

平成21年 2月

星谷英寿 学位論文審査要旨

主 査 佐 藤 建 三
副主査 押 村 光 雄
同 二 宮 治 明

主論文

A highly stable and nonintegrated human artificial chromosome (HAC) containing the 2.4Mb entire human dystrophin gene

(2.4Mbの全長ヒトジストロフィン遺伝子を搭載した非常に安定で非挿入性のヒト人工染色体ベクター)

(著者：星谷英寿、香月康弘、阿部智志、滝口正人、梶谷尚世、渡邊芳徳、吉野とう子、白吉安昭、檜垣克美、Graziella Messina、Giulio Cossu、押村光雄)

平成21年 Molecular Therapy 掲載予定

学 位 論 文 要 旨

A highly stable and nonintegrated human artificial chromosome (HAC) containing the 2.4Mb entire human dystrophin gene

(2.4Mbの全長ヒトジストロフィン遺伝子を搭載した非常に安定で非挿入性のヒト人工染色体ベクター)

はじめに

デュシャンヌ型筋ジストロフィー (DMD) はヒトX染色体上に存在するジストロフィン遺伝子の機能欠損により引き起こされる。DMDの発生率は、新生男児3500人に1人であり、骨格筋障害、神経系障害を生じ、呼吸障害や心障害による早期死亡を見る疾患として特徴づけられる。ジストロフィン遺伝子は、少なくとも7つのプロモーター及び選択的スプライシングにより組織ごとに異なる多数のアイソフォームを産生することが報告されており、複雑な転写調節を受けている。既存のベクターでの遺伝子治療は強制発現システムである為、多数のアイソフォームや組織特異性、発現量、発現時期などのジストロフィンの生理的な発現を再現することはできなかった。また、2.4Mbと遺伝子のサイズが巨大なため、全ての発現調節領域を含む全長ジストロフィンゲノムを搭載した非挿入型ベクターは存在しなかった。その為DMDの完全な遺伝子治療は現行ではできていない。ヒト人工染色体 (HAC) ベクターは、利点として1) 宿主染色体に挿入されず独立したミニ染色体として維持される (宿主遺伝子の変異による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、発現消失が少ない)、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エレメント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優れた特徴を備えている。そこで、本研究ではジストロフィン遺伝子2.4MbをもつHACベクターを構築し、DMDの遺伝子治療の可能性を検討した。

方 法

相同組み換え用ベクターを分子生物学的手法により作製した。作製したプラスミドベクターを使用し、相同組み換え頻度の高いトリDT40細胞内で相同組み換え法によりX染色体を改変した。その後、微小核細胞融合法、Cre/loxPシステムによる染色体転座によりジストロフィン遺伝子をHACベクターに導入し、2.4Mbのジストロフィン遺伝子全長を搭載したHACベクター (DYS-HAC) を構築した。作製した各ステップの改変染色体を保持するクローン細胞についてはPCR解析と蛍光インサイツハイブリダイゼーション (FISH) 解析により確認した。構築したDYS-HACをマウス胚性幹細胞 (ES細胞) に微小核細胞融合法により移入し、インジェクション法によりキメラマウスを作製した。このマウスを用いて蛍光顕微鏡下でのGFPの観察、RT-PCR法、および免疫組織化学染色を行った。また、DYS-HACを微小核細胞融合法によりヒト不死化間葉系幹細胞 (hiMSCs) に移入し長期培養後、染色体解析、蛍光顕微鏡下でのGFP観察を行った。

結 果

2.4Mbのジストロフィン遺伝子を搭載したHACベクター、DYS-HACを作製することに成功した。作製した各ステップの改変染色体を保持するクローン細胞についてはPCR解析とFISH解析により確認した。loxPサイトが挿入され、テロメア側の不要な遺伝子が削除されたX染色体を保持したDT40細胞を4クローン得た。改変したX染色体とHACベクターを保持したCHO細胞を微小核細胞融合法により9クローン得た。転座クローニング法により、DYS-HACを保持するCHO細胞を11クローン得た。DYS-HACを保持したマウスES細胞を7クローン得た後、3ラインのキメラマウスを作製した。キメラマウスの各組織においてヒトジストロフィン遺伝子のアイソフォームがヒトと同様に発現しているかをRT-PCR法で確認した結果、ヒトと同様に、ヒトジストロフィンアイソフォームDp427M、Dp427Iは心臓、骨格筋、子宮で、Dp140は脳で特異的に発現していることが確認された。また、ヒトジストロフィン特異的な抗体で免疫組織化学染色を行った結果、骨格筋繊維の内部表面にヒトジストロフィンが局在していることを確認した。次に、ヒト細胞内でDYS-HACが安定に維持されるかを検討するために、DYS-HACを保持したhiMSCsを2クローン作製した。選択薬剤なしの長期培養後、染色体解析と蛍光顕微鏡下においてGFPの観察を行うことでDYS-HACの保持率を調べた。その結果、100PDLにおいてもほぼ100%の割合でDYS-HACは独立したミニ染色体として保持されていること、またDYS-HAC上のGFP遺伝子が恒常的に発現していることが確認された。以上のことからDYS-HACは、ヒトへの治療に使用可能なベクターであることが示唆された。

考 察

著者らが作製したDYS-HACは、1) 全てのアイソフォームを作製することが可能なこと、2) 発現量や発現時期など生来のジストロフィンの様式を再現可能なことから、心筋や神経系などの全身の症状を治す可能性を秘めている。また、治療を目的とするだけでなく、今後DYS-HACを用いてヒト型ジストロフィンマウスを作製することで、ヒトジストロフィン遺伝子の機能解析のツールになることも期待できる。今後、「患者由来の幹細胞にDYS-HACを導入することでジストロフィン遺伝子を回復させ、移植する」というコンセプトのもと、遺伝子・細胞治療を目指していく。

結 論

従来不可能であった「発現調節領域を含むジストロフィン遺伝子全長を搭載した非挿入型ベクター」であるDYS-HACを作製した。作製したジストロフィンはヒトとマウスにおいて長期間、安定に維持されることがわかった。また、DYS-HACは生理的なヒトジストロフィンの発現を再現することができた。これは新たな筋ジストロフィーの遺伝子・細胞治療に向けた第一歩と言える。