこで本研究では既存の HAC の問題点を解決した新規 HAC ベクターの作製を目的とし、遺伝子治療、再生医療における将来利用を想定した実用性の検討を動物モデルを用いて実施する。

B. 研究方法

HAC ベクター系の構築にあたり以下の 5 つのサブテーマを設定し、分担研究者が並行して研究を遂行する。HAC ベクターへの遺伝子クローニング法としては、環状インサートをカセット方式で挿入する「挿入型」、および染色体転座により染色体断片を導入する「転座型」を検討する。

- ・ HAC ベクターの構築と安定性確認ならびに挿入型クローニング系の確立

本年度は基本基本ベクターの構築を中心に研究を進めた。塩基配列既知のヒト 21 番染色体から染色体工学の手法により短腕および長腕遠位を削除し、目的とする遺伝子のクローニングサイトとして loxP 配列を導入する。Cre/loxP システムを利用した遺伝子の挿入と発現を検討する。HAC ベクターをヒト細胞に移入し長期継代培養における安定性を確認する。

A. 研究目的

ヒト人工染色体 (Human Artificial Chromosome: HAC) ベクターは、ヒト染色体に任意の改変を施しそれ自体を遺伝子導入ベクターとして利用するという、新規のベクター系である。①宿主染色体に挿入されず独立して維持される (宿主遺伝子の変異やがん化の懸念がない)、②一定のコピー数で長期間安定に保持される (過剰発現、発現消失の懸念がない)、③導入可能な DNA の長さの制限がない (正常な発現制御を保証する DNA エレメントを含む遺伝子や複数遺伝子を同時に導入可能)、という既存のベクター系にない多くの特徴を備えている。このため HAC ベクターは、哺乳動物細胞用遺伝子ベクターとして従来不可能であった多くの応用を可能にすると想像される。一方そのサイズ (数 Mb 以上) が従来

- ・ HAC ベクターおよび受容細胞の高度精製法の確立

個体から単離できる造血系幹細胞の数は有限である。造血系幹細胞に HAC を移入するには、体外に取り出した造血系幹細胞の造血系細胞の再構築能を損なわずに培養、増幅する必要がある。そこで本年度は sIL-6R と IL-6 の融合タンパクである FP6 を用いて、造血幹細胞を無血清培地において効率的に増幅する系を検討した。

- ・ 付加的遺伝子治療の試み

蛋白ホルモン欠乏性疾患においては当該遺伝子を患者由来の細胞に導入発現させ、生体に移植することは有効な治療法となりうる。一方これらホルモンの過剰発現は副作用をもたらすため厳密な発現制御が要求され、導入 DNA の大きさに制限がなく、コピー数が厳密に維持される HAC ベクターの利用が望ましい。本年度はホルモン補充療法の重要な対象のひとつである腎性貧血の治療薬ヒトエリスロポエチン (hEPO) について検討する。

- ・ 欠損型遺伝病 (SCID) に対する遺伝子治療の試み

DNA-PKcs 遺伝子ノックアウトマウスは自然発生の SCID マウスと同一の重症複合免疫不全を示す。この欠損マウス由来の細胞に DNA-PKcs 遺伝子を cDNA 強制発現ベクターで導入しても極めて少ない発現しか得られない。これは、大量発現により細胞毒性あるいは増殖抑制が現れて、低発現の導入細胞のみが選択的に分離される可能性が考えられる。この問題点を克服し人工的な発現制御を可能にするため、テトラサイクリンによる発現誘導が可能な DNA-PKcs 遺伝子を HAC に組み込む。

- ・ 欠損型遺伝病 (DMD) に対する遺伝子治療の試み

デュシャンヌ型筋ジストロフィー (DMD) の原因遺伝子であるジストロフィン (Dp71) は全長 2.4MB にも及ぶ巨大な遺伝子である。ベクターに組み込み可能な DNA サイズの制約により、通常の遺伝子操作で細胞に導入することは困難である。そこで HAC ベクターによりヒト染色体断片を細胞に直接導入するという新しい手法により、筋ジストロフィーモデル動物の作成や遺伝子治療のための基本技術の確立を試みる。これまでにジストロフィン遺伝子を含むヒト X 染色体短腕全長をマウス ES 細胞に導入し、キメラマウスが作成された。しかしこの染色体断片は著しく不安定であり発生の過程で多くは消失することが判明した。この結

果に基づき、本年度はジストロフィン遺伝子領域を、ヒトおよびマウスの細胞で安定性が確認されているヒト人工染色体 HAC-SC20 に転座させることを試みた。

(倫理面への配慮)

本研究は、将来的に遺伝子治療に利用可能な新規ベクター系の基盤技術を培養細胞、マウス個体レベルで確立することを目標とする。したがって新規ベクターの患者個体への適用を含むものではない。本研究の遂行にあたっては、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守する。同指針の定める「資料」に該当する筋ジストロフィー (DMD) 患者由来の体細胞を用いた実験は、研究分担者の花岡 (北里大学・理学部) が担当する。同細胞は国立精神神経センターにおいて同指針を遵守して採取されたものを、同研究分担者が同センターのリサーチ・リソース・ネットワークの承諾を得て分与を受けるものである。このため資料は連結不可能匿名化されており、人権擁護上の問題はない。また本分担研究は北里大学医学部倫理委員会の承認を受けている。研究分担者の西川 (キリンビール・医薬探索研究所) は造血幹細胞を用いた実験を行う。ソースは臍帯血、骨髄、動員末梢血であるが、これらはインフォームド Consent のもと取得され、キリンビール株式会社群馬地区研究所研究倫理委員会で審査の上使用が認められた細胞を使用する。その他の分担研究は既に広く一般に流布しているヒト培養細胞株から分離した染色体断片をマウス細胞に導入するものであり、一般的なトランスジェニックマウス作成と同等の組換え DNA 実験 (P2 レベル) の範疇に入る。本研究の実施にあたっては同指針を遵守する。実験動物の愛護については、安楽死の方法を含めて十分に配慮して研究を遂行する。

c. 研究結果

本研究内容の一部については特許出願中である。研究成果を知的所有権として確保することは重要と考える。このため公開を前提としている本報告書において、現時点で得られている結果を全て記載することは差し控えたい。したがって以下は特許出願に支障のない範囲で記す。

1. HAC ベクターの構築と安定性確認ならびに挿入型クローニング系の確立

ヒト 21 番染色体を改変するための中間宿主としては、相同組み換えを高頻度に起こす二

ワトリ DT40 細胞を用いる。染色体移入は微小核細胞融合法により行う。オンラインデータベースより得たヒト 21 番染色体近位の塩基配列をもとに相同組換えの標的配列を設定し、薬剤耐性遺伝子および人工テロメア配列ないし loxP 配列を含むターゲットングコンストラクトを作成する。長腕削除にはピューロマイシン耐性遺伝子, loxP 導入にはブラストサイジン耐性遺伝子, 短腕削除にはハイグロマイシン耐性遺伝子を用いる。電気パルス法にてターゲットングコンストラクトを細胞に導入し、薬剤耐性細胞について PCR, サザンブロット, FISH 解析を行い目的の相同組み換え体を選別する。

構築した HAC ベクターはヒト細胞に移入し、非選択培養条件下で長期継代培養ののち FISH 解析を行い、保持率を検討する。

Cre/loxP システムによる環状インサートの挿入法は GFP 遺伝子を用いて検討を行う。蛍光顕微鏡観察およびフローサイトメーターによる蛍光蛋白の発現を検証するとともに、サザンブロット, FISH 解析によって目的の相同組み換え体であることを確認する。

