

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 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 押村 光雄

平成 17 (2005) 年 3 月

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 16 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 押村 光雄

平成 17 (2005) 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
	井上 敏昭	
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	13
	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	15
	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	20

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 ベクターについて、導入遺伝子の発現制御に関する性能を検証した。骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) 株の *in vitro* 分化誘導系を用いて、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。また人工リガンドに応答して体性幹細胞に分化シグナルを伝達する抗体/受容体キメラ遺伝子を搭載した HAC ベクターを構築し、MSC を選択的に骨芽細胞に分化誘導する系を確立した。温度感受性を示す HSP70 遺伝子のプロモーターを利用して、HAC ベクターに挿入した遺伝子は物理的刺激に応答して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* 遺伝子治療の対象のひとつである成体由来造血幹細胞に対し、微小核細胞融合法によって HAC が移入可能であることを明らかにした。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-HAC ベクターは受容細胞 (ヒト正常線維芽細胞) において安定に保持され、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を確立した。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、内在のマウスジストロフィン遺伝子を欠損した ES 細胞に移入して、ジストロフィン遺伝子をヒト化したマウス個体を作製する系を確立した。

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

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

井上敏昭 鳥取大学大学院 医学系研究科
生命科学系専攻ゲノム医工学講座
助教授

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、基本性能（培養細胞およびマウス個体における保持安定性、受容細胞内での導入遺伝子の発現安定性）が確認できた。本年度はさらに HAC ベクターの性能検証を進める目的で、受容細胞（体性幹細胞）の分化に伴う生理的発現制御、物理刺激（温度変化）に応答した発現制御、ならびに薬剤投与による発現制御（テトラサイクリン発現誘導系）について検討した。HAC ベクターの *ex vivo* 遺伝子治療、再生医療における将来利用に対し、予想される最大の課題はヒト由来 primary 細胞への移入効率である。移入法の向上を目指した検討を開始するに先立ち、現状の方法による HAC の primary 細胞への移入の可否を検証する目的で、線維芽細胞および造血系細胞を対象とした検討を行った。

最近の遺伝子マッピング研究の進展により 21HAC の含まれるヒト 21 番染色体セントロメア近傍に、これまで報告されていなかった転写領域の存在が報告された。21HAC からこれらの転写物が生成されるかどうかは検証できない為、これらの領域を含まない第 2 世代の 21HAC 構築に着手した。

転座型 HAC による欠損型遺伝病治療モデルの構築については、前年度までに構築したジストロフィン HAC を、新たに構築したマウスジストロフィン欠損 ES 細胞に移入し、ジストロフィン遺伝子がヒト化されたモデルマウス作製法の構築を目指した。

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した。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」を検討した。

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

HAC ベクターによる導入遺伝子の生理的発現制御を実証するため、多分化能を維持する MSC 株の *in vitro* 分化誘導系を利用した。MSC の骨芽細胞への分化に伴い発現が上昇するオステオポンチン (OPN) 遺伝子のプロモーターを GFP 遺伝子に繋いだコンストラクトを用いて検討した。

HAC ベクターによる導入遺伝子の生理的発現制御を実証するため、熱応答性を示す HSP70

遺伝子のプロモーターの制御下にプロインスリン遺伝子を繋いだコンストラクトを挿入した HAC を構築し、ヒト細胞株 (HT1080) を用いて検討した。

2. HAC ベクターおよび受容細胞の高度精製法の確立

人工リガンドであるフルオレセイン二量体の添加によって crosslink され細胞内に増殖/分化のシグナルを伝達する gp130 キメラ受容体（東京大学・河原正浩博士より分与）発現コンストラクトを CHO 雑種細胞内で HAC ベクターに挿入し、この F1/gp130-HAC を上述の MSC 株に移入する。人工リガンドの添加による骨芽細胞系譜への分化誘導について探索する。

ヒト 21 番染色体セントロメア近傍の転写領域を含まない第 2 世代の HAC ベクター構築は、従来と同様 DT40 を改変宿主とし、相同組み換えを利用した染色体改変技術により行った。

前年度までに、造血幹細胞の分化能を損なうことなく体外増幅できる培養条件を特定することができた。本年度はこれを利用し、21HAC を微小核細胞融合法 (Microcell-Mediated Chromosome Transfer; MMCT) により造血系細胞に移入した。ヒト骨髄由来単核球細胞 (MNC) への移入では、*in vitro* colony formation assay を行い、臍帯血由来 CD34 陽性細胞画分への移入では、放射線照射 NOD-SCID mouse への移植後、骨髄への生着を検証した。

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（線維芽細胞等）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線維芽細胞 HFL-I（胎児肺由来）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

(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 を繋いだ発現ユニットと (r)tTA 発現ユニットを含むコンストラクトを構築し、DNA-PKcs 遺伝子欠損細胞株である v3 細胞 (CHO の亜株) 内に保持されている HAC ベクター上に挿入した。ドキサイクリン (Dox; テトラサイクリン誘導体) 投与による DNA-Pkcs 遺伝子の発現亢進/抑制を RT-PCR および western blotting 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

内在のジストロフィン遺伝子を欠損したマウス ES 細胞として、MDM モデルである mdx 由来の ES 細胞株 (mdx-E2) と、Cre/loxP システムを利用して X 染色体ジストロフィン遺伝子領域 (~2.4Mb) を欠失したマウス ES 細胞株 (TT2-O 由来) を新たに樹立した。

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 (前年度までに取得済み) を前述の mdx-E2 株に移入し、キメラマウスの作出および表現型の解析を行った。

(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」を遵守した。各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) HAC ベクターによる生理的発現制御

OPN/EGFP-HAC を保持する MSC 株は、骨芽細胞系譜へ分化誘導したときにのみ EGFP を発

現した。分化誘導に伴って内在の OPN 遺伝子の発現上昇が認められたことから、HAC ベクターのより導入した遺伝子は、受容細胞内において生理的な発現制御を受けることが示された。

2) HAC ベクターによる物理的刺激に応答した発現制御

HSP70/proinsulin-HAC を保持する HT1080 株は 50°C 5 分の熱処理に応答してプロインスリンを発現することが示され、HAC ベクターにより物理的刺激に応答した発現制御が可能ながことが明らかとなった。

2. HAC ベクターおよび受容細胞の高度精製法の確立

1) キメラ受容体を利用した人工リガンドによる体性幹細胞の分化誘導

F1/gp130-HAC を中間宿主である CHO 細胞内で構築し、MSC に移入した。この MSC 株に人工リガンド (BSA-フルオレセイン) を添加して培養したところ、骨芽細胞に特異的なアルカリホスファターゼ活性が検出された。以上から HAC 上に挿入した gp130 キメラ受容体遺伝子が機能的に発現し、MSC の分化が制御できることが示された。

