

20030354

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15年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 押村 光雄

平成16（2004）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	7
	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	10
	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	14
	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	17
	花岡 和則	
III.	研究成果の刊行に関する一覧表	21

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 鳥取大学大学院・医学系研究科・教授

研究要旨

前年度までに構築したヒト 21 番染色体由来 HAC ベクターは、ヒト培養細胞、マウス ES 細胞の増殖において安定に保持され、HAC 上の挿入遺伝子 (GFP) はヒト培養細胞において安定に発現することを確認した。また組織特異的プロモーターの制御下に GFP 遺伝子を置いた発現コンストラクトを用いて、HAC ベクターに挿入した遺伝子は受容細胞内での生理的な発現制御を受けることを明らかにした。HAC ベクターによる *ex vivo* 遺伝子治療の対象として、従来の成体由来造血幹細胞に加えマウス ES 細胞をモデルとする検討を開始した。実験系の確立に向けマウス ES 細胞から造血細胞への分化誘導系の構築を試みた。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 (hEPO) 遺伝子を例に検討を進めた。hEPO 発現ユニットを挿入した HAC ベクターをヒト正常線維芽細胞に再現性良く導入することに成功し、移入クローンは *in vitro* で少なくとも 12 週にわたり hEPO を発現し続けることを確認した。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。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) に転座させた染色体ベクターをマウス個体およびヒト筋芽細胞に導入し、染色体ベクターの有用性を検証するための実験系を確立した。

研究組織

主任研究者

押村光雄 鳥取大学大学院 医学系研究科  
機能再生医科学専攻 生体機能  
医工学講座 遺伝子機能工学部門  
教授

分担研究者

西川光郎 キリンビール (株) 医薬探索  
研究所 細胞再生医療グループ  
主任研究員

富塚一磨 キリンビール (株) 医薬探索  
研究所 染色体工学グループ  
主任研究員

栗政明弘 鳥取大学大学院 医学系研究科  
機能再生医科学専攻 遺伝子再生  
医療学講座 遺伝子医療学部門  
助教授

花岡和則 北里大学理学部 生物科学科  
分子発生学講座 教授

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lement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が期待できる。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った。

実用可能な HAC ベクター系の構築を目標として、前年度までにヒト 21 番染色体をもとに染色体工学的手法を用いて HAC ベクターを構築した。本年度はこの HAC ベクターの基本性能 (保持安定性、発現安定性、組織特異的発

現制御、テトラサイクリン発現誘導系、ヒト正常細胞への移入および導入遺伝子の発現)の検討を目的とした。また HAC ベクターの遺伝子治療、再生医療における将来利用に対し、最大の問題は移入効率である。そこで現状の移入効率でも実用可能な受容細胞系を模索することを開始した。

転座型 HAC については、昨年度構築した HAC-SC20-dys ベクターによる *ex vivo* 遺伝子治療の対象となるヒト筋芽細胞の培養条件確立を試みた。同時に DMD モデルマウス作成の準備として *mdx* マウス由来 ES 細胞、ジストロフィン遺伝子領域を欠失したマウス ES 細胞の樹立を目指した。

## 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。

### 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

本年度は HAC ベクターの培養細胞における保持安定性、HAC ベクターに挿入した遺伝子の発現安定性および組織特異的発現制御の可能性を検討した。

保持安定性の検索にはヒト培養細胞 HT1080 株、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 hiMSC 株およびマウス ES 細胞株 E14tg2a を用いた。非選択培養条件で長期継代培養し、染色体 FISH 解析により HAC の保持率を検索した。HAC 保持 hiMSC 株については分化誘導培地で培養し、骨、軟骨、脂肪細胞への多分化能を維持していることを組織染色および分化マーカー遺伝子の RT-PCR 解析により検討した。HAC 保持マウス ES 細胞からはキメラマウスを作成し、個体レベルでの HAC 保持率を脳、胸腺、肝臓、脾臓、精巣について調べた。

発現安定性は CMV/EGFP 遺伝子を例として HAC 保持 HT1080 細胞株を用いて検討した。

組織特異的発現制御に関しては、アルブミンエンハンサ/プロモータ/EGFP-HAC をアルブミン発現/非発現肝細胞株 (Fao/OC-CDE6) に移入する系と、骨芽細胞特異的オステオポンチン遺伝子プロモータ/EGFP-HAC をヒト骨髄由来間葉系幹細胞 hiMSC 株に移入し、*in vitro* で分化誘導する系の二つについて検討した。

### 2. HAC ベクターおよび受容細胞の高度精製法の確立

最近 ES 細胞から造血幹細胞を産生させる技術が報告されるようになった。ES 細胞への HAC 移入は現時点での移入効率でも十分可能であることから、造血系細胞に対する HAC ベクターを用いた *ex vivo* 遺伝子治療の対象として、成体由来造血幹細胞だけでなく ES 細胞を用いることは現実的な選択肢である。マウス ES 細胞から生着可能な造血細胞を産生させる分化誘導系には、HoxB4、bcr-abl を用いる手法がある。これらの遺伝子を導入した ES 細胞より胚体を作成し、造血細胞を分化させる。分化した造血細胞を放射線照射マウスに移植する。

### 3. 付加的遺伝子治療の試み

ホルモン補充療法においては、受容細胞は必ずしも本来の産生細胞である必要はないため、例えば患者から採取した増殖能の高い細胞(繊維芽細胞等)に HAC を導入し、インビトロで選抜、培養後、十分な細胞数を自家移植することができれば、それは現実的な選択肢となり得る。今年度は CMV プロモーター/hEPO 遺伝子発現ユニットを挿入した 21HAC ベクターをヒト正常繊維芽細胞 HFL-I (胎児肺由来;RCB0521)に移入後培養上清中の hEPO 濃度を ELISA 法により測定し、これまで十分な検討がなされていなかった HAC のヒト正常体細胞への導入及び、その安定性・発現性について検討した。

### 4. 欠損型遺伝病 (SCID) に対する遺伝子治療の試み

HAC ベクター上に挿入する Tet 応答性 DNA-Pkcs 遺伝子発現ユニットの最適化を目的として、複数のコンストラクトを構築して比較検討を行った。(r)tTA により発現制御される tetO プロモーターに DNA-Pkcs 遺伝子 cDNA を繋ぎ、その下流に (r)tTA 発現ユニットを配置したカセットを基本として、転写単位間のインスレーター配列による遮断による影響について検討した。

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) に 21ΔqHAC を移入した。これに上記発現カセットを挿入した細胞株を取得し、ドキシサイクリン (Dox;テトラサイクリン誘導体) を投与による DNA-Pkcs 遺伝子の発現亢進/抑制を RT-PCR により検索した。また DNA-Pkcs 遺伝子の機能発現は v3 細胞の示す放射線高感受性に対する相補試験により検討した。

## 5. 欠損型遺伝病 (DMD) に対する遺伝子治療の試み

昨年度の研究により、ヒト X 染色体のジストロフィン遺伝子 (*dys*) を人工染色体 HAC-SC20 (ヒト 14 番染色体由来) に転座させた染色体ベクター HAC-SC20-*dys* の作成に成功した。今年度は *mdx* マウスをモデルとした HAC による遺伝子治療を試みるため、はじめに *mdx* マウス由来の ES 細胞株を樹立し、これに HAC-SC20-*dys* を移入した。

またヒト細胞での治療に関しては、HAC-SC20-*dys* の DMD 患者由来筋芽細胞への移入を試みた。その過程で初代培養の筋芽細胞は増殖能が極めて低いことが判明したため、筋芽細胞に対する増殖刺激効果が報告されている増殖因子 (*bFGF*, *LIF*, *TNF $\alpha$* , *PDGF-AA*, *PDGF-BB*, *IGF-I*, *IGF-II*, *HGF* 等) を様々な組み合わせで添加し、クローニング状態で増殖可能な培養条件を検索した。

