

相同組み換えによる異常遺伝子を標的とした 遺伝子破壊の試み

—— 造血器腫瘍への遺伝子治療の可能性 ——

新潟大学医学部内科学第一教室（主任：相澤義房教授）

鈴木 訓 充

Replacement of Bcr-Abl Fused Oncogene by Homologous Recombination Method
— An Attempt of Gene Therapy for Hematopoietic Malignancy —

Noriatsu SUZUKI

*First Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Yoshifusa AIZAWA)*

Ideal somatic gene therapy for genetic diseases is to replace the abnormal gene with a normal gene and to normalize the abnormal cells. Up to now, repair of an abnormal gene can be performed only by homologous recombination between the abnormal gene and the gene used for correction. Our study was designed to assess whether homologous recombination occurs in hematopoietic cells and to see if it is possible to apply homologous recombination. Murine hematopoietic cell line, FDC-P2, which became IL-3 independent by being transfected with p210bcr-abl, was used for the target cell. In order to perform such gene replacement, we constructed the vector for homologous recombination. The plasmid was made by inserting Neo-gene in the region of the bcr-abl, thymidine kinase gene outside of bcr-abl, and placing bcr-abl in antidromic way for restricting the homologous recombination to bcr-abl area. Transfection was performed by electroporation and selection was done by culture adding G418 and gancyclovir. One clone was established and was confirmed to be replaced by the vector constructed for homologous recombination by the detection of no transcription of thymidine kinase and bcr-abl, but positive transcription of Neo gene in RT-PCR analysis, and by the expected changes in the size of the bands in Southern blot analysis. Reacquisition of IL-3 dependency was demonstrated in the cells which autonomously proliferate in the IL-3 free condition. These findings suggest the

Reprint requests to: Noriatsu SUZUKI,
First Department of Internal Medicine,
Niigata University School of Medicine,
Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先：〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部内科学第一講座

鈴木 訓 充

possibility of homologous recombination as the gene replacement therapy in hematological diseases including leukemias.

Key words: homologous recombination, bcr-abl, thymidine kinase, Neo, gene replacement
相同組み換え, bcr-abl, チミジンキナーゼ, ネオマイシン耐性遺伝子, 遺伝子組み換え

はじめに

遺伝子治療は患者の細胞に遺伝子を導入することによる治療であるが、これまで、単に遺伝子を導入することで治療効果がある症例を選択して行われてきた。すなわち、変異により欠損している遺伝子機能を導入遺伝子の発現によって相補することを目的としたものである。このような方法では、生体内における様々な正常制御機構に従った導入遺伝子発現が困難であることや、挿入部位がコントロールできないことからくる挿入変異による癌化等の潜在的危険の存在などの問題点が指摘されてきた。ところで、近年の微生物系での細胞内遺伝子組換え機能の解明と、哺乳動物細胞での遺伝子導入技術の開発が結び付いて、哺乳類の細胞においても、2つの遺伝子間のホモロジーを認識し、互いに組み換えを起こす機構(相同組み換え: homologous recombination)が解明され、胚性幹細胞(ES細胞)にこの技術を用いて特定の遺伝子を標的とした遺伝子欠損マウス(ノックアウトマウス)を作成することで、標的遺伝子の生体内での機能解明が大きく進展している¹⁾。この方法は、体細胞に応用することで、遺伝子変異によるヒト疾患の理想的な遺伝子治療となりうることが期待されている。相同組み換えによる変異遺伝子の修正は、導入遺伝子の発現が正常に制御されることはもちろん、導入により変化する遺伝子がほぼ正常遺伝子と同一であることから、これまでの遺伝子治療における潜在的危険の存在が少ないなどの長所を有している。しかし、ES細胞に比し体細胞ではこの相同組み換えの効率が低いことから、組み換え効率を上げる試みが今後の大きな課題となっている²⁾³⁾。近年の遺伝子工学の発展により、多くの造血器腫瘍が何らかの遺伝子異常を伴うことが明らかにされてきた。なかでも慢性骨髄性白血病(CML)における遺伝子異常は早くから注目されており、染色体転座 t(9;22)(q34;q11)により、bcr (breakpoint cluster region) 遺伝子(22番染色体長腕上に存在)の5'側と、abl 遺伝子(9番染色体長腕上に存在)のエクソン2より下流部分との融合が生じ、その結果形成された bcr-abl キメラ

遺伝子産物が白血病化に重要であることが示されている⁴⁾。我々はこの遺伝子異常の細胞増殖における作用を検討してきており、造血因子依存性に増殖するマウス血液細胞株 FDC-P2 細胞に、この異常遺伝子を導入することで、造血因子依存性が消失し、自律性増殖能を獲得することを明らかにしてきた⁶⁾。

今回、白血病に対する相同組み換えを応用した遺伝子治療の開発を目的として、bcr-abl キメラ遺伝子を導入して自律増殖を獲得した FDC-P2 細胞を用い、bcr-abl キメラ遺伝子を標的とした相同組み換え技術による遺伝子破壊を試み、増殖因子依存性を再獲得した細胞を得ることに成功した。このことは造血器腫瘍における遺伝子治療の可能性を示唆するものであり、ここに報告する。

材料と方法

プラスミド及びプラスミド処理に用いた方法: 1) pGD' 210 (図 1); Dr. Martin L. Scott (Whitehead Institute, Nine Cambridge Center, Cambridge, MA) より供与された。これは Molony leukemia virus (Mo) の 5' long terminal repeat (LTR) と myeloproliferative sarcoma virus (MPSV) の 3' LTR の間に bcr-abl 及び Neomycin resistant gene (Neo) を含む⁷⁾。2) pS-HT⁸⁾; Thymidine kinase (TK) の供給源として使用した。これは SV40 及び HSV (単純ヘルペスウイルス) の TK のダブルプロモーターを有する TK を含む。3) pMC1NeoPolyA (STRATAGENE, LA, USA); Neo の供給源として用いた。HSV の TK の promotor を有する Neo は制限酵素 Xho I, Sal I 処理にて切り出し可能である。

