

香月 康宏 *Kazuki Yasuhiro*

鳥取大学 医学部 生命科学科 教授/
鳥取大学 染色体工学研究センター 副センター長
2018年よりCREST研究代表者

特集

OVERVIEW

次世代のデザイン染色体導入技術 難病治療や創薬への貢献を目指して

生命科学の研究分野では、ゲノム編集をはじめとした遺伝子改変技術が生まれつつある。中でも注目されているのが、ヒトやマウスの「人工染色体」だ。遺伝子の乗り物(ベクター)として使うと、さまざまな哺乳類細胞や個体に大きな遺伝子を導入できるメリットがある。鳥取大学染色体工学研究センター・副センター長を務める同大学医学部生命科学科の香月康宏教授は、ユニークな染色体操作技術を用いて、難病治療や創薬への貢献を目指している。

遺伝子搭載サイズに制限なし 論文に刺激を受けてこの道へ

ヒトの遺伝子を別の哺乳類の細胞に導入する技術は、遺伝子治療や病気の解明に欠かせない。細胞に遺伝子を導入する際、遺伝子を運ぶ乗り物は「ベクター」と呼ばれる。従来の遺伝子導入ベクターには、ウイルスベクターと非ウイルスベクターがあるが、小さい遺伝子しか導入できなかった。その問題を解消したのが、ヒト人工染色体(HAC)である。

人間には46本の染色体上に2~3万個もの遺伝子が搭載されている。その染色体の1つを取り出し、遺伝子を全て取り除き、両末端のテロメアと中央のセントロメアだけを残すとHACになる。空になった乗り物である「HACベクター」に目的の遺伝子を乗せ、さまざまな細胞や動物に移し替えることができる。「従来の遺伝子導入ベクターは10~50キロベース(塩基対)しか運べませんでした、HACベクターは搭載サイズに制限がなく、従来の100倍以上もの遺伝子を乗せられるといった特徴があります」と話すのは、鳥取大学医学部生命

科学科の香月康宏教授だ。

香月さんが生命科学の道に進んだきっかけは、1995年に北海道大学が国内初の遺伝子治療に成功した記事を読んだことだという。遺伝子研究に興味を持ち、医学分野の研究者育成を掲げる鳥取大学医学部生命科学科の第7期生として入学した。97年に、同学科の押村光雄教授(現・鳥取大学名誉教授)が、マウスの中に導入した1本のヒト染色体断片が機能することを明らかにした論文がNature Genetics誌に掲載された。外部から導入したヒト染色体断片が子孫に伝達することを世界で初めて示した「トランスクロモソミックマウス」作製論文に刺激を受けて、香月さんは染色体工学の道に進んだ。

筋ジスを標的に研究開始 iPS技術との融合で成果

香月さんはヒト21番染色体をもとに、空の乗り物であるHACベクターの作製に取り組んだ。同様の手法で、マウス11番染色体をもとにしたマウス人工染色体(MAC)ベクターの作製にも成功している(図1)。

これらの人工染色体上には自由自在に望みの遺伝子を搭載することができ、そのような「デザイン染色体」で、遺伝子の機能解明、疾患モデル細胞や動物の作製などの基礎研究、それらを応用した創薬開発を目指した研究に着手した。HACベクターの特性を生かした研究の中で、香月さんは難病の1つである「デュシェンヌ型筋ジストロフィー(DMD)」をターゲットとした研究に取り組んできた。

この病気はジストロフィンという遺伝子が機能しないことが原因で筋力低下が徐々に進行し、約3500人に1人の頻度で重篤な骨格筋障害を起こす疾患だ。発症原因となるジストロフィン遺伝子(DYS)は、2.4メガ(メガは100万)ベースという、ヒトの中でも最も大きな遺伝子の1つで、従来型のベクターでは運ぶことができなかった。香月さんは、大きな遺伝子をそのまま搭載できるHACに、正常なDYSを乗せることはできないかと考えた。