DMD モデルマウス作成に関しては、はじめにジストロフィン遺伝子領域 (2.4Mb) を欠損した ES 細胞株の樹立を試みた。マウス ES 細胞株 TT2-0 のジストロフィン遺伝子の 5' 上流と 3' 下流に *loxP* サイトを挿入し、*Cre* 酵素を一過性に発現させてジストロフィン遺伝子領域を欠損させた。

### (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たものである。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) は動物移植モデルを検討する。動物実験に関しては、キリンビール医薬探索研究所動物倫理委員会にて実験の審査を行い、適合する実験を実施する。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した。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した。

## c. 研究結果

### 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

#### 1) 培養細胞およびキメラマウス個体における HAC ベクターの安定性評価

21HAC ベクターは、ヒト培養細胞株 (HT1080)、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 (hiMSC) において 100 継代まで安定に保持されることが示された。一方マウス ES 細胞株 (E14tg2a) では、21 $\Delta$ pqHAC は 75 継代まで安定に保持されたが、21 $\Delta$ qHAC は継代に伴い減少していく傾向が見られた。

21 $\Delta$ qHAC を保持する E14tg2a 株から作成されたキメラ率約 50% の個体では、HAC 保持率は最も高い骨髄で 45%、以下脾臓、胸腺、脳、精巣、肝臓の順となり、臓器により異なる傾向を示した。

21 $\Delta$ pqHAC を移入した hiMSC 株を分化誘導培地で培養し、組織染色および RT-PCR を行った。Alizarin Red、Alcian Blue、Oil Red-O で染色される骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞が認められ、各分化細胞に特異的なマーカー遺伝子 (*ALP*, *OPN*; 骨芽細胞、*AGC*, *COMP*, *COL2A1*; 軟骨細胞、*PPAR $\gamma$* ; 脂肪細胞) の発現が RT-PCR により確認された。以上から hiMSC 株の多分化能は HAC ベクターの移入によって損なわれないことが示された。

#### 2) HAC ベクター上に挿入された遺伝子の発現安定性

CMV/EGFP 遺伝子を挿入した 21HAC ベクターを保持する HT1080 細胞で発現する GFP 蛍光タンパク質は、非選択条件での継代培養 (30 日) では変化しなかった。このことから HAC ベクター上に挿入した外来遺伝子は、染色体位置効果により発現が抑制されないことが示された。

#### 3) HAC ベクターに挿入した遺伝子の宿主細胞による生理的発現制御

21 $\Delta$ pqHAC ベクターに挿入したアルブミンエンハンサー/プロモーター/EGFP 遺伝子は、アルブミン産生肝細胞株 (Fao) において発現し、非産生株 (OC/CDE6) では発現しなかった。このことから HAC ベクター上に挿入した

アルブミン遺伝子制御配列は、内在のアルブミン遺伝子と同様宿主細胞の生理的発現調節を受けることが示された。

## 2. HAC ベクターおよび受容細胞の高度精製法の確立

### 1) ES 細胞からの造血細胞誘導系

マウス ES 細胞からの造血細胞分化系として、既報の HoxB4、bcr-abl 遺伝子コンストラクト構築を開始した。

### 2) HAC ベクターの *in vitro* 分化誘導時の安定性評価

HAC ベクターを保持するマウス ES 細胞を *in vitro* で分化誘導した際の安定性を検索するため、hCMV/EGFP を 21ΔpqHAC ベクターに挿入し、E14tg2a 株に移入した。特異性の高い *in vitro* 分化が可能な SIDA 法を利用して神経系細胞を誘導した結果、GFP の発現が維持されることが確認された。HAC ベクターはマウス ES 細胞の *in vitro* 分化に際して保持されることが示された。

## 3. 付加的遺伝子治療の試み

EPO-21 Δ pqHAC/CHO を染色体供与細胞、ヒト正常繊維芽細胞 HFL-I を受容細胞としたマイクロセル融合により、プラストサイジン耐性コロニーを多数得た。単離後の増殖能はクローン間で異なったが、 $10^6$  個以上まで増殖可能なクローンが再現性良く得られた。中には少なくとも 2 ヶ月間の継代培養が可能な増殖能の高いクローンもあった。PCR により HAC 上のマーカーが検出されたクローンのうち代表的な #1-1 について #21/#13 セントロメア特異的プローブを用いた FISH 解析を行い、90%以上の核板で独立した 1 コピーの HAC が確認された。さらに PFGE 解析を行った結果、ゲノム情報より推測される HAC の大きさに相当する約 3Mb のシグナルが検出された。接触阻害により増殖停止した細胞について培地交換を継続したところ、12 週後においても上清中に hEPO 産生 (数 mIU) が認められた。

## 4. 欠損型遺伝病 (SCID) に対する遺伝子治療の試み

発現誘導系を含まないコンストラクトを DNA-Pkcs 遺伝子が正常な CHO 細胞内で HAC ベクターに挿入すると高発現が見られるのに対し、V3 細胞では低レベルの発現しか認められなかった。V3 細胞において CMV プロモーターにより DNA-Pkcs 遺伝子を高発現させると細胞の増殖が抑制されるためクローンとして

単離されず、増殖に影響のない低発現クローンのみが単離されたものと考えられる。

Tet-on システムについては、HAC ベクターへのカセット挿入体を選別するための neo 遺伝子と cDNA を head to head に配置し、両方向性の Tet 応答プロモーターで制御し、さらに cDNA の前にイントロン ( $\beta$ -globin 由来) を配置したコンストラクトに関して検討した。Leaky な発現がみられたものの、Dox による発現誘導が確認された。Tet-on システムについては、CAG プロモーターで駆動される tTA の転写単位の両端をインスレーター配列で囲ったコンストラクトにおいて最も厳密な制御が可能であることが示された。

## 5. 欠損型遺伝病 (DMD) に対する遺伝子治療の試み

mdx マウスから新たに樹立した ES 細胞株 mdx-1 は正常核型 (XY) を示し、ジストロフィン遺伝子の点突然変異は PCR により確認された。mdx-1 株を受容細胞、HAC-SC20/CHO を供与細胞としたマイクロセル融合で得られた薬剤耐性 22 株はヒトジストロフィン遺伝子を保持することを PCR により確認した。現在キメラマウスを作成中である。

ヒト DMD 患者由来筋芽細胞について初代培養の条件を検討したところ、bFGF, PDGF AA および PDGF BB (各 20ng/ml) の添加により 1 細胞からの増殖が可能であることが示された。

DMD モデルマウス作成の準備として、ジストロフィン遺伝子領域 (2.4Mb) を欠損した ES 細胞株の樹立を試みた。ジストロフィン遺伝子の上流および下流に loxP 配列を挿入するためのコンストラクトを構築し TT2-O 株に導入した。サザンブロットにより相同組み換えを確認したのち Cre 酵素を一過性に発現させて、ハイグロマイシン耐性遺伝子の再構成を指標に部位特異的組み換え体を選別した。ジストロフィン遺伝子の欠失はサザンブロットにより確認した。染色体を解析したところ、核型の異常は認められなかった。

## D. 考察

21HAC ベクターはヒト培養細胞株およびマウス (ES) 細胞株の増殖に際して安定に維持されること、HAC ベクター上に挿入した遺伝子はヒト培養細胞株において安定に発現することが示された。これらは HAC ベクターが *in vitro* での遺伝子機能解析に利用可能なことを示す重要な知見である。また HAC ベクターがヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) 株の増殖