2. HAC ベクターおよび受容細胞の高度精製法の確立

a) FP6 の産生

S IL-6R, IL-6 融合タンパク質 FP6 を CHO 細胞にて発現し、精製した。FP6 の測定系として、IL-3 依存性細胞細胞株 Ba/F3 にヒト gp130 遺伝子を発現させ gp130 シグナルに依存して増殖する細胞株 (Ba/F3-gp130) を樹立した。精製 FP6 は濃度依存的に Ba/F3-gp130 の増殖を刺激し、20ng/ml 程度で増殖刺激は最大となった。

b) 無血清培地の選択と培養の至適化

(1) FP6 のコロニー形成能に与える影響
FP6 の造血細胞に対する直接作用を効無血清培地でのコロニーアッセイにより検討した。FP6 単独では全く造血細胞の増殖を刺激しなかった。そこで SCF, TPO, FL といった造血幹細胞に作用する因子との協調作用を FP6 の濃度を変化させ検討した。その結果 FP6 の濃度は 100ng/ml 以上で有効に作用させることができ、CFU-GEM, CFU-Blast といった非常に未分化な細胞を生存、維持させる活性を有する有効なサイトカインであることが明らかとなった。

(2) 無血清培地による造血幹細胞の増幅培養

FP6 の未分化細胞維持の活性が確認できたので、QBSF60 無血清培地を用いて造血幹細胞の増幅条件を検討した。TPO+SCF+FP6+FL の

4 サイトカイン存在の条件で FP6 の濃度をふり、経時的にコロニー形成細胞の増幅を観察した。その結果、FP6 100ng/ml 添加時では、1 週、2 週、3 週でコロニー形成細胞数が約 18 倍、61 倍、160 倍に増幅した。すなわち、本培養系により造血細胞を効率的に長期にわたり増幅可能であることが示された。

3. 付加的遺伝子治療の試み

HAC による hEPO 遺伝子の発現には、各種サイトカインの組み換え体産生に広く利用され、大量生産も行われている CHO 細胞を用いる。ヒト 21 番染色体から長腕部を削除し loxP サイトを導入した HAC を CHO 細胞に移入し、CMV プロモーター/hEPO 遺伝子発現ユニットを含むベクターと Cre 発現ベクターを co-transfection (電気パルス法) により導入する。出現した G418, Bsr 二重耐性クローンについて、HAC 上 loxP 部位への発現ユニット挿入を PCR 法で確認し、さらに培養上清中の hEPO 濃度を ELISA 法により測定する。同じ構造の発現ユニットがランダム挿入された CHO 細胞株も対照として取得し、上清中 EPO 濃度の測定を同様に実施する。

4. 欠損型遺伝病 (SCID) に対する遺伝子治療の試み

DNA-PKcs 発現用のカセットは、P_{CMV} の制御下でテトラサイクリンによる誘導に必要な rtTA を発現させる構造とする。DNA-PKcs 遺伝子は、tetO の下流に置き、DNA-PKcs 遺伝子がテトラサイクリンの投与により発現を操作できるよう設計する。

このコンストラクトを Cre 発現ベクターと共に HAC を保持する CHO 細胞に導入し、G418 耐性クローンを得る。RT-PCR およびウエスタンブロットにて、DNA-PKcs の発現を確認する。次に DNA-PKcs を含む Δ qHAC を、DNA-PKcs 遺伝子欠損細胞株である V3 細胞 (チャイニーズハムスター細胞由来) と M059J 細胞 (ヒト神経膠腫由来) に導入し、G418 耐性クローンを得る。RT-PCR およびウエスタンブロットにて、DNA-PKcs の発現を確認したのち放射線感受性の補正を検討する。

一方で先に Δ qHAC を V3 細胞と M059J 細胞に移入したのち、テトラサイクリン誘導型 DNA-PKcs 遺伝子コンストラクトを導入する。得られた G418 耐性クローンについて DNA-PKcs の発現を RT-PCR およびウエスタンブロットにより確認し、放射線感受性の補正を検討する。

5. 欠損型遺伝病 (DMD) に対する遺伝子治療の試み

ヒト X 染色体ジストロフィン遺伝子の遠位約 2Mb には GK(glycerol kinase deficiency) が、近位には TCTE1L(t-complex-associated-testis-expressed 1-like) の存在が報告されている。この情報をもとに、ジストロフィン遺伝子領域 (2.3Mb) だけをヒト X 染色体より切り出し人工染色体 HAC-SC20 に連結した。

a) Telomere truncation

GK 遺伝子の塩基配列をもとに約 3.2Kb の DNA を PCR 法により増幅し、ピューロマイシン耐性遺伝子および人工テロメア配列 (TTAGGG)_n を連結したターゲティングベクターを作成した。このベクターをヒト X 染色体断片を保持したトリ DT40 細胞に導入し、ピューロマイシン耐性細胞をクローニングし、PCR および FISH により GK 遺伝子座よりテロメア側が切断されていることを確認した。

b) ヒト人工染色体 HAC-SC20 との連結

上記 X 染色体断片の TCTE1L 遺伝子領域に、相同組み換えを利用して LoxP 配列と PGK プロモーターを挿入した。ヒト 14 番染色体由来の HAC である SC20 には LoxP 配列と GFP が挿入されており、両染色体を保持した DT40 細胞に Cre recombinase を作用させると両染色体の LoxP 配列間で組み換えが生じて GFP が発現する。GFP 陽性細胞を FACS で分離し、PCR および FISH で転座を確認した。ジストロフィン遺伝子領域が転座した HAC-SC20 (HAC-SC20-dys) を効率的にマウス ES 細胞やヒト筋芽細胞に導入するため、DT40 細胞から CHO 細胞に移入し、PCR および FISH で移入を確認した。

現在、HAC-SC20-dys をマウス ES 細胞およびヒト DMD 患者生検試料から分離した筋芽細胞に導入している。ES 細胞ではすでに HAC-SC20-dys を保持した細胞株が得られている。

D. 考察

本年度はヒト 21 番染色体を改変した HAC 基本ベクターの構築を進めた。Cre/loxP システムによる環状 DNA の挿入と遺伝子発現を確認し、培養細胞中での安定保持が検証でき次第、hEPO による付加的治療、DNA-PKcs による欠損型遺伝子病に対する治療への適用を検討する。

HAC 受容細胞の高度精製については、FP6 を用いることで造血幹細胞を無血清培地において効率的に増幅できることを示した。これら培養細胞の幹細胞としての性質、前駆細胞

としての性質についてはさらに詳細に検討しなければならないが、非常に未分化な造血細胞を培養する系については前進した。来年度は本培養系での幹細胞の増幅様式の検討ならびに改善を行う予定である。

転座型クローニング系については、ジストロフィン遺伝子を人工染色体 HAC-SC20 に転座させた染色体ベクター HAC-SC20-dys が完成した。これまでの研究において HAC SC20 は、ヒトおよびマウスの細胞内で極めて安定であり、ES 細胞へ導入した場合、生殖系列への伝達も確認されているので mdx マウスと交配することによりジストロフィン遺伝子だけがヒト化されたマウスを作成することが可能になる。DMD 患者由来の培養細胞の X 染色体を用いて同様な操作を行うことにより、変異したジストロフィン遺伝子領域だけが「ヒト化」された究極的な DMD 疾患モデルマウスを作成できると期待される。