2) 第 2 世代 21HAC ベクターの構築

トリ DT40 細胞における相同組換えにより、ヒト 21 番染色体長腕上セントロメアより約 30kb の位置に loxP 部位をもち、短腕上に数 kb、長腕上に約 30kb の、転写領域を含まない配列を保持した HAC ベクターが構築できた。長腕削除前の ΔpHAC では、CHO を宿主細胞として EGFP の発現が認められたことから、任意に設定した loxP 部位に挿入した遺伝子がセントロメア近傍のヘテロクロマチン効果を受けて発現が抑制されないことが示された。

3) 造血系細胞への HAC 移入

MNC に GFP-HAC を移入し 5 日間の回復培養ののち G418 選択を行ったところ、耐性コロニーが出現し GFP 発現が確認された。受容細胞あたりの耐性株の出現頻度は平均 5×10^{-6} (n=3) であった。メイギムザ染色による検鏡では、約 4 割が顆粒球ないしマクロファージ、残りは赤芽球の形態を示したことから、HAC ベクターは MMCT により造血系細胞に移入可能であり、HAC が移入された前駆細胞は分化能を維持していることが明らかになった。

臍帯血由来 CD34+細胞分画に GFP-HAC を移入し放射線照射した NOD-SCID マウスに移植した。2 週間後に回収した骨髓細胞をフローサイトメーターで解析したところヒト CD45+

細胞分画の一部で GFP 発現が認められたことから、HAC を移入した造血幹細胞がマウス個体に生着可能なことが明らかになった。

3. 付加的遺伝子治療の試み

EPO-HAC を移入したヒト正常繊維芽細胞 HFL-I 株 4 クローンは、倍加数 10~14 まで分裂したのち増殖を停止した。HAC 移入により得られた単一細胞から、最大 3.8×10^7 まで増殖可能であった。FISH 解析によりこの間の HAC 脱落率を算出したところ、約 1.8% であった。ヒト正常細胞に移入した HAC ベクターが安定に保持されること、HAC を保持する正常細胞は一定回数分裂の後形質転換することなく増殖停止することが明らかになった。

4. 欠損型遺伝病 (SCID) に対する遺伝子治療の試み

HAC ベクターを保持する V3 細胞株に DNA-Pkcs 発現カセット (Tet-off) と Cre 発現プラスミドを導入して得られた G418 耐性株のうち約 60% が目的の挿入体であった。このうち 3 株について解析したところ、Dox 応答性の発現制御が RNA およびタンパク質レベルで確認された。さらに放射線高感受性の相補試験によって、DNA-Pkcs 遺伝子の機能的発現が Dox 応答性に制御可能なことが明らかになった。

5. 欠損型遺伝病 (DMD) に対する遺伝子治療の試み

Cre/loxP システムを利用して Dystrophyn 領域を欠失させた ES 細胞は正常核型を維持し、キメラマウス個体への高い寄与率が確認された。さらに生殖系列への伝達が可能であり、交配により Dystrophyn 欠損マウスが得られた。

mdx マウスから新たに樹立した ES 細胞株に HAC-SC20-dys を移入し、キメラマウスを作製した。脳、骨格筋、肝臓におけるヒト Dystrophyn の発現を RT-PCR により検索したところ、各組織で特異的なアイソフォームの発現が確認された。交配実験により、HAC-SC20-dys を保持する ES 細胞が次世代伝達したことを確認できた。

D. 考察

HAC ベクターの最大の特徴は、宿主細胞の染色体外に独立して存在し、導入遺伝子に対して単一の受容部位を提供することにある。この特徴が、導入遺伝子の発現制御に関し再

現性を保証することを検証した。目的遺伝子の挿入体は G418 耐性の獲得を指標として選別したが、耐性株の全てが導入遺伝子全長を含むとは限らず、目的の挿入体が得られる率は挿入カセット毎に異なるという結果を得た。しかし中間宿主である CHO 細胞内でインタクトな導入遺伝子を保持する HAC が選別できれば、MMCT によって次の受容細胞へ移入可能であることが明らかになった。受容細胞による生理的発現制御、物理刺激にตอบสนองした発現制御、ならびに薬剤添加にตอบสนองした発現制御について検討したが、いずれの場合も HAC ベクター上の単一受容部位において、入力刺激にตอบสนองした目的遺伝子の発現制御系を構築できることが確認された。前年度までに得られた HAC ベクターの各種培養細胞における安定保持の結果も合わせて、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といえる。

HAC を含む染色体断片を MMCT により移入する対象は、これまで殆どの場合樹立された細胞株に限られていた。Ex vivo 遺伝子治療への適用を考えると、成体由来 primary 細胞への HAC 移入が課題といえる。現状の MMCT プロトコルによる基礎データを得る目的で、線維芽細胞を対象とした検討を行った。付加的遺伝子治療モデルの構築を目指した EPO-HAC の線維芽細胞への移入では、従来データを上回る効率 (受容細胞あたり 10^{-4}) で移入クローンが取得され、なおかつ構成的に導入遺伝子を発現する株が最大で細胞数 3.8×10^7 まで増幅できることが示された。この結果から、現状の導入効率でも対象疾患と方法を選べば、HAC を利用した付加的治療が可能であることが示唆された。一方造血系細胞を用いた研究では、予備的ではあるが分化能を維持した前駆細胞に GFP-HAC が移入でき、免疫不全マウスに移植・生着可能であることが示された。現行プロトコルは受容細胞毎に最適化は行っていないので、さらに改善の余地がある。定性的ではあるが HAC 移入が確認できたことから、今後の展開に期待が持たれる。今後は受容細胞に対応した MMCT プロトコルの最適化を進めると同時に、当初計画に挙げながら達成できなかった、受容細胞から HAC を含む微小核細胞の効率的な分取法についても検討を予定している。

動物モデルを用いた ex vivo 遺伝子治療モデルの検討については、目的遺伝子を搭載した HAC ベクターの構築までは完了したものの、HAC 保持細胞を動物個体に移植し、治療効果

を検討する実験については今後課題を残した。EPO-HACによる付加的治療の場合は、HACを保持するヒト線維芽細胞が取得できた。今後は移植後の免疫による拒絶を最小限に抑えるためのデリバリー法の検討（低分子透過性膜カプセルの利用など）およびレシピエントとなるマウスの選択（SCIDないしNOD-SCID）について検討する予定である。DNA-Pkcs-HACによる欠損遺伝子の相補の場合は、Tet応答性のDNA-Pkcs-HAC構築まで終了した。現在DNA-Pkcs欠損であるSCIDマウスからES細胞株を単離する試みを続けており、これが樹立できればHAC移入ES細胞をin vitro分化誘導後移植するモデル実験が可能となる。

