

＜シンポジウム (2)—9—3＞神経疾患 iPS 細胞の現状と展望

ヒト人工染色体をもちいたデュシャンヌ型筋ジストロフィー 遺伝子治療への挑戦

押村 光雄 香月 康宏 宇野 愛海

(臨床神経 2012;52:1139-1142)

Key words : デュシャンヌ型筋ジストロフィー, iPS細胞, ヒト人工染色体, 中胚葉性血管芽細胞, 遺伝子治療

特定の転写因子を体細胞へ導入することにより, ES 細胞と同等の分化能を有する iPS 細胞が皮膚などの分化した体細胞から誘導できることがマウスおよびヒトにおいて相次いで報告された¹⁾²⁾. この技術を用いれば, 自己の線維芽細胞, もしくは同じタイプの主要組織適合遺伝子複合体 (HLA) を持つドナー由来の線維芽細胞から, 拒絶反応を回避できる治療用の iPS 細胞を作製できる. しかしながら, iPS 細胞による安全な医療への基盤技術の構築のためには, 以下の条件が求められる.

- 1) ホストゲノムへの外来遺伝子の挿入がない遺伝子導入
- 2) iPS 細胞の効率的誘導・純化
- 3) 特定分化細胞への効率的分化・純化
- 4) 未分化細胞の除去
- 5) 腫瘍形成時の安全対策

上記のステップにおいて近年開発されたヒト人工染色体 (HAC : human artificial chromosome) ベクターを, 遺伝子・細胞治療へ利用できると期待される³⁾⁴⁾. HAC 技術の概要と iPS 細胞や中胚葉系血管芽細胞などの幹細胞を利用したデュシャンヌ型筋ジストロフィー遺伝子細胞治療に向けた基盤研究を例に, HAC 技術の遺伝子・細胞治療への利用の可能性について紹介する.

デュシャンヌ型筋ジストロフィー (Duchenne muscular dystrophy, 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⁵⁾. DMD に対する治療研究として, 遺伝子治療, 薬物治療, 細胞移植治療などがあるが, いずれの場合も副作用や拒絶反応などの課題が残されており, すべての患者に適応できる治療戦略は開発途上である. 特に, DMD 遺伝子は全長 2.4Mb にもおよぶ巨大な遺伝子で, 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. 1) 2.4Mb の巨大遺伝子を導入するベクターが存在しない, (2) 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, (3) ジストロフィン遺伝子の欠損領域が巨大なばあい, 相同組換えやアンチセンスオリゴなどでのゲノムレベルでの遺伝子修復は困難である, など従来

型ベクターや技術では解決できない課題がある.

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 iPS 細胞などの幹細胞をもちいた *ex vivo* 細胞遺伝子治療がこれまでの治療方法に代わる新たな治療策と期待されている.

近年, 筆者らのグループにより作製されたヒト人工染色体 (HAC) ベクターはトップダウン法により正常ヒト 21 番染色体の長腕, 短腕のすべての遺伝子領域が削除され, クローニングサイトである loxP サイトが導入されている³⁾ (Fig. 1b, c). HAC ベクターの利点は, (1) ウィルスベクターのように宿主染色体に挿入されず, 独立して維持されるため, 宿主遺伝子を破壊しない, (2) 一定のコピー数で安定に保持され, 宿主細胞の生理的発現制御を受けるため, 過剰発現や発現消失がおきない, (3) 導入可能な DNA サイズに制約がないため, 発現調節領域をふくむ遺伝子や複数遺伝子/アイソフォームの導入が可能となる. 上述の HAC ベクターの利点を活かして, エクソン 4 から 43 の巨大領域に欠損がある DMD 患者由来線維芽細胞にヒトジストロフィン遺伝子のゲノム全長 2.4Mb を搭載した HAC ベクターを導入することで, 内在ゲノムを傷つけることなく, その原因遺伝子が完全に修復された (Fig. 2a)⁶⁾. さらに, その細胞から iPS 細胞誘導後, iPS 細胞由来の筋肉細胞においてジストロフィン遺伝子の発現が観察された. 上記研究では奇形腫作製によって, 筋肉細胞を作製したが, 実際の遺伝子・細胞治療の際には, 遺伝子修復した患者由来 iPS 細胞を *in vitro* で筋肉細胞あるいは筋肉前駆細胞に分化誘導して, 移植治療に用いる必要がある. その方法はすでに世界の研究者がヒト ES 細胞やマウス ES 細胞を用いて成功している⁷⁾⁸⁾. 今回の遺伝子修復方法と分化誘導方法を組み合わせ, さらにその安全性を確認することによって, 遺伝子・細胞治療の可能性が広がるものと考えられる. 最近, イタリアの研究チームとの共同研究によって, デュシャンヌ型筋ジストロフィーのモデルマウスを用い, 細胞に遺伝子治療を施し体内にもどすことで運動機能を回復させることに成功した⁹⁾. すなわち, 遺伝子操作でジストロフィン遺伝子の異常を持つマウスから筋肉の基になる中胚葉性血管芽細胞を採取

