

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究

若手研究者奨励研究報告書

目 次

課題番号

第1分野

20000	13001	アドレノメデュリン投与による重症心不全治療の臨床評価	永谷 憲歳	……	1
1009A	13002	子宮体癌に対するヒト型モノクローナル抗体の作製	福地 剛	……	5
1008A	13003	新しい変異導入法の開発による神経疾患モデルマウスの樹立	笹岡 俊邦	……	10
1010A	13004	病原細菌のコミュニケーションシステムを標的とした医薬品の開発	阿部 章夫	……	15
1006A	13005	糖部立体配座を固定した人工核酸によるアンチセンス医薬品の開発	小比賀 聡	……	20
1007A					

第2分野

1011A	23001	慢性C型肝炎に対するインターフェロン治療効果に関与する宿主因子の解析と医療への応用	土方美奈子	……	29
1012A	23002	ゲノム情報に基づいた移植免疫機構の解明と免疫抑制療法	梨井 康	……	35
1016A	23003	ヒトヘルペスウイルス8による悪性腫瘍発症機構の解明と医療への応用	片野 晴隆	……	42
1013A	23004	血管内造血機構の解明と臍腸間膜動脈より新規造血幹細胞因子の単離	高倉 伸幸	……	47
1014A	23005	BRS-3安定発現細胞系を用いた新規摂食調節ペプチドの同定と病態生理学的意義の解明	宮里 幹也	……	52
1015A	23006	ATP受容体を介した痛み情報伝達機序の解明と医療への応用	小泉 修一	……	57
1018A	23007	トリプトファンによる細胞性免疫の制御	五條 理志	……	61
1019A	23008	気管支喘息における気道リモデリングの制御についての検討	中尾 篤人	……	66
1017A	23009	顔面神経再生に際して発現制御を受ける遺伝子データベースの構築	赤澤 智宏	……	69

第3分野

1020A	33001	循環器病治療薬開発に不可欠な小動物における循環動態テレメトリシステムの開発	佐藤 隆幸	……	73
1022A	33002	有機アニオントランスポーターを介した小腸および腎臓における排出・分泌機構	崔 吉道	……	77
1021A	33003	組換えヒトP450酵素の代謝反応を利用した医薬品等の評価方法の開発	山崎 浩史	……	81

第4分野

1025A	43001	腹膜透析の重篤な合併症である硬化性被嚢性腹膜炎 (Sclerosing Encapsulating Peritonitis) の診断と治療に関する研究	平原 一郎	……	89
1023A	43002	多発性硬化症における病原性T細胞特異的抑制方法の検討	三宅 幸子	……	98
1024A	43003	熱帯病に対する新たな治療薬の開発に関する研究	小出 達夫	……	103

20000	第5分野		
1026A	53001	カルボシラン dendリマーを基本骨格としたペロ毒素中和剤の開発	西川喜代孝 …… 109
1027A	53002	新規抗酸化酵素ペルオキシレドキシンを標的とする抗マラリア薬の開発に関する研究	河津信一郎 …… 113
1028A	53003	Non-typable Haemophilus influenzae 由来リポオリゴ糖抗原に対するペプチドミミックのワクチン応用についての研究	橋本 雅仁 …… 119
1029A	53004	RNAヘリカーゼを標的とする抗ウイルス剤の開発	清水 博之 …… 124
1030A	53005	薬用植物の分子エンジニアリングによる抗酸化物質生産の改良	山崎 真巳 …… 132
	第6分野		
1031A	63001	分子間相互作用制御による高度安定型タンパク質製剤の設計	伊豆津健一 …… 137
1032A	63002	生分解性を有する新規な化学合成ハイドロゲルの開発と組織再建スキャホールドへの応用	山岡 哲二 …… 140
1033A	第7分野		
	73001	ヒト破骨細胞と骨芽細胞培養系を用いた薬物の有効性と安全性に関する検討	和田 誠基 …… 151

新しい変異導入法の開発による神経疾患モデルマウスの樹立

所 属 国立精神・神経センター 神経研究所
疾病研究第七部
研究者 笹岡 俊邦

要旨

新たな遺伝子改変マウス作成法として、特定細胞群で対象遺伝子にアミノ酸置換を導入する独自のシステムを開発し、NMDA受容体のマグネシウムブロック解除による活性化を導入したマウスを作成し、NMDA受容体機能の詳細な解析を可能とした。