今回作成した HAC-SC20-dys がヒト細胞内で安定に維持され、正常なジストロフィンタンパクを産生し続けるかは、DMD 治療のための染色体ベクターとしての有用性を確かめるうえで重要である。現在、DMD 患者由来筋芽細胞に本染色体ベクターを導入してその発現を解析するための準備を進めている。

E. 結論

- ・ ヒト 21 番染色体の長腕および短腕を削除し loxP サイトを導入した挿入型 HAC ベクターの構築を進めた。
- ・ HAC 受容細胞となる造血幹細胞の増幅系として、FP6 を発現・精製する系を確立した。FP6 を用いることで従来法に比べ造血幹細胞を未分化状態を保って培養可能なことを示した。
- ・ ヒトエリスロポエチン遺伝子発現ユニットの HAC への導入を検討した。
- ・ テトラサイクリン応答性 DNA-PKcs 遺伝子発現ユニットの HAC への導入を検討した。
- ・ 転座型クローニング系により、ジストロフィン遺伝子を HAC-SC20 にクローニングした。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. Yamamoto K, Yoshida K, Miyagoe Y, Ishikawa A, Hanaoka K, Nomoto S, Kaneko K, Ikeda S and Takeda S:

Quantitative evaluation of
expression of iron-metabolism
genes in ceruloplasmin-deficient
mice, BBA, 1588 (3), 195-202, 2002

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

<申請中>

ヒト人工染色体 (HAC) ベクター (特願
2002-292853)

HAC ベクターの構築とクローニング系の確立に関する研究

主任研究者 押村 光雄 鳥取大学・医学部・教授

研究要旨

染色体工学の手法を駆使してヒト 21 番染色体から長腕遠位を削除し、クローニングサイトとして loxP 配列を付与したヒト人工染色体ベクターの構築を進めている。GFP 遺伝子を例としてヒト人工染色体ベクターからの遺伝子発現を確認中である。また非選択条件下での継代培養により、ヒト細胞における染色体ベクターの安定性を検討しつつある。

A. 研究目的

ヒト人工染色体（Human Artificial Chromosome: HAC）ベクターは、ヒト染色体に任意の改変を施しそれ自体を遺伝子導入ベクターとして利用するという、新規のベクター系である。①宿主染色体に挿入されず独立して維持される（宿主遺伝子の変異やがん化の懸念がない）、②一定のコピー数で長期間安定に保持される（過剰発現、発現消失の懸念がない）、③導入可能な DNA の長さの制限がない（正常な発現制御を保証する DNA エレメントを含む遺伝子や複数遺伝子を同時に導入可能）、という既存のベクター系にない多くの特徴を備えている。このため HAC ベクターは、哺乳動物細胞用遺伝子ベクターとして従来不可能であった多くの応用を可能にすると想像される。一方そのサイズ（数 Mb 以上）が従来の組み換え DNA 操作技術で扱える範囲を超え、取り扱いが困難であることから、性能的に満足すべき基本ベクターすら未だに作製されていない状況にある。そこで本研究では既存の HAC の問題点を解決した新規 HAC ベクターの作製を目的とする。

B. 研究方法

・ HAC ベクターとクローニング系の構築

HAC 構築のアプローチは①自然発生断片利用、②ボトムアップアプローチ（クローン化された構造既知の DNA 断片を細胞に導入してアセンブル）、③トップダウンアプローチ（天然の染色体をトリミング）の 3 種がある。本研究ではトップダウン方式で人工染色体の構築を行う。出発資材にはゲノム配列が決定済みであるヒト 21 番染色体を利用する。染色体改変の部位を任意に設定でき、構築した HAC ベクターの一次構造が既知であるという利点がある。はじめに高頻度に相同組換えを生じるニワトリ DT40 細胞中において人為的にテロ

メア配列を挿入（テロメアシーディング）することにより、ヒト 21 番染色体の短腕および長腕遠位を削除する。自律複製・分配、安定維持が可能であり、なおかつ余分な遺伝子の持ち込みがない最小単位の HAC を作製する。次に loxP 配列を挿入して外来 DNA のクローニングサイトとする。導入する外来 DNA は環状とし、これにあらかじめ loxP 配列を導入しておく。環状インサート DNA を Cre 発現ベクターと共に、HAC ベクターを保持する DT40 細胞にトランスフェクトする。インサートとベクターの双方に分断した薬剤耐性遺伝子を導入しておき、Cre 酵素の発現による環状インサートの挿入に伴う薬剤耐性遺伝子の再構成を指標として組み換え体を選択する。

・ HAC ベクターの安定性評価

HAC ベクターを各種細胞に移入し、非選択条件下で長期継代培養し、HAC の保持率を検索して安定性を確認する。

（倫理面への配慮）

本分担研究では既に広く一般に流布しているヒト培養細胞株から分離した染色体断片を動物細胞に導入する。これは一般的なトランスジェニック動物作成と同等の組換え DNA 実験（P2 レベル）の範疇に入る。本研究の実施にあたっては同指針を遵守する。

C. 結果

本研究内容については特許出願中である。このため公開を前提としている本報告書において、現時点で得られている結果を全て記載することは差し控えたい。したがって以下は特許出願に支障のない範囲で記す。

1) HAC ベクターの構築

ヒト 21 番染色体を DT40 細胞株に移入し、以下の手順に従って HAC ベクターを構築中である（図 1）。

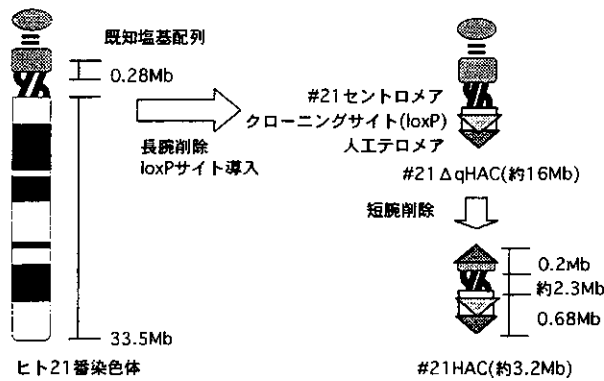


図1. 染色体改変によるヒト21番染色体からのHAC構築

(a) 長腕遠位の削除

ヒト 21 番染色体を保持する DT40 細胞に長腕近位を標的としたテロメアトランケーションベクターを導入し、ピューロマイシン耐性クローンを単離する。削除部位より長腕遠位に位置する 3 種の STS マーカーを用いた PCR を行い候補クローンを同定する。これらについてサザンブロットにより解析し、目的の相同組換え体であることを確認する。さらに FISH 解析を行い、21 番染色体長腕の短縮を確認する。

(b) loxP 配列の挿入

次いでヒト 21 番染色体長腕近位に loxP 配列をベクターを導入し、ブラストサイジン耐性のクローンを同定する。サザンブロットにより解析し、目的の相同組換え体を選別する。さらに FISH 解析を行い、ブラストサイジン耐性遺伝子の挿入を確認する。これを 21 ΔqHAC ベクターと呼ぶ。

(c) 短腕遠位の削除

ヒト 21 番染色体短腕近位を標的としたテロメアトランケーションベクターを導入し、ハイグロマイシン耐性クローンを単離する。これらをサザンブロットにより解析し、目的の相同組み換え体を選別する。