制限酵素には Cla I (TOYOBO, 東京), EcoR I (TOYOBO, 東京), Nde I (TOYOBO, 東京), Hind III (TOYOBO, 東京), Sal I (TOYOBO, 東京), Xho I (TOYOBO, 東京), を用い、制限酵素断端平滑化には DNA blunting kit (TaKaRa, 大津), ligation には DNA Ligation Kit Ver. 1 及び Ver. 2 (TaKaRa, 大津) を使用した。

Cell line: IL-3 依存性に増殖するマウス骨髓球系細

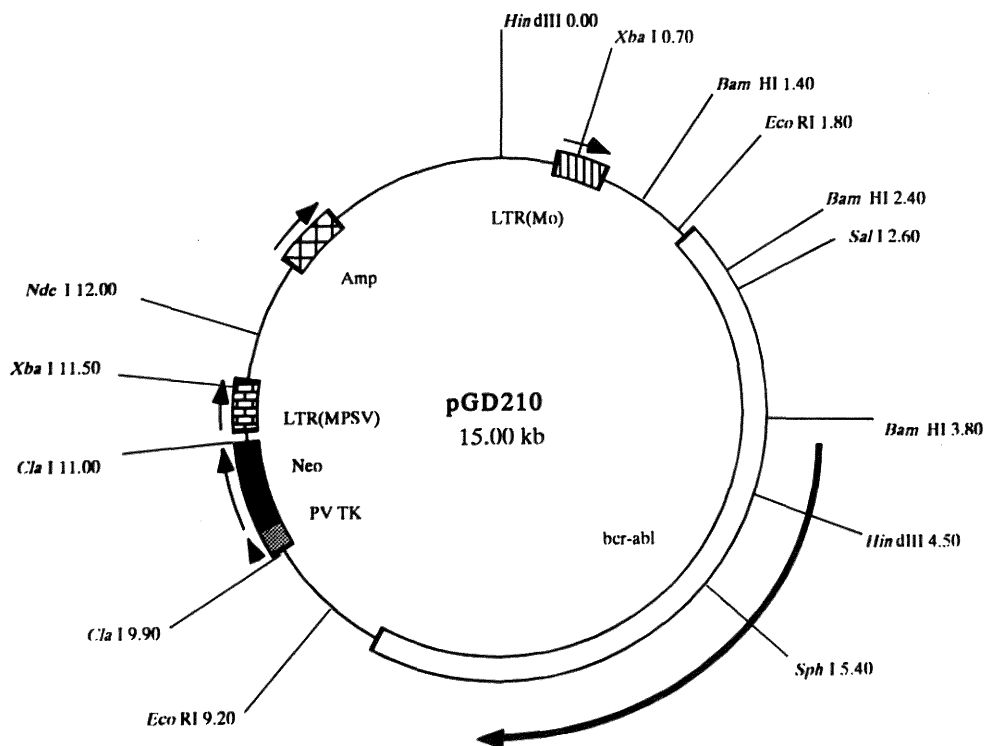


図1 プラスミド pGD' 210. 円上の数字は HindIII 認識部位を0とした各々の制限酵素認識部位を示し, 単位は kb である. 矢印は挿入遺伝子の5' から3' の方向を示す. bcr-abl は LTR (Mo), LTR (MPSV), Neo, Amp と転写方向が一致している. LTR (Mo): Molony leukemia virus の long terminal repeat, LTR (MPSV): Myeolo-proliferative sarcoma virus の long terminal repeat, Neo: neomycin resistant gene, Amp: ampicillin resistant gene

胞株 FDC-P2 を使用した⁹⁾. 培養は10%牛胎仔血清 (FBS) を含む RPMI 1640 培地で行い, IL-3 供給源としては WEHI-3 (マウス骨髄単球性細胞株で, IL-3 を産生) 培養上清を10%添加した.

in situ hybridization: FDC-P2 細胞を染色体解析と同様にスライドガラス上に滴下して, 変性処理後 Nick Translation Kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) を用いて digoxigenin-dUTP にて標識した pGD' 210Neo⁻ を probe としてハイブリダイズした. その後, propidium iodide を用いて染色体を染色し, anti-digoxigenin FITC にて免疫染色を施行, ハイブリダイズしたシグナルを染色体上に検出した.

Electroporation: 遺伝子導入は electroporation を利用した. 増殖期にある FDC-P2 を RPMI 1640 培養液で2回洗浄後 2.5×10^6 個の細胞と 50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度

の線状プラスミド DNA を 80 μl の培地に浮遊させて電気パルス用キューベットにいれ, パルス電界強度 1.75 kV/cm, パルス幅 500 μs の矩形波を Shimazu SSH-10 (島津, 京都) を利用し印加パルス数1回の条件で electroporation を行った¹⁰⁾.

核酸の抽出: genomic DNA の抽出は SepaGene (Sanko Junyaku) を用いた. RNA は acid guanidine, phenol, chloroform (AGPC 法) を用い抽出した.