折しも研究着手当時は、京都大学iPS細胞研究所の山中伸弥教授(現・同研究所名誉所長・教授)によりiPS細胞の作製成功が報告されており、

これらの技術を融合させることで治療につながらないかと研究を進めていったという。そして、同疾患のモデルマウスから採取した筋肉の幹細胞に、正常なDYS遺伝子を持つHACベクターを導入、この幹細胞を増やして、筋芽細胞に分化誘導後、モデルマウスの動脈に注射して移植することで、運動機能を改善できた。この研究成果は、HACを遺伝子治療に応用するための基礎研究として世界的に注目された(図2)。

図1 HAC/MAC技術の開発

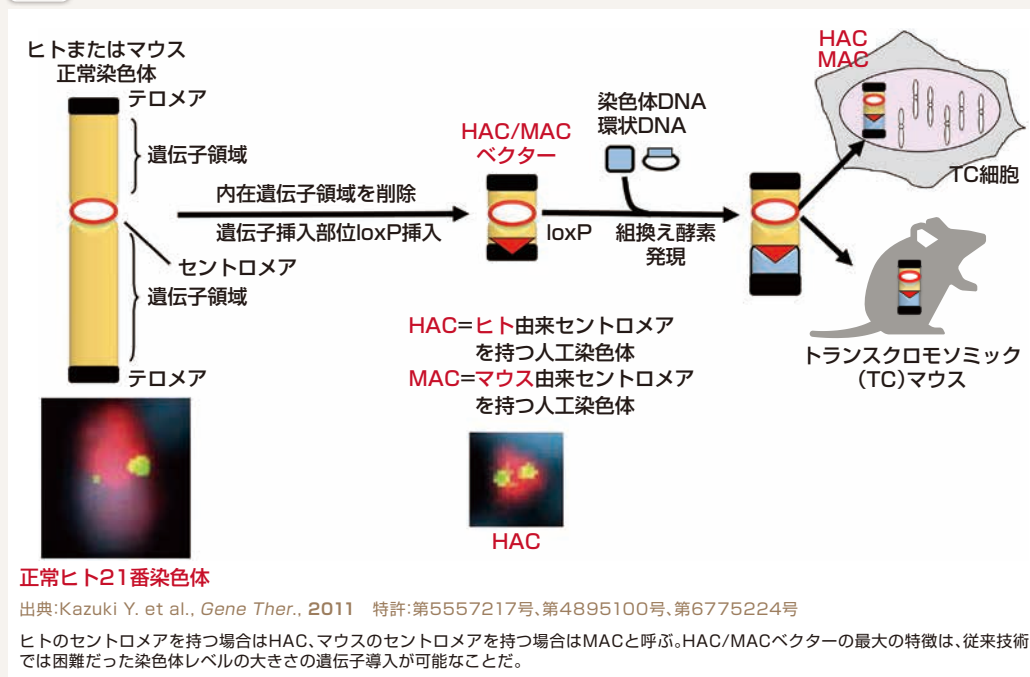
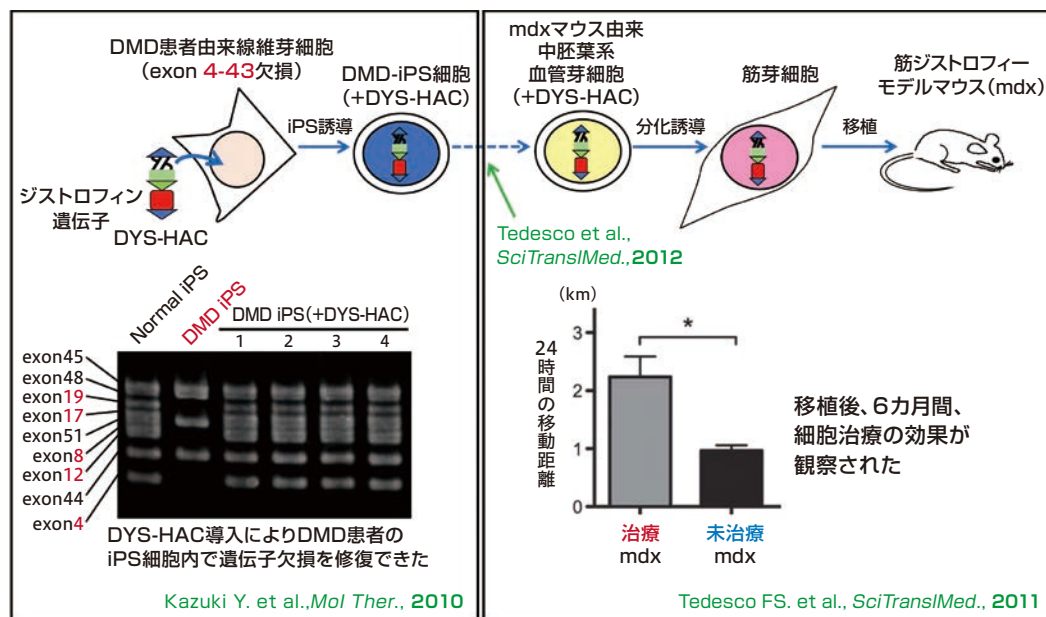