DMDを対象とした検討では、内在のジストロフィン遺伝子を欠損した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。HACを保持したキメラマウスにおいて、ヒトジストロフィン遺伝子の組織特異的アイソフォームの発現が確認されたことから、ジストロフィン遺伝子をヒト化したマウスを構築する手法が確立されたといえる。今後は同様の手法によりDMD患者由来の変異ジストロフィン領域を保持するモデルマウスの構築を進めることで、正常ヒトジストロフィンHACの移入による治療モデルが検証できると期待される。

E. 結論

今年度の研究により、21HACベクター上に挿入した遺伝子は1) 宿主細胞による生理的な発現制御、2) 温度感受性プロモーターの利用による熱応答性の発現制御 3) テトラサイクリン応答性の発現制御、を受け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。またヒト線維芽細胞へのEPO-HAC移入、造血系細胞へのGFP-HAC移入が可能であることが示され、ヒトprimary細胞を対象としたHACによる遺伝子治療に道を拓いた。転座型HACのアプローチでは、DMD遺伝子をヒト化したモデルマウスの作成技術が確立できた。以上から、HACを用いた遺伝子治療を進める上で、基盤技術および資材が整備できたと考える。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- Kazuki Y, Kimura M, Nishigaki R, Kai Y, Abe S, Okita C, Shirayoshi Y, Schulz TC, Tomizuka K, Hanaoka K, Inoue T, Oshimura M. Human chromosome 21q22.2-qter carries a gene(s) responsible for downregulation of mlc2a and PEBP in Down syndrome model mice. *Biochem Biophys Res Commun.* ;317(2):491-9, 2004.

- Katoh M, Ayabe F, Norikane S, Okada T, Masumoto H, Horike S, Shirayoshi Y, Oshimura M. Construction of a novel human artificial chromosome vector for gene delivery. *Biochem Biophys Res Commun*; 321(2): 280-90, 2004.

- Horibata K, Iwamoto Y, Kuraoka I, Jaspers NG, Kurimasa A, Oshimura M, Ichihashi M, Tanaka K. Complete absence of Cockayne syndrome group B gene product gives rise to UV-sensitive syndrome but not Cockayne syndrome. *Proc Natl Acad Sci US A.* ;101(43):15410-5, 2004.

- Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, Baba S, Kato T, Kazuki Y, Toyokuni S, Toyoshima M, Niwa O, Oshimura M, Heike T, Nakahata T, Ishino F, Ogura A, Shinohara T. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. *Cell*; 119(7): 1001-12, 2004.

- Kudoh H, Ikeda H, Kakitani M, Ueda A, Hayasaka M, Tomizuka K, Hanaoka K. A new model mouse for Duchenne muscular dystrophy produced by 2.4 Mb deletion of dystrophin gene using Cre-loxP recombination system. *Biochem Biophys Res Commun.*; 328(2): 507-16, 2005.

- Otsuki A, Tahimic CG, Tomimatsu N, Katoh M, Chen DJ, Kurimasa A, Oshimura M. Construction of a novel expression system on a human artificial chromosome. *Biochem Biophys Res Commun*; 329(3): 1018-1025, 2005.

- Kakeda M, Oshimura M, Tomizuka K et al. Human artificial chromosome (HAC) vector provides long-term therapeutic transgene expression in normal human primary fibroblasts. *Gene Ther.* 2005 Mar 3; [Epub ahead of print]

- Haruta M, Meguro M, Sakamoto YK, Hoshiya H, Kashiwagi A, Kaneko Y, Mitsuya K,

Oshimura M. Narrowed abrogation of the Angelman syndrome critical interval on human chromosome 15 does not interfere with epigenotype maintenance in somatic cells. J Hum Genet. 2005 Mar 3; [Epub ahead of print]

2.学会発表

- Otsuki A, Kurimasa A, Tahimic CGT, Katoh M, Oshimura M. In vitro rescue of radiosensitive phenotype using a novel human artificial chromosome (HAC) vector containing DNA-PKcs gene. The American Society of Gene Therapy's 7th annual meeting, 2004, USA.
- Katoh M, Ayabe F, Norikane S, Hoshiya H, Ren X, Suda T, Okita C, Oshimura M. Construction of a novel human artificial chromosome and its use for gene delivery. The American Society of Gene Therapy's 7th annual meeting, 2004, USA.
- Kakeda M, Hiratsuka M, Nagata K, Takahashi M, Ayabe F, Katoh M, Oshimura M., Tomizuka K. Application of a novel human artificial chromosome (HAC) vector to gene therapy aimed at erythropoietin (EPO) replacement. The American Society of Gene Therapy's 7th annual meeting, 2004, USA.
- Oshimura M. Chromosome engineering using chromosome transfer for functional analyses. 15th International Chromosome Conference, 2004, UK.
- Katoh M, Ayabe F, Norikane S, Hoshiya H, Ren X, Suda T, Okita C, Oshimura M. Construction of a novel human artificial chromosome (HAC) and its use for gene delivery. 15th International Chromosome Conference, 2004, UK.
- 任鮮英、加藤基伸、柴田弘太郎、戸口田淳也、押村光雄「新規 HAC ベクターによる間葉系幹細胞の分化に伴う組織特異的遺伝子発現」(第 27 回日本分子生物学会年会; 2004 年 12 月)
- 工藤寛枝、池田春子、柿谷誠、早坂美智子、富塚一磨、花岡和則「ジストロフィンゲノム全領域 (2.4Mb 欠損マウスの作製) (第 27 回日本分子生物学会年会; 2004 年 12 月)
- 高藤淳、早坂美智子、花岡和則「X-linked muscular dystrophy (mdx) mouse からの ES 細胞株の樹立」(第 27 回日本分子生物学会年

会; 2004 年 12 月)

- 木村健太、早坂美智子、黒岩義巳、香月康宏、押村光雄、富塚一磨、花岡和則「ヒトジストロフィン全ゲノム領域が転座した人工染色体を保持したマウスの作製」(第 27 回日本分子生物学会年会; 2004 年 12 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

厚生労働科学研究費補助金（ヒトゲノム・再生医療等研究事業）
分担研究報告書

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 番染色体から構築した 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。熱応答性プロモーターの制御下にインスリン遺伝子を配した HAC ベクターを構築し、HAC 上に搭載した遺伝子が物理刺激により発現誘導されることを示した。以上から、21HAC ベクターは遺伝子発現ベクターに求められる基本性質を満たすことが実証された。