RT-PCR 及び PCR: RT-PCR は total RNA 2 μg より random primer をもちいて Rous associated virus (RAV-2) を逆転写酵素として cDNA を作成し, これを鋳型に PCR をおこなった. Genomic DNA は, 1 μg を PCR に使用した. bcr-abl: センスプライマー; "5'-GGAGCTGCAGATGCTGACCAAC-3'", アンチセンスプライマー; "5'-TCAGACCCTGAGGCTCAAAGTC-

3'". Neo: センスプライマー; "5'-TCCATCATGGC-TGATGCAATGCGGC-3'", アンチセンスプライマー; "5'-GATAGAAGGCGATGCGCTGCGAATCG-3'". TK: センスプライマー; "5'-ATCGTCTACGTACCC-GAGCCGATGACTTAC-3'", アンチセンスプライマー; "5'-GGCCTGGGGGGTCATGCTGCCATAAGGTA-3'". 反応条件は denature: 94°C 1分, annealing: bcr-abl に 63°C 1分, 他は 55°C 1分, extension: 72°C 1分 で 30 cycle 施行した. 電気泳動は 3% NuSieve/1% Seakem agarose gel でおこない, エチジウムブロマイド染色にて紫外線下でバンドを確認した. PCR product はそれぞれ bcr-abl; 200 bp, Neo; 432 bp, TK; 327 bp である.

サザンブロット: 抽出した DNA 10 µg を Sph I にて処理したものを 0.8% agarose gel で泳動し, Hybond-N+membrane (Amersham, England) にブロットした後, pGD'210Neo⁻ より bcr 部分を EcoRI, Sal I にて切り出した 800 bp 領域を probe として検索した. ラベルには digoxigenin-dUTP をもちい, ハイブリダイゼーションとブロットの洗いは DIG DNA labeling and detection kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) のマニュアル通り施行した.

結 果

pGD'210Neo⁻ 導入 FDC-P2 細胞株: pGD'210Neo⁻ プラスミドを制限酵素 Cla I 処理により Neo を切り出した後に, 再度プラスミド自体を self-ligation して 13.90 kbp の Neomycin resistant gene を欠く pGD'210Neo⁻ を作成した. pGD'210Neo⁻ は Nde I 処理で線状化した後, FDC-P2 に electroporation で導入した. 導入後の FDC-P2 細胞株は 48 時間 IL-3 存在下で培養後, IL-3 非存在下での培養を継続し, IL-3 非依存性となったクローンを選択した. その結果, 6 クローンが IL-3 非依存性株として得られた. これらの細胞が bcr-abl キメラ遺伝子を発現していることは RT-PCR にて確認された. また, 相同組み換え目的のため, キメラ遺伝子のコピー数を in situ hybridization で検索したところ, 全てのクローンは 1 コピーであることが確認された (図 2).

pGD'210TKbcrNeoablreverse の構築: 標的遺伝子を bcr-abl キメラ遺伝子に限定させるために, まず pGD'210Neo⁻ の bcr-abl 領域を EcoRI 処理にて切り出し, 逆向きにして再度挿入した (pGD'210Neo⁻ reverse). さらに, 相同組み換え遺伝子導入後の negative 及び positiveselection のために pSHT⁸⁾ から SV40, HSV-TK プロモーターを含んだ TK 遺伝子を切り出し, pGD'-

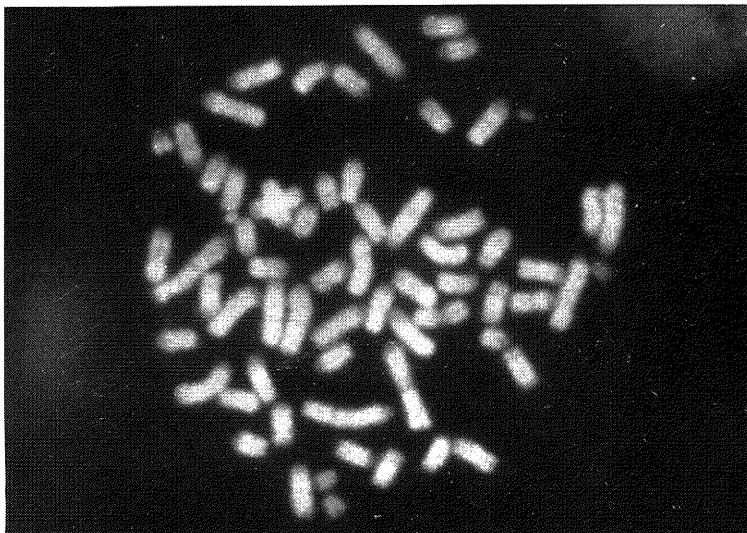


図 2 pGD'210Neo⁻ 導入 FDC-P2 細胞の pGD'210Neo⁻ に対する FI-SH. digoxigenin-dUTP にて標識した pGD'210Neo⁻ を probe として. pGD'210Neo⁻ が 1 コピー導入されていることを示す.

210Neo⁻ reverse を Nde I 処理後どちらも平滑端処理して ligation した (pGD' 210TKreverse). 最後に pMC1NeoPolyA から Xho I, Sal I 処理にて切り出された HSV-TK プロモーターを有する Neo 遺伝子を, Sal I 処理後の pGD' 210TKreverse に ligation して pGD' 210TKbcrNeoablreverse を構築した (図 3).

pGD' 210TKbcrNeoablreverse を用いた相同組み換え遺伝子導入: 1 コピーの pGD' 210Neo⁻ を導入され自律増殖を呈する FDC-P2 に対して相同組み換え遺伝子導入を意図して, pGD210TKbcrNeoablreverse を制

限酵素 Cla I 処理して線状化後, electroporation による導入を試みた. electroporation 後は IL-3 存在下で 48 時間培養後, 続いてさらに G418 (neomycin analogue: Sigma, St Louis, MO), gancyclovir (Syntex-Roche, Palo Alto, CA) をそれぞれ 1 mg/ml, 100 μ M の濃度となるように加えた培養に移行した. その後の培養で G418, gancyclovir どちらにも抵抗性を示して増殖した細胞から RNA を抽出, bcr-abl の発現を検索した. その結果, RT-PCR にて bcr-abl の発現が認められず, G418, gancyclovir どちらにも抵抗