図2 DMDの遺伝子・細胞治療



ジストロフィン搭載HACをDMD患者の細胞へ導入し、iPS細胞を樹立。赤字部分のエクソンはDMD iPS細胞では欠損しているのに対し、DYS-HAC導入細胞では欠損が修復されている(左)。マウスを用いた検証では、DMDのモデルマウスの幹細胞にDYS-HACを導入、筋芽細胞に分化誘導後にマウスへ移植した。その結果治療群のマウスは、移植後6カ月間にわたり細胞治療の効果が確認された(右)。

3つのプロジェクトが並行 基盤技術から産業応用まで

HACの遺伝子治療への応用は、一足飛びに創薬研究、治療研究へ行くことは難しい。香月さんは基礎研究が最も重要であると考え、2018年にJSTのCREST「ヒト/マウス人工染色体を用いたゲノムライティングと応用」に採択された。ヒト細胞を含む哺乳類ゲノムに対してのゲノム合成研究(ゲノムライティング)は、世界的にもほとんど進んでいないという状況だった。それは染色体レベルでの遺伝子操作、導入技術が難しかったからだ。

香月さんは、それまでヒト染色体そのものをベクターとして活用する研究を進めてきたことから、CRESTではHAC/MACベクターを中心に①基盤技術開発プロジェクト②ゲノム動作原理解明プロ

ジェクト③産業・医療応用プロジェクトの3プロジェクトを並行して取り組むこととした。基盤となる研究を香月さんのグループが担当し、東京薬科大学、東京都医学総合研究所、筑波大学、自然科学研究機構生命創成探究センターの研究者と共に研究を進めている(図3)。