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證する 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利点が期待できる。前年度までにヒト 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、ヒト細胞、マウス細胞およびキメラマウス個体における保持安定性を確認した。そこで今年度はさらに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) 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、2) 温度感受性プロモーターを利用したインスリン遺伝子の発現誘導について検討した。

B. 研究方法

1) 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

骨髄由来間葉系幹細胞（Mesenchymal Stem Cells; MSCs）の骨芽細胞系譜への分化に伴い発現が上昇する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た。このコンストラクトを CHO 雑種細胞内で HAC ベクターに挿入し（opn/EGFP-HAC）、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；hTERT 遺伝子およびヒトパピローマ E6/E7 遺伝子により株化された）に移入した。分化誘導用培地で培養して骨芽細胞への分化を誘導し内在の OP 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。

2) 温度感受性プロモーターを利用したインスリン遺伝子の発現誘導

HAC ベクターにより、物理的な刺激による導入遺伝子の発現制御が可能かどうか検証する目的で、温度感受性を示す HSP70 遺伝子プロモーター（京都大学・永田和宏教授より分与）の制御下にプロインスリン遺伝子（神戸大学・清野進博士より分与）を繋いだコンストラクトを構築する。これを HT1080 細胞中に保持される 21HAC ベクターに挿入し、プロインスリンの温度感受性発現を RNA（RT-PCR）およびタンパク質レベル（ELISA 法）により検索する。

（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。

C. 研究結果

1) 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

発現制御実験に先立ち 21HAC ベクターの hiMSC 細胞における安定性を検証した。選択薬剤を含まない培地で長期培養し、FISH による染色体解析から保持率を検索した。保持率は 100 継代まで定常的に 80%以上を示し、

21HAC ベクターは hiMSC 細胞内で安定に保持されることが明らかになった。

Opn/EGFP 発現ユニットの両端にインスレーターを配したコンストラクトを作製し 21HAC ベクターを保持する CHO 雑種細胞にトランスフェクトした結果、G418 耐性を示す 8 株を得た。PCR により OPN/EGFP 発現単位を含むことを確認した 3 株について FISH 解析を行ったところ、転座/挿入なく独立して存在する HAC が認められた。

この 3 株から任意の OPN/EGFP-HAC 供与細胞株を選び、hiMSC に移入した。得られたプラスチジン耐性の 16 株がインタクトな OPN/EGFP 発現単位を含むことを PCR およびサザンプロットにより確認した。さらに染色体レベルでの変異がないことを FISH 解析により確認した。

このうち任意に選んだ 4 株について骨芽細胞および脂肪細胞系譜への分化誘導培地にて培養したところ、骨芽細胞に特異的なアルカリホスファターゼ活性の発現に伴って EGFP 蛍光の発現が認められた。同時に内在の OPN 遺伝子の発現上昇が認められたことから、HAC ベクター上に挿入した遺伝子発現単位は宿主細胞による生理的発現制御を受けることが示された。

2) 温度感受性プロモーターを利用したインスリン遺伝子の発現誘導

HSP70 遺伝子プロモーターの制御下にプロインスリン cDNA を繋いだ発現コンストラクトを挿入した 21HAC ベクターを保持する HT1080 株を取得した。培養ディッシュをホットプレート上 50°C で 5 分間静置したのち細胞を回収し RT-PCR を行ったところ、熱処理によってプロインスリンの転写が誘導された。さらに回収した培養上清を ELISA 法により解析したところ、タンパク質レベルでもプロインスリンの発現誘導が確認できた。

D. 考察

1) 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

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 b-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。今回はインスレーターを併用し、短い調節配列によるレポーター遺伝子の転写調節が可能であることを示し

た。今後は、目的遺伝子とその上流制御配列 (エンハンサー、サイレンサー等を含む) をゲノム DNA として HAC に導入し、組織特異的なアイソフォームの発現が再構成できることを検証する予定である。

2) 温度感受性プロモーターを利用したインスリン遺伝子の発現誘導

インスリンをはじめとするホルモン補充療法の場合、付加的に導入する治療遺伝子の受容細胞は本来の発現細胞ではなく、単離・体外培養が容易な線維芽細胞で代替することも可能である。しかし線維芽細胞は、前駆体として発現されたプロインスリンをプロセスして活性型のインスリンに変換するプロテアーゼを発現していない。この問題は、プロインスリンの切断認識部位を線維芽細胞で発現される furin のそれに置換することで解決可能である。変異型プロインスリン HAC を用いた検討も進行中であり、熱応答によりインスリン発現制御が可能な線維芽細胞モデルが構築できると期待される。

E. 結論

今年度の研究により、1) 21HAC ベクター上に挿入された遺伝子は受容細胞の生理的転写制御を受け、組織特異的な発現を再現すること、2) 21HAC ベクターを利用して、物理的刺激 (温度変化) に応答した遺伝子発現制御が可能なが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

- Kazuki Y, Kimura M, Nishigaki R, Kai Y, Abe S, Okita C, Shirayoshi Y, Schulz TC, Tomizuka K, Hanaoka K, Inoue T, Oshimura M. Human chromosome 21q22.2-qter carries a gene(s) responsible for downregulation of mlc2a and PEBP in Down syndrome model mice. *Biochem Biophys Res Commun.* ;317(2):491-9, 2004.

- Katoh M, Ayabe F, Norikane S, Okada T, Masumoto H, Horike S, Shirayoshi Y, Oshimura M. Construction of a novel human artificial chromosome vector for gene delivery. *Biochem Biophys Res Commun*; 321(2): 280-90, 2004.

- Horibata K, Iwamoto Y, Kuraoka I, Jaspers NG, Kurimasa A, Oshimura M, Ichihashi M, Tanaka K. Complete absence of Cockayne syndrome group B gene product gives rise to UV-sensitive syndrome but not Cockayne syndrome. Proc Natl Acad Sci US A. ;101(43):15410-5, 2004.

- Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Lee J, Yoshimoto M, Ogonuki N, Miki H, Baba S, Kato T, Kazuki Y, Toyokuni S, Toyoshima M, Niwa O, Oshimura M, Heike T, Nakahata T, Ishino F, Ogura A, Shinohara T. Generation of pluripotent stem cells from neonatal mouse testis. Cell; 119(7): 1001-12, 2004.

- Otsuki A, Tahimic CG, Tomimatsu N, Katoh M, Chen DJ, Kurimasa A, Oshimura M. Construction of a novel expression system on a human artificial chromosome. Biochem Biophys Res Commun; 329(3): 1018-1025, 2005.