に際して安定に維持され、なおかつ MSC の *in vitro* での多分化能を妨げないことを示唆する結果が得られた。*ex vivo* 遺伝子治療の重要なターゲットの一つである MSC が HAC ベクターによる遺伝子導入の対象として適していることを示す新知見である。

HAC ベクターに挿入した遺伝子の宿主細胞による生理的発現制御については、肝細胞/アルブミン遺伝子の系と並行して骨芽細胞/オステオポンチン (OPN) 遺伝子の系を進行中である。この場合は HAC ベクターを移入した hiMSC 細胞を分化誘導することによりマーカー遺伝子とレポーター遺伝子の発現動態を連続的に検索できるので、より直接的な検討が可能になると期待できる。

一方研究の過程でいくつかの問題点も明らかとなった。①HAC 移入の可否は受容細胞の質 (増殖能) に依存する。②ドナー CHO 細胞中で HAC 構造異常が起こる場合がある。③受容細胞への移入に伴い HAC の構造が変化する場合がある。今後は得られた HAC 移入クローンについてより詳細に解析する中で、上記課題の原因を究明し、その解決につなげたい。

HAC ベクターの *ex vivo* 遺伝子治療への将来利用に際して最大の問題は移入効率の向上である。その解決を目標に造血幹細胞の体外増幅法の開発を続けてきたが、限られた研究期間の中で目標を達成するには残された課題が多い。一方で近年、ES 細胞から造血幹細胞を産生することが可能との報告がなされている。これまで成体から取得した造血幹細胞に対して HAC を導入する試みに取り組んできたが、無限増幅が可能な ES 細胞への HAC 導入は現在の効率で十分可能であることから、HAC を保持する ES 細胞を造血細胞に分化させる系が確立できれば治療の実現可能性が高くなると期待される。

HEPO-HAC を用いた検討からは、マイクロセル法によるヒト正常繊維芽細胞への HAC 導入が可能であり、導入された HAC は構造的に安定かつ挿入された遺伝子が機能し得るとの知見が得られた。今回用いたのは胎児由来繊維芽細胞であり、実際の治療を考慮すると成人由来細胞での検討が必要だが、HAC によるホルモン補充療法の実現に向けた大きな一歩と言える。

DNA-Pkcs 遺伝子を対象とした検討では、HAC ベクターを用いたテトラサイクリン応答性の発現制御が可能であることが明らかとなった。次年度において DNA-Pkcs 遺伝子を欠損するマウス ES 細胞への DNA-Pkcs/HAC 移

入、*in vitro* での造血幹細胞への分化誘導、DNA-Pkcs 欠損マウスへの移植、成熟 T/B 細胞の回復確認の手順で進行する遺伝子治療モデル実験のための基盤が確立できた。HAC ベクターによる DNA-Pkcs の Tet-off システムが構築できたことは、遺伝子治療モデルの構築に止まらず、DNA-Pkcs 遺伝子の機能解析に対しても有効なツールを提供することが期待できる。

DMD を対象とした検討では、DMD モデルである mdx-1 マウス由来の ES 細胞株を樹立しこれにヒトジストロフィン HAC が移入できた。この細胞株と mdx マウス胚盤胞を用いて作成したキメラマウスでは、HAC 由来のヒトジストロフィンだけが機能することになり、HAC ベクターにより mdx マウスを“治療”できることを実証する実験系になると期待される。また DMD 患者由来の筋芽細胞を低密度で増殖可能にする培養条件を明らかにしたことから、ヒトジストロフィン HAC の移入に関する課題の一つを解決できたと言える。さらに本年度作成したジストロフィン遺伝子領域欠失マウス ES 細胞は、ヒトジストロフィン HAC 移入による「ヒト型」マウスの作成に必須の資材を提供することになる。

## E. 結論

今年度の研究により、21HAC ベクターは 1) ヒト体細胞株、骨髄由来間葉系幹細胞株、マウス ES 細胞株の増殖に伴い安定に保持されること、2) 骨髄由来間葉系幹細胞株の *in vitro* での多分化能を損なわないこと、HAC ベクター上に挿入した遺伝子は 3) 染色体位置効果により発現が抑制されないこと、4) 宿主細胞による生理的な発現制御が可能なこと、5) ヒト正常体細胞への移入が可能であり、導入された HAC は構造的に安定かつ挿入された遺伝子が機能し得ること、6) テトラサイクリン応答性に DNA-Pkcs 遺伝子の発現制御が可能であることが明らかとなり、遺伝子発現ベクターに求められる基本性質の多くを満たすことが実証できた。また転座型 HAC のアプローチにおいても、DMD の疾患モデルマウスの作成や遺伝子治療ベクターの開発のための実験的基盤が確立したと考えられる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

1. 論文発表:

Imai H, Hirao F, Sakamoto T, Sekine K, Mizukura Y, Saito M, Kitamoto T, Hayasaka M, Hanaoka K and Nakagawa Y: Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene, BBRC 305, 278-286, 2003  
2.学会発表:(第26回日本分子生物学会年会; 2003年12月)

「新規ヒト人工染色体(HAC)ベクターの構築」  
加藤基伸、綾部文明、押村光雄

「新規 HAC ベクター系の構築:ヒト培養細胞株における安定性と遺伝子発現の検証」則兼聡子、加藤基伸、岡田晃明、舛本寛、押村光雄

「新規 HAC ベクター系の構築:マウス ES 細胞における継代培養および in vitro 分化誘導時の安定性」沖田千芽、加藤基伸、山田秀俊、白吉安昭、押村光雄

「新規 HAC ベクター系の構築:アルブミンエンハンサー/プロモーターを用いた肝細胞特異的な発現調節の検討」星谷英寿、加藤基伸、佐藤建三、押村光雄

「新規 HAC ベクター系の構築:環状 YAC として単離した ATM 遺伝子ゲノム配列挿入の試み」綾部文明、加藤基伸、押村光雄

「新規 HAC ベクター系の構築:間葉系幹細胞の遺伝子再生医療への応用を目指した基礎的検討」任鮮英、加藤基伸、柴田弘太郎、戸口田淳也、押村光雄

「新規 HAC ベクター系の構築:テトラサイクリン誘導系を用いた DNA-PKcs 遺伝子の発現調節」大槻明広、加藤基伸、栗政明弘、押村光雄

「新規 HAC ベクター系の構築:遺伝子治療への応用~エリスロポイエチン補充療法の試み」掛田実、平塚正治、永田恵子、高橋雅代、綾部文明、加藤基伸、押村光雄、富塚一磨

「ジストロフィン遺伝子領域が転座したヒト人工染色体ベクターの作成」早坂美智子、黒岩義己、香月康宏、木村健太、後藤雄一、鈴木友子、武田伸一、押村光雄、富塚一磨、花岡和則

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

・特許取得

<申請中>

ヒト人工染色体(HAC)ベクター



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 鳥取大学大学院・医学系研究科・教授

研究要旨

ヒト 21 番染色体から長腕/短腕遠位を削除し、クローニングサイトとして loxP 部位を付与して構築した HAC ベクターは、ヒト培養細胞、マウス ES 細胞の増殖において安定に保持され、HAC 上の挿入遺伝子 (GFP) はヒト培養細胞において安定に発現することを確認した。また組織特異的プロモーターの制御下に GFP 遺伝子を置いた発現コンストラクトを用いて、HAC ベクターに挿入した遺伝子は受容細胞内での生理的な発現制御を受けることを明らかにした。

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変更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が期待できる。昨年度までにヒト 21 番染色体から染色体工学的手法によって長腕/短腕遠位の既知遺伝子領域を削除し、外来遺伝子のクローニングサイトとして loxP 部位を備えた HAC ベクターを構築した。そこで今年度は遺伝子発現ベクターとしての基本性能を検証することを目的として、1) 宿主細胞の増殖と分化に伴う HAC ベクター保持の安定性、2) HAC ベクターに挿入した遺伝子の発現安定性、および 3) HAC ベクターに挿入した遺伝子の宿主細胞による生理的発現制御について検討した。

