

ターを一過的に作用させた後、ハイグロマイシンを含む培地中で培養し、クローン株として分離した。ゲノム DNA を抽出しサザンハイブリダイゼーションで確認した結果、これらの ES 細胞株では 2.4Mb のジストロフィン遺伝子領域が欠失していることが判明した。

現在、この ES 細胞株を用いたキメラ作成に着手している段階であるが、ES 細胞の核型に変化は認められなかったため、この ES 細胞株に由来するマウスを作成できるものと期待できる。

ジストロフィン遺伝子は 7 つの組織特異的 promoter と 85 の exon をもちゲノムサイズ

が 2.4Mb にも及ぶヒト最大の遺伝子である。DMD (および BMD) 患者では、ジストロフィン遺伝子の様々な部位に欠失や重複、点突然変異が生じており、それに伴って臨床症状も多様である。本研究により作成したジストロフィン遺伝子を完全に欠失したマウス ES 細胞に、ヒト DMD のジストロフィン領域が転座した HAC ベクターを導入することにより、ジストロフィン遺伝子領域のみが「ヒト」型のマウス作成が可能となる。このようにして作成したマウスは、DMD の理想的な疾患モデルマウスとして DMD 発症機序の解明や治療法の開発に極めて有用であろうと期待できる。

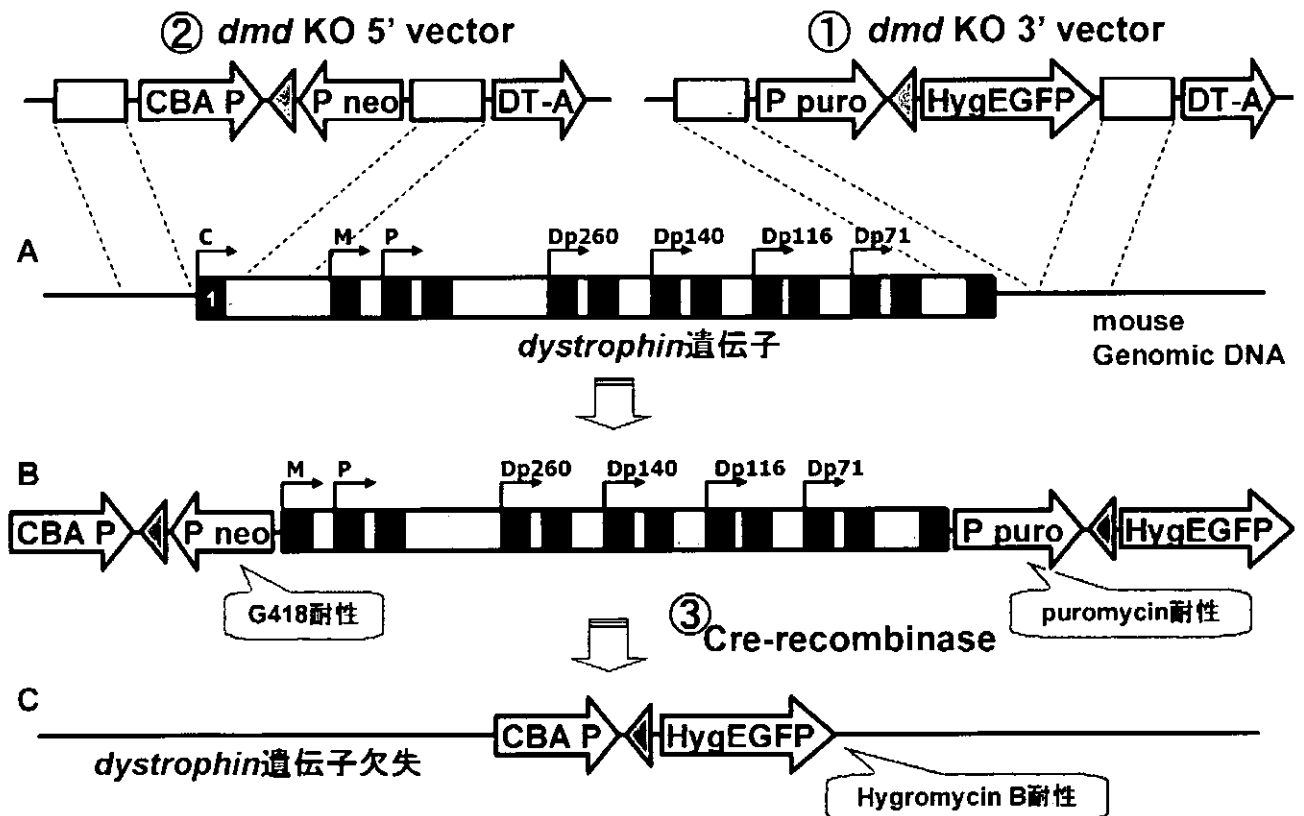


図2 ジストロフィン遺伝子領域を欠失したマウス作成のための手順を示す模式図。
A. 野生型マウスのジストロフィン遺伝子の構造。7種類のプロモータと85個のエクソンを持つ。 B. dmd KO 3' ベクター①および5' ベクター②による相同組み換え後のジストロフィン遺伝子領域。 C Cre-recombinase 処理後。ジストロフィン遺伝子領域が欠失するとともにハイグロマイシン-GFP 融合タンパクが作られるようになる。

3) ヒト DMD 患者由来筋芽細胞への HAC-SC20-dys 導入の試み

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。そこで、DMD 患者由来筋芽細胞への本

染色体ベクター導入を試みた。しかし、DMD 由来筋芽細胞は増殖能が低く、特に低密度の培養状態で非常に不安定であり、他の多くのマウス・ヒト細胞とは異なりマイクロセル融合が極めて困難であることが判明した。本年度は、ヒト初代培養筋芽細胞が低密度状態で安定して増殖する培養条件について詳細に検

討した。その結果、bFGF, PDGF AA および PDGF BB (各々20ng/ml)を培地に加えることにより1個の筋芽細胞からでも増殖可能であることが明らかになった。今後、今回明らかになったヒト DMD 由来筋芽細胞の培養条件を用いて HAC-SC20-dys 導入を再度試みる予定である。

D. 結論

今年度の研究により、マウスおよびヒト染色体を直接操作することによる 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。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1.論文発表

Imai H, Hirao F, Sakamoto T et al.
Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse PHGPx gene, BBRC 305, 278-286, 2003

2.学会発表

「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、第26回日本分子生物学会年会(2003年12月)

G. 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
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	Biochem. Biophys. Res. Commun.	305	278-286	2003