2) 21 ΔqHAC ベクターの CHO 細胞への移入

染色体改変のための中間宿主である DT40 細胞は、微小核形成能を有し染色体供与細胞となりうるが、受容細胞との組み合わせによっては微小核細胞融合の効率が低い。DT40 細胞からハムスター卵巣由来線維芽細胞 CHO へは効率よく染色体が移入され、CHO 細胞は染色体供与細胞として優れている（微小核形成能が高い、受容細胞によらず染色体移入ができる）。そこで初めに 21 ΔqHAC ベクターを DT40 から CHO 細胞に移入する。ブラストサイジン耐性クローンについて STS マーカー 2 種の存在を PCR で検討し、CHO 細胞内で 1 コピーの

HAC が独立して存在することを FISH 解析により確認する。

3) 21 ΔqHAC ベクターへの遺伝子挿入と発現 neo 遺伝子の再構成を利用した Cre/loxP 系による部位特異的な遺伝子の挿入と発現を、GFP を例として検討する (図 2)。GFP コンストラクトと Cre 酵素発現ベクター pBS185 を 21 ΔqHAC ベクターを保持する CHO 細胞に導入し、G418 耐性クローンを選別する。蛍光顕微鏡下での観察により、GFP の発現を検討する。これらについてサザンブロットにより解析し、目的の相同組換え体であるかどうかを検討する。

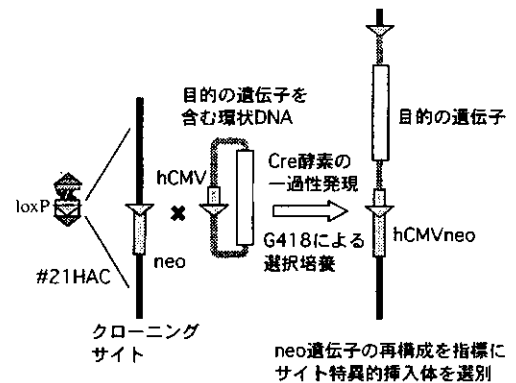


図2. Cre/loxPシステムを利用した環状DNAインサートのHAC上への部位特異的挿入

4) 21 ΔqHAC ベクターの各種細胞における安定性評価

(a) 雑種細胞における安定性

21 ΔqHAC ベクターを保持する DT40 細胞を選択薬剤 (ブラストサイジン) 添加、非添加の培地で長期継代培養し、HAC の保持を FISH 法により検討する。

(b) ヒト細胞における安定性

はじめに 21 ΔqHAC ベクターを CHO 雑種細胞からヒト細胞 HT1080 に移入し、ブラストサイジン耐性 12 クローンを得る。これらを長期継代培養し、ギムザ染色による染色体解析から HAC の保持を検討する。

D. 考察

HAC ベクターは、ヒト染色体に任意の改変を施してそれ自身を遺伝子導入用ベクターとして利用するという、新規のベクター系である。これまでの研究から、ヒト染色体を任意の部位で特異的に切断する技術、ヒト染色体を移入する技術は確立されている。ヒト 21 番染色体をマウス ES 細胞に移入した実験では、キメラ率の高い個体が作出され、21 番染色体の

部分断片は次世代伝達が確認されていることから、ヒト 21 番染色体由来の HAC ベクターは培養細胞、マウス個体中で安定に保持されると予想される。

E. 結論

宿主染色体に挿入されず独立に存在し外来遺伝子の発現が可能な HAC ベクターが構築を試みている。この HAC ベクターがヒトおよび雑種細胞において安定に保持されることが確認できれば、培養細胞系における遺伝子発現実験による機能解析や培養細胞における有用物質生産、さらには付加的遺伝子治療に有用であると考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

<申請中>

ヒト人工染色体 (HAC) ベクター (特願
2002-292853)

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療研究事業）
分担研究報告書

HAC ベクターおよび受容細胞の高度精製法の確立に関する研究

分担研究者 西川光郎 キリンビール（株）医薬探索研究所 主任研究員

研究要旨

造血幹細胞から未分化な造血細胞を維持・増幅する系の確立を目的として、s IL-6R、IL-6 融合タンパクである FP6 を CHO 細胞で発現し、精製する系を確立した。FP6 を用いて、造血幹細胞の無血清培地による効率的な増幅系の検討を開始した。FP6 の利用により従来の方法よりも造血幹細胞を未分化な状態を保ったまま培養することが可能となると示唆された。

A. 研究目的

ヒト人工染色体を造血細胞に長期に維持させるには、造血幹細胞に導入することが理想的である。造血幹細胞にヒト人工染色体を導入する際に *in vitro* で培養することが必要であるが、現在まで造血幹細胞を試験管内で分化させずに培養する方法は確立されていない。また、少数の造血幹細胞にしかヒト人工染色体導入が導入されなくとも、造血幹細胞を増幅することで染色体保持細胞を増幅することが可能となる。本研究テーマでは、造血幹細胞を増幅する系を確立し、染色体保持造血細胞を提供することを目的とする。

B. 研究方法

造血幹細胞の増幅系の確立には適切なサイトカインを選択し、分化を促進せず自己複製を促進するようなサイトカインの組み合わせで培養する必要がある。造血幹細胞には、造血前駆細胞とは異なるサイトカイン受容体が発現されており、さらに造血前駆細胞でも発現している受容体が発現していてもシグナルを伝達できないことを我々は明らかにしてきた。多くの研究から、既知のサイトカインの組み合わせとしては、TPO、SCF、flt-3 リガンド、gp130 受容体刺激の組み合わせが造血幹細胞の自己複製を促進するのに適していることが明らかにされてきた。

gp130 シグナル伝達系は、gp130 とサイトカインに特有な α 鎖（たとえば、IL-6 受容体 α 鎖、LIF 受容体 α 鎖など）の関与が必要である。一方、可溶化型 IL-6 受容体は IL-6 とともに作用させることで、IL-6 受容体 α 鎖が細胞に発現していなくとも、IL-6 シグナルを伝達することができる。造血幹細胞では、gp130 は発現しているが、IL-6 受容体 α 鎖の発現は確認されておらず、gp130 シグナル刺

激を入れるには s IL-6R、IL-6 を同時に添加することが重要である。s IL-6R、IL-6 のシグナル伝達は、これらの分子を融合タンパク質として発現することでさらに gp130 への結合能が 1000 倍以上あがることが知られている。そこで、s IL-6R-IL-6 融合タンパク質である FP6 を CHO にて発現し、さらにその活性を評価する系を確立した。通常培養に使用されるウシ胎児血清は臨床的に好ましくなく、無血清培養により培養することが望まれている。無血清培養における各種サイトカインの組み合わせの至適化を行った。

（倫理面への配慮）

造血幹細胞ソースとしては、臍帯血、骨髓、動員末梢血をもちいるが、これらの細胞はインフォームドコンセントのもと取得され、キリンビール株式会社群馬地区研究所研究倫理委員会で審査の上使用が認められた細胞を研究に供する。

C. 研究結果

1. FP6 の産生

報告されている s IL-6R、IL-6 融合タンパク質である FP6 を CHO 細胞にて発現し、精製した。FP6 の測定系として、IL-3 依存性細胞細胞株 Ba/F3 にヒト gp130 遺伝子を発現させ gp130 シグナルに依存して増殖する細胞株 (Ba/F3-gp130) を樹立した。精製 FP6 は濃度依存的に Ba/F3-gp130 の増殖を刺激し、20ng/ml 程度で増殖刺激は最大となる。