- Kakeda M, Oshimura M, Tomizuka K et al. Human artificial chromosome (HAC) vector provides long-term therapeutic transgene expression in normal human primary fibroblasts. Gene Ther. 2005 Mar 3; [Epub ahead of print]

- Haruta M, Meguro M, Sakamoto YK, Hoshiya H, Kashiwagi A, Kaneko Y, Mitsuya K, Oshimura M. Narrowed abrogation of the Angelman syndrome critical interval on human chromosome 15 does not interfere with epigenotype maintenance in somatic cells. J Hum Genet. 2005 Mar 3; [Epub ahead of print]

2. 学会発表

- Otsuki A, Kurimasa A, Tahimic CGT, Katoh M, Oshimura M. In vitro rescue of radiosensitive phenotype using a novel human artificial chromosome (HAC) vector containing DNA-PKcs gene. The American Society of Gene Therapy's 7th annual meeting, 2004, USA.

- Katoh M, Ayabe F, Norikane S, Hoshiya H, Ren X, Suda T, Okita C, Oshimura M. Construction of a novel human artificial chromosome and its use for gene delivery. The American Society of Gene Therapy's 7th annual meeting, 2004, USA.

- Kakeda M, Hiratsuka M, Nagata K, Takahashi M, Ayabe F, Katoh M, Oshimura M, Tomizuka K. Application of a novel human artificial chromosome (HAC) vector to gene therapy aimed at erythropoietin (EPO) replacement. The American Society of Gene Therapy's 7th annual meeting, 2004, USA.

- Oshimura M. Chromosome engineering using chromosome transfer for functional analyses. 15th International Chromosome Conference, 2004, UK.

- Katoh M, Ayabe F, Norikane S, Hoshiya H, Ren X, Suda T, Okita C, Oshimura M. Construction of a novel human artificial chromosome (HAC) and its use for gene delivery. 15th International Chromosome Conference, 2004, UK.

- 任鮮英、加藤基伸、柴田弘太郎、戸口田淳也、押村光雄「新規 HAC ベクターによる間葉系幹細胞の分化に伴う組織特異的遺伝子発現」(第 27 回日本分子生物学会年会; 2004 年 12 月)

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当なし

研究要旨

人工リガンドに応答して体性幹細胞に分化シグナルを伝達する抗体/受容体キメラ遺伝子を搭載した HAC ベクターを構築し、骨髄由来間葉系幹細胞を選択的に骨芽細胞に分化誘導する系を確立した。さらにヒト 21 番染色体セントロメア近傍に新たにマップされた転写領域を含まない第 2 世代の HAC ベクターを構築した。ヒト造血系細胞への HAC 導入を試みた。ヒト骨髄由来造血系細胞に対し GFP-HAC を微小核細胞融合法により移入し *in vitro* でコロニーアッセーを行ったところ、増殖細胞において GFP の発現が認められた。さらに GFP-HAC を移入したヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞画分を放射線照射した免疫不全マウス (NOD-SCID) に移植したところ、骨髄内にヒト CD45 陽性 GFP 陽性細胞の存在が認められた。HAC 移入効率を向上させることで、造血系細胞を対象とした HAC による *ex vivo* 遺伝子治療が可能になることが示された。

A. 研究目的

造血幹細胞をはじめ間葉系幹細胞など成体由来の体性幹細胞は、体外増幅が可能であり多分化能を示すことから HAC を用いた *ex vivo* 遺伝子治療の対象として重要である。体外で治療目的の遺伝子を導入した幹細胞を、移植後に体内で人工的に分化制御できれば、目的の遺伝子を局限された細胞系譜でのみ発現できるシステムが構築できると考えられる。そこで生体に毒性を持たない人工リガンドに対する抗体と細胞増殖分化シグナルを伝達する受容体とのキメラ遺伝子を搭載した HAC ベクターを構築し、受容細胞の分化制御の可否を検討することにした。

既に構築した 21HAC は 2000 年に発表された塩基配列情報に基づいて設計したもので、転写領域を削除する様染色体遠位を削除した。ところがその後配列解析が進み、21HAC 上には転写領域が含まれることが明らかとなった。HAC が機能未知の転写領域を含むことは、将来的な治療への適用を想定すると好ましくない。そこでさらにセントロメアに近い位置で染色体遠位領域を削除することを試みた。

造血系細胞は、現在主にウイルスベクターを利用した臨床的な遺伝子治療に多く用いられており、HAC ベクターを利用した *ex vivo* 遺伝子治療の対象としても重要である。しかし生体から取得できる造血幹細胞数には限りがあるため、前年度までに分化能を維持した造血細胞の体外増幅に適した培養条件を確立してきた。従来より、HAC をはじめとする染色体/染色体断片を受容細胞に移入するには、

微小核細胞融合法 (Microcell-mediated chromosome transfer; MMCT) を利用してきた。21HAC ベクターは、MMCT によりヒト細胞株、マウス ES 細胞株に移入可能なが示されている。そこで本研究では、MMCT 法により造血系細胞への HAC ベクター移入が可能かどうかを検証した。

B. 研究方法

1) キメラ受容体を利用した人工リガンドによる体性幹細胞の分化誘導

人工リガンドであるフルオレセイン二量体の添加によって crosslink され細胞内に増殖/分化のシグナルを伝達する gp130 キメラ受容体 (東京大学・河原正浩博士より分与) 発現コンストラクトを CHO 雑種細胞内で HAC ベクターに挿入し、この F1/gp130-HAC を上述の hiMSC に移入する。人工リガンドの添加による骨芽細胞系譜への分化誘導について検索する。

2) 第 2 世代 HAC の構築

染色体改変は従来通り D40 細胞内で行った。テロメアトランケーションおよび loxP 導入コンストラクトを、相同組み換えによりヒト 21 番染色体セントロメア近傍に導入した。

3) 造血系細胞への HAC 移入

<In vitro 解析>

ヒト骨髄由来単核球細胞に MMCT により GFP-HAC を移入した。具体的には HAC 供与細胞である CHO 株 (1×10^8) から調整した

microcell を、受容細胞 (1×10^7) と融合させた。サイトカイン (hSCF、hTPO、FP6) を含む培地中で 5 日間培養後 G418 による選択を 12 日間行ったのち、GFP 陽性コロニーの出現を確認し、得られた G418 耐性 GFP 陽性細胞の性状を組織染色およびフローサイトメーターにより検索した。