り、香月さんもこの展開を目指している。

ダウン症モデルラットを作製 筋ジス遺伝子を持つブタも

ヒトの病気への治療効果を調べるため、基礎研究の段階ではマウスや

図3 CRESTの体制図

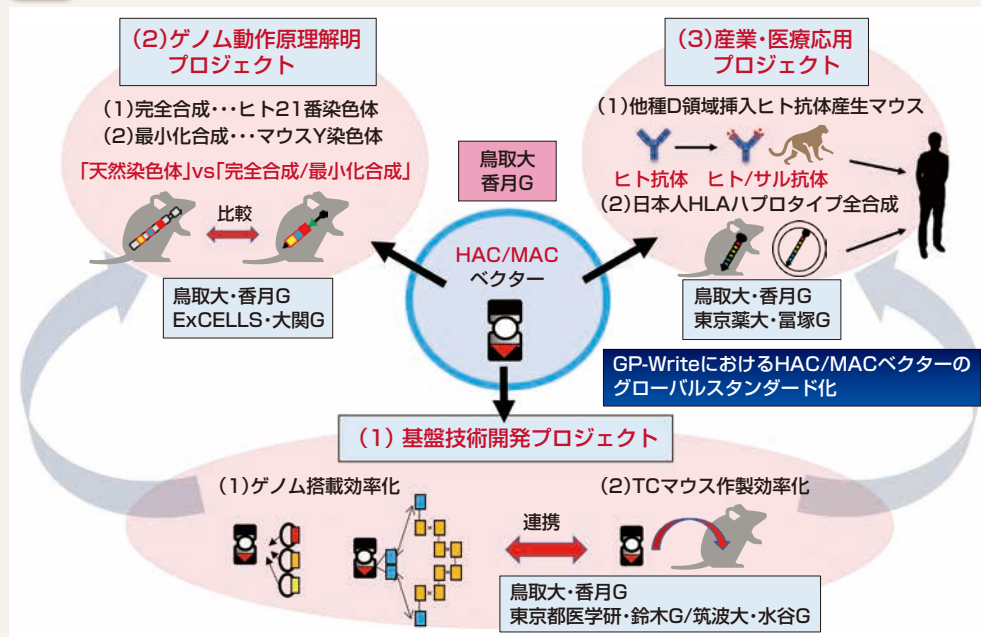
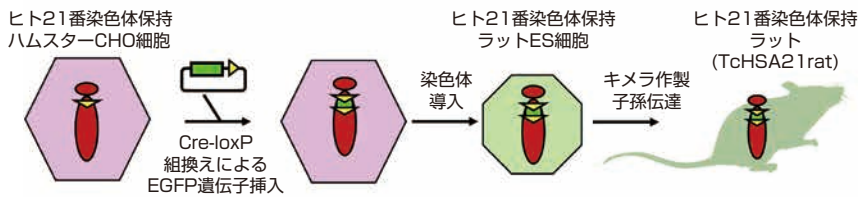
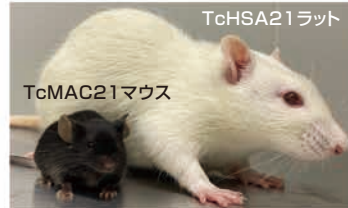


図4 ダウン症モデルラットの作製

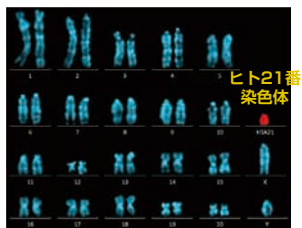
A. ヒト21番染色体の改変と移入方法



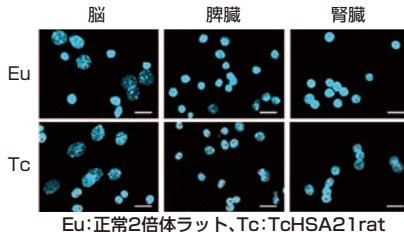
B. ダウン症モデルマウスとラットの写真



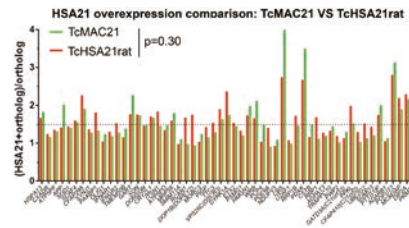
C. 子孫伝達個体の染色体解析像



D. 各組織由来細胞における典型的なFISH像



E. ヒト21番上の遺伝子の発現解析



出典: Kazuki Y. et al., *Am J Hum Genet.* 2022, 109(2):328-344 Fig.1-3を基にJSTにて改変

<https://www.jst.go.jp/pr/announce/20220125/pdf/20220125.pdf>

ヒト21番染色体における長腕の動原体付近の非翻訳領域に、緑色蛍光たんぱく質遺伝子(EGFP)を挿入し、この染色体をラットES細胞へ移入し、このES細胞からモデルラット(TcHSA21rat)を作製した(A・B)。このラットを解析した結果、ヒト21番染色体が独立に存在していた(C)。また、FISH解析像ではヒト21番染色体を保持する細胞を示す赤色シグナルが、TcHSA21ratで90パーセント以上の陽性を示した(D)。生後1日のダウン症モデルマウス(TcMAC21)も同様に解析したところ、ヒト21番染色体上の遺伝子の発現レベルに類似が確認できた(E)。

ラットなどが実験動物として使われている。CRESTでの顕著な成果の1つは、ダウン症モデルラットの作製だ。ダウン症はヒトの21番染色体が3本になる疾患で、香月さんは、ダウン症の病態のメカニズムを解明するため、00年代からこの21番染色体をマウスに導入する研究を進めていた。しかし当時の技術では、ヒト21番染色体を持つラットを効率的に作れなかった。そこで香月さんは、独自の染色体工学技術を用いてEGFP