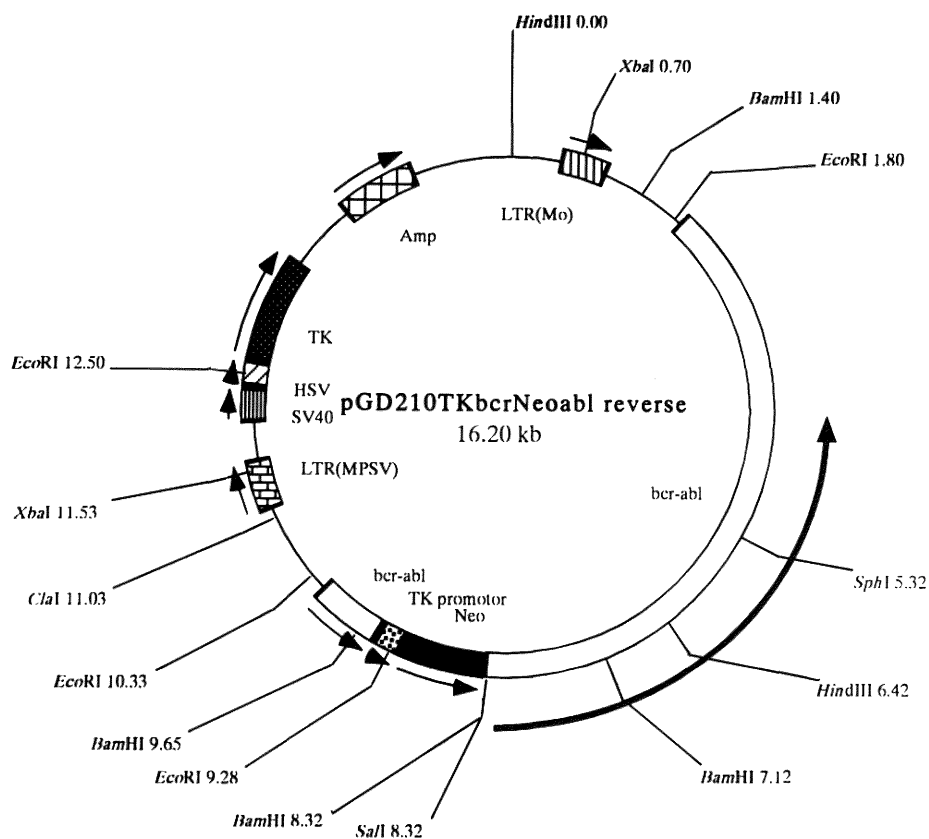


図 3 プラスミド pGD' 210TKbcrNeoablreverse. 円上の数字は Hind III 認識部位を 0 とした各々の制限酵素の位置を示し, 単位は kb である. 矢印は挿入遺伝子の 5' から 3' の方向を示す. bcr-abl と Neo は LTR (Mo), LTR (MPSV), TK, Amp と転写方向が逆転している. LTR (Mo): Molony leukemia virus の long terminal repeat, LTR (MPSV): Myeloid-proliferative sarcoma virus の long terminal repeat, Neo: neomycin resistant gene, この部位は pMC1NeoPolyA 由来である, TK: Thymidine kinase, HSV: herpes simplex virus TK promotor, SV40: SV40 promotor, TK, HSV, SV40 は pSHT 由来である, Amp: ampicillin resistant gene

性を示して増殖した細胞が1クローン得られた。相同組み換え遺伝子導入は合計して 1×10^8 個以上の細胞に対して試みたが、そのうちの1クローンのみが上記条件を満たすものだった。

pGD' 210Neo⁻ 導入 FDC-P2 (pGD' 210Neo⁻) と、pGD' 210Neo⁻ 導入後に pGD' 210TKbcrNeoablreverse にて相同組み換えによる導入に成功したと考えられた FDC-P2 (pGD' 210TKbcrNeoablreverse (HR)) より抽出した DNA を用いて bcr-abl, Neo そして TK それぞれの遺伝子についてその integration を PCR で検

索した。その結果、pGD' 210Neo⁻ 導入細胞では bcr-abl は存在するが、Neo, TK は確認されなかった。一方、相同組み換え後の細胞では bcr-abl, Neo は存在するが、TK は認められなかった (図 4-a)。次にこれらの細胞でのそれぞれの遺伝子発現を RT-PCR にて検索した。pGD' 210Neo⁻ 導入 FDC-P2 では bcr-abl のみの発現を認め、Neo, TK は発現していなかった。一方、相同組み換え後の細胞では bcr-abl, TK は発現しておらず、Neo のみの発現が確認された (図 4-b)。さらに相同組み換え遺伝子導入後 G418, gancyclovir 存在下で増殖