2. 無血清培地の選択と培養の至適化

(1) FP6 のコロニー系性能に与える影響の検討

FP6 の造血細胞に対する直接作用を効無血清培地でのコロニーアッセイにより検討した。その結果、FP6 を単独で作用させた場合には全く造血細胞の増殖を刺激しなかった。SCF、

TPO、FL といった造血幹細胞に作用する因子との協調作用を FP6 の濃度を変化させ検討した。

FP6+SCF では、1ng/ml 以上で FP6 の効果が観察され、FP6 の 100ng/ml まで濃度依存的にコロニー数が増加した。10ng/ml までのコロニー数の上昇は BFU-E の増加によるものであるが、100ng/ml 以上の濃度ではより未分化な CFU-GEM、CFU-Blast が出現し、FP6 により分化成熟度の低い細胞が維持される可能性が示唆された。

FP6+TPO+SCF の培養でも FP6 の濃度依存的にコロニー数が上昇し、100ng/ml 以上で CFU-GEM、CFU-Blast の出現が確認される。さらに、TPO+SCF+FL の培養系では、コロニー数も減少し、さらにほとんどが CFU-GM コロニーとなる。しかし、100ng/ml 以上の FP6 を添加することで CFU-GEM、BFU-E、CFU-Blast が他の培養系と同程度に出現してくる。これらの結果から、FP6 の濃度は 100ng/ml 以上で有効に作用させることができ、CFU-GEM、CFU-Blast といった非常に未分化な細胞を生

存、維持させる活性を有する有効なサイトカインと結論できる。

(2) 無血清培地による造血幹細胞の増幅培養

FP6 の未分化細胞維持の活性を確認できたので、QBSF60 無血清培地を用いて造血幹細胞の増幅条件を検討した。TPO+SCF+FP6+FL の4サイトカイン存在の条件で FP6 の濃度をふり、経時的にコロニー形成細胞の増幅を観察した。その結果、FP6 100ng/ml 添加時では、1週、2週、3週でコロニー形成細胞数が約 18 倍、61 倍、160 倍に増幅した。すなわち、本培養系により造血細胞を効率的に長期にわたり増幅させることが可能であることを示唆している。

これら培養細胞の幹細胞としての性質、前駆細胞としての性質をさらに詳細に検証する予定である。

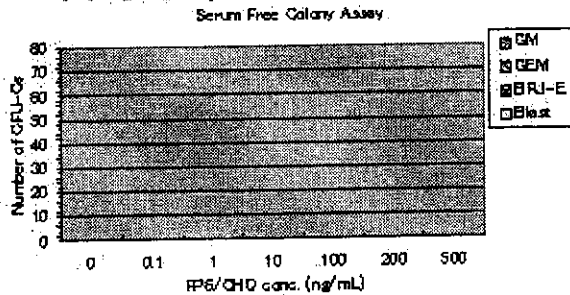
D. 考察

ヒト人工染色体保持造血細胞を樹立するた

FP6のコロニー刺激活性

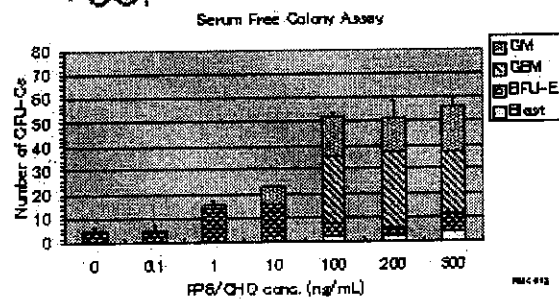
～無血清コロニーアッセイ～

FP6のみ

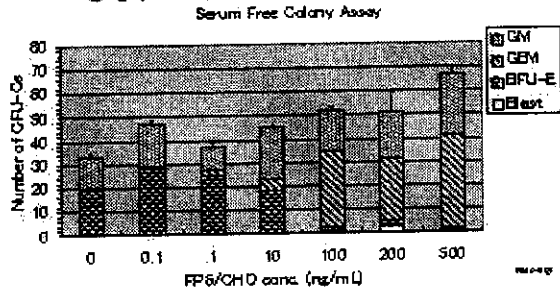


+SCF

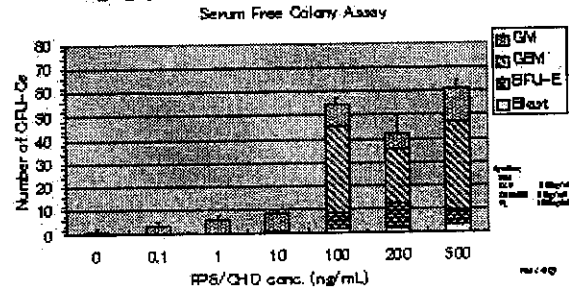
* 200 CD34⁺ cells per dish



+SCF+TPO



+SCF+TPO+FL



めに、今年度は造血幹細胞増幅系の確立を中心に実施した。造血幹細胞が増幅されているかは、まだ検討しなければならないが、非常に未分化な造血細胞を培養する系の確立については前進した。そこで、来年度は本培養系での幹細胞の増幅様式の検討、並びに改善を行いたい。さらに、実際にヒト人工染色体を実際に導入する検討を開始してみたい。

E. 結論

FP6 は、造血幹細胞培養系で有効に活用されることが示された。今後、この培養系で増幅される細胞集団、培養細胞の検討を行い HAC 導入細胞としての適性を検討していく。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療研究事業）
分担研究報告書

遺伝子治療用ヒト人工染色体ベクター開発に関する研究

分担研究者 富塚一磨 キリンビール（株）医薬探索研究所 主任研究員

研究要旨

ホルモン補充療法への適用に向けたヒト 21 番染色体由来人工染色体（21HAC）ベクター性能評価のため、ヒトエリスロポエチン（hEPO）遺伝子発現ユニットの HAC への導入を検討する。発現細胞にはサイトカインの組み換え体産生に広く用いられている CHO 細胞を選定した。宿主染色体に挿入される従来型ベクターとの比較により HAC ベクター系の優位性を検討する。

A. 研究目的

ヒト 21 番染色体に由来する人工染色体ベクターに挿入された外来遺伝子の発現量、発現安定性を評価することにより、本ベクター系のホルモン補充療法への適用可能性を見極める。外来遺伝子としてはホルモン補充療法の重要なターゲットの一つであるヒトエリスロポエチン（hEPO）を用いる。

B. 研究方法

ヒト 21 番染色体長腕部を削除した 21HAC Δ q 及び長・短腕部を削除した 21HAC Δ pq をそれぞれ保持する CHO 細胞に、CMV プロモーター/hEPO 遺伝子発現ユニットを含むベクターと Cre 発現ベクターを co-transfection（電気パルス法）する。出現した G418、Bsr 二重耐性クローンについて、HAC 上 loxP 部位への発現ユニット挿入を PCR 法で確認し、さらに培養上清中の hEPO 濃度を ELISA 法により測定する。同じ構造の発現ユニットがランダム挿入された CHO 細胞株も対照として取得し、上清中 EPO 濃度の測定を同様に実施する。