<In vivo 解析>

ヒト臍帯血由来 CD34 陽性細胞に MMCT により GFP-HAC を移入した。具体的には HAC 供与細胞である CHO 株 (1×10^8) から調整した microcell を、受容細胞 (1×10^6) と融合させた。サイトカイン (hSCF、hTPO、FP6) を含む培地中で 5 日間培養後、予め 200cGy の X 線を照射した NOD-SCID マウスの尾静脈に注射した。2 週間後に骨髓細胞を回収してフローサイトメーターによる解析を行った。

(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。

動物移植モデルの検討は、キリンビール医薬探索研究所にて行った。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した。

C. 研究結果

1) キメラ受容体を利用した人工リガンドによる体性幹細胞の分化誘導

PGK プロモーターの制御下に gp130 キメラ受容体遺伝子/IRES/EGFP を繋いだ発現コンストラクトを CHO 細胞に保持される HAC ベクター上に挿入し、gp130 キメラ受容体 HAC を得た。発現ユニットの HAC への部位特異的挿入は、サザンブロットにより確認された。HAC ベクターに染色体レベルでの変異がないことは FISH 解析により示された。この gp130 キメラ受容体 HAC を MSC 株に移入し、得られたプラストサイジン耐性株がインタクトな HAC を保持することは FISH により確認された。この MSC 株に人工リガンド (BSA-フルオレセイン) を添加して培養したところ、骨芽細胞に特異的なアルカリホスファターゼ活性が検出された。以上から HAC 上に挿入した gp130 キメラ受容体遺伝子が機能的に発現し、MSC の分化が制御できることが示された。

2) 第 2 世代 HAC の構築

はじめにトリ DT40 細胞中において、ヒト 21 番染色体長腕上セントロメアより約 30kb の位置に loxP 配列を導入した。次にテロメアトランケーションにより短腕遠位を既知配列をほぼ残さない位置で削除した。最後に長腕遠位を、セントロメアから約 40kb の位置で削除した。長腕削除前の Δ pHAC を CHO に移入し、EGFP 発現コンストラクトをトランスフェクトしたところ、薬剤耐性株が得られ EGFP の発現が確認された。

3) 造血系細胞への HAC 移入

< In vitro 解析 >

3 回の試行で平均約 50 の薬剤耐性コロニーが出現した。蛍光顕微鏡下での観察により、得られた G418 耐性コロニーはほぼ例外なく GFP を発現していることを確認した。メイギムザ染色による観察から、約 4 割が顆粒球ないしマクロファージ、残りは赤芽球の形態を示したことから、HAC ベクターが増殖能を持つ前駆細胞に移入され、複数の細胞系譜に分化したことが示唆された。薬剤耐性コロニーを形成する細胞を回収しフローサイトメーターにより解析したところ、70%以上の画分が GFP 陽性を呈した。以上から HAC ベクターは MMCT により造血系細胞に移入可能であり、HAC が移入された前駆細胞は分化能を維持していることが明らかになった。

<In vivo 解析>

HAC 移入ヒト CD34 陽性細胞を移植した NOD-SCID マウスから回収した骨髓細胞をフローサイトメーターにより解析した。ヒト CD45 陽性の画分が認められたことから、移植したヒト細胞の生着が示された。さらにヒト CD45 陽性の画分の一部の細胞が GFP 陽性を呈した。この CD45 陽性 GFP 陽性の細胞画分が HAC を含むことは、neo 遺伝子を増幅する PCR により確認した。以上から、MMCT の過程で体外培養しポリエチレングリコール処理を施した造血幹細胞は、移植によりレシピエントマウスの骨髓に生着可能であり、低頻度ながら HAC 移入細胞が存在することが示された。

D. 考察

1) キメラ受容体を利用した人工リガンドによる体性幹細胞の分化誘導

MSC は骨、軟骨、脂肪細胞を含め多様な細胞系譜への分化能を示し、体外培養が可能なことから、HAC ベクターを利用した ex vivo 遺伝子治療の対象として有望である。患者か

ら単離した MSC に *in vitro* で目的遺伝子を導入し移植後に体内で増幅したのち分化誘導できれば、患部に限局した導入遺伝子の発現が可能となる。今後は、毒性のない抗原にตอบสนองして幹細胞の分化シグナルを伝達する抗体/受容体キメラによって、導入細胞のみを分化誘導可能な系を生体内で構築できるか否か、モデル動物を用いて検証する予定である。

2) 第 2 世代 HAC の構築

第一世代の HAC 構築を通じて得た情報の蓄積は染色体改変技術の向上につながり、より迅速に任意の染色体改変を行うことが可能になった。第 2 世代の HAC は、ほぼ正味セントロメアのアルフォイド配列から構成される。このため受容細胞における HAC の保持安定性と HAC 上に挿入された遺伝子の発現安定性を検証することが緊急の課題である。長腕削除前の検討では、*loxP* 部位に挿入した EGFP 遺伝子の構成的な発現が確認された。このことから、設定した *loxP* 部位がセントロメア近傍のヘテロクロマチン化を受けないことが示唆された。

3) 造血系細胞への HAC 移入

これまで MMCT は、主に付着細胞を受容細胞として行われており、浮遊細胞への適用例は限られていた。本研究では、いわば最適化以前の一般的な条件で造血細胞への HAC 移入を試みたといえる。にもかかわらず、高い効率ではないにせよ造血細胞への HAC が可能であったという結果は、今後の研究に期待を持たせるものとして評価できる。本研究の分担研究者である富塚らがエリスロポエチン HAC をヒト線維芽細胞に移入した例でも、細胞融合時の実験条件を最適化することにより移入効率が 100 倍向上することが明らかになった (Kakeda et al. *Gene Ther* 2005)。造血系細胞でも、移入効率の向上を目指して同様の条件検討を進める予定である。

E. 結論

今年度の研究により、HAC ベクター上に挿入したキメラ受容体遺伝子により、宿主細胞の分化を人工的に操作できることが明らかとなった。HAC ベクターが大容量であるという利点と体性幹細胞の多分化能とを生かして、目的の治療用遺伝子に加えて受容細胞の増殖分化を人工的に制御するようなシグナル伝達系を導入できれば、標的細胞に限局した目的遺伝子の発現制御が可能になることが示唆された。一方で更新されたヒト 21 番染色体上セントロメア近傍のマッピング情報に基づき、

転写配列を含まない第 2 世代 21HAC ベクターを構築した。HAC ベクターは微小核細胞融合法によりヒト造血系細胞に移入可能であることが明らかとなった。今後 MMCT の効率を改善することで HAC による *ex vivo* 遺伝子治療の実現が可能になることが期待される。