B. 研究方法

1) 宿主細胞の増殖/分化に伴う HAC ベクターの安定性評価

HAC ベクターをヒト培養細胞株 (HT1080 ; 線維肉腫由来)、マウス ES 細胞株 (E14tg2a) に移入後非選択条件下で長期継代培養し、染色体解析により HAC の保持率を検索した。ヒト培養細胞の染色体解析はギムザ染色により行い、マウス ES 細胞の染色体解析はヒト特異的 Cot1-DNA をプローブとした FISH 法により行った。さらに HAC ベクターを移入した ES

細胞からキメラマウスを作出し、各臓器における HAC 保持率について Cot-1 プローブを用いた間期核 FISH により検索した。

ヒト体性幹細胞の分化に伴う HAC 保持の安定性を検索するため、HAC ベクターをヒト骨髄由来間葉系幹細胞株 hiMSC (京都大学・戸口田淳也教授より分与) に移入した。非選択条件下で長期継代培養し、ヒト 21 番染色体由来アルフォイド DNA (名古屋大学・舛本寛講師より分与) をプローブとした FISH 解析により HAC の保持率を検索した。また HAC を保持する hiMSC 細胞を分化誘導培地で培養し、骨、軟骨、脂肪細胞への分化の確認を、組織染色および分化マーカー遺伝子の RT-PCR により行った。

2) HAC ベクターに挿入した遺伝子の発現安定性の検索

ヒト HT1080 細胞株に保持された 21HAC ベクター上の loxP サイトに、Cre 酵素の一過性発現によって CMV-EGFP 遺伝子を挿入した。得られた薬剤耐性クローンにおける EGFP タンパク質の発現を蛍光顕微鏡で確認したのち、非選択培養条件下で継代培養して EGFP タンパク質の発現を経時的に観察した。

3) HAC ベクターに挿入した遺伝子の宿主細胞による生理的発現制御の検索

(a) 肝細胞におけるアルブミン遺伝子  
マウスアルブミン遺伝子エンハンサー/プロモーター (Dr. RD.Palmiter; Univ. Washington より分与) の下流に EGFP 遺伝子を繋いだコンストラクトを作成し、CHO 細胞に保持された HAC ベクター上に挿入した。HAC ベクター上の loxP 部位に挿入した遺伝子発現ユニットの発現制御は、周囲から干渉作用を受ける可能性がある。この点を考慮し、発現ユニットの前後に干渉作用を遮断する効果があると報告されているトリ β-globin 遺

伝子上流 HS4 領域由来のインスレーター配列を配置する設計とした。この HAC をさらにアルブミン発現/非発現ラット肝臓細胞株 (Fao/OC-CDE6) に移入し、EGFP 蛍光タンパクの発現を検索するとともに内在のアルブミン遺伝子の発現を RT-PCR により検索した。

(b) 骨芽細胞におけるオステオポンチン遺伝子

ヒトオステオポンチン (OPN) 遺伝子プロモーター (大分医科大学・山本俊輔教授より分与) の下流に EGFP 遺伝子を繋いだコンストラクトを作成し、CHO 細胞に保持される HAC ベクター上に挿入した。この HAC を hiMSC 細胞に移入し、分化誘導用培地で培養して骨芽細胞への分化を誘導する。分化に応答して内在の OPN 遺伝子発現の発現が上昇するのに伴い HAC 上の EGFP 遺伝子が発現することを確認する。

(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した。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した。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した。

## c. 研究結果

(21ΔpqHAC ベクターの CHO 細胞への移入)

昨年度までに、トリ DT40 細胞を改変宿主としてヒト 21 番染色体より長腕/短腕遠位を削除し、クローニングサイトとして loxP 部位を挿入した 21ΔpqHAC ベクターを構築した。今年度ははじめにこの 21ΔpqHAC ベクターを中間宿主である CHO 細胞に移入した。染色体移入で得られたハイグロマイシン耐性 CHO 細胞 8 株について 21 番染色体上のマーカー遺伝子を増幅する PCR を行い、保持領域に変化のない 2 株を選別した。これらについてはヒト Cot1-DNA をプローブとした FISH 解析を行い、染色体変異のないことを確認した。

1) 養細胞およびキメラマウス個体における HAC ベクターの安定性評価

(a) ヒト培養細胞株

HT1080 細胞株における HAC ベクターの保持率推移を 100 継代まで検索した。細胞あたりの HAC コピー数は 1 ないし 2 であることを確認した。長腕遠位を削除した 21ΔqHAC、さらに短腕遠位を削除した 21ΔpqHAC いずれも非選択培養条件下で 100 継代まで安定に保持されることが明らかになった。

骨髄由来間葉系幹細胞株 hiMSC における 21ΔpqHAC ベクターの保持率推移を 100 継代まで検索した。細胞あたりの HAC コピー数は 1 であることを確認した。調べた 4 クローンの中で多少の幅があるものの 100 継代においても 90%以上の保持率を示し、非選択培養条件下で安定に保持されることが明らかになった。なお 1 細胞あたりの HAC コピー数は 1 であることを確認した。

(b) ヒト骨髄由来間葉系幹細胞株の in vitro 分化誘導

21ΔpqHAC を移入した hiMSC 株 5 クローンについて分化誘導培地で培養し、組織染色および RT-PCR を行った。いずれのクローンにおいてもそれぞれ Alizarin Red、Alcian Blue、Oil Red-O で染色される骨芽細胞、軟骨細胞、脂肪細胞が認められた。また各分化細胞に特異的なマーカー遺伝子 (ALP, OPN; 骨芽細胞、AGC, COMP, COL2A1; 軟骨細胞、PPARG; 脂肪細胞) の発現が RT-PCR により確認された。以上のことから、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞株の多分化能は HAC ベクターの移入によって損なわれないことが明らかとなった。

(c) マウス ES 細胞

マウス ES 細胞における HAC ベクターの保持率推移を 75 継代まで検索した。細胞あたりの HAC コピー数は 1 であることを確認した。21ΔqHAC の保持率は継代培養に伴い減少傾向を示したのに対し、21ΔpqHAC は 75 継代まで安定に保持されることが明らかとなった。

(d) キメラマウス個体

21ΔqHAC を保持する ES 細胞からキメラマウスを作出した。移植した胚 396 から得られた出生仔 40 のうち、キメラ率 50%程度が 5 匹、50%以下が 14 匹であった。3 匹を選んで各臓器における HAC ベクターの保持率を検索した。保持率は最も高い骨髄で 45%、以下脾臓、胸腺、脳、精巣、肝臓の順であった。臓器により保持率が異なる傾向は 3 匹の個体間で再現性を示した。

2) HAC ベクターに挿入した遺伝子発現安定性  
CMV/EGFP 遺伝子を挿入した 21HAC ベクターを保持する HT1080 細胞計 9 クローン (21ΔqHAC ; 3 クローンおよび 21ΔpqHAC ; 6 クローン) を非選択条件下で継代培養した。30 日後に蛍光顕微鏡により観察したところ、GFP 蛍光タンパクの発現は継代前後で変化がなかった。このことから HAC ベクター上に挿入した外来遺伝子は、染色体位置効果により発現が抑制されないことが明らかとなった。