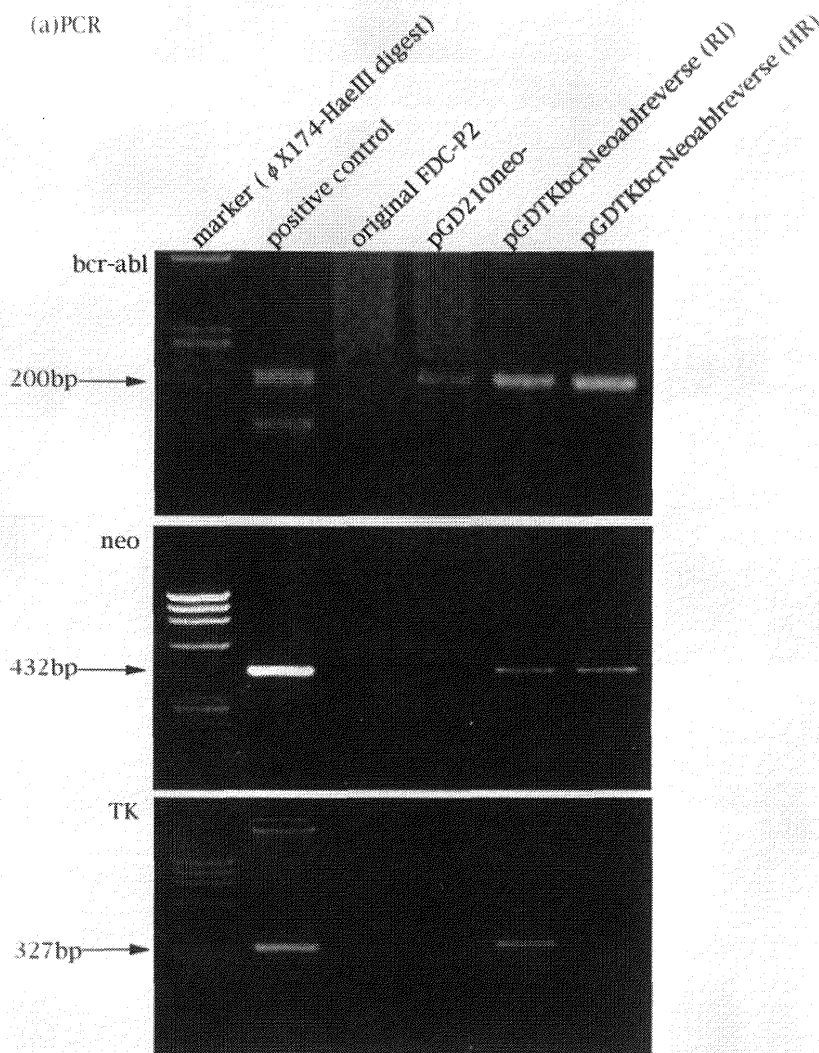


図 4-a

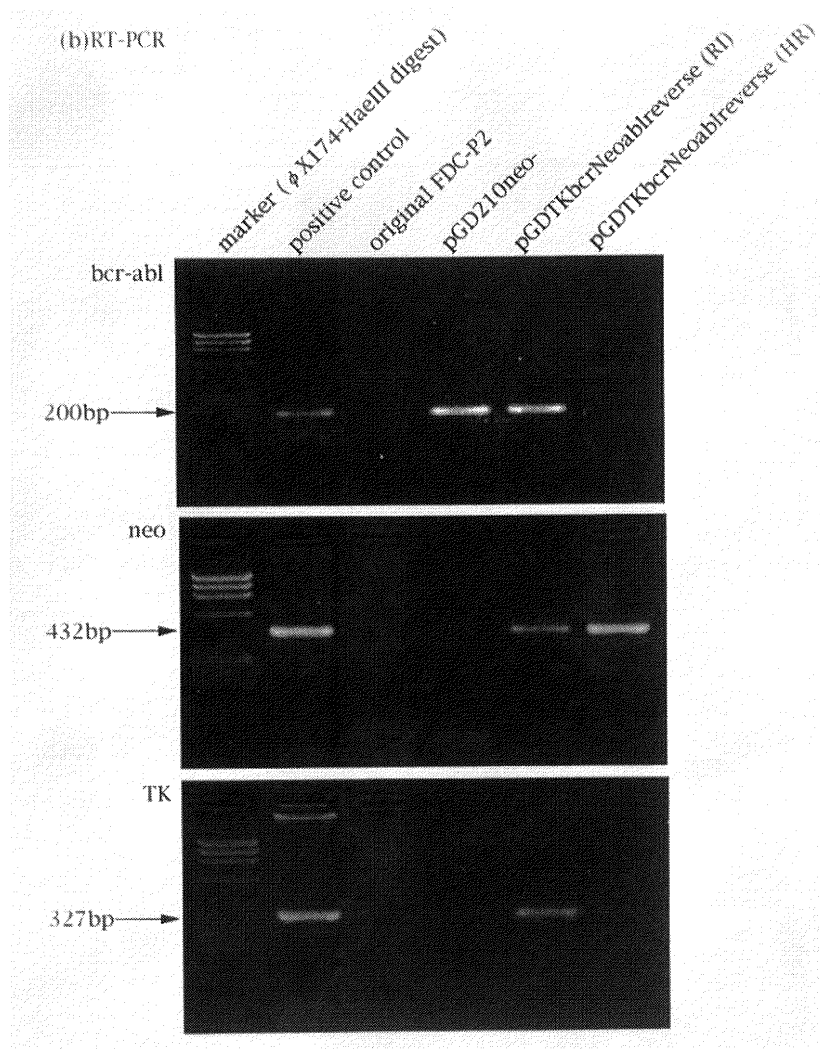


図 4-b

図 4 各種導入細胞の bcr-abl, Neo, TK の, (a) PCR 解析, および, (b) RT-PCR 解析. プライマー, 方法は本文参照. pGD210Neo⁻: pGD210Neo⁻ 導入 FDC-P2. pGD210TKbcrNeoablreverse (RI): pGD210Neo⁻ 細胞に pGD210TKbcrNeoablreverse を導入し, G418 のみで選択して増殖したクローンの 1 つ. pGD210TKbcrNeoablreverse (HR): pGD210Neo⁻ 細胞に pGD210TKbcrNeoablreverse を導入し, 相同組み換えが起こったと考えられた FDC-P2. (a): Genome DNA において, 200 bp の b3a2 タイプ bcr-abl キメラ遺伝子が, original FDC-P2 を除き全てに integrate されている. positive control の短いバンドは 125 bp であり, bcr-abl の b2a2 タイプのキメラ遺伝子を反映する¹¹⁾. Neo 遺伝子は pGD210TKbcrNeoablreverse (RI), pGD210TKbcrNeoablreverse (HR) において検出される. TK 遺伝子は pGD⁺210TKbcrNeoablreverse (RI) で検出されるが, pGD210TKbcrNeoablreverse (HR) では検出されない. (b): それぞれの遺伝子の発現をみると, pGD⁺210TKbcrNeoablreverse (HR) では, bcr-abl, TK の発現は認められず, Neo のみの発現が認められた. 一方, pGD⁺210TKbcrNeoablreverse (RI) では, bcr-abl, Neo さらに TK のいずれの遺伝子も発現が認められた.