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。我々は昨年度までに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 Δ pqHAC）を構築し、同 HAC をマイクロセル融合法（MMCT）によりヒト正常繊維芽細胞（hPF）へ導入することに成功した。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 を産生し続けたが、ヒト正常体細胞への HAC 移入として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いえた。本年度は、取得された HAC 導入 hPF の増殖能と HAC 安定性を詳細に検討すると共に、動物モデルにおける安定性・発現性検討のため免疫不全動物への HAC 導入 hPF 移植実験に着手した。さらにこれまでの成果について記載した論文が *Gene Therapy* 誌に掲載された。

A. 研究目的

正常体細胞における HAC の mitotic stability 及び HAC 導入細胞の増殖能は、その実用化を考える上で非常に重要なポイントの一つである。一方、HAC の正常体細胞への導入が困難であったことにより、mitotic stability に関する従来の研究はガン化あるいは不死化した宿主細胞における検討がほとんどであった。我々は昨年度までに、MMCT を用いて EPO-21 Δ pqHAC を再現性良く hPF に導入することに成功したが、本年度は取得された HAC 導入 hPF を用いてその増殖能及び HAC の mitotic stability に関する検討を実施した。さらに実用化に向けた次のステップである動物モデルでの評価を実施するため、HAC 導入 hPF の免疫不全動物への移植条件検討に着手した。

B. 研究方法

非選択培養条件における HAC の安定性を評価するため、HAC 導入 hPF (HFL-1) クローンについて 6~9 回継代培養（10~14PDL: population doubling level に相当）した後 FISH 解析を行い、HAC 保持率を決定した。さらにその結果にもとづき細胞分裂 1 回あたりの脱落率を算出した。HAC 導入 hPF 移植のための免疫不全動物としては、SCID マウス系統を用いた。

C. 研究結果

4 種（A, B, C, D）の HAC 導入 HFL-1 クローンについて細胞分裂 1 回あたりの脱落率を算出したところ A:2.3%, B:0.94%, C:1.9%, D:2.2%であった。上記の継代を経た後、全てのクローンは増殖を停止したが、最も長期間継代培養可能であったクローン A は、単一コロニーから 3.8×10^7 という細胞数にまで増殖した。

SCID マウスの皮下に *in vitro* で hEPO 産生能を持つ EPO-21 Δ pqHAC 導入 hPF 移植を実施。今後経時的に血算値及び血清中 hEPO 濃度を測定し、移植細胞からの hEPO 産生について評価する予定である。

D. 考察

若干の脱落は観察されるものの、EPO-21 Δ pqHAC の HFL-1 における安定性はこれまでに作製された様々な HAC の HT1080（ヒト繊維肉腫細胞株）における脱落率（0.1%~1.7%）と比較して概ね同等であった。すなわち、HAC が正常体細胞においても安定に保持されることが初めて示された。

また、EPO-21 Δ pqHAC 導入 hPF クローンは 3.8×10^7 という細胞数まで増殖可能であった。例えば、レトロウイルスにより hEPO 遺伝子を導入したヒヒ MSC を用いた研究においては、マイクロカプセルに封入した細胞（ $0.81-6.6 \times 10^6$ cells/kg）を皮下に埋め込むことによりヘマトクリット値の上昇が観

察された。上記の結果より、HAC 導入 hPF についても、この程度の細胞数を十分確保できるであろう。もちろん成人由来の hPF の分裂寿命は今回用いた胎児由来のもの (HFL-1) よりも短いので、成人由来のフレッシュな hPF から同等の HAC 導入細胞数が確保できるかは実用化に向けた今後の重要な検討課題である。

SCID マウスへの移植実験結果については現在までに結論を得るに至っていないが、ヒト由来の hPF に対する拒絶反応 (SCID マウスにおいても異種への拒絶反応は残存している) をいかに抑えるかが重要なポイントであると考えられる。この観点から、拒絶を最小限に抑えるための TheraCyte System (polytetra fluoroethylene 膜のカプセルに細胞を詰めて移植するシステム) やより拒絶応答が軽減されている NOD-SCID マウス系統の利用についても今後検討していく予定である。

E. 結論

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 Δ pgHAC) を構築し、同 HAC をマイクロセル融合法 (MMCT) によりヒト正常繊維芽細胞 (hPF) へ導入することに成功した。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いえる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表:

・ Kakeda M, Hiratsuka M, Nagata K, Kuroiwa Y, Kakitani M, Katoh M, Oshimura M, Tomizuka K. Human artificial chromosome (HAC) vector provides long-term therapeutic transgene expression in normal human primary fibroblasts. *Gene Ther.* 2005 Mar 3 (Advanced online publication)

・「ヒト人工染色体ベクターを用いたホルモン補充療法の試み」富塚一磨、掛田実、押村光雄、*Molecular Medicine*、Vol. 42、312-318、2005、Review (和文)

2. 学会発表:

・ Application of a Novel Human Artificial Chromosome (HAC) Vector to Gene Therapy Aimed at Erythropoietin (EPO) Replacement. Kakeda M, Hiratsuka M, Nagata K, Kuroiwa Y, Katoh M, Oshimura M, Tomizuka K. 7th Annual Meeting of the American Society of Gene Therapy, June, 2004

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

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モデルの構築を試みる。HAC ベクターの有効性を検証する目的で、人工的な発現制御系である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単一部位に隣接して挿入した 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。HAC ベクターの利用により、テトラサイクリン応答性の発現を示す遺伝子導入細胞株を再現性良く取得できることが明らかとなった。

A. 研究目的

構成的発現を示す強力なプロモーターを用いて遺伝子導入を行うと、細胞の増殖に影響を及ぼして導入遺伝子の機能を評価できない場合がある。この問題点に対処する方法の1つはテトラサイクリン（Tet）を利用した遺伝子発現制御システムである。Tet 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 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できると考えられる。そこで Tet 応答性 DNA-Pkcs 遺伝子発現ユニットを構築して HAC ベクター上に挿入し、発現制御に関する性能評価を行った。

B. 研究方法

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 DNA-Pkcs cDNA を head to head に配置し、両方向性の Tet 応答性プロモーターで制御し、さらに cDNA の前にイントロン（ β -globin 由来）を配置した。

(r)tTA の両側にはインスレーター配列（トリ β -globin 遺伝子上流 HS4 領域由来）を配置した。なお十分量の transactivator の発現を確保するため、哺乳動物細胞に対して毒性の低い tTA2 を用いプロモーターは CAG を用いた。

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 21 Δ qHAC 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 RNA レベル（RT-PCR）およびタンパク質レベル（Western blot）により検索した。さらに 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。

