

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～16年度 総合研究報告書

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 14 年度～16 年度 総合研究報告書

主任研究者 押村 光雄

平成 17 (2005) 年 3 月

目 次

I. 総合研究報告	
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. 研究成果の刊行に関する一覧表10

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）
総合研究報告書

新規ヒト人工染色体ベクター開発と応用に関する研究

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 番染色体から長腕および短腕遠位を削除し、ヒト人工染色体（Human Artificial Chromosome）を構築した。HAC 上には目的遺伝子の受容部位として loxP 配列を配置し、Cre 酵素を利用した部位特異的組換えを用いて環状 DNA を挿入する系を確立した。21HAC ベクターは、ヒト培養細胞、マウス ES 細胞内において安定に保持され、HAC 上の挿入遺伝子（GFP）はヒト培養細胞内で安定に発現することを確認した。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 に搭載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。ヒトエリスロポエチン（hEPO）遺伝子を搭載した HAC を構築し、ヒト正常線維芽細胞への移入が可能であること、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 遺伝子治療のモデル構築のため、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 HAC を構築し、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

西川光郎 キリンビール（株）医薬探索
（平成 14 研究所 細胞再生医療グループ
～15 年度） 主任研究員

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

A. 研究目的

哺乳動物細胞に外来遺伝子を導入発現させるベクターは、生命科学基礎研究はもとよりその成果を医療、医薬品産業において実用化する上でも極めて重要なツールである。しかしこれまでの我が国におけるベクター系開発への取り組みは、欧米諸国と比較して十分とはいえず、当該分野における国際競争力の確保は今後の我が国の研究戦略上喫緊の課題である。

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。

本研究は既存の HAC の問題点を解決した新規 HAC ベクター系の構築を目的とし、遺伝子治療、再生医療への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

(鳥取大・押村)

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 配列を導入した。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、マウス細胞に移入し長期継代培養における安定性を検証した。HAC 保持マウス ES 細胞からはキメラマウスを作出し、個体レベルでの HAC 保持率を臓器毎に調べた。

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、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 (キリン・西川/ 鳥取大・井上)

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。そこではじめに 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。

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。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検索した。

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、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これらの領域を含まない第 2 世代の 21HAC 構築に着手した。

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、造血系細胞を対象とした検討を行った。先に確立した造血幹細胞の体外増幅条件を利用し、21HAC 造血系細胞に移入した。ヒト骨髓由来単核球細胞(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、骨髓への生着を検証した。

3. 付加的遺伝子治療の試み (キリン・富塚)

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。そこで 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)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 (鳥取大・栗政)

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。DNA-PKcs 遺伝子の機能解析には、人工的な発現制御が可能になることが望ましい。そこで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 に搭載することを試みた。(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。ドキシサイクリン (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 (北里大・花岡)

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(ジス)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 ベクターを利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試みた。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 (TT2-0 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 を構築し、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。

またヒト細胞を用いた治療モデルの検討に関しては、DMD 患者由来筋芽細胞への HAC-SC20-dys 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 α 、PDGF-AA、PDGF-BB、IGF-I、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。

(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。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) が担当した。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) は造血幹細胞を用いた実験を行った。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した。その他の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 ベクターの構築

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起こすニワトリ DT40 細胞を用いた。染色体移入は微小核細胞融合法により行った。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した。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た。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, サザンプロット, FISH 解析を行い目的の相同組み換え体を選別した。

2) HAC 安定性の検索

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、保持率を検討した。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、21ΔpqHAC は 75 継代まで安定に保持されたが、21ΔqHAC は継代に伴い減少していく傾向が見られた。

21ΔqHAC 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。

3) HAC ベクター上に挿入された遺伝子の発現安定性

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した。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、サザンプロット, 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した。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。

4) 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。

5) 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 分の熱処理に反応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反応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) 造血幹細胞の体外培養法の確立

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) 造血系細胞への HAC 移入

MNC に GFP-HAC を移入したところ、耐性コロニーが出現し GFP 発現が確認された。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髄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。

4) 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。

5) 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 Δ pHAC 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. 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 週間においても上清中に hEPO 産生 (数 mIU) が認められた。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

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した。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した。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。

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。筋芽細胞へのジストロフィン HAC 移入を試みているが、移入株の取得には至っていない。

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 細胞内でインタクと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、物理刺激に応答した発現制御、ならびに薬剤添加に応答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、入力刺激に応答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、

線維芽細胞および造血系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 を含む微小核細胞を効率よく分取する方法についても検討する予定である。

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。

一方患者由来の筋芽細胞初代培養は、ようやく増殖が確認できる条件を設定したが、未だ HAC 移入には至っていない。この方針で研究を進めるには、培養条件のさらなる改善が必須であると考えられる。

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 21HAC ベクターが構築できた。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) 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が可能なこと 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。またヒト正常線維芽細胞への 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の基盤技術および資材が整備できたといえる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 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, 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; [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

- 加藤基伸、綾部文明、押村光雄「新規ヒト人工染色体 (HAC) ベクターの構築」(第 26 回日本分子生物学会年会; 2003 年 12 月)
- 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: ヒト培養細胞株における安定性と遺伝子発現の検証」(第 26 回日本分子生物学会年会; 2003 年 12 月)
- 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: 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」(第 26 回日本分子生物学会年会; 2003 年 12 月)
- 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: 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」(第 26 回日本分子生物学会年会; 2003 年 12 月)
- 綾部文明、加藤基伸、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」(第 26 回日本分子生物学会年会; 2003 年 12 月)
- 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: 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」(第 26 回日本分子生物学会年会; 2003 年 12 月)
- 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: 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」(第 26 回日本分子生物学会年会; 2003 年 12 月)
- 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「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」(第 26 回日本分子生物学会年会; 2003 年 12 月)
- 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「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」(第 26 回日本分子生物学会年会; 2003 年 12 月)

- 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、黒岩義己、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

・「ヒト人工染色体 (HAC) ベクター」(特願 2002-292853、2002 年 10 月出願)

・上記出願に基づく PCT 国際出願 (PCT/JP03/12784; 指定国に日本を含む) (2003 年 10 月出願)

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
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 USA	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, <u>Oshimura M</u>	Construction of a novel expression system on a human artificial chromosome	Biochem Biophys Res Commun	329 (3)	1018-1025	2005
Kakeda M, Hiratsuka M, Nagata K, Kuroiwa Y, Kakitani M, Katoh M, <u>Oshimura M</u> , <u>Tomizuka K</u>	Human artificial chromosome (HAC) vector provides long-term therapeutic transgene expression in normal human primary fibroblasts	Gene Ther	Epub ahead of print		2005 Mar 3
Haruta M, Meguro M, Sakamoto YK, Hoshiya H, Kashiwagi A, Kaneko Y, Mitsuya K, <u>Oshimura M</u>	Narrowed abrogation of the Angelman syndrome critical interval on human chromosome 15 does not interfere with epigenotype maintenance in somatic cells	J Hum Genet	Epub ahead of print		2005 Mar 3