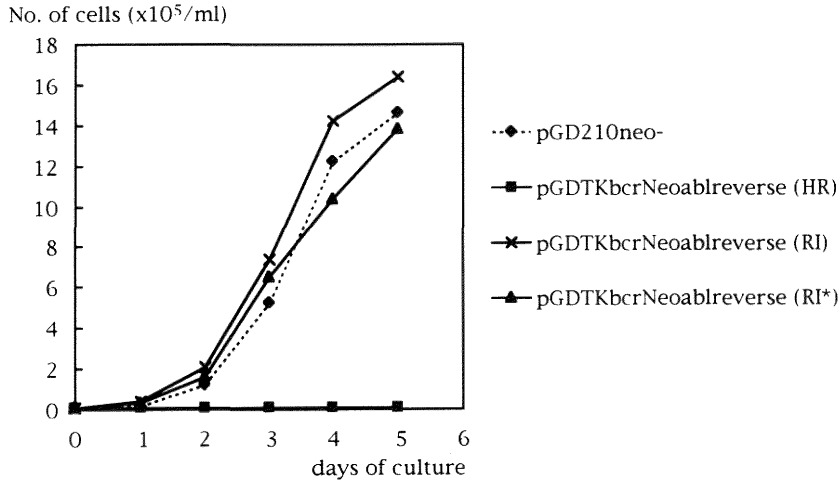


図 5 IL-3 非存在下における細胞増殖曲線. pGD210Neo⁻: pGD210Neo⁻ 導入 FDC-P2. pGD210TKbcrNeoablreverse (RI*) : pGD210Neo⁻ 細胞に pGD210TKbcrNeoablreverse を導入し, G418, gancyclovir で選択された FDC-P2 クローン 1 つ. pGD210TKbcrNeoablreverse (RI) : pGD210Neo⁻ 細胞に pGD210TKbcrNeoablreverse を導入し, G418 のみで選択して増殖したクローンの 1 つ. pGD210TKbcrNeoablreverse (HR) : pGD210Neo⁻ 細胞に pGD210TKbcrNeoablreverse を導入し, 相同組み換えが起こったと考えられた FDC-P2. 相同組み換えが起こったクローンのみが IL-3 非存在下での培養で増殖が認められなかった.

を認めた細胞の IL-3 依存性を検索すると, bcr-abl が発現していない細胞株 (pGD⁺ 210TKbcrNeoablreverse (HR)) のみ, IL-3 依存性増殖を示すことが確認された (図 5).

ところで, 相同組み換えのための遺伝子導入試行後に G418 のみで選択された FDC-P2 細胞は, 比較的容易に得られたのであるが, このような細胞についてその integration と発現を検索すると, bcr-abl, Neo, TK 全ての遺伝子挿入と発現が確認され, この段階では導入遺伝子がランダムに挿入されたと考える (図 4 pGD⁺ 210TKbcrNeoablreverse (RI)). さらに G418, gancyclovir 存在下での培養にて増殖した細胞も, 実際に相同組み換えが起こったと考えられるもの以外にもいくつか得られたが (図 4 pGD⁺ 210TKbcrNeoablreverse (RI*)), そのような細胞では bcr-abl の発現が認められ, さらに PCR にて TK 遺伝子の integration がいないことが確認された. これは導入が相同組み換えによるものでなくランダムに導入され, 加えて導入のさいに TK が失われたものとする (図 6). このことは, それぞれのプラスミ

ドを導入した FDC-P2 細胞株から抽出したサザンブロットで, 相同組み換え遺伝子導入が確認された細胞 (pGD⁺ 210TKbcrNeoablreverse (HR)) ではオリジナルである pGD⁺ 210Neo⁻ 導入細胞に認められるバンドよりも約 1 kb 長いことが確認され, それに対して G418, gancyclovir 存在下で増殖した細胞 (pGD⁺ 210TKbcrNeoablreverse (RI*)) では 2 本のバンドが認められ, そのうち 1 つはオリジナルである pGD⁺ 210Neo⁻ 導入 FDC-P2 と同じサイズで, もう一方は全くサイズの異なる部位にバンドを認めたことから示唆された.

考 察

相同組み換えを応用した遺伝子治療は, 導入遺伝子の発現が正常に制御されることや, 導入による遺伝子変化が少ないことなど大きな可能性を秘めている. しかし, 相同組み換えが起こる率が非常に低い上に ES 細胞に比し体細胞ではさらにその効率が低いことから, 組み換え効率を向上させることが今後遺伝子治療に応用する上での大きな課題の 1 つである²⁾³⁾. 今回使用したマウス