1. 研究目的

興奮性神経伝達の代表分子であるNMDA受容体の機能異常は神経細胞死等、多くの神経疾患の病態に関わっていることが示唆されている。NMDA受容体のマグネシウム(Mg)イオンによるブロック(Mgブロック)機能の解除による活性化は、Caイオン透過性調節の中心的性質であり、Mgブロック機能は膜貫通領域の一つのアミノ酸置換により減弱しNMDA受容体の異常活性化が起こることが培養細胞系で示されている。しかし、これまでのNMDA受容体遺伝子ノックアウトマウス、トランスジェニックマウスによる方法では、NMDA受容体のMgブロック機能を特定細胞で変化させ、解析を行うことは困難であった。本研究では、我々が独自に開発した変異導入法を用いて、組織特異的および時期特異的にNMDA受容体のMgブロック機能の解除を導入したマウスを作成することで、NMDA受容体の情報伝達機構を明らかにすること、ならびにNMDA受容体の異常活性化による神経細胞死の機構を解明することを目的とする。さらに、これまでNMDA受容体の阻害薬として臨床応用できる薬剤の開発が待たれる状況にあることから、我々の作成したNMDA受容体アミノ酸置換マウスはNMDA受容体の異常活性化に作用する治療薬開発の基礎研究への応用が期待される。さらに我々の開発した方法を「てんかん」と「パーキンソン病」の関連分子への変異導入に応用し、その病態の理解にふさわしいモデルマウスの樹立もおこなう。

2. 研究方法

我々はこれまでに、マウス個体の特定場面でNMDA受容体に機能変異を導入するため、RNAスプライシング機構とCre-loxP組換え機構を応用し、「特定の組織や発生段階で、対象分子にアミノ酸の変異を導入する新たなシステム」の開発をおこなった。

(1) 目的分子の特定アミノ酸置換を導入する方法の開発： NMDA受容体遺伝子の正常配列エクソンと変異配列エクソンを並列に配置し、正常エクソンの両側にはloxP配列を配置し、2つのエクソン間は特殊な工夫を加えた人工イントロンとした相同組換えベクターを構築し、マウス胚幹(ES)細胞を用いてマウス個体(NMDAR/loxPマウス)を作成した。この状態では人工イントロンの性質により、絶えず正常配列エクソンのみを選択させることが可能であるが、正常配列エクソンを欠失させると変異エクソンが利用され、転写産物にアミノ酸置換が導入される。正常配列エクソンを欠失させる方法として

P1 フェージ由来の Cre-loxP 組換えシステムを利用した。

(2) 特定細胞におけるアミノ酸置換の導入： Nestin 遺伝子プロモーターおよびエンハンサーにより神経細胞特異的に Cre を発現するトランスジェニックマウス(Cre マウス)を用意し、NMDAR/loxP マウスと掛け合わせ、NMDAR/loxP-Cre マウスを得ることにより、神経細胞特異的に NMDA 受容体のアミノ酸置換を導入し、変異導入の様式を観察した。

(3) 電気生理実験による NMDA 受容体の機能解析： 神戸大学医学部生理学講座 真鍋俊也教授の協力を得て、NMDAR/loxP-Cre マウスの NMDA 受容体機能の電気生理的解析を行った。

(4) アミノ酸置換導入後の NMDA 受容体発現様式の解析： 本変異導入方法は内在の NMDA 受容体遺伝子の発現様式を変えないことを目的としていることから、NMDAR/loxP-Cre マウスと対照マウスの NMDA 受容体の発現様式を、ノーザンプロット、ウエスタンプロットにより解析した。

(5) 「てんかん」および「パーキンソン病」の理解に相応しいマウスの作成： 「てんかん」と「パーキンソン病」の病態関連分子である GABA 受容体と、ドーパミン受容体に着目し、それぞれの遺伝子の単離を行った。アミノ酸置換マウス作製の基礎データを得る目的で、当該受容体分子へのアミノ酸変異と受容体の機能の連関を解析する実験系を準備した。

