

厚生労働科学研究費補助金

長寿科学総合研究事業

高齢者炎症性・難治性肺疾患における病態分子機序の解明  
および新治療法開発の戦略的展開に関する研究

平成16年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 長瀬 隆英

平成17（2005）年 3月

## 目 次

### I. 統括研究報告書

高齢者炎症性・難治性肺疾患における病態分子機序の解明：

生理活性脂質およびペプチドを中心に ..... 1

長瀬 隆英

### II. 分担研究報告

1. 炎症性疾患におけるdefensin発現異常の関与に関する研究 ..... 15

栗原 裕基

2. Gタンパク質共役型受容体を介した生体制御機構の解析 ..... 34

石井 聡

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 51

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 54

総括研究報告書

高齢者炎症性・難治性肺疾患における病態分子機序の解明：  
生理活性脂質およびペプチドを中心に

主任研究者 長瀬隆英 東京大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

老年者における重症肺感染症（特に嚥下性肺炎）、ARDS、特発性間質性肺炎、気管支喘息などは、炎症を主体とする病態であり、治療の困難さや発症頻度から、社会的にも極めて重大な疾患群である。これらの炎症性肺疾患発症機序は未だに不明確であるため、有効な治療法、治療薬も存在せず、画期的な新治療法の開発が急務とされている。本研究では、近年、その生理学的意義が注目されている 1) 脂質性メディエーター、2) 抗菌ペプチド、および 3) CGRP ファミリー（CGRP, adrenomedullin）などに着目し、老年者炎症性肺疾患発症との関連を探索した。その結果、以下の新知見が得られた。

1) 白血球遊走に関与するロイコトリエン B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) 受容体の遺伝子ノックアウトマウスを新たに作成し、LTB<sub>4</sub> 受容体遺伝子ノックアウトマウスのホモ接合体・生存個体が得られた。

2) LTB<sub>4</sub> 受容体遺伝子ノックアウトマウスを用いた解析により、気管支喘息モデルにおける気道過敏性、炎症細胞浸潤に LTB<sub>4</sub> 受容体が関与することが示唆された。

3) 加齢による innate immunity への影響を検討するため、加齢マウスを用いて beta defensin の発現を検討した。その結果、マウス β-defensin は舌、精巣上体、食道、気管など広範に発現を認めた。特に、舌において最も強い発現を確認した。さらにその発現は加齢にて減少傾向がみられたことより、高齢者の肺炎発症における局所関連因子の可能性も考えられる。

4) AM 遺伝子欠損マウスにおいて気道過敏性が亢進することが明らかとなった。このことより内因性 AM の減少が、気道過敏性の亢進に関与することが示唆される。

以上の知見は、難治性の老年者呼吸器系炎症性疾患に対する新しい治療薬開発の実現化に寄与することが期待される。

分担研究者

栗原裕基・東京大学大学院医学系研究科教授

石井 聡・東京大学大学院医学系研究科講師

A. 研究目的

老年者における重症肺感染症（特に嚥下性肺炎）、ARDS、特発性間質性肺炎、

気管支喘息などは、炎症を主体とする病態であり、治療の困難さや発症頻度から、社会的にも極めて重大な疾患群である。これらの炎症性肺疾患発症に関しては、種々の化学物質が複雑に関与していると考えられ、TNF $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8等のサイトカインなどが関与している可能性が報告されている。しかし、サイトカイン以外のメディエーターとの関連については、十分な検討がなされていない。また、治療の標的が不明確であるため、有効な治療法、治療薬も存在せず、画期的な新治療法の開発が急務とされている。本研究では、近年、その生理学的意義が注目されている 1) 脂質性メディエーター、2) 抗菌ペプチド、および 3) CGRP ファミリーなどその他のメディエーターに着目し、老年者炎症性肺疾患発症との関連を探索する。