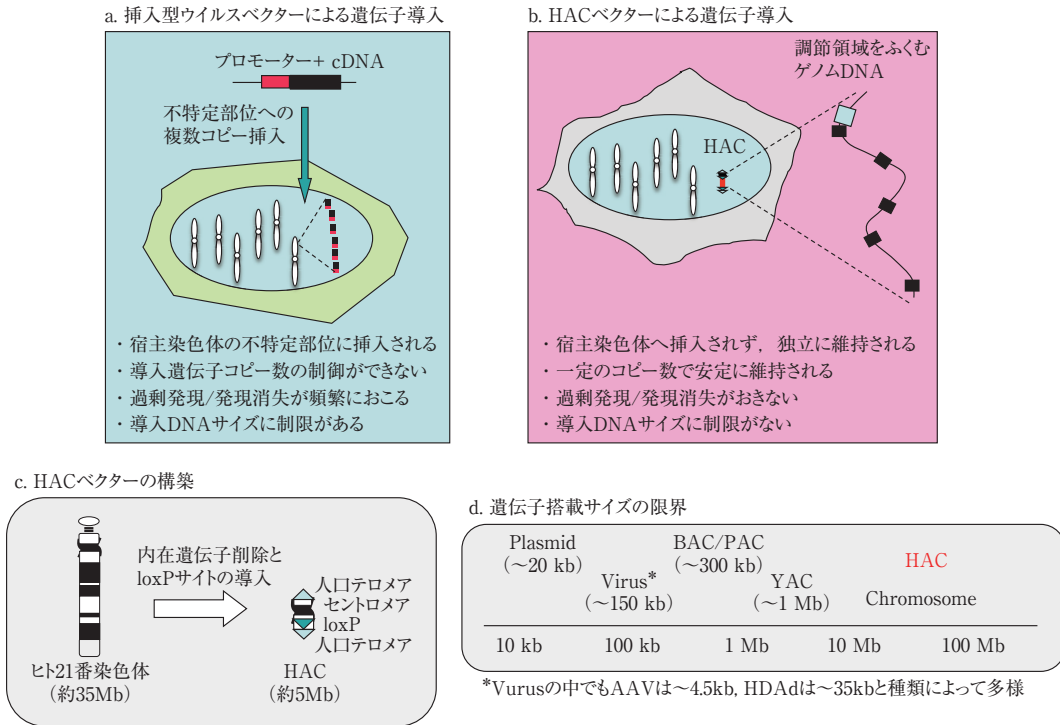


Fig. 1 HAC ベクターの特徴.

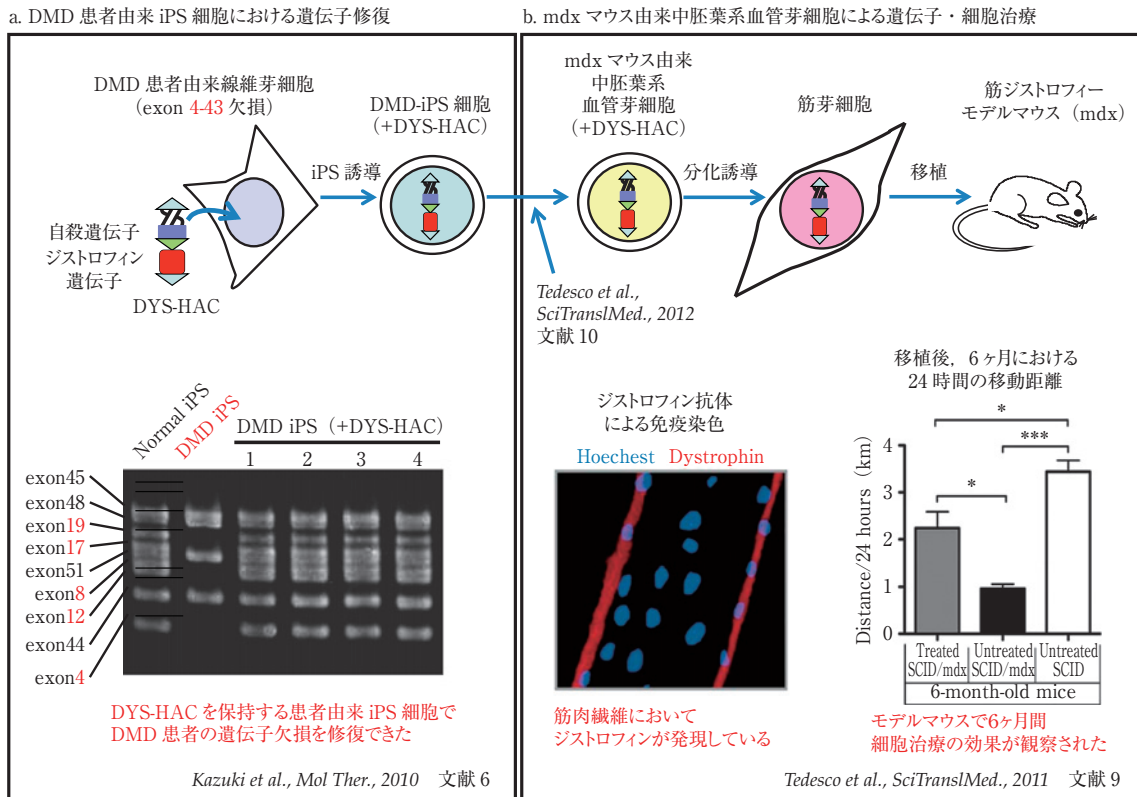


Fig. 2 HAC ベクターを用いた筋ジストロフィー (DMD) の遺伝子治療法の概略^{6) 9) 10)}.