(倫理面への配慮) 本研究のすべての動物実験はマウス個体を対象とし、実験実施施設が定める「動物実験に関する倫理指針」にもとづきおこなった。

3. 研究成果

(1) 特定アミノ酸の変異を導入する方法の開発： 上記の方法により作成した NMDAR/loxP マウスはホモ接合体であっても、成長・繁殖は野生型と変わらず、運動異常などは示さなかった。NMDAR/loxP マウス脳の NMDA 受容体 epsilon1 サブユニット mRNA は正常配列エクソンを読み取っていた。Nestin プロモーターにより神経細胞に Cre recombinase が発現するトランスジェニックマウス(Cre マウス)と掛け合わせ、NMDAR/loxP-Cre マウスを作成した。この NMDAR/loxP-Cre マウスは、発育不全と運動機能異常を示し、NMDA 受容体に Ca イオン透過性を上昇させるアミノ酸置換の導入による神経細胞活動性異常が示唆された。マウスの各臓器における Cre-loxP 組換えによる変異導入の様式を調べたところ、脳、脊髄、及び一部の生殖細胞で変異導入がされていた。脳の各部位での組換えを調べると効率の差はあるが、広く組換えが起っていた。さらに、NMDA 受容体 epsilon1 遺伝子 mRNA を調べたところ、Cre-loxP の作用により正常配列エクソンが欠失した個体(NMDAR/loxP-Cre マウス)においてのみ、変異配列エクソンが利用され変異導入が行われていた。この結果から、本システムでは当初の計画通りに、Cre-loxP 組換え前には正常型遺伝子が発現し、Cre-loxP 組換え後に変異型遺伝子が発現することが明らかになった。

(2) 電気生理実験による NMDA 受容体の機能解析： マウス脳スライスを用いたパッチクランプ実験により、海馬 CA1 領域錐体細胞の NMDA 受容体の Mg ブロック機能の変化がみられた。

(3) Cre-loxP 組換えによる変異導入後の NMDA 受容体の発現様式： NMDAR/loxP-Cre マウスにおいて Cre-loxP 組換え後の NMDA 受容体の発現様式を、ノーザンプロット、ウエスタンプロットにより解析したところ、発現量は対照マウスとほぼ同じであった。この結果から我々のアミノ酸変異導入方法は、内在の NMDA 受容体遺伝子の発現様式に従うので、変異導入による効果のみを解析できる実験系であり、従来のトランスジェニックマウスを用いた実験系の問題点を克服できると考えられた。

(4) 特定の神経細胞に Cre を発現するマウスの作製： 特定の神経細胞群の一つであるドーパミン神

神経細胞を対象とし、遺伝子機能の変化を導入してパーキンソン病に類似する運動異常を示すマウスの作成をすすめている。既にドーパミン神経特異的に遺伝子を発現するプロモーターを用いて、ドーパミン神経特異的に Cre が発現するトランスジェニックマウスを作成し、マーカー遺伝子の発現により Cre-loxP 組換えの作用する細胞を見分けるためのマウスと掛け合わせ、作製されたトランスジェニックマウスの Cre の発現様式を解析中である。また、大脳皮質の神経細胞特異的に変異導入をおこなうことを目的として、大脳皮質特異的に Cre を発現するマウスも準備している。

(5) 「てんかん」および「パーキンソン病」の病態モデルマウス作成への応用： 「てんかん」および「パーキンソン病」の病態に関連する遺伝子として、GABA 受容体及びドーパミン受容体の機能変換マウスの作成の準備として、受容体分子の特定機能に重要なアミノ酸配列の決定をする実験を培養細胞を用いて進めている。

3. 考察

(1) 特定アミノ酸の変異を導入する方法の開発： RNA スプライシングと Cre-loxP 組換え機構を応用して、我々の開発した変異導入法は、当初の計画通りに、Cre-loxP 組換え前には正常型遺伝子が発現し、Cre-loxP 組換え後に変異型遺伝子が発現することが確認され、特定の場面において対照遺伝子の機能変換を解析できるシステムが完成した。これは、従来の遺伝子改変マウス作成法の新たなブレークスルーとなるものである。

(2) 電気生理実験による NMDA 受容体の機能解析： 海馬 CA1 領域錐体細胞の NMDA 受容体の Mg ブロック機能の変化がみられ、計画通りに機能変換も導入されていることが明らかとなった。これまで、NMDA 受容体の Mg ブロック機能は培養細胞レベルで解析されてきたが、われわれの方法により作成した NMDAR/loxP-Cre マウスによって、個体を用いた解析が可能となり、NMDA 受容体活性化による神経細胞死の機構の解析等に貢献することができる。