C. 研究結果

本研究内容については特許出願中である。このため公開を前提としている本報告書において、現時点で得られている結果を全て記載することは差し控えたい。したがって以下は特許出願に支障のない範囲で記す。

1 コピーの hEPO 発現ユニットを挿入した場合の、培養上清中 hEPO 生産量を観察する。この生産量をランダム挿入株の値と比較する。長期培養試験を行い、薬剤選択条件および非選択条件において HAC 保持率を検証する。タンデムに配置された 2 コピー、4 コピーの発現ユニットを含み、かつユニット間に転写終結配列が挿入されたベクターを設計し、コピー数依存的な hEPO の発現が確認できるかどうか

か検討する。

D. 考察

宿主染色体に挿入された外来遺伝子の発現は、一般的に挿入部位の構造（塩基配列）に強く影響される。ランダム挿入の場合、強力なプロモーターを含む発現ユニットであっても多くの場合不活化され、高発現株を得るためには多数の株をスクリーニングする必要がある。21HAC における外来遺伝子挿入部位（loxP 配列）はセントロメア近傍の内因性遺伝子が存在しない領域に設計するが、HAC ベクターにおいて外来遺伝子発現を人為的に制御するためには、挿入領域から受ける影響ができる限り少ないことが望まれる。CMV プロモーター/hEPO 遺伝子発現ユニットをモデルとした本研究を進めることにより、挿入部位周辺の構造が外来遺伝子発現に対してネガティブな影響を及ぼさないかが検討できる。さらにランダム挿入では通常観察されないコピー数依存的発現が認められれば、HAC により複数遺伝子の同時発現や導入遺伝子の微妙な発現量コントロールが可能であると期待できる。

E. 結論

ヒトエリスロポエチン遺伝子発現ユニットの HAC への導入と、コピー数依存的な発現の検証を進めている。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

<申請中>

ヒト人工染色体（HAC）ベクター（特願 2002-292853）

欠損遺伝子病（SCID）に対する遺伝子治療に関する研究

分担研究者 栗政 明弘 鳥取大学大学院・医学系研究科・助教授

研究要旨

DNA-PKcs 遺伝子の突然変異が原因であるマウス重症複合性免疫不全（SCID）を例として、HAC ベクターを用いた遺伝子治療を試みる。DNA-PKcs 欠損細胞に HAC を用いて DNA-PKcs 遺伝子を導入し、発現制御実験を行う。これから得られた DNA-PKcs 発現 HAC を、SCID（DNA-PKcs 欠損）マウスの ES 細胞（DNA-PKcs -/-）に導入する。DNA-PKcs の欠損が補正された ES 細胞（DNA-PKcs + HAC）を造血系幹細胞に分化誘導し、DNA-PKcs 欠損マウスの成体に戻すことにより、成熟した T および B 細胞の回復を観察する。

A. 研究目的

DNA-PKcs 欠損マウスはジーンターゲティングの手法を用いてつくられ、自然発生の SCID マウスと同一の重症複合免疫不全を示す。今までの報告では、この欠損マウス由来の DNA-PKcs 欠損細胞に DNA-PKcs 遺伝子を cDNA 強制発現ベクターで導入しても、正常細胞と比較して極めて少ない発現しか得られない。これは、大量発現により細胞毒性あるいは細胞増殖の抑制が現れて、低発現の導入細胞が選択的に分離される可能性が考えられている。この問題点を克服し人工的な発現制御を可能にするために、一定のコピー数で安定に保たれ、発現制御のための DNA エLEMENT を含む遺伝子や複数遺伝子を同時に導入できる HAC ベクターを用いた発現系を構築する。これには、テトラサイクリンによる誘導系と巨大なタンパク質の遺伝子である DNA-PKcs を HAC に組み込む。これを DNA-PKcs 欠損細胞に導入し、その発現コントロール実験を行い、人工染色体の有用性と将来にわたる遺伝子治療等への応用の可能性を検討する。

さらに HAC の遺伝子治療、再生医療における将来利用を想定した実用性検討を、疾患モデル動物を用いて実施する。DNA-PKcs 遺伝子欠損マウスより ES 細胞を樹立し、先に培養細胞で検証した DNA-PKcs 遺伝子を組み込んだ HAC ベクターを導入する。この DNA-PKcs の欠損が補正された ES 細胞（DNA-PKcs + HAC）を造血系幹細胞に分化誘導したのち DNA-PKcs 欠損マウスの成体に戻すことにより、重症複合免疫不全マウスにおいて成熟した T および B 細胞の回復を観察する。

B. 研究方法

はじめに DNA-PKcs 遺伝子欠損細胞株である V3 細胞（チャイニーズハムスター細胞由来）と M059J 細胞（ヒト神経膠腫由来）に、テロメアトランケーションにより長腕遠位を削除して長腕近位に loxP 配列を導入したヒト 21 番由来人工染色体（ Δq HAC）を導入する。

DNA-PKcs 発現用のカセットをまずプラスミド上に構築する。これには、1) サイトメガロウイルスプロモータ（strong immediate early promoter of cytomegalovirus, P_{CMV} ）の制御下でテトラサイクリンによる誘導に必要な逆テトラサイクリン応答性転写活性化因子（reverse tet-responsive transcriptional activator | rtTA）、2) rtTA とテトラサイクリンで制御される P_{hCMV-1} プロモータ（tetO）の下流に置かれた DNA-PKcs 遺伝子、3) 選択マーカー用の 5' 領域のみを有する neo 遺伝子ならびに 4) HAC 組み込み用の loxP 配列が含まれる。

このカセットは、 Δq HAC を保持するハムスター細胞、V3 細胞、M059J 細胞に導入すると同時に、Cre 組み換え酵素を一過性に発現させることで、loxP 配列間の部位特異的組み換え反応により人工染色体に挿入され、 Δq HAC-DNA-PKcs 発現系が構築される。

目的の組換えが起こった細胞は、カセットと人工染色体にそれぞれ存在する neo 遺伝子の 5' と 3' 領域が再構成されるため、G418 耐性となる。この耐性株をクローニングし、RT-PCR 法を用いて DNA-PKcs のメッセンジャー RNA の発現がテトラサイクリンの濃度によって変化することを観察する。また、ウエスタンブロット法で DNA-PKcs 蛋白の発現量も観察する。

さらに DNA-PKcs 遺伝子発現を *in vitro* で証明するため細胞形質の変化にて相補テストを行う。DNA-PKcs 蛋白は、DNA 損傷修復にかかわっており、この遺伝子に変異のある V3 細胞では放射線感受性であることが知られている。DNA-PKcs 遺伝子を導入し、テトラサイクリンにて遺伝子発現を誘導することで、V3 細胞の放射線感受性が改善すると考えられる。放射線感受性は、放射線照射後のコロニー形成能を検討する。

遺伝子治療に用いる ES 細胞は、SCID マウスを交配し、3.5 日胚を得て、これを培養し DNA-PKcs 遺伝子欠損 ES 細胞を樹立する。この細胞に V3 細胞、M059J 細胞で検証した DNA-PKcs 遺伝子を含む HAC を微小核融合法によって導入し DNA-PKcs の欠損が補正された ES 細胞 (DNA-PKcs + HAC) を得る。この ES 細胞も先の細胞と同様に発現解析を行う。

