

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19790246  
 研究課題名（和文） ヒト人工染色体ベクターを用いた毛細血管拡張性運動失調症の新規遺伝子治療法の開発  
 研究課題名（英文） Generation of gene therapy method for ataxia-telangiectasia using a human artificial chromosome

## 研究代表者

香月康宏（KAZUKI YASUHIRO）  
 鳥取大学・大学院医学系研究科・助教  
 研究者番号：90403401

## 研究成果の概要（和文）：

毛細血管拡張性運動失調症（ataxia-telangiectasia:AT）の遺伝子治療を目指して、原因遺伝子である ATM 遺伝子ゲノム領域を染色体工学技術を用いて HAC ベクター上にクローニングすることに成功した(ATM-HAC ベクターとよぶ)。この ATM-HAC ベクターを保持する AT 患者由来の細胞株において、ATM 遺伝子の発現は修復され、非常に安定に維持され、放射線感受性が回復していることが示された。以上のことより、本研究で作製した ATM-HAC ベクターは AT の遺伝子治療に利用できることが示された。

## 研究成果の概要（英文）：

To generate gene therapy vector for ataxia telangiectasia (AT), we constructed novel human artificial chromosome (HAC) containing ATM gene, which is mutated in ataxia telangiectasia (AT) patients. The ATM-HAC were transferred into ATM-deficient cell line derived from a AT patient. The ATM-deficient phenotypes of gene regulation and radiation sensitivity were complemented by introducing the ATM-HAC. Furthermore, the ATM-HAC was stably maintained in the cell lines. Thus, the ATM-HAC vector will be useful for gene therapy of AT.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,300,000	0	1,300,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	540,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：ヒト人工染色体、遺伝子治療、染色体工学、毛細血管拡張性運動失調症

### 1. 研究開始当初の背景

毛細血管拡張性運動失調症 (Ataxia-Telangiectasia:AT) はヒト 11 番染色体上に存在する ATM 遺伝子の機能欠損により引き起こされる常染色体劣性の疾患であり、小脳失調に伴う神経変性、免疫不全や発癌感受性、放射線感受性など多彩な表現型を示す。ATM 遺伝子は全長 150kb にも及ぶ巨大な遺伝子で少なくとも 5'-UTR の異なる 12 種のスプライシングアイソフォームが報告されており、ATM 遺伝子の発現は複雑な転写調節を受けていると考えられる。上記の理由からウイルスベクターなどを用いた単一の cDNA を導入する従来法では複数のアイソフォームを同時に生理的発現制御のもとに再現できないことから AT の遺伝子治療は現時点では困難であると考えられる。また、ヒトにおいて細胞治療を行う際の最大の障壁は主要組織適合遺伝子複合体 (HLA) の違いである。一方、これまでに申請者らは巨大な遺伝子を染色体レベルで搭載可能なヒト人工染色体 (HAC) ベクターの開発および自己幹細胞同定 (作製) 技術を開発してきた。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。HAC ベクターの利点として、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)、という従来の遺伝子導入ベクターにはない多くの特徴を備えている。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は上述の問題点を解決するため 1) ヒト人工染色体 (HAC) ベクターに ATM 遺伝子全長をクローニングし治療用 ATM-HAC ベクターを作製すること、2) ATM 欠損マウスから自己の胚性幹細胞 (ntES) を核移植技術を用いて作製すること、3) 上記の自己幹細胞に ATM-HAC ベクターを導入し、造血幹細胞へ分化誘導後 ATM 欠損マウス (自己) に移植し、AT 患者の死亡原因のトップを占める造血系表現型を対象とした遺伝子治療の基盤研究を行うこと、である。

### 3. 研究の方法

ヒト 11 番染色体上に存在する ATM 遺伝子のテロメア側を人工テロメア配列移入により切断し、セントロメア側に loxP 配列を導入した。改変 11 番染色体を HAC 導入 CHO 細胞へ MMCT 法を用いて移入後、Cre を一過性に発現させることで HAC 上の loxP サイトに ATM ゲノム領域を転座クローニングした (ATM-HAC ベクターとよぶ)。なお、上記の部位特異的染色体改変は相同組み換え頻度の高いトリ DT40 細胞にヒト 11 番染色体を移入して効率的に行った。

次に作製した ATM-HAC が機能的に発現するかを確認するため ATM-HAC ベクターを毛

細血管拡張性運動失調症 (AT) 患者由来の細胞株 (ATBIVA) へに導入した。FISH 法により ATM-HAC が導入された ATBIVA 細胞株を選別し、遺伝子発現解析ならびに放射線感受性試験を行った。次に ATBIVA 細胞での ATM-HAC の安定性を検討するため、長期培養後、FISH 法にて ATM-HAC の保持率を検討した。次に、Atm 欠損マウスの尻尾培養細胞から移植技術により、ntES 細胞を作製し、分化能について検討した。ATM-HAC を上記マウス Atm 欠損 ntES 細胞に微小核細胞融合法にて導入し RT-PCR 法にて、ATM 遺伝子発現を調べた。

#### 4. 研究成果

200 kb におよぶ ATM 遺伝子ゲノム領域を染色体改変技術を利用した染色体転座型クローニング法で HAC ベクター上にクローニングすることに成功した。この ATM-HAC ベクターを保持する患者由来の細胞株 ATBIVA 細胞株において、ATM 遺伝子の発現は生理的に発現し、コントロールの ATBIVA では放射線感受性を示したのに対し、ATM-HAC を導入した ATBIVA 細胞では放射線感受性が回復していることが明らかとなった。さらに ATBIVA 細胞での ATM-HAC ベクターは非常に安定に維持されることが示された。次に Atm 欠損 ntES 細胞を作製したところ、ES 細胞様の独立した 2 ラインを樹立することに成功した。次にこの細胞が分化能を持つかを検討するため、ヌードマウスの皮下に移植して、HE 染色をすることで 3 胚葉への分化を検討したところ、いずれも 3 胚葉への分化を示すことが明らかとなった。さらに、ATM-HAC をマウス Atm 欠損 ntES 細胞に微小核細胞融合法にて導入したところ、ATM 遺伝子の存在が PCR 法により確認できた。次に上記クローンを RT-PCR 法に

て、ATM 遺伝子発現を調べたところ、ATM 遺伝子の発現が観察された。今後は、この ntES 細胞を用いて、血液系への分化を誘導し、Atm 欠損マウスへ移植することで、自己幹細胞による遺伝子治療モデル構築を目指す。以上のことより、本研究で作製した ATM-HAC ベクターは AT の遺伝子治療に利用できることが示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Kazuki Y., Hiratsuka M., Takiguchi M., Osaki M., Kajitani N., Hoshiya H., Hiramatsu K., Yoshino T., Kazuki K., Ishihara C., Takehara S., Higaki K., Nakagawa M., Takahashi K., Yamanaka S. and Oshimura M. (2010 Feb.) Complete genetic correction of iPS cells from Duchenne muscular dystrophy. *Mol. Therapy*. Volume18, number 2: 386-93.、査読有
2. 香月康宏、押村光雄：幹細胞のゲノム操作：ヒト人工染色体ベクターの開発、*ゲノム医学* Vol.9, No.3, p37-40 (2009)、査読無
3. Hoshiya H., Kazuki Y., Abe S., Takiguchi M., Kajitani N., Watanabe Y., Yoshino T., Shirayoshi Y., Higaki K., Messina G., Cossu G., Oshimura M. (2009 Feb.) A highly stable and non-integrated human artificial chromosome (HAC) containing the 2.4Mb entire human

- dystrophin gene. *Mol. Therapy*.  
Volume 17, number 2:309-17. 、査読有
4. Kai Y., Wang CC., Kishigami S., Kazuki Y., Abe S., Takiguchi M., Shirayoshi Y., Inoue T., Ito H., Wakayama T., Oshimura M. (2009 Feb) Enhanced apoptosis during early neuronal differentiation in mouse ES cells with autosomal imbalance. *Cell Res.* Volume 19, number 2:247-58. 、査読有
  5. Shitara S, Kakeda M, Nagata K, Hiratsuka M, Sano A, Osawa K, Okazaki A, Katoh M, Kazuki Y., Oshimura M, Tomizuka K. (2008 May) Telomerase-mediated life-span extension of human primary fibroblasts by human artificial chromosome (HAC) vector. *Biochem Biophys Res Commun.* Volume 369, number 3:807-11. 、査読有
  6. Kazuki Y., Hoshiy H, Kai Y, Abe S, Takiguch M, Osaki M, Kawazoe S, Katoh M, Kanatsu-Shinohara M, Inoue K, Kajitani N, Yoshino T, Shirayoshi S, Ogura A, Shinohara T, Barrett JC, Oshimura M. (2008 Apr.) Correction of a genetic defect in multipotent germline stem cells using a human artificial chromosome. *Gene therapy* Volume 15, number 8:617-24、査読有
1. 香月康宏、小林カオル、千葉 寛、押村光雄(平成 21 年 5 月埼玉) ヒト型 P450 薬物代謝酵素発現マウス、第 56 回日本実験動物学会総会
  2. Kazuki Y., Hoshiya H., Abe S., Takiguchi M., Iida Y., Watanabe Y., Osaki M., Katoh M., Kajitani N., Yoshino T., Shirayoshi Y., Hiratsuka M., Kurimasa K., and Oshimura M., A novel human artificial chromosome (HAC) for gene therapy and animal transgenesis (2008 May U.S.A.) ASGT 11<sup>th</sup> annual meeting
  3. 香月康宏、押村光雄(平成 21 年 3 月京都) 染色体工学技術を用いたヒト型モデル動物の作製と応用、第 129 回日本薬物学会年会
  4. Kazuki Y., Hoshiya, H., Kai Y., Abe S., Takiguchi M., Osaki M., Yuichi I., Mizutani E., Kajitani N., Yoshino T., Shirayoshi Y., Tomimatsu N., Hratsuka M., Kurimasa A., Wakayama T. and Oshimura, M., Genetic restoration of ataxia telangiectasia cells using a human artificial chromosome mediated-genomic cloning system (2007 May U.S.A.) ASGT 10<sup>th</sup> annual meeting
  5. 香月康宏, 星谷英寿, 甲斐義輝, 阿部智志, 滝口正人, 飯田雄一, 渡辺義徳, 尾崎克彦, 梶谷尚世, 吉野とう子, 白吉安昭, 富松望, 平塚正治, 栗政明弘, 押村光雄(平成 20 年 3 月名古屋) 遺伝子治療に向けた新規遺伝子治療用ヒト人工染色体ベクターの開発、第 7 回日本再生医療学会総会

[学会発表] (計 5 件)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：ヒト人工染色体（HAC）ベクター及びヒト人工染色体（HAC）を有するヒト細胞医薬

発明者：掛田実、富塚一磨、押村光雄、香月康宏

権利者：キリンファーマ株式会社

種類：PCT

番号：PCT/JP2007/063944

出願年月日：2007 年 7 月 6 日

国内外の別：外国

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

香月 康宏 (KAZUKI YASUHIRO)

鳥取大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90403401