(3) Cre-loxP 組換えによる変異導入後の NMDA 受容体の発現様式： NMDAR/loxP-Cre マウスにおいて Cre-loxP 組換え後の NMDA 受容体の発現量は対照マウスとほぼ同じであったことから我々のアミノ酸変異導入方法は、変異導入による効果のみを解析できる実験系であり、従来のトランスジェニックマウスを用いた方法では困難であった発現様式の調節の問題点を克服できることがわかった。

(4) 特定の神経細胞に Cre を発現するマウスの作製： Cre 組換え酵素の発現様式を適切に選択することにより、特定の場面に焦点を当てた解析が可能である。また、特定の発達時期に Cre を発現させるシステムについては開発中であるが、特定時期に発現誘導をおこなう前にわずかに Cre が発現してしまう問題点を今後解決する必要がある。

(5) 「てんかん」および「パーキンソン病」の病態モデルマウス作成への応用： 本システムを GABA 受容体及びドーパミン受容体の機能変換マウス作成に応用するためには、導入した変異と機能変化の連関を解析して受容体分子の特定機能に重要なアミノ酸配列を指し示す基礎データを得る目的で培養細胞を用いた実験系を並行して進めることが重要である。

5. まとめ

個体を用いる遺伝子機能解析の方法として、遺伝子改変マウス作成法の従来の問題点にブレークスルーをはかるため、本研究では「特定の細胞群や特定の発生段階で、対象遺伝子にアミノ酸の変異を導入する新たなシステム」の開発を進めてきた。本システムを用いて目的の細胞で NMDA 受容体のマグ

ネシウムブロック機能を解除するアミノ酸置換を導入したマウスが得られ、NMDA 受容体の機能変化を詳細に解析することが可能となった。特に NMDA 受容体の Mg ブロックの解除による異常活性化と Ca の過剰な流入は、神経細胞死過程に関連すると考えられており、情報伝達過程の解析と神経細胞死の病態の解析に有用である。さらに、この変異導入システムは「てんかん」および「パーキンソン病」の関連分子に応用して新たなモデルマウスを作成し、病態の理解を進めたい。

6. 研究発表

(1) Yoshida, M., Hama, H., Ishikawa-Sakurai, M., Imamura, M., Mizuno, Y., Araishi, K., Wakabayashi-Takai, E., Noguchi, S., Sasaoka, T. and Ozawa E.:

Biochemical evidence for association of dystrobrevin with the sarcoglycan-sarcospan complex as a basis for understanding sarcoglycanopathy.

Human Mol. Genet. 9, 1033-1040, (2000)

(2) Wang, Y., Xu, R., Sasaoka, T., Tonegawa, S., Kung, M.-P., and Sankoorikal, E-B.:

Dopamine D2Long receptor-deficient mice display hypolocomotion and reduced level of haloperidol-induced catalepsy.

J. Neurosci., 20, 8305-8314 (2000)

(3) Hagiwara, Y., Sasaoka, T., Araishi, K., Imamura, M., Yorifuji, H., Nonaka, I., Ozawa, E., and Kikuchi, T.:

Caveolin-3 deficiency causes muscle degeneration in mice.

Human Mol. Genet. 9, 3047-3054, (2000)

(4) Sasaoka, T., Imamura, M., Araishi, K., Noguchi, S., Mizuno, Y., Takagoshi, N., Hama, H., Wakabayashi-Takai, E., Yoshimoto-Matsuda, Y., Nonaka, I., Yoshida, M., and Ozawa, E.:

Pathologic analysis of muscle hypertrophy and degeneration in muscular dystrophy in γ -sarcoglycan-deficient mice.

Neuromusc. Disord. (Submitted)

(5) Araishi, K., Sasaoka, T., Noguchi, S., Imamura, M., Takagoshi, N., Yoshida, M., and Ozawa, E.:

Expression of basic fibroblast growth factor (bFGF) is up-regulated in degenerating muscle fibers of β -sarcoglycan-deficient mice. (Submitted)

(6) Noguchi, S., Wakabayashi-Takai, E., Sasaoka, T., and Ozawa, E.:

Analysis of the spatial, temporal and tissue-specific transcription of γ -sarcoglycan gene using transgenic mouse.

FEBS Lett. (in press)

(7) 笹岡俊邦:

「筋：ジストロフィン結合タンパク」

「生体の科学」ノックアウトマウスリスト Vol. 51, No.5, 395-397, 2000年9-10月, 医学書院

平成12年度

創薬等ヒューマンサイエンス研究
若手研究者奨励研究報告書

平成13年11月30日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号

共同ビル（小伝馬町駅前）4F

電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社