3) HAC ベクターに挿入した遺伝子の宿主細胞による生理的発現制御

(a) 肝細胞におけるアルブミン遺伝子

CHO 細胞においてアルブミンエンハンサー/プロモーター/EGFP コンストラクトを挿入した 21 $\Delta$ pqHAC ベクターを Fao および OC/CDE6 細胞株に移入しそれぞれ 2 クローンの薬剤耐性株を得た。Fao 細胞クローンでは内在のアルブミン遺伝子の発現が RT-PCR により確認され、同時に GFP 蛍光タンパク質の発現が蛍光顕微鏡により観察された。これに対し OC/CDE6 細胞クローンでは内在のアルブミン、GFP 蛍光タンパク質いずれも発現が認められなかった。このことから HAC ベクター上に挿入したアルブミン遺伝子制御配列は、内在のアルブミン遺伝子と同様宿主細胞の生理的発現調節を受けることが明らかとなった。

(b) 骨芽細胞における OPN 遺伝子

CHO 細胞において OPN プロモーター/EGFP コンストラクトを挿入した 21 $\Delta$ pqHAC ベクターを hiMSC 細胞株に移入し、9 クローンの薬剤耐性株を得た。DNA および染色体解析により HAC ベクターの移入を確認した上で分化誘導培地による培養を行い、内在の OPN 遺伝子の発現上昇に伴って HAC ベクター上に挿入した GFP 遺伝子が発現することを確認する予定である。

#### D. 考察

21HAC ベクターは、ヒト人工染色体の構築と安定性評価に汎用されている HT1080 細胞において安定に保持されていた。また短腕遠位の有無は HAC ベクターの安定性に影響しないことが示唆された。マウス ES 細胞では短腕遠位を削除した 21 $\Delta$ pqHAC がより安定であったことから、21 $\Delta$ qHAC 上の短腕に残る機能遺伝子群が HAC ベクターの安定性に影響を与えている可能性が示唆された。個体レベルでの安定性は、現時点で得られている 21 $\Delta$ qHAC 保持 ES 細胞由来のキメラマウスについてのみ解析した。In vitro での長期培養では 21 $\Delta$ pqHAC がより安定であったことから、個体レベルでも 21 $\Delta$ pqHAC についての解析がより重要と考えられ、現在キメラマウスを作成中である。キメラ率の高い個体が得られた場合には HAC 保持率を検索するとともに、交配実験により次世代伝達を確認する予定である。

21HAC ベクターに挿入した CMV/EGFP の発現検索では、クローン間の発現量差はみられなかったが、クローン内(細胞間)で発現量に差が見られた。この点については従来のラ

ンダム挿入型を対照において比較検討する予定である。

#### E. 結論

今年度の研究により、21HAC ベクターは 1) ヒト体細胞株、骨髄由来間葉系幹細胞株、マウス ES 細胞株の増殖に伴い安定に保持されること、2) 骨髄由来間葉系幹細胞株の in vitro での多分化能を損なわないこと、HAC ベクター上に挿入した遺伝子は 3) 染色体位置効果により発現が抑制されないこと、4) 宿主細胞による生理的な発現制御が可能となることが明らかとなり、遺伝子発現ベクターに求められる基本性質の多くを満たすことが実証された。

#### 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：7 件(第 26 回日本分子生物学会年会；2003 年 12 月)

「新規ヒト人工染色体(HAC)ベクターの構築」  
加藤基伸、綾部文明、押村光雄

「新規 HAC ベクター系の構築：ヒト培養細胞株における安定性と遺伝子発現の検証」  
則兼聡子、加藤基伸、岡田晃明、舛本寛、押村光雄

「新規 HAC ベクター系の構築：マウス ES 細胞における継代培養および in vitro 分化誘導時の安定性」  
沖田千芽、加藤基伸、山田秀俊、白吉安昭、押村光雄

「新規 HAC ベクター系の構築：アルブミンエンハンサー/プロモーターを用いた肝細胞特異的な発現調節の検討」  
星谷英寿、加藤基伸、佐藤建三、押村光雄

「新規 HAC ベクター系の構築：環状 YAC として単離した ATM 遺伝子ゲノム配列挿入の試み」  
綾部文明、加藤基伸、押村光雄

「新規 HAC ベクター系の構築：間葉系幹細胞の遺伝子再生医療への応用を目指した基礎的検討」  
任鮮英、加藤基伸、柴田弘太郎、戸口田淳也、押村光雄

「新規 HAC ベクター系の構築：テトラサイクリン誘導系を用いた DNA-PKcs 遺伝子の発現調節」  
大槻明広、加藤基伸、栗政明弘、押村光雄

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：ヒト人工染色体(HAC)ベクター(申請中)

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**

近年 ES 細胞から造血幹細胞産生することが可能になってきている。これまで生体から取得した造血幹細胞に対して HAC を導入する試みに取り組んできたが、無限増幅が可能な ES 細胞に HAC を導入し、HAC を保持する ES 細胞を造血細胞に分化させる治療法の実現が可能となりつつある。そこで、生体由来の造血幹細胞ではなく ES 細胞に HAC を導入し生体において HAC を保持する造血細胞を確認することを目的とした実験系の確立に着手した。本年度は、実験系の確立に向けマウス ES 細胞から造血細胞の分化誘導系確立、効果を検証する HAC ベクターの樹立を試みた。

**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。一方、生体より取得できる造血幹細胞数には限りがあり、現在の HAC の細胞への導入効率からでは HAC が導入された造血幹細胞を十分量取得することは難しい。この課題を解決するために、本研究を開始したが、最近 ES 細胞から造血幹細胞を産生させる技術が報告されてきており、ES 細胞を利用することで造血幹細胞数の少なさの問題を解決することができる。そこで無限増殖可能な ES 細胞に予め HAC を導入し、HAC 導入 ES 細胞を造血細胞に分化させ、生体に移植することで HAC の治療上の有効性を検証する研究計画を遂行する。

**B. 研究方法**

1. マウス ES 細胞から生着可能な造血細胞を産生させる分化誘導系には、HoxB4、bcr-abl を用いる手法がある (Kyba M et al. Cell, 109, 29-, 2002, Peters DG et al. Oncogene, 20, 2636-, 2001)。これらの遺伝子を導入し ES 細胞より胚体を作成し、造血細胞を分化させる。分化した造血細胞を放射線照射マウスに移植する。

2. ES 細胞由来造血細胞における HAC 機能の解析。ES 細胞より分化させた造血細胞において HAC が機能することを解析する。HAC 導入による造血細胞への機能付加を検証することを最終目的とするが、まず、HAC の保持を検討することから開始する。そのため、GFP を発現する HAC ベクターを構築し、マウス ES 細胞に導入する。

(倫理面への配慮)

動物移植モデルを検討する予定であり、動物実験に関しては、キリンビール医薬探索研究所動物倫理委員会にて実験の審査を行い、適合する実験を実施する。

**C. 研究結果**

1. ES 細胞からの造血細胞誘導系  
現在 HAC 導入細胞を用いて造血細胞の分化誘導系確立の検討を開始した。既報の HoxB4、bcr-abl 遺伝子構築を開始するとともに、ES 細胞からの造血細胞分化系の検討を開始した。

2. HAC ベクターの構築

HAC ベクターとして改良を重ねた最新のベクターに CMV プロモータで発現制御されるように GFP 遺伝子を導入した GFP-HAC ベクターを構築した。本ベクターをマウス ES 細胞株 E14 に導入した。GFP-HAC を保持する ES 細胞より分化した細胞における GFP の発現を解析するため、神経細胞に分化誘導したときの GFP 発現について検討した。その結果、神経細胞に分化した際に、GFP の発現が維持されることが確認された。

**D. 考察**

ES 細胞を利用することで現状の HAC ベクターの課題となっている細胞への導入効率の低さを克服することが可能であると考えられる。GFP-HAC を保持する ES 細胞株を確立し、さらに神経細胞に分化させた際にも GFP の発現を確認することができた。この結果は、ES 細胞から造血細胞を分化させた際にも GFP が発現されることが期待される。