C. 研究結果

HAC ベクターを保持する v3 細胞に DNA-Pkcs 発現カセットと Cre 発現プラスミドを co-transfection し G418 耐性株を得た。DNA-Pkcs 発現ユニットを増幅する PCR による検索から、約 60% が目的の挿入体であった。このうち 3 株について RT-PCR により検索したところ、Dox 添加に依存した発現制御が認められた。Dox 添加量を 1ng/ml から 100ng/ml まで変化させたが、RNA レベルでの発現量は用量依存性を示さなかった。また Dox 添加後の時間経過を追ったところ、RNA レベルでは 12 時間後から発現変化が認められ、タンパク質レベルでも同様の結果が得られた。

Tet 誘導系を含まない発現カセットを 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。

HAC ベクターを用いた DNA-Pkcs 遺伝子の機能発現を、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。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が示された。

D. 考察

tet 応答性プロモーターの制御下に目的の遺伝子を繋いだ発現コンストラクトと transactivator 発現プラスミドを 2 ステップで導入していた従来の Tet 誘導系と比較して、HAC ベクターを利用することでより簡便 (1 ステップ) に、なおかつ導入遺伝子の発現量および発現制御に関し再現性よく導入細胞株が得られることが明らかとなり、HAC ベクターの有効性が示された。

また従来法は導入プラスミドの宿主染色体へのランダムインテグレーションに依存しているため、受容細胞内に構築された発現制御システムを別の受容細胞に移すことは不可能である。これに対し一度 HAC ベクター上に構築された発現制御システムは、他の受容細胞に移すことが可能である。今後は本研究で構築した tet 応答性 DNA-Pkcs 遺伝子を搭載した HAC を DNA-Pkcs 遺伝子を欠損するマウス ES 細胞へ移入し、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により遺伝子治療モデル実験を進める予定である。

実験動物を用いた移植治療モデルを確立するため、HAC 構築と並行して受容細胞の樹立についても試みている。DNA-Pkcs 遺伝子を欠損した SCID マウスの交配で得られた胚盤胞からの ES 株の樹立および SCID マウス体細胞核移植による ES 株の樹立である。予備的な結果ではあるが、現時点で ES 株の樹立には至っ

ていない。今後も試行を継続し ES 株が取得できれば、当初予定していた移植モデルの検討に進みたい。

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とどまらず、DNA-Pkcs 遺伝子異常が DNA 二重鎖切断修復や発がんに果たす役割を解明する上で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。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

- Horibata K, Iwamoto Y, Kuraoka I, Jaspers NG, Kurimasa A, Oshimura M, Ichihashi M, Tanaka K. Complete absence of Cockayne syndrome group B gene product gives rise to UV-sensitive syndrome but not Cockayne syndrome. Proc Natl Acad Sci US A. ;101(43):15410-5, 2004.

- Otsuki A, Tahimic CG, Tomimatsu N, Kato M, Chen DJ, Kurimasa A, Oshimura M. Construction of a novel expression system on a human artificial chromosome. Biochem Biophys Res Commun; 329(3): 1018-1025, 2005.

2. 学会発表

- Otsuki A, Kurimasa A, Tahimic CGT, Kato M, Oshimura M. In vitro rescue of radiosensitive phenotype using a novel human artificial chromosome (HAC) vector containing DNA-PKcs gene. The American Society of Gene Therapy's 7th annual meeting, 2004, USA.

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

Cre-loxP システムを用いて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遺伝子を完全に欠失したマウスを作成した。また、ヒトジストロフィンを人工染色体 HAC-SC20 に転座させた染色体ベクターHAC-DMD をマウス個体内で発現させることに成功した。これらの結果から、ジストロフィン遺伝子を「ヒト」化した新しい DMD モデルマウスを作成するための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）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、少なくとも 7 つのプロモーターにより多数のアイソフォームが産生されていることが知られている。本研究は、染色体操作技術や発生工学技術を用いることにより、新しい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。昨年度までの研究により、1) ヒト X 染色体のジストロフィン遺伝子領域をヒト第 14 染色体に由来する人工染色体 HAC-SC20 に転座させた染色体ベクターHAC-DMD(HAC-SC20-dys, 全長約 20Mb)の作製、2)mdx マウスに由来する新規 ES 細胞株 mdxE-2 の樹立および本 ES 細胞株への HAC-DMD の導入、3)ジストロフィン遺伝子の全領域を欠失した DMD-null ES 細胞株の樹立などを行ってきた。本年度は、1) ジストロフィン遺伝子の全領域を欠失した DMD-null マウスの作成、2)このマウスに人工染色体ベクターHAC-DMD を導入することにより、ゲノムレベルでジストロフィン遺伝子だけが「ヒト」化した DMD モデルマウスの作成を最終目標に研究を行った。特に、1)2.4Mb ものジストロフィン領域を欠失させた ES 細胞がキメラ形成能を失わずに安定に培養できるのか、2)この ES 細胞から作成したマウスはどのような表現型を示すのか、また、3)ES 細胞を介してマウス個体内に導入された人工染色体 DMD-HAC がマウス個体内で安定に保持されるのか、4)DMD-HAC に転座させたヒトジストロフィン遺伝子がマウス個体内で安定に発現

されるのかについて検証した。

B. 研究方法

1) DMD-null マウスの作成

Cre-loxP システムを利用してジストロフィン遺伝子領域を欠失させた ES 細胞株は昨年度の研究ですでに樹立されていた。この ES 細胞を用いて作成したキメラマウスの生殖系列に DMD-null ES 細胞を分化させ、ジストロフィン遺伝子の欠失した雄マウス (XDMD-nullY) を得ることに成功した。DMD-null マウスでジストロフィン遺伝子全領域が欠失していることは、サザン解析、RT-PCR およびウエスタンブロッティング法により確認した。

2) DMD-null マウスの表現型の解析

DMD-null マウスの各組織の組織切片を作成し、通常の組織学的観察および抗ジストロフィン抗体を用いた免疫組織学的解析を行った。

3) ES 細胞を介した、HAC-DMD のマウス個体内への導入。

HAC-DMD を保持した CHO 細胞からコルセミドおよびサイトカラシン B 処理によりマイクロセルを作成した。このマイクロセルとマウス ES 細胞をポリエチレングリコール処理により融合させることにより、HAC-DMD を ES 細胞に導入した。ES 細胞で、HAC-DMD が保持されていることを、PCR 解析および FISH 解析で確認した。これらの ES 細胞を用いてキメラマウスを作成した。個体レベルでも、PCR 解析および FISH 解析により HAC-DMD の存在を確認した。

4) HAC-DMD の個体レベルでの発現解析

ジストロフィン遺伝子は、合計 85 個のエク