- DMD 患者由来 iPS 細胞における遺伝子修復
- mdx マウス由来中胚葉系血管芽細胞による遺伝子・細胞治療

し、ヒトの正常な遺伝子をもたせたヒト人工染色体を培養細胞内に導入した。この幹細胞を増やしてマウスの動脈に注入すると、運動能力が改善、寿命の7割以上の期間、効果が続いた。このように、国際的共同研究によって、人工染色体工学をもちいた様々な遺伝子疾患の遺伝子・再生医療に向けて挑戦をしている。さらに、同グループによりヒトiPS細胞から中胚葉系血管芽細胞への効率的分化誘導技術が確立された¹⁰⁾。上述の遺伝子修復済みDMD-iPS細胞にその技術を適応してモデル動物で治療効果と安全性が証明されれば、DMD患者への治療研究が可能になるものと考えられる。

以上のように、HACベクターをもちいた遺伝子導入技術は、従来のベクター系や相同組換え技術では完全に治療できなかった巨大遺伝子原因疾患や遺伝子変異部位未知の疾患の遺伝子・細胞治療の試みにも応用可能である。HACベクターの受容細胞への導入効力の向上と安全性を確認し、また、HACベクターの利点を活かして、がんの発症を防ぐシステムの構築等が、新しい治療法の実現に向けた課題であり、現在その実現に向け開発中である。

※本論文に関連し、開示すべきCOI状態にある企業、組織、団体はいずれもありません。

文 献

- 1) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006;126:663-676.
- 2) Takahashi K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007;131:861-872.
- 3) Kazuki Y, et al. Refined human artificial chromosome vectors for gene therapy and animal transgenesis. *Gene Ther* 2011;18:384-393.
- 4) Kazuki Y, Oshimura M. Human artificial chromosomes for gene delivery and the development of animal models. *Mol Ther* 2011;19:1591-1601.
- 5) Koenig M, et al. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 1987;50:509-517.
- 6) Kazuki Y, et al. Complete genetic correction of ips cells from Duchenne muscular dystrophy. *Mol Ther* 2010;18:386-393.
- 7) Darabi R, et al. Functional skeletal muscle regeneration from differentiating embryonic stem cells. *Nat Med* 2008;14:134-143.
- 8) Barberi T, et al. Derivation of engraftable skeletal myoblasts from human embryonic stem cells. *Nat Med* 2007;13:642-648.
- 9) Tedesco FS, et al. Stem cell-mediated transfer of a human artificial chromosome ameliorates muscular dystrophy. *Sci Transl Med* 2011;3:96ra78.
- 10) Tedesco FS, Gerli MF, Perani L, et al. Transplantation of Genetically Corrected Human iPSC-Derived Progenitors in Mice with Limb-Girdle Muscular Dystrophy. *Sci Transl Med* 2012;4:140ra89.

Abstract**Challenge toward gene-therapy using iPS cells for Duchenne muscular dystrophy**

Mitsuo Oshimura, D.Sc., Yasuhiro Kazuki, Ph.D. and Narumi Uno, MS

Department of Biomedical Science, Institute of Regenerative Medicine and Biofunction, Graduate School of Medical Science/Director of Chromosome Engineering Research Center (CERC) Tottori University

Human artificial chromosomes (HACs) are stable episomal gene vectors that can carry large gene inserts. We have reported complete correction of a genetic deficiency following the transfer of a HAC carrying the genomic dystrophin sequence (DYS-HAC) into induced pluripotent stem (iPS) cells derived from either a Duchenne muscular dystrophy (DMD) model mouse or a human DMD patient. The engineered iPS cells could differentiate in immunodeficient nude mice, and human dystrophin expression was detected in muscle-like tissues. Furthermore, chimeric mice generated from the engineered cells showed tissue-specific expression of dystrophin.

Recently, Giulio's group has isolated and characterized a population of blood vessel-associated stem cells, called mesoangioblasts, that can differentiate into multiple mesoderm cell types, including skeletal muscle. The DYS-HAC was transferred to mesoangioblasts from the DMD-model mouse. Thus, when delivered in the arterial circulation, mesoangioblasts crossed the blood vessel wall and participated in skeletal muscle regeneration, ameliorating signs of muscular dystrophy in the DMD model mice. Most recently, the iPS cells from a DMD patient corrected with the DYS-HAC, were successfully differentiated to mesoangioblasts.

Therefore, autologous transfer of genetically corrected iPS cells and muscle progenitor cells will be desirable therapeutic cells because immune suppression would not be required.

(Clin Neurol 2012;52:1139-1142)

Key words: Duchenne muscular dystrophy, Human artificial chromosome, Mesoangioblast, Gene therapy, iPS cell