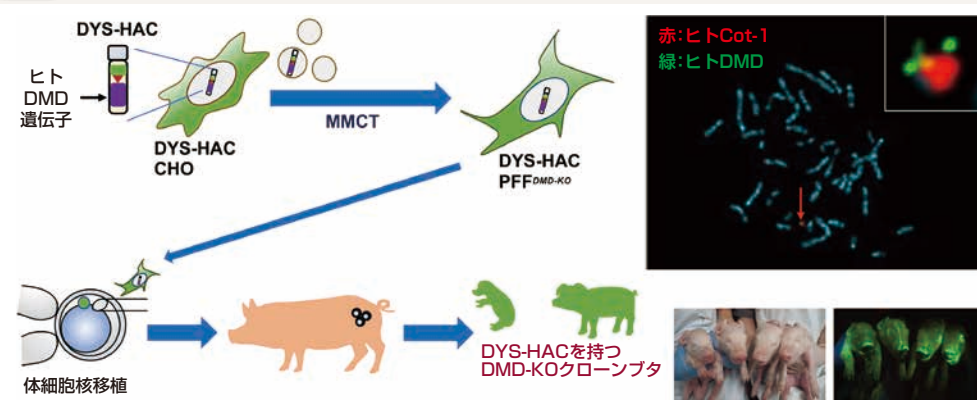
遺伝子を搭載したヒト21番染色体を作製し、その21番を1本移入したラットES細胞を作製した。これにより、子孫に伝達することが可能なヒト21番染色体を保持するラットを作することに成功した(図4)。

実は、08年頃まではラットの遺伝子改変は技術的に困難と言われていた。それが可能となったのは、08年に子孫伝達可能なキメララットを作出できるES細胞の開発が報告されたことが大きい。日本でも自然科学

研究機構生理学研究所の平林真澄准教授が研究を進めており、平林准教授との共同研究が同成果につながったという。この研究成果は生命科学分野のTrends in Genetics誌に掲載され、海外の研究者からも大きな反響を受けた。ダウン症の病態解明における重要なカギとなったことに加えて、治療薬開発につながる技術移転にも展開している。

また、ブタへのヒト染色体の導入も大きな成果の1つである。ブタは解剖学的、生理学的な特徴から、医療応用に向いているため、これまで多くの遺伝子改変ブタが作製されてきたが、非常に巨大な遺伝子をブタに導入することには技術的な課題があった。香月さんは、体細胞クローニング技術と人工染色体技術を組み合わせることで、デュシェンヌ型筋ジストロフィーを発症するブタ(DMD-KOブタ)の線維芽細胞にヒトDYS-HACを導入した。明治大学の長嶋比呂志教授らと