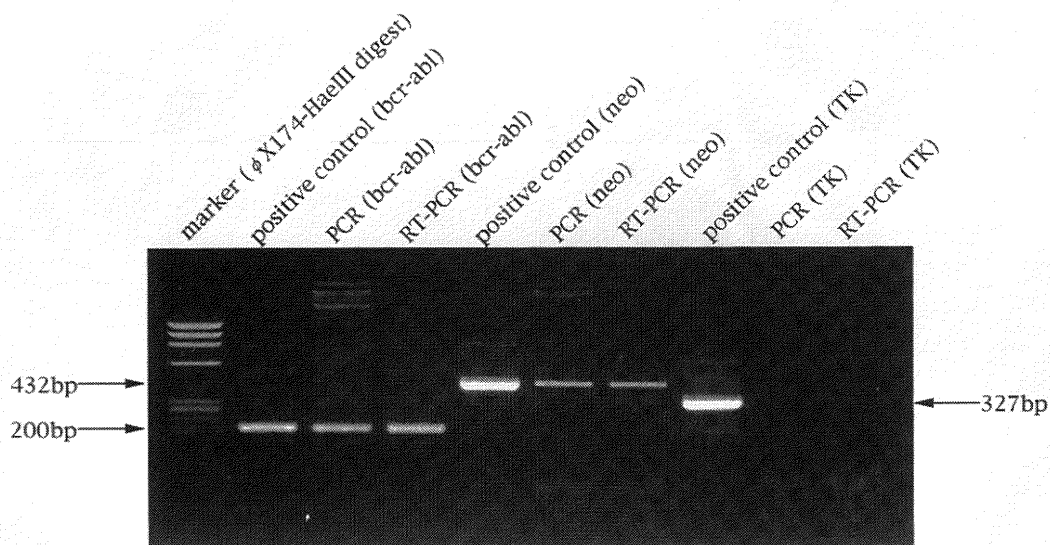


図 6 pGD' 210TKbcrNeoablreverse が導入されたクローンで G418, gancyclovir 存在下での培養にてセレクトされたが bcr-abl を発現したクローンの PCR および RT-PCR 解析. 方法は本文参照. TK 遺伝子は Genome 上に検出されず, また発現も認められなかった.

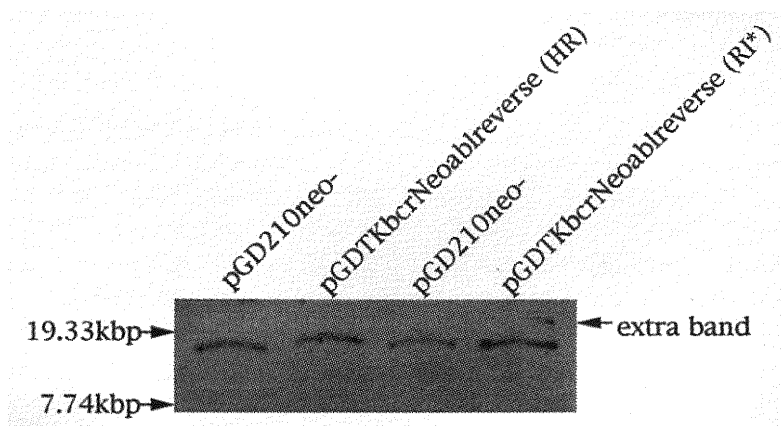


図 7 各種導入細胞のサザンブロット解析. 方法は本文参照. pGD' 210-Neo⁻: pGD' 210Neo⁻ 導入 FDC-P2, pGD' 210TKbcrNeoablreverse (RI*) : pGD' 210TKbcrNeoablreverse が導入された FDC-P2 のうち TK は発現しないが bcr-abl は発現するクローン, pGD' -210TKbcrNeoablreverse (HR) : pGD' 210TKbcrNeoablreverse により相同組み換えが起こったクローン. pGD' 210TKbcrNeoablreverse (HR) では約 1,000 bp 長いバンドが認められ, pGD' 210TKbcrNeoablreverse (RI*) では 2 本のバンドが認められるが, うち 1 本は pGD' 210Neo⁻ に認められるバンドと大きさが一致している. 長いバンドはランダムな位置への挿入であることを示唆している.

骨髄性白血病細胞株 FDC-P2 を用いた系においても、相同組み換えが発生したと考えられる確率はほぼ 10^8 個に1個という低さであった。しかしながら最近では、哺乳動物細胞における遺伝子の組み換えや、修繕に関与するとされる Rad 51 などのヒト組み換え遺伝子がクローニングされてきている¹²⁾。このような遺伝子の生物活性の解明及びその応用により相同組み換えの効率が向上する可能性があるものと考えられる。相同組み換えを意図した導入方法としては、現段階ではウイルスを用いた方法よりも electroporation の有用性が高いと考えられる。実際 Smithies らは鎌状赤血球貧血に対して異常 β -globin 遺伝子を標的とした相同組み換えによる遺伝子置換を成功させている¹³⁾¹⁴⁾。

今回、bcr-abl キメラ遺伝子導入により自律増殖する造血器腫瘍のモデルを作成し、さらに相同組み換えを用いて、導入した異常遺伝子を破壊して、その発現を抑制し、元来 FDC-P2 細胞株が有していた成長因子依存を再度獲得した細胞を得ることに成功したことを示した。相同組み換えを意図しての plasmid 作成においては、

neomycin 耐性遺伝子 (Neo) による positive selection と、thymidine kinase 遺伝子 (TK) による gancyclovir を用いた negative selection を利用した。さらに bcr-abl を逆向きに挿入したプラスミドを用いたのは、相同組み換えを bcr-abl 領域以外のプラスミド部分で発生しにくくするためである。その結果として期待した遺伝子組み換えが確認されるのは、図 8 に示すような遺伝子配列の間で組み換えが起こった場合である。今回得られた1クローンにおいては、以下の点が検索された。1) bcr-abl, Neo 遺伝子の integration が示される。2) TK 遺伝子の integration が否定される。3) Neo 遺伝子の発現が認められ、一方、bcr-abl, TK 遺伝子の発現が認められない。4) bcr-abl 遺伝子のサザンブロットで、bcr-abl よりも Neo 遺伝子の分だけ長いバンドとして検出された。以上のデータから今回得られた1クローンにおいては、目的とした標的遺伝子との相同組み換えが生じているものと考えられる。問題点はやはり組替え効率が非常に低いことであった。しかしながら、造血器腫瘍細胞においても homologous recombination が起こ