ES 細胞 (DNA-PKcs + HAC) は、LIF 非存在下にメチルセルロースを用いて半固定状態で培養する方法 (三次元培養法) により、造血系幹細胞に分化させる。この細胞を DNA-PKcs 欠損マウスの成体に戻すことにより、成熟した T および B 細胞の回復を観察する。

C. 研究結果

本研究内容については特許出願を予定している。このため公開を前提としている本報告書において、現時点で得られている結果を全て記載することは差し控えたい。したがって以下は特許出願に支障のない範囲で記す。

テロメアトランケーションにより長腕遠位を削除し、長腕近位に loxP 配列を導入したヒト 21 番由来人工染色体 ΔqHAC の構築が別の分担課題 (押村担当) で行われている。これを保持する CHO 雑種細胞が得られてから、DNA-PKcs 遺伝子の導入実験を進める。

最初に用いる予定の DNA-PKcs 発現用のカセットは、P_{CMV} の制御下でテトラサイクリンに

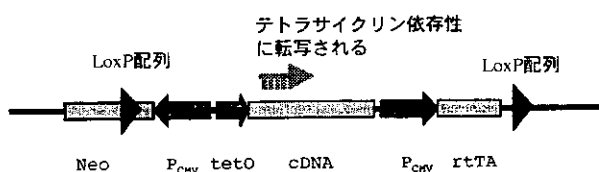


図1. DNA-PKcs発現制御コンストラクト HACベクターに挿入された状態を示す。矢印はプロモーター、四角は遺伝子を示す。

よる誘導に必要な rtTA を発現させる構造を取

っている。DNA-PKcs 遺伝子は、tetO の下流に置き、DNA-PKcs 遺伝子がテトラサイクリンの投与により発現を操作できるように設計する。(図1)

このコンストラクトを Cre 発現ベクターとともに ΔqHAC を保持する CHO 細胞に導入し、G418 耐性クローンを得る。RT-PCR およびウエスタンブロットにて、DNA-PKcs の発現を確認する。次に DNA-PKcs を含む ΔqHAC を、DNA-PKcs 遺伝子欠損細胞株である V3 細胞 (チャイニーズハムスター細胞由来) と M059J 細胞 (ヒト神経膠腫由来) に導入し、G418 耐性クローンを得る。RT-PCR およびウエスタンブロットにて、DNA-PKcs の発現を確認したのち放射線感受性の補正を検討する。

一方で ΔqHAC を V3 細胞と M059J 細胞に移入の後、テトラサイクリン誘導型 DNA-PKcs 遺伝子コンストラクトを導入する。得られた G418 耐性クローンについて DNA-PKcs の発現を RT-PCR およびウエスタンブロットにより確認し、放射線感受性の補正を検討する。

D. 考察

HAC を用いたテトラサイクリンによる遺伝子発現誘導系を確立するにあたっては、応答性を正確に制御できるかどうか課題である。HAC 上に挿入する loxP サイトの位置効果については今後明らかになるが、予め位置効果を遮断する設計も可能である。遺伝子発現ベクターのランダムインテグレーションでは、染色体上の挿入位置によって発現が抑制されることが多い。これに対してインスレーター配列を利用することによって位置効果を防ぐ効果があることが報告されている。インスレーターを用いた HAC 導入用コンストラクトについても検討していく予定である。

E. 結論

HAC による欠損型遺伝子治療の試みとして、テトラサイクリンによる誘導が可能な HAC 導入型 DNA-PKcs 発現用カセットを作製している。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

欠損型遺伝病（DMD）に対する遺伝子治療の試みに関する研究

分担研究者 花岡和則 北里大学理学部・教授

研究要旨 デュシャンヌ型筋ジストロフィー（DMD）の原因遺伝子であるジストロフィンを含むヒト X 染色体断片を人工染色体 HAC-SC20 に転座させた染色体ベクター HAC-SC20-dys を作成した。本研究により、DMD の遺伝子治療や DMD モデルマウス作成のための基礎的な実験系が確立したと考えられる。

A. 研究目的

デュシャンヌ型筋ジストロフィー（DMD）は、その原因遺伝子が X 染色体短腕にあるジストロフィンとよばれる巨大な遺伝子であることが判明して以来、本疾患についての分子レベルでの理解は急速に深まり着実に研究が進展しているが、依然として有効な治療法は知られていない。

ジストロフィン遺伝子は全長 2.4MB にも及ぶ巨大な遺伝子であり、このような巨大な遺伝子を通常の遺伝子操作により細胞内に導入することは、ベクターに組み込む遺伝子サイズの制約によりきわめて困難である。本研究は、マイクロセル融合法を用いてヒト染色体の断片を細胞に直接導入するという新しい遺伝子導入法を応用して、筋ジストロフィーモデル動物の作成や遺伝子治療のための基本技術の確立を目標とするものである。

今までの研究により、ジストロフィン遺伝子領域を含むヒト X 染色体短腕ほぼ全長をマイクロセル融合法を用いてマウス ES 細胞に導入し、この ES 細胞を用いてキメラマウスが作成された。しかし、これらのキメラマウス内では、この染色体断片は著しく不安定であり発生の過程で多くは消失することが判明した。この結果に基づき、本年度は、ジストロフィン遺伝子領域だけを、ヒトおよびマウスの細胞で安定性が確認されているヒト人工染色体 HAC-SC20 に転座させることにより、DMD 遺伝子治療や DMD モデルマウス作成のための人工染色体ベクターを作成することを目標とした。

B. 研究方法

インターネット上で公開されている塩基配列をもとに、二つのベクターを作成した（図 1）。一つはジストロフィン遺伝子座（DMD）よりテロメア側にあるグリセレートキナーゼ（GK）遺伝子座からテロメア側を相同組み換えにより

切断するためのベクター（Telomere truncation vector）であり、もう一つは DMD 近傍セントロメア側にある t-complex-associated-testis-expressed 1-like (TCTE1L) 遺伝子座に LoxP 配列を挿入するためのベクターである。HAC-SC20 にはすでに LoxP 配列が組み込まれているので cre-recombinase の作用による LoxP 配列間の組み換えにより HAC-SC20 に転座させることができる。相同組み換えの効率を高めるために、マイクロセル法でヒト X 染色体断片をとり DT40 細胞株へ移入し、以後の遺伝子組み換え操作は DT40 細胞株で行った。

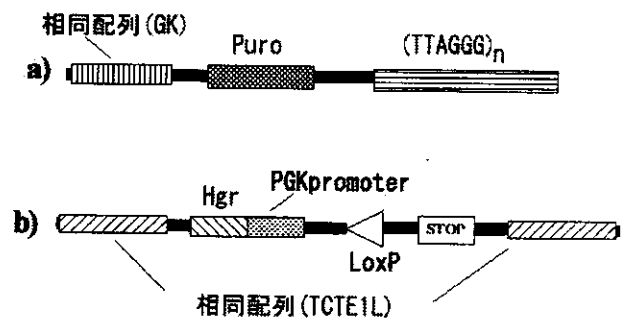


図 1 本実験に用いたベクター

a) 相同組み換えにより X 染色体上の GK 遺伝子座（ジストロフィン遺伝子領域より約 2Mb テロメア側）で染色体を切断 truncate するためのベクター。truncate 後の染色体の安定のため人工テロメア配列を連結している。

b) ジストロフィン遺伝子領域よりセントロメア側にある TCTE1L 遺伝子座に、相同組み換えにより LoxP 配列と PGK プロモーターを挿入するためのベクター。HAC-SC20 には、LoxP 配列と GFP 遺伝子がすでに組み込まれているので、cre-recombinase の作用により相互転座が生じると GFP が発現するようになる。