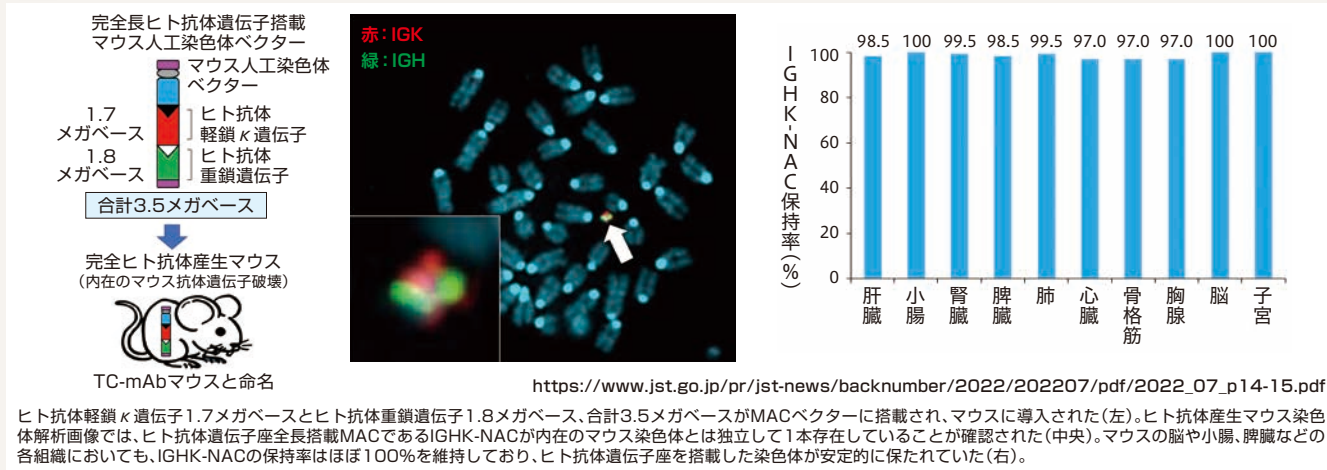
図5 HACを導入した遺伝子改変ブタの作出



出典: Watanabe M., et al., *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2023 Sep 12, 33:444-453 Fig.1を基にJSTにて改変

微小核細胞融合法により、ヒトジストロフィン搭載人工染色体(DYS-HAC)をデュシェンヌ型筋ジストロフィーのブタの線維芽細胞へ導入。これを核ドナーとした体細胞クローニングにより、DYS-HACクローンブタを作出した(左)。胎仔と産仔それぞれで、DYS-HACベクターに搭載された緑色蛍光たんぱくにより、DYS-HACベクターが全身に導入されていること、FISH解析によりDYS-HACベクターがブタ染色体とは独立して1本存在していることがわかった(右)。

図6 完全ヒト抗体産生マウスの作製



の共同研究で、世界で初めてHACを導入したブタを作製することに成功した(図5)。

さらに香月さんは、完全長のヒト抗体遺伝子を組み込んだ人工染色体を導入した「完全ヒト抗体産生マウス」の作製にも成功している(図6)。このマウスではヒトに見られる抗体レパトア(多様性)が再現されていることから、疾患に対して高い効き目と安全性を持つ抗体医薬品の開発への貢献が期待される。「完全ヒト抗体産生マウスを広く国内外へ提供することで、鳥取大学からがんや新興再興感染症の治療薬の開発などにつなげていければうれしいですね」と香月さんは今後の意気込みを語る。

これらの施設は、染色体工学技術を核とした地域産官学連携拠点に加えて、染色体工学研究センターが連携する大学発ベンチャーの拠点にもなっている。「医学部生命科学科と染色体工学研究センターは治療や創薬の種となる基礎研究や人材育成を担い、とっとりバイオフロンティアはアーリーステージの支援、とっとり創薬実証センターは医薬品上市に向けた取り組みをサポートしていく体制で製薬企業などが共同研究に参画しています」と鳥取発の医療・創薬展開に期待を寄せる。

病気で苦しむ患者さんを救いたいという思いが研究のモチベーション

だという香月さん。ビジョンとパッションを持って基礎研究と創薬研究を両輪で進めていくことが大事だと強調する。「そのためには、自分を含め、若い世代が自由な発想でワクワクして研究ができる環境作りが大事だと思っています」。現在、鳥取県には製薬企業の拠点や工場がない。大学発のベンチャーが大きくなれば、卒業後の学生たちの就職や、県内外からの医療・創薬人材の結集、そして研究の活性化も実現できるかもしれない。教育と研究の好循環も見据えながら、香月さんは難病治療研究と創薬研究にまい進していく。

(TEXT:伊藤左知子,PHOTO:石原秀樹)

地域産官学連携拠点が発足 さらなる研究環境作りを模索

22年10月、香月さんは鳥取大学医学部生命科学科の教授に就任。また、09年に鳥取県と鳥取大学の共同教育研究施設として設置された「染色体工学研究センター」の副センター長と、同センターが管理運営する「とっとり創薬実証センター」のセンター長も務めている。センターの隣には、研究の成果を実用化するための拠点として鳥取県が管理運営する「とっとりバイオフロンティア」が建設されている。



鳥取の医療・創薬研究が活発になり、そこに魅力を感じて学生が入学して、地域で育った学生が地域で活躍してくれる良いサイクルを産み出すことが私のミッションです。次世代に向けた研究環境作りはもちろん、世界に伍して戦えるオンリーワン研究に挑む志も忘れずにいたいですね。