### 1) 脂質性メディエーター：

脂質性メディエーターであるプロスタグランジン、トロンボキサン、ロイコトリエンなどはエイコサノイドと総称され、アラキドン酸を起点とする代謝経路の代謝産物である。アラキドン酸は、炭素数 20 よりなる構造をもち、生体ではリン脂質から細胞質型ホスホリパーゼ A<sub>2</sub>(cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>, cPLA<sub>2</sub>)によって切り出される。この際に、同時にリゾPAF (lyso-PAF)が生成され、リゾPAF から血小板活性化因子 (platelet-activating factor, PAF)が作られる。アラキドン酸は、図 1 に示すように、アラキドン酸カスケードと呼ばれる代謝経路を経て様々なエイコサノイドを生成する。その 2 つの大きな経路が、シクロオキシゲナーゼ (cyclooxygenase,

COX) 系および、5-リポキシゲナーゼ (5-lipoxygenase, 5-LO) 系である。プロスタグランジン、トロンボキサンはシクロオキシゲナーゼ系の代謝物であり、ロイコトリエンは 5-リポキシゲナーゼ系の代謝物である。

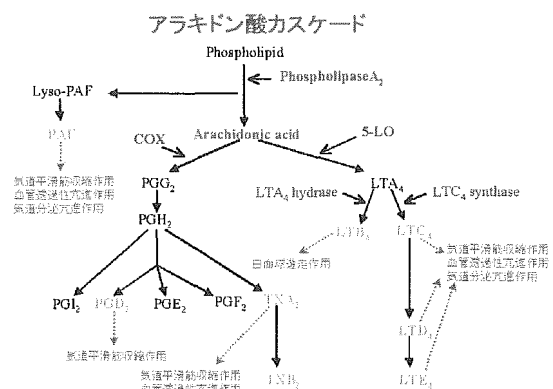


図 1 アラキドン酸カスケードの模式図

アラキドン酸カスケードの代謝産物であるエイコサノイドは、ごく微量で多彩な生理活性作用を呈するのが特徴である。呼吸器系においても、エイコサノイドは極めて重要な生理的意義を有することが示唆されている。例えば気管支喘息は、気道平滑筋収縮、血管透過性亢進、血管拡張等による気管支収縮を主体とする病態であり、種々の化学物質が複雑に関与していると考えられるが、近年、特にトロンボキサン、ロイコトリエンなどのエイコサノイドが重要な発症因子とされ、有効な治療標的となりつつある。

PAF およびエイコサノイドは、その生理活性作用より、炎症性肺疾患の発症メカニズムに寄与している可能性が推察されるが、未だに検証されていない。本研究では、発生工学的手法を応用し、脂質性メディエーターの炎症性肺疾患発症機序における重要性について検討する。特

に、ARDS、特発性間質性肺炎、気管支喘息などにおける、PAF およびエイコサノイド関連遺伝子の意義を明らかにする。さらに、白血球遊走に関するロイコトリエン B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) 受容体の遺伝子ノックアウトマウスを新たに作成し、解析・検討を行う。以上を総括して、治療の標的を明確にし、有効な治療法、治療薬の開発および実用化を目的とする。

## 2) 抗菌ペプチド：

近年、生体における感染防御機構の一環として、抗菌ペプチド defensin の存在が注目されている。ヒトでは、抗菌ペプチドとして alpha-defensin (6 種類) および beta-defensin (4 種類) が発見されており、その抗菌作用によって感染防御に関与していることが想定される。特に、最近発見された human beta-defensin-2 (hBD2) および hBD3 は、皮膚や呼吸器系に存在し、細菌・真菌感染や TNF $\alpha$  等の炎症性サイトカイン刺激によって誘導・産生され、感染防御および炎症調節機序に重要な役割を果たしている可能性が考えられる (*Nature* 1997, *J Biol Chem* 2000)。さらに、この hBD2 は、ケカイン CCR6 を介して T cell を遊走させ、免疫機序活性化にも関与することが報告されている。

2000 年以降、マウスなどにおいて新しい defensin が次々と発見され、GenBank のデータ上でも、新しい defensin が次々と報告されている。本研究者らが発見した mBD6 (*J Biol Chem* 2001) は、従来の報告と異なって、骨格筋に多量に存在することが報告された。さらに、ヒトおよびマウスの精巣上体において特異的に発現する defensin (hBD5,6 および mBD11,12)

を発見し、やはり抗菌活性を有することを報告した。本知見より、defensin の多彩な生理学的機能が推測される。現在まで判明しているマウス beta defensin は以下の通りである。

