

研究種目： 基盤研究 (B)
 研究期間： 2006～2008
 課題番号： 18390107
 研究課題名 (和文) デュシャンヌ型筋ジストロフィー遺伝子治療を目指したヒト人工染色体ベクターの作製
 研究課題名 (英文) Construction of human artificial chromosome for gene therapy of Duchenne muscular dystrophy

研究代表者 押村 光雄 (OSHIMURA MITSUO)
 鳥取大学・大学院医学系研究科・教授
 研究者番号： 20111619

研究成果の概要：

デュシャンヌ型筋ジストロフィー (DMD) の遺伝子治療を目指して、2.4Mb におよぶジストロフィン (DMD) 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 (DYS-HAC ベクターとよぶ)。この DYS-HAC ベクターを保持するキメラマウスにおいて、DMD 遺伝子の発現は組織特異的かつ筋肉の細胞膜周辺に発現することが示された。さらにヒト細胞での DYS-HAC ベクターは非常に安定に維持されることが示された。以上のことより、本研究で作製した DYS-HAC ベクターは DMD の遺伝子治療に利用できることが示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2007 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
2008 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	11,000,000	3,300,000	14,300,000

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：遺伝子治療、染色体工学

1. 研究開始当初の背景

デュシャンヌ型筋ジストロフィー (DMD) はヒト X 番染色体上に存在する DMD 遺伝子の機能欠損により引き起こされる進行性筋萎縮症である。DMD 遺伝子は全長 2.4Mb にも及ぶ巨大な遺伝子で少なくとも 7 つのプロモーターに制御され、18 種のスプライシン

グアイソフォームが報告されており、複雑な転写調節を受けていると考えられる。1) 2.4Mb の巨大遺伝子を導入するベクターが存在しないこと、2) 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 DMD

の完全な遺伝子治療は現時点では不可能である。また、ヒトにおいてドナー細胞を移植する際の最大の障壁は主要組織適合遺伝子複合体 (HLA) の違いであることから、自己の幹細胞を用いた ex vivo 細胞遺伝子治療が最善の治療策と考えられる。

2. 研究の目的

これまでに我々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) ベクターの開発を行ってきた。本研究の目的は上述の背景で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 DMD 遺伝子全長をクローニングし治療用 DYS-HAC ベクターを作製すること、2) DYS-HAC ベクターを保持するキメラマウスを作製し、組織特異的かつ機能的発現を確認すること、3) ヒト間葉系幹細胞に導入し、安定性を検討し、DYS-HAC ベクターが筋ジストロフィーの遺伝子治療用ベクターとしての有用性を示すことである。

3. 研究の方法

ヒト X 染色体上に存在する DMD 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 X 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 DMD ゲノム領域を転座クローニングした (DYS-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 X 染色体を移入して効率的に行った。

次に作製した DYS-HAC が機能的に発現するかを確認するためマウス ES 細胞に導入した。FISH 法により DYS-HAC が導入されたマウス ES 細胞株を選別し、その ES 細胞を 8

細胞期胚にインジェクション後、仮親に移植することでキメラマウスを作製した。このマウスを用いて各種組織において DMD 遺伝子の組織特異的スプライシングバリエントがヒトと同様に発現しているかを RT-PCR 法を用いて解析した。また、筋肉において細胞膜周辺にジストロフィン遺伝子が発現するかを確認するために免疫蛍光染色を行った。

次にヒト間葉系幹細胞での安定性を検討するため、MMCT 法を用いて DYS-HAC を導入した。長期培養後、FISH 法にて DYS-HAC の保持率を検討した。

4. 研究成果

2.4Mb におよぶジストロフィン (DMD) 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 DYS-HAC ベクターを保持するキメラマウスにおいて、DMD 遺伝子の発現は組織特異的かつ筋肉の細胞膜周辺に発現することが示された。さらにヒト細胞での DYS-HAC ベクターは非常に安定に維持されることが示された。以上のことより、本研究で作製した DYS-HAC ベクターは DMD 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 5 件)

1. Oshimura M., Katoh M.: Transfer human artificial chromosome vectors into stem cells. *Reproductive BioMedicine Online*. Vol. 16 No. 1, 57-69, 2008
2. Kazuki Y., Hoshiya H., Kai Y., Abe S.,

- Takiguchi M., Osaki M., Kawazoe S., Katoh M., Kanatsu-Shinohara M., Inoue K., Kajitani N., Yoshino N., Shirayoshi Y., Ogura A., Shinohara T., Barrett JC., Oshimura M.: Correction of a genetic defect in multipotent Germline stem cells using a human artificial chromosome. *Gene Therapy*. 15:617-24, 2008.
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.,: A highly stable and non-integrated human artificial chromosome (HAC) containing the 2.4Mb entire human dystrophin gene. *Mol. Therapy*. 2008
 4. Shitara S, Kakeda M, Nagata K, Hiratsuka M, Sano A, Osawa K, Okazaki A, Katoh M, Kazuki Y., Oshimura M, Tomizuka K. :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. 2008
 5. Ren X, Tahimic CG, Katoh M., Kurimasa A, Inoue T, Oshimura M.: Human artificial chromosome vectors meet stem cells: new prospects for gene delivery. *Stem Cell Rev*. 2:43-50, 2006
- [学会発表] (計 7件)
1. 掛田 実、永田恵子、佐野暁子、大澤加奈子、岡崎晃代、設楽真吾、香月康宏、押村光雄、富塚一磨 (平成 20 年 5 月東京) 新規ヒト人工染色体ベクターの構築: サブテロメアを用いた高発現ベクター系、第 6 回幹細胞シンポジウム
 2. Hoshiya H., Kazuki Y., Abe S., Kai Y., Takiguchi M., Iida Y., Watanabe Y., Osaki M., Kajitani N., Yoshino T., Shirayoshi Y. and Oshimura M., A human artificial chromosome (HAC) vector with about 2.4 Mb-human Dystrophin genome including native expression control elements (2008 May U.S.A.) ASGT 11th annual meeting
 3. 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 11th annual meeting
 4. 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
 5. 阿部智志、香月康宏、星谷英寿、甲斐義輝、滝口正人、尾崎克彦、川添真史郎、加藤基伸、篠原美都、井上貴美子、梶谷尚世、吉野とう子、白吉安昭、小倉淳郎、篠原隆司、押村光雄 (平成 20 年 3 月名古屋) 多能性精原幹細胞 (mGS) とヒト人工染色体ベクターを用いた欠損型遺伝子治療を目指して、第 7 回日本再生医療学会総会
 6. 星谷英寿、香月康宏、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, 押村光雄 (平成 20 年 3 月名古屋) 全長ジストロフィンゲノム DNA (2.5Mb) を搭載した HAC ベクター: 遺伝子治療を目指して、第 7 回日本再生医療学会総会
 7. Kazuki Y., Hoshiya, H., Kai Y., Abe S., Takiguchi M., Osaki M., Kanatsu-Shinohara M., Kajitani N., Shirayoshi Y., Hiratsuka M., Ogura A., Shinohara T. and Oshimura, M., Functional restoration of a genetic defect in

multipotent germline stem cells by human artificial chromosome containing a genomic insert (2006 May U.S.A.) ASGT 9th annual meeting

〔図書〕(計 3 件)

1. 香月康宏、押村光雄：幹細胞とヒト人工染色体ベクターの出会い、アニテックス Vol.19, No.1, p41-46 (2007)
2. 香月康宏、押村光雄 (2006 年 7 月) ヒト人工染色体ベクター導入と遺伝子・再生医療への可能性、分子呼吸器病、vol.10, No4, p316-318
3. 平塚正治、押村光雄：再生医療 11 Vol.5 No.4, 72-77, 2006

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

1.

産業財産権の名称：

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

産業財産権の種類、番号：特許権、PCT/JP2007/063944

出願年月日：2007 年 7 月 6 日 (外国)

2.

産業財産権の名称：

内在遺伝子を含まないヒト人工染色体ベクター

発明者：押村光雄、香月康宏、松岡隆之

産業財産権の種類、番号：特許権、特願 2006-127372

出願年月日：2006 年 5 月 2 日 (国内)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

押村 光雄 (OSHIMURA MITSUO)

鳥取大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：20111619

(2) 研究分担者

加藤 基伸 (KATO MOTONOBU)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：00273904

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

(3) 連携研究者

なし