〔倫理面への配慮〕

本研究は、北里大学医学部倫理委員会の承認のもとに行われた。また、本研究で用いた生検試料(DMD 由来筋芽細胞)は、国立精神神経センターの「生検に関するガイドライン」に基づいて同センターで分離されたものであり、同センターとの契約に基づき、連結不可能匿名化された試料として研究に使用した。

C. 研究結果

1) 人工染色体ベクターの作成

DT40 細胞株に、マイクロセル融合法によりヒト X 染色体断片を導入した後、以下の手順に従ってジストロフィン遺伝子をヒト第 14 染色体由来する人工染色体 HAC-SC20 に転座させた(図 2)。

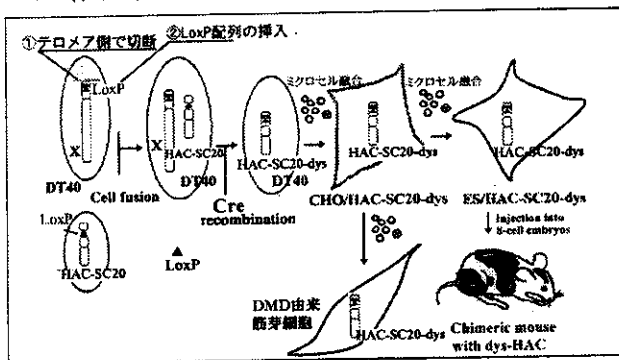


図 2 ヒトジストロフィン遺伝子を保持する人工染色体の作成

a) Telomere truncation

Telomere truncation ベクターを導入した DT40 細胞株からピューロマイシン選択により約 200 株をクローニングした。うち 100 株について PCR でスクリーニングし、11 株で相同組み換えが生じていることを確認した。この X 染色体上のマーカー遺伝子について PCR による解析を行いテロメア側で切断されていることを確かめた。さらに FISH 解析により以上のことを染色体レベルで確認した。

b) LoxP 配列の挿入

次いで、TCTE1L 遺伝子座に LoxP 配列を挿入するためのベクターを導入した。導入後、ハイグロマイシン選択で得た 100 株の細胞株について PCR でスクリーニングし、30 株で相同組み換えが生じていることを確認した。さらに、FISH 解析で loxP 配列が挿入されていることを染色体レベルで確認した(図 3)。

c) ジストロフィン遺伝子領域の HAC-SC20 への転座

b) で得られた、DMD 遺伝子テロメア側で切断され、セントロメア側 TCTE1L 遺伝子座に

LoxP 配列が挿入された X 染色体を保持している DT40 細胞と HAC SC20 を保持した DT40 細胞をポリエチレングリコール処理により細胞融合した。薬剤による選択培養後、生き残った細胞株クローン 100 株を PCR でスクリーニングし、19 株で両者の染色体が存在していることを確認した。これらの細胞に Cre-recombinase を作用させた後、GFP を発現している細胞株を FACS で分離した。分離された細胞株について、ジストロフィンを含む断片が HAC-SC20 に転座していることを PCR で確認した。さらに、実際に X 染色体断片が HAC-SC20 に転座していることを FISH で確認した。

ジストロフィン遺伝子領域が転座した HAC-SC20 (HAC-SC20-dys) をマウス ES 細胞やヒト筋芽細胞に移入する時の効率をあげるために、DT40 細胞中の HAC-SC20-dys をマイクロセル融合法を用いて CHO 細胞に移入した(図 2)。これらの細胞についても HAC-SC20-dys の存在を PCR および FISH で確認した。

D. 考察

現在までの研究により、ヒト X 染色体より DMD 領域をヒト人工染色体 HAC-SC20 に転座させた染色体ベクター HAC-SC20-dys の作成がほぼ完成した。現在、CHO 細胞からマイクロセル融合法によりマウス ES 細胞株 TT2-O へ HAC-SC20-dys を導入することを試みており、予備的な段階ではあるが、本ベクターを保持した ES 細胞株が分離されつつある。

図 3 ジストロフィン遺伝子領域を含む X 染色体断片の HAC-SC20 への転座

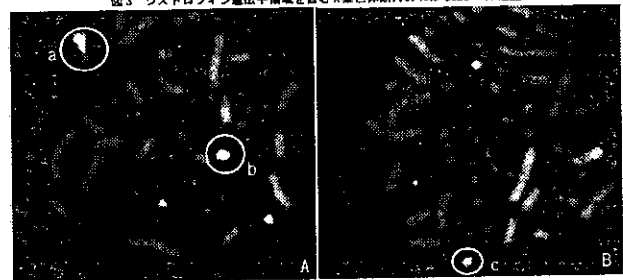


図 3 ジストロフィン遺伝子領域を含む X 染色体断片の HAC-SC20 への転座

cre-recombinase を作用させる前 (A) と後 (B) の FISH を示す。図中の a は X 染色体 b は HAC-SC20 c は HAC-SC20-dys (ジストロフィン遺伝子領域を含む X 染色体断片が転座した HAC-SC20) HAC SC20 は、ヒトおよびマウスの細胞内で極めて安定であり、また、ES 細胞へ導入した場合、生殖系列への伝達も確認されているので mdx マウスと交配することによりジストロフィン遺伝子領域だけがヒト化されたマウス

を作成することが可能になる。同様な操作を DMD 患者由来の X 染色体を用いて行うことにより、ジストロフィン遺伝子領域だけが「ヒト化」された究極的な DMD 疾患モデルマウスを作成できると期待される。

今回作成した HAC-SC20-dys がヒト細胞内で安定に維持され、正常なジストロフィンタンパクを産生し続けるかは、DMD 治療のための染色体ベクターとしての有用性を確かめるうえで重要である。現在、DMD 患者由来筋芽細胞に本染色体ベクターを導入してその発現を解析するための準備を進めている。本研究で用いられた手法は、導入する遺伝子サイズに制限がなくゲノム自体を導入することができる点に特徴があり、今後、DMD 治療のための染色体ベクターについて研究をさらに進めていきたいと考えている。

E. 結論

本研究により、ジストロフィン遺伝子領域を含む人工染色体ベクターを作成することができた。今後、このベクターをマウス ES 細胞やヒト培養筋芽細胞へ導入し、その安定性や

ジストロフィンの発現について詳細に解析する予定である。本研究は、最近の遺伝子操作技術、胚操作技術の発展やゲノムプロジェクトの進展を背景に、ヒト染色体を直接操作して DMD の疾患モデルマウス作成や遺伝子治療ベクターの開発に発展させる試みであり、その意義は大きいと考える。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

Yamamoto K, Yoshida K, Miyagoe Y, Ishikawa A, Hanaoka K, Nomoto S, Kaneko K, Ikeda S and Takeda S: Quantitative evaluation of expression of iron-metabolism genes in ceruloplasmin-deficient mice. *Biochim. Biophys. Acta*, 1588 (3), 195-202, 2002

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
Yamamoto K, Yoshida K, Miyagoe Y, Ishikawa A, Hanaoka K, Nomoto S, Kaneko K, Ikeda S and Takeda S	Quantitative evaluation of expression of iron- metabolism genes in ceruloplasmin-deficient mice	Biochim. Biophys. Acta	1588 (3)	195-202	2002