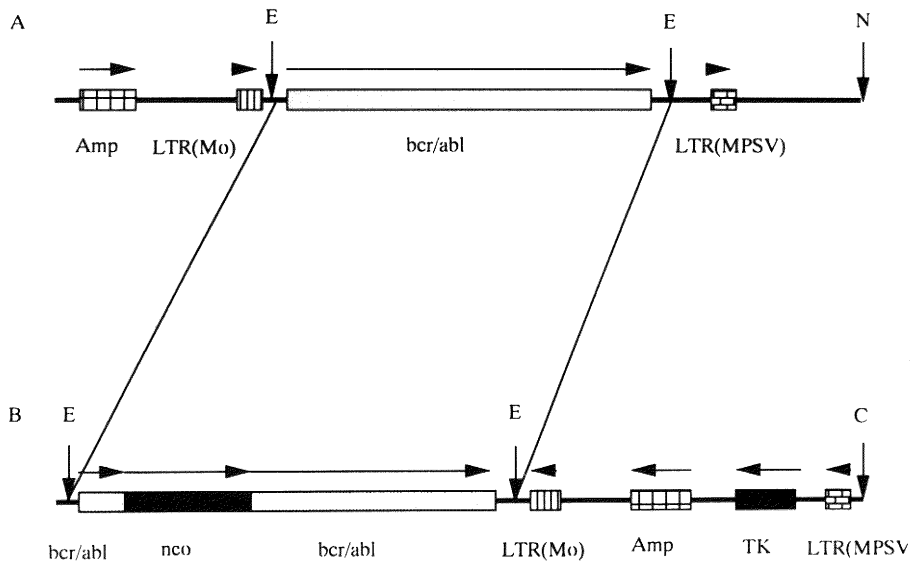


図 8 相同組み換えの模式図。Aは pGD' 210Neo⁻ を Nde I 処理にて線状化したもの、Bは pGD' 210TKbcrNeoablreverse を Cla I 処理にて線状化したもの。LTR: long terminal repeat, Amp: アンピシリン耐性遺伝子, TK: Thymidine kinase gene, Neo: Neomycin resistant gene, E: EcoR I site, N: Nde I site, C: Cla I site, Mo: Molony leukemia virus, MPSV: Myelo-proliferative sarcoma virus, 縦矢印は制限酵素認識部位を示し、横矢印は転写方向を示す。EcoR I 認識部位ではさまれた領域間で相同組み換えが起こることを目的とした。

ることを確認し得たことは、今後の遺伝子治療の1つの方向性を示唆したものである。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲、ご厚情を賜りました相澤義房教授、高橋益廣教授、小池正助教授、岸 賢治講師、古川達雄先生に深謝申し上げます。

参 考 文 献

- 1) **Bronson, S.K. and Smithies, O.:** Altering mice by homologous recombination using embryonic stem cells. *J. Bio. Chem.*, **269**: 27155~27158, 1994.
- 2) **Arbones, M.L., Austin, H.A., Capon, D.J. and Greenburg, G.:** Gene targeting in normal somatic cells: inactivation of the interferon-gamma receptor in myoblasts. *Nature Genetics*, **6**: 90~97, 1994.
- 3) **Shirasawa, S., Furuse, M., Yokoyama, N. and Sasazuki, T.:** Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated Ki-ras. *Science*, **260**: 85~88, 1993.
- 4) **Orna, D., Eli, C. and Robert, P.G.:** Molecular biology of chronic myelogenous leukemia. *Seminars in Hematology*, **25**: 1; 35~49, 1988.
- 5) **Razzelle, K., Jordan, U.G. and Moshe, T.:** The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N. Engl. J. Med.*, **319**: 15; 990~998, 1988.
- 6) **Takahashi, M., Furukawa, T., Tanaka, I., Ohsawa, Y., Nikkuni, K., Aoki, A., Goto, T., Hashimoto, S., Kishi, K., Koike, T., Moriyama, Y. and Shibata, A.:** Transfection of the bcr/abl oncogene into factor-dependent cells by electroporation: Acquisition of autonomous proliferation. *Hematol Oncol*, **12**: 53~60, 1991.
- 7) **Daley, G.Q., Van Etten, R.A. and Baltimore, D.:** Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the p210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome. *Source*, **247**: 824~830, 1990.
- 8) **Steven, L. McKnight.:** The nucleotide sequence and transcript map of the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Nucleic Acid Research*, **8**: 22; 5949~5964, 1980.
- 9) **Dexter, T.M., Garland, J., Scott, D., Scolnick, E. and Metcalf, D.:** Growth of factor-dependent hemopoietic precursor cell lines. *J. Exp. Med.*, **152**: 1036~1047, 1980.
- 10) **Takahashi, M., Furukawa, T., Nikkuni, K., Aoki, A., Nomoto, N., Koike, T., Moriyama, Y., Shinada, S. and Shibata, A.:** Efficient introduction of a gene into the hematopoietic cells in S-phase by electroporation. *Exp. Hematol.*, **19**: 343~346, 1994.
- 11) **Tatsuo, F. and Akira, S.:** Serial detection of residual bcr/abl mRNA by polymerase chain reaction in patients with chronic myelogenous leukemia after bone marrow transplantation. *Leukemia and Lymphoma*, **4**: 263~269, 1991.
- 12) **Shinohara, A., Ogawa, H., Matsuda, Y., Ushio, N., Ikeo, K. and Ogawa, T.:** Cloning of human, mouse and fission yeast recombination genes homologous to RAD51 and recA. *Nature Genetics*, **4**: 239~243, 1993.
- 13) **Smithies, O., Gregg, R.G., Bogs, S.S., Koralewski, M.A. and Kucherlapati, R.S.:** Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β -globin locus by homologous recombination. *Nature*, **317**: 230~234, 1985.
- 14) **Shesly, E.G., Kim, H.S., Shehee, W.R., Papayannopoulou, T. and Smithies, O.:** Correction of a human β -globin gene by gene targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**: 4294~4298, 1991.

(平成9年1月23日受付)