### mouse beta defensins

	発現している部位	誘導性	抗菌活性	参考文献
mBD1	様々な臓器の上皮細胞 (特に多いのは腎臓)	constitutive	グラム陰性菌 グラム陽性菌	<i>FEBS Lett.</i> 1997 <i>Infect Immun.</i> 1998
mBD2	腎臓、気道	inducible	報告なし	<i>FEBS Lett.</i> 1999
mBD3	肺、小腸、肝臓など	inducible	グラム陰性菌 グラム陽性菌	<i>Infect Immun.</i> 1999
mBD4	舌、気管、食道	constitutive	報告なし	<i>J Biol Chem.</i> 2000
mBD5	報告なし		報告なし	
mBD6	骨格筋、食道、舌、気管	inducible	グラム陰性菌	<i>J Biol Chem.</i> 2001
mEP2e	精巣上体		グラム陰性菌	<i>J Immunol.</i> 2002
mBD11	精巣上体		グラム陰性菌	<i>J Immunol.</i> 2002
mBD12	精巣上体		グラム陰性菌	<i>J Immunol.</i> 2002

図 2 マウス beta defensin の一覧表

高齢者肺炎をはじめとする炎症性呼吸器疾患においては、感染症が重要な病態悪化因子となっており、defensin を含めた感染防御機構および炎症成立機序の解明が研究推進上、必須と考えられる。本研究では、主にマウスを用いて抗菌ペプチド defensin の炎症性呼吸器疾患発症分子機構への関与について検討を加える。さらに、加齢による defensin 発現の影響および生体調節への変化について探索する。

## 3) CGRP ファミリー：

近年、炎症を促進あるいは抑制する生理活性因子として、エンドセリン-1 (endothelin-1, ET-1)、アドレノメデュリン (adrenomedullin, AM)、calcitonin gene-related peptide (CGRP) などのペプチドが注目されている。ET-1 は、炎症促進、血管・気管支平滑筋収縮、エイコサノイド産生、サイトカイン産生刺激能を有す

ることが報告されている (T.Nagase. *Am. J. physiol.* 1995)。一方、CGRP は、炎症抑制、血管・気管支平滑筋の拡張・弛緩作用を有しており (T.Nagase. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996)、アドレノメデュリンも同様の血管平滑筋拡張・弛緩作用が報告されている。CGRP およびアドレノメデュリンは、受容体を共有することが報告されており、CGRP ファミリーと呼ばれるペプチド群に属している。CGRP およびアドレノメデュリンは、気管支喘息や ARDS の発症メカニズムに重要な役割を担っている可能性が考えられるが、国内・海外において未だ十分な検討がなされていないのが現状である。生理活性作用を有する循環ペプチドは、気管支喘息などの治療薬開発の標的としても画期的な系であると考えられる。

本研究では、この CGRP およびアドレノメデュリン遺伝子の気管支喘息発症機序への関与について探索する。CGRP は 37 アミノ酸残基より構成され、循環器・神経系を中心に多彩な作用を有することが知られている。肺・気管支には CGRP を含む感覚神経 C-fiber が豊富に存在し、また receptor も豊富に存在することが報告されている。従って、気道過敏性発症機序に関与する可能性が想定されるが、未だ十分に検討されていない。最近、CGRP 遺伝子欠損マウスが作成され (Oh-hashii. *Circ. Res.* 2001; 89: 983-990)、CGRP が循環動態に重要であることが報告されている。本研究では、この CGRP 遺伝子欠損マウスを用いて、CGRP の気道過敏性発症機序への関与について検討を加える。

Figure 3. Amino acid sequence of CGRP family peptides. The amino acid sequence of the CGRP family peptides is shown. The amino acid sequence of the CGRP family peptides is shown. The amino acid sequence of the CGRP family peptides is shown.

AM	YRQSMANFQGLRSEG	RFG	TV K	HQLYQFTDKD	D VA	RSKI	ROG	-NH2
CGRP	A	DTA	VTHR	GLLSRSGGVV	N FV	TNFG	KA-F	-NH2
CGRP II	A	NFA	VTHR	GLLