

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21249022

研究課題名（和文） 自己由来幹細胞とヒト人工染色体ベクターを用いた筋ジストロフィー遺伝子治療

研究課題名（英文） Gene therapy of Duchenne muscular dystrophy using own stem cells and human artificial chromosome

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（和文）：

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遺伝子ゲノム領域を搭載したヒト人工染色体ベクター(DYS-HAC)により、DMDモデル(mdx)マウス由来の中胚葉性血管芽細胞に遺伝子修復を施し、モデルマウスに移植することで、長期間、運動機能を改善させることに成功した。以上より、DYS-HACベクターと中胚葉性血管芽細胞により、DMDの遺伝子治療に利用できる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

Toward gene therapy of Duchenne muscular dystrophy (DMD), we transferred the human artificial chromosome with 2.4 Mb genomic dystrophin gene (DYS-HAC) to the DMD mouse model (mdx)-derived mesoangioblasts, then the corrected mesoangioblasts were transplanted to mdx-mice. As a result, we succeeded in the long term-amelioration of the dystrophic phenotype in the mdx mice. Thus, a combination of HAC-mediated gene replacement and transplantation with mesoangioblasts will be useful for gene therapy of DMD.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	12,700,000	3,810,000	16,510,000
2010年度	11,500,000	3,450,000	14,950,000
2011年度	11,500,000	3,450,000	14,950,000
年度			
年度			
総計	35,700,000	10,710,000	46,410,000

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：遺伝子治療学、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法は存在しないのが現状である。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。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。さらに、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することで治療用 DYS-HAC ベクターを作製し、この DYS-HAC ベクターがヒト細胞で安定に維持されること、マウス個体内で機能的な DMD 遺伝子の発現が制御されていることを示し、本研究の基盤研究を行ってきた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は上述の問題点を解決し、これまで作製した DYS-HAC ベクターを、DMD 患者の治療に対応できるレベルに到達させることである。具体的には、筋ジストロフィーモデルマウス (mdx) 由来の自己由来幹細胞である中胚葉系血管芽細胞 (Mesosngioblast) と DYS-HAC ベクターを用いて、以下の方法にあげる基盤研究を実施することで、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有用であるかを検討するこ

とである。

## 3. 研究の方法

以下の 5 つのステップで本研究を実施した。

1) これまでに作製した治療用 DMD-HAC ベクターを mdx-マウス由来中胚葉系血管芽細胞 (Mesosngioblast) に導入した。2) 治療用 DYS-HAC ベクター導入済み mdx-Mesosngioblast へ MyoD 遺伝子および LacZ 遺伝子を導入し、in vitro で分化誘導させることで機能的発現を in vitro で確認した。3) 上記細胞を mdx-nude マウスに移植することで治療効果が得られるかを検討した。4) 改良型の DYS-HAC ベクターを構築した。5) 筋ジストロフィー患者由来 Mesosngioblast へ改良型の DYS-HAC ベクターを導入した。

## 4. 研究成果

筋ジストロフィーのモデルマウスである mdx マウスから、mesoangioblast 細胞を樹立し、これまでに構築・精製した DYS-HAC を微小核細胞融合法にて導入した。GFP 陽性コロニーを 29 クローンピックアップし、そのうち 24 クローンでシングルセル由来の増殖を確認した。それらの 24 クローンについて、PCR 法にて、DMD ならびに HAC 上のプライマーを用いてゲノムの存在を確認した結果、13 クローンで DYS-HAC 全長が存在することが明らかとなった。次に、それらのうちの 8 クローンについて、FISH 解析を行った結果、6 クローンについて、DYS-HAC が宿主染色体とは独立に保持されていることが確認された。

次に in vivo で DYS-HAC ベクター導入筋肉細胞を標識すること、ならびに筋分化を誘導するため、核移行 LacZ 遺伝子ならびに MyoD 遺伝子を mdx-mesoangioblast (DYS-HAC) 細胞に導入し

た。これらの細胞をクローン化し、増殖能、分化能を *in vitro* において解析し、*in vivo* 実験に利用できる細胞を 2 クローン選別した。これらの細胞を用いて、mdx-ヌードマウスの静脈内に移植し、免疫染色、ウェスタンブロット解析、RT-PCR 解析を行った結果、mdx-mesoangioblast (DYS-HAC) 由来の細胞が筋肉において生着し、ヒトジストロフィンタンパク質が検出された。さらに、上記細胞を mdx-ヌードマウスの動脈内に注射し、*in vivo* での性能評価を行動解析などにより実施した。その結果、6 ヶ月以上長期に上記細胞は生着し、さらに行動解析試験で mdx マウスと比較して優位に機能が回復していることが示された。以上のことから、mesoangioblast 細胞と DYD-HAC ベクターを用いた治療戦略の有用性が示された。

一方で、これまでに作製した DYD-HAC ベクター上には免疫原性となる可能性がある MC1-TK 遺伝子と CAG-GFP 遺伝子が搭載されていたので、それらを除去するために DT40 細胞内で相同組換えにより FRT で挟まれた neo 遺伝子を置換することで、上記遺伝子を除去することに成功した (DMD-HAC2 と呼ぶ)。さらに上記で作製した DMD-HAC2 ベクターを筋ジストロフィー由来の mesoangioblast 細胞に微小核細胞融合法にて導入し、1 クローン獲得された。今後は mdx マウス由来 mesoangioblast 細胞での実験を筋ジストロフィー患者由来 mesoangioblast 細胞で再現する予定である。

#### 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 8 件)

- ① Kazuki Y, Oshimura M. (2011 Sep) Human Artificial Chromosomes for Gene Delivery and the Development of Animal

Models. Mol Ther. Volume 19, number 9 :1591-601. doi: 10.1038/mt.2011.136. 、  
査読有

- ② Tedesco FS, Hoshiya H, D'Antona G, Gerli MF, Messina G, Antonini S, Tonlorenzi R, Benedetti S, Berghella L, Torrente Y, Kazuki Y, Bottinelli R, Oshimura M, Cossu G. (2011 Aug) Stem cell-mediated transfer of a human artificial chromosome ameliorates muscular dystrophy. Sci Transl Med. Volume 3, number 96 :96ra78. DOI: 10.1126/scitranslmed.3002342、査読有
- ③ 香月康宏、押村光雄：ヒト人工染色体ベクターによる遺伝子細胞治療へ向けて、日本臨床、Vol. 69, No. 12, p 2142-7 (2011)、  
査読無
- ④ 山口繁幸、大林徹也、香月康宏、押村光雄：ヒト人工染色体ベクターの利点とその応用、生化学、Vol. 82, No. 9, p846-852 (2010) 、査読無
- ⑤ Kazuki Y, Hoshiya H, Takiguchi M, Abe S, Iida Y, Osaki M, Katoh M, Hiratsuka M, Shirayoshi Y, Hiramatsu K, Ueno E, Kajitani N, Yoshino T, Kazuki K, Ishihara C, Takehara S, Tsuji S, Ejima F, Toyoda A, Sakaki Y, Larionov V, Kouprina N and Oshimura M (2010 Nov) Refined human artificial chromosome vectors for gene therapy and animal transgenesis. Gene therapy. Volume 18, number 4: 384-93. doi: [10.1038/gt.2010.147](https://doi.org/10.1038/gt.2010.147)、査読有
- ⑥ 香月康宏、押村光雄：筋ジストロフィー患者由来の iPS 細胞における遺伝子修復へヒト人工染色体ベクターによる新たな遺伝子治療戦略の可能性、Medical Bio Vol. 7, No. 2, p58-63 (2010) 、査読無
- ⑦ 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. doi: [10.1038/mt.2009.274](https://doi.org/10.1038/mt.2009.274)、査読有

- ⑧ 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

[学会発表] (計 10 件)

- ① 押村光雄 (2012 年 2 月 2 日) 遺伝子発現ベクターとしての人工染色体、文部科学省「再生医療の実現化プロジェクト」ヒト多能性幹細胞の培養・解析の標準化レクチャーシリーズ第 6 回「幹細胞の遺伝子操作の実践 (つば)」(招待講演)、理化学研究所 (兵庫県)
- ② Oshimura M (2012 年 1 月 9 日) Human artificial chromosomes for gene delivery and stable expression、11<sup>th</sup> Annual PEP TALK、San Diego (California)
- ③ Kazuki Y (2011 年 12 月 13 日) Novel human artificial chromosome vector for gene delivery、第 34 回分生生物学会年会、パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ④ 押村光雄 (2011 年 11 月 19 日) ヒト人工染色体を用いた遺伝子・再生医療への挑戦、文部科学省 iPS 細胞等研究ネットワーク第 3 回合同シンポジウム (招待講演)、国立京都国際会館 (京都府)
- ⑤ Oshimura M (2011 年 10 月 3 日) Human artificial chromosomes for gene delivery、World stem cell summit、

Pasadena (California)

- ⑥ 香月康宏 (2011 年 3 月 2 日) 遺伝子再生医療・ヒト型モデル動物作製のためのヒト人工染色体ベクター (HAC) システムの開発、第 10 回日本再生医療学会総会、京王プラザホテル (東京)
- ⑦ 押村光雄 (2010 年 10 月 12 日) Human artificial chromosome and its medical and pharmaceutical applications、The 4<sup>th</sup> Asian Chromosome Colloquium (ACC4) Plenary Lectures、Fragrant Hill Empark Hotel (北京・中国)
- ⑧ 押村光雄 (2010 年 5 月 12 日) 人工染色体を用いた遺伝子/再生医療、第 180 回川崎医学会講演会 (招待講演)、川崎医科大学 (倉敷)
- ⑨ 香月康宏 (2010 年 3 月 18 日) ジストロフィン 2.4Mb 搭載ヒト人工染色体による筋ジストロフィー由来 iPS 細胞の遺伝子完全修復、第 9 回日本再生医療学会総会、広島
- ⑩ Kazuki Y (2009 年 10 月 21 日) Correction of Duchenne muscular dystrophy in induced pluripotent stem cells using a human artificial chromosome、ASHG 59<sup>th</sup> annual meeting、USA、ハワイ

[その他]

- ・ 鳥取大学ホームページ (<http://www.tottori-u.ac.jp/dd.aspx?itemid=7273#moduleid10>)
- ・ 毎日新聞：筋ジス遺伝子治療へ前進。2011 年 8 月 20 日
- ・ 読売新聞：科学 Monday 筋ジス進行押さえた。2011 年 10 月 31 日

## 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

尾崎 充彦 (OSAKI MITSUHIKO)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：40325006

(3)研究分担者

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

(H23: 連携研究者)