#### **E. 結論**

HAC 導入 ES 細胞から造血細胞を分化誘導することで、HAC を保持する造血細胞の評価が可能となると期待される。

#### **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

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

ホルモン補充療法におけるヒト人工染色体（HAC）の適用は、①目的遺伝子が挿入された HAC の構築、②患者から採取した体細胞への HAC 導入、③HAC 保持細胞選択と患者への自家移植、という *ex vivo* 遺伝子治療と同様のプロセスにより達成される。昨年度報告ではヒトエリスロポエチン（hEPO）遺伝子発現ユニットを挿入したヒト 21 番染色体由来 HAC（EPO-21  $\Delta$  pqHAC）の構築と HAC 保持 CHO 細胞における hEPO 高発現（ステップ①）について示したが、本年度は HAC の臨床応用に向けた最大の課題とも言える正常体細胞への導入（ステップ②）について、EPO-21  $\Delta$  pqHAC 及びヒト正常繊維芽細胞（hPF）を用いた検討を実施した。その結果、マイクロセル融合法により HAC 導入 hPF クローンを再現性良く得ることに成功した。HAC を独立染色体として維持する hPF クローンは、*in vitro* で少なくとも 12 週にわたって hEPO を産生し続けた。ヒト正常体細胞への HAC 移入としては初めての例である本成果は、HAC 実用化に向けた大きな一歩と言える。

A. 研究目的

細胞への HAC 導入効率は一般的な手法であるマイクロセル融合法を用いた場合で  $10^{-5}$ - $10^{-7}$  と低く、これが HAC の遺伝子治療への応用における最大の障害であることは言うまでもない。特に有限増殖である正常体細胞への導入及びその選抜は困難と考えられてきた。一方ホルモン補充療法においては、受容細胞は必ずしも本来の生産細胞である必要はないため、例えば患者から採取した増殖能の高い細胞（繊維芽細胞等）に HAC を導入し、インビトロで選抜、培養後、十分な細胞数を自家移植することができれば、それは現実的な選択肢となり得る。本年度の研究目的は、これまで十分な検討がなされていなかった HAC のヒト正常体細胞への導入及び、その安定性・発現性について検討することである。

B. 研究方法

CMV プロモーター/hEPO 遺伝子発現ユニットを挿入した 21  $\Delta$  pqHAC（EPO-21  $\Delta$  pqHAC、長・短腕削除型）を保持する CHO 細胞を染色体供与細胞、ヒト正常繊維芽細胞 HFL-I（胎児肺由来；RCB0521）を受容細胞としたマイクロセル融合を実施した。得られたプラストサイジン（Bsr）耐性クローンにおける HAC の構造解析は、PCR、FISH、サザンブロット、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）等により実施した。培養上清中の hEPO 濃度は ELISA 法により測定した。

C. 研究結果

12 種の EPO-21  $\Delta$  pqHAC/CHO クローンより比較的高いマイクロセル形成能（20-40%）を持つものとして選択されたクローン（c10）を染色体供与細胞、胎児肺より調製され高い増殖能を維持しているヒト正常繊維芽細胞 HFL-I を受容細胞としたマイクロセル融合により、多数のプラストサイジン耐性コロニーを得た。ピックアップ後の増殖能はクローンにより大きく異なったが、 $10^6$  個以上（100mm シャーレコンフルエント）の細胞数まで増殖可能なクローンが再現性良く得られた。さらに少なくとも 2 ヶ月間の継代培養が可能な増殖能の高いクローンもあった。PCR 解析により HAC 上の全てのマーカーが検出されたクローンのうち代表的な #1-1 についてより詳細な解析を実施した結果は以下の通りである。#21/#13 セントロメア特異的プローブを用いた FISH 解析の結果、90%以上の核板（正常核型）において独立した 1 コピーの HAC が確認された。さらに HAC サイズ決定のための PFGE 解析を行った結果、ゲノム情報より推測される HAC の大きさと同等の約 3Mb の位置にシグナルが検出された。接触阻害により増殖停止した細胞について培地交換のみで長期培養を行ない、上清中の hEPO 産生について検討した結果、12 週間においても hEPO 産生（数 mIU）が認められた。

#### D. 考察

以上の結果は、マイクロセル法によるヒト正常繊維芽細胞への HAC 導入が可能であり、導入された HAC は構造的に安定かつ挿入された遺伝子が機能し得ることを示している。今回用いたのは胎児由来繊維芽細胞であり、実際の治療を考慮すると成人由来細胞での検討が必要だが、HAC によるホルモン補充療法の実現に向けた大きな一歩と言える。一方本研究の過程でいくつかの問題点（以下①～④）も明らかとなった。①導入の可否は受容細胞の質（増殖能）に依存する。②ドナー CHO 細胞中で HAC 構造異常が起こる場合がある。③hPF クローンの中には巨大化等構造異常のある HAC を保持するものがある。④HAC/hPF クローンにおける hEPO 発現量は CHO での発現量（数 IU）と比較して 100-1000 分の 1 である。今後は得られた hPF クローンについてより詳細な解析を実施する中で、上記の課題の原因を究明し、その解決につなげたい。またインビボでの検証のため HAC/hPF クローンの SCID マウスへの移植やサルを用いた試験を計画している。

#### E. 結論

マイクロセル法によるヒト正常体細胞への HAC 導入に初めて成功した。導入された HAC は構造的に安定かつ挿入された遺伝子が機能し得ることが示された。

#### 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：『新規 HAC ベクター系の構築：遺伝子治療への応用～エリスロポイエチン補充療法の試み』 掛田実、平塚正治、永田恵子、高橋雅代、綾部文明、加藤基伸、押村光雄、富塚一磨、第 26 回日本分子生物学会年会（2003 年 12 月）

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得：ヒト人工染色体（HAC）ベクター（申請中）

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。人工的な発現制御を可能にするため、テトラサイクリン誘導系の利用を検討した。目的遺伝子とその発現調節ユニットを挿入した HAC ベクターを構築して DNA-PKcs 欠損細胞株に移入し、テトラサイクリン応答性の発現を *in vitro* において検索した。目的遺伝子と発現調節ユニットの間にインスレーター配列を挿入することで厳密な制御が可能になることが明らかとなった。

A. 研究目的

テトラサイクリン応答性発現制御が可能な細胞株は通常 2 段階で構築される。はじめにテトラサイクリン（Tet）応答性転写調節因子（rtTA/tTA）発現ベクターを目的の細胞に導入し、これにレポーター遺伝子を一過性に導入して発現調節が可能な細胞株を選別する。さらに rtTA/tTA で制御されるプロモーターに目的遺伝子を繋いだコンストラクトを導入して、最終的に目的遺伝子が Tet 応答性に発現する細胞株を選別する。2 回のトランスフェクションとも導入遺伝子は宿主染色体上にランダムに挿入されるため、挿入部位の位置効果の影響から厳密な発現制御が可能な株を再現性良く取得することは難しい。これに対し一定の部位に遺伝子の挿入が可能な HAC ベクターを利用すれば、宿主染色体を破壊することなく調節因子と目的遺伝子を同時に移入可能と考えられる。今年度は HAC ベクター上に挿入する Tet 応答性 DNA-Pkcs 遺伝子発現ユニットの最適化を目的として、複数のコンストラクトを構築して比較検討を行った。

B. 研究方法

構築した 5 種類の Tet 応答性 DNA-Pkcs 遺伝子発現ユニットを図 1 に示した。カセット 0 は Tet 応答配列をもたない対照、カセット 1 は cDNA と (r)tTA を順方向に配置したもの、カセット 2 は HAC ベクターへのカセット挿入体を選別するための neo 遺伝子と cDNA を head to head に配置し、両方向性の Tet 応答プロモーターで制御し、さらに cDNA の前にイントロン（ $\beta$ -globin 由来）を配置したもの、カセット 3 は cDNA と (r)tTA の間にインスレーター配列（トリ  $\beta$ -globin 遺伝子上流

HS4 領域由来）を配置したもの、そしてカセット 4 は (r)tTA のプロモーターを hCMV から CAG に変え、(r)tTA の後ろにもインスレーター配列を配置したものである。

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）に 21DqHAC を移入した。これに上記発現カセットを挿入した細胞株を取得し、ドキシサイクリン（Dox; テトラサイクリン誘導体）を投与による DNA-Pkcs 遺伝子の発現亢進/抑制を RT-PCR により検索した。また DNA-Pkcs 遺伝子の機能発現は V3 細胞の示す放射線高感受性に対する相補試験により検討した。

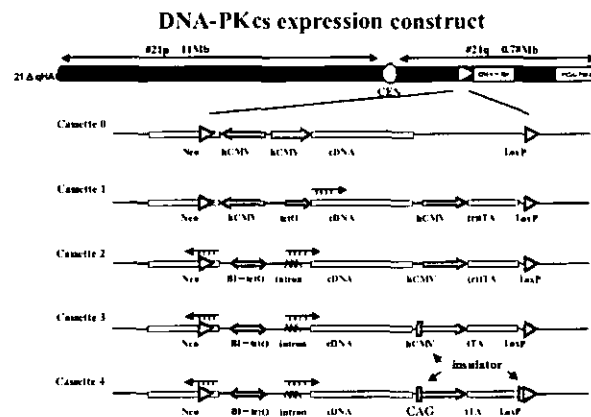


図 1. Tet 応答性 DNA-Pkcs 遺伝子発現ユニットの構築

C. 研究結果

RT-PCR（リアルタイム法）により DNA-Pkcs 遺伝子の発現量を検索した結果を図 2 に示す。発現誘導系を含まないカセット 0 を DNA-Pkcs 遺伝子が正常な CHO 細胞内で HAC ベクターに挿入すると高発現が見られるのに対し、V3 細胞では低レベルの発現しか認められなかった。V3 細胞において CMV プロモーターにより



DNA-Pkcs 遺伝子を高発現させると細胞の増殖が抑制されるためクローンとして単離されず、増殖に影響のない低発現クローンのみが単離されたものと考えられる。

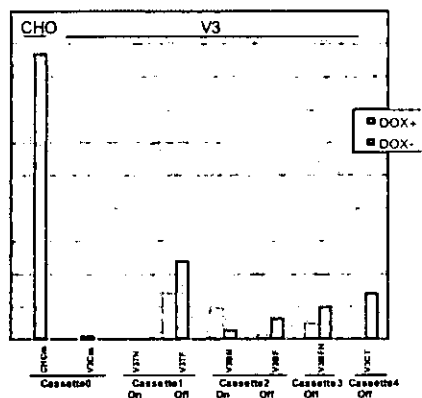
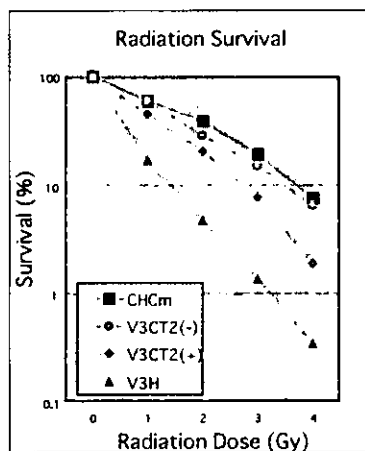


図 2. RT-PCR による DNA-Pkcs 遺伝子の発現量の比較

Tet-on システムについてはカセット 2 のみ検討した。Leaky な発現がみられたものの、Dox による発現誘導が確認された。Tet-on システムについてはカセット 1 から 4 までの 4 種類を検討したが、CAG プロモーターで駆動される *tTA* の転写単位の両端をインスレーター配列で囲ったカセット 4 において最も厳密な制御が可能であることが示された。



(-) : Dox なし  
(+) : Dox 1000 ng/mL

図 3. 放射線照射後のコロニー形成能を指標とした DNA-Pkcs 遺伝子の機能発現の検討

HAC ベクター (カセット 4) を用いた DNA-Pkcs 遺伝子の機能発現を V3 細胞の放射線高感受性に対する相補試験により検討した結果を図 3 に示す。V3 細胞の放射線感受性は DNA-Pkcs/HAC の移入によって DNA-Pkcs 遺

伝子が正常な CHO 細胞と同レベルまで相補され、Dox 添加により DNA-Pkcs 遺伝子の発現を抑制すると放射線感受性が上がることを示された。

#### D. 考察

本年度の研究により、HAC ベクターを用いてテトラサイクリン応答性に DNA-Pkcs 遺伝子の発現制御が可能であることが明らかとなった。次年度において DNA-Pkcs 遺伝子を欠損するマウス ES 細胞への DNA-Pkcs/HAC 移入、*in vitro* での造血幹細胞への分化誘導、DNA-Pkcs 欠損マウスへの移植、成熟 T/B 細胞の回復確認の手順で進行する遺伝子治療モデル実験のための基盤が確立できた。

DNA-PKcs 欠損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し、放射線感受性の上昇や V(D)J recombination の障害といった表現型を示す。SCID マウスでは発癌率の上昇が見られるが、これが成熟 B、T 細胞が減少したためであるのか、または直接 DNA 修復機構の破綻が原因であるのかは不明である。したがって発癌リスクに対する DNA-Pkcs の寄与を評価するためには、生後成熟リンパ球数が上昇するまで DNA-PKcs を発現し、その後ロックアウトされるような発現制御システムが望まれた。

DNA 二重鎖切断の修復機構である相同組換え (Homologous recombination; HR) と非相同末端再結合 (Non-homologous end joining; NHEJ) は相互補完的に機能すると考えられ、反応機序を解明するためには二重欠損モデルの作製が有効であると考えられる。しかし二重欠損モデルでは致死率が非常に高いので、単遺伝子欠損モデルを作製したのち人工的な遺伝子発現制御システムによって二重欠損とすることで、モデルの作製が期待できる。

HAC ベクターによる DNA-Pkcs の Tet-off システムが構築できたことは、遺伝子治療モデルの構築に止まらず、DNA-Pkcs 遺伝子の機能解析に対しても有効なツールを提供することが期待できる。

#### E. 結論

HAC ベクターを用いてテトラサイクリン応答性に DNA-Pkcs 遺伝子の発現制御が可能であることが明らかとなった。次年度に予定している DNA-Pkcs 欠損マウスを対象とした遺伝子治療モデル実験のための基盤が確立できた。

**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

「新規 HAC ベクター系の構築：テトラサイクリン誘導系を用いた DNA-PKcs 遺伝子の発現調節」大槻明広、加藤基伸、栗政明弘、押村光雄（第 26 回日本分子生物学会年会；2003 年 12 月）

**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 をマウス個体内およびヒト筋芽細胞に導入し本染色体ベクターの有用性を検証するための実験系を確立した。

A. 研究目的

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、新しい染色体操作技術を用いて、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。

昨年度の研究により、ヒト X 染色体のジストロフィン遺伝子領域を人工染色体 HAC-SC20（ヒト第 14 染色体由来）に転座させた染色体ベクターHAC-SC20-dys を作成することに成功した。この染色体ベクターHAC-SC20-dys がマウス個体内で正常に機能することの確認、およびこの染色体ベクターを用いてジストロフィン遺伝子だけが「ヒト」化した新しいモデルマウスの作成を最終目標に、そのための基礎的な研究を本年度は行った。具体的には、1) *mdx* マウスに由来する ES 細胞株 *mdx-1* の樹立および HAC-SC20-dys の導入、2) ジストロフィン遺伝子のほぼ全領域を欠失した ES 細胞株の樹立等である。これらの成果により DMD モデルマウス作成のための基本的な実験系がほぼ確立したと考えられる。

一方、人工染色体 HAC-SC20-dys がヒト細胞で機能することを証明するために DMD 患者由来筋芽細胞に本染色体ベクターを導入することを試みた。しかし、初代培養のヒト筋芽細胞は増殖能が極めて低いことが判明したため、本年度は主としてこれらの細胞の培養条件等について検討した。

B. 研究方法

1) *mdx* マウス由来 ES 細胞株

*mdx* マウス胚盤胞を採取し、フィーダー細胞上で継代培養することにより体外培養可能

な胚幹細胞株 *mdx-1* として分離した。

2) ジストロフィンノックアウトベクター

マウスゲノム情報をもとに、相同組み換えによりジストロフィン遺伝子領域 (2.4Mb) の 5' 側および 3' 側のそれぞれに loxP 配列を挿入するための 2 種類のベクターを作成した (図 2 参照)。

①ジストロフィン上流域に loxP 配列を挿入するための *dmd* KO 5' ベクター

ジストロフィン遺伝子の大脳皮質 (C) 特異的プロモーター領域近傍を PCR で増幅し、全長 7.2Kb および 2.8Kb の DNA 断片を得た。PCR 断片の塩基配列を確認した後、この 2 つのゲノム DNA 断片、loxP 配列、ネオマイシン耐性遺伝子、ジフテリア毒素遺伝子および  $\beta$  アクチンプロモーターを連結した全長 20Kb のプラスミドベクターを作成した。

② ジストロフィン下流域に loxP 配列を挿入するための *dmd* KO 3' ベクター

①と同様な方法により、ジストロフィン遺伝子エクソン 79 を含む下流域に loxP を挿入するためのベクターを作成した。このベクターは、ゲノム DNA 断片、loxP 配列、ピューロマイシン耐性遺伝子、ジフテリア毒素遺伝子およびハイグロマイシン-EGFP 融合遺伝子を含む (全長約 20Kb)。

マウス ES 細胞株 TT2-O に上記のベクター ②を導入した後、ネオマイシン存在下で培養した。生き残った ES 細胞クローンを分離した後、loxP がジストロフィン遺伝子下流に正しく挿入されていることをサザンハイブリダイゼーションで確認した。次いで、ベクター ①を導入し、loxP がジストロフィン遺伝子上流域に挿入されていることを確認した。上流域及び下流域にそれぞれ loxP が挿入されたこれらの ES 細胞株に Cre-recombinase 発現ベクター pBs185 (Gibco BRL) を導入し、ハイグロマイシン存在下で選択培養した。

3) ミクロセル融合法による人工染色体 HAC-SC20-dys の導入。

HAC-SC20-dys を保持した CHO 細胞からコロネミドおよびサイトカラシン B 処理によりミクロセルを作成した。このミクロセルとマウス ES 細胞またはヒト DMD 患者由来筋芽細胞とをポリエチレングリコール処理により融合させ、HAC-SC20-dys をこれらの細胞に導入した。

#### 4) ヒト DMD 由来筋芽細胞

ヒト DMD 由来筋芽細胞 (初代培養) に GFP 発現ベクターをリポフェクション法を用いて導入した。1 個の GFP を発現している筋芽細胞を採取し、20%FBS を含む DMEM/HamF12 培地に、bFGF, LIF,  $TNF\alpha$ , PDGF-AA, PDGF-BB, IGF I, II, HGF 等筋芽細胞に対して増殖刺激効果が報告されている増殖因子をさまざまな組み合わせで添加し、クローニング状態でヒト筋芽細胞が増殖できる培養条件を検索した。

#### [倫理面への配慮]

本研究は、北里大学医学部・病院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. 研究結果及び考察

#### 1) mdx マウス由来 ES 細胞株の樹立および HAC-SC20-dys 導入

mdx マウスより新に樹立した mdx-1 ES 細胞株は、正常な核型 (XY) を持ち、通常の培養条件で長期間安定に維持された。この細胞株のジストロフィン遺伝子に点突然変異が生じていることは PCR で確認した。これらの細胞を正常マウス胚に注入してキメラマウスを作成した。誕生したマウスの約半数が被毛色キメラであり、その 2/3 は 50%以上の高いキメリズムを示した。この mdx-1 細胞に電気穿孔法を用いて GFP 発現ベクターを導入することにより標識し、組織レベルでキメラを解析するための実験系を確立した (図 1)。

これらの mdx-1 ES 細胞に人工染色体 HAC-SC20-dys をミクロセル融合法を用いて導入した。融合操作後、選択培養下で生き残った 22 株の ES 細胞クローンを分離し、PCR で解析した結果、ヒトジストロフィン遺伝子が導入されていることが確かめられた。これらの細胞株と mdx マウス胚盤胞を用いて作成したキメラマウスでは HAC 由来のヒトジストロフィンだけが機能することになり、HAC ベ

クターにより mdx マウスを "治療" できることを確かめるための実験系となると期待できる。現在、キメラマウスを作成する準備を進めている段階である。

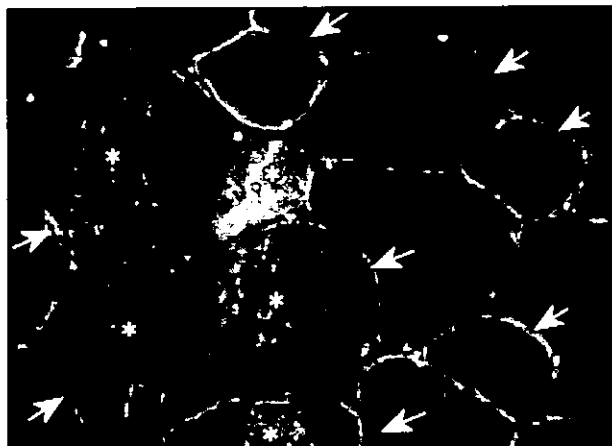


図 1 mdx-1 ES 細胞株から作成したキメラマウス (10 週齢) 筋組織

mdx-1 由来の筋繊維と宿主胚由来筋繊維は、GFP による蛍光で判別できる。宿主胚由来筋繊維細胞膜ではジストロフィンの発現が認められる (矢印) が、mdx-1 由来の筋繊維 (\*) には発現が認められない

#### 2) ジストロフィン遺伝子領域 (2.4Mb) を欠損したマウス ES 細胞株の樹立

mdx マウスは、ジストロフィン遺伝子がエクソン 23 の点突然変異により null になったものであり、現在唯一の DMD モデルマウスである。mdx マウスでは DMD 患者と同様な出生後における筋線維の崩壊は認められるが、筋崩壊後に筋組織が著しく再生し重篤な筋障害を示さない点でヒト DMD とは大きく異なる。ジストロフィン遺伝子領域を完全に欠失したマウスを作成し、そのマウスに正常あるいは DMD 患者のジストロフィン遺伝子を導入することにより「ヒト」型のジストロフィン遺伝子のみを保持する新しいモデルマウスを作成することは本研究の目標の 1 つである。これに関連して本年度は以下の研究を行った。

相同組み換えによりジストロフィン遺伝子の上流域および下流域に各々 loxP 配列を挿入するための 2 つのベクター、DMD KO 5' ベクターおよび 3' ベクターを作成し、順次、マウス ES 細胞株 TT2-O に導入し、2 度の相同組み換えを行わせた (図 2)。LoxP 配列がジストロフィン遺伝子の上流域および下流域に計画通りに挿入されていることはサザンハイブリダイゼーションで確認した。これらの ES 細胞株に対して Cre-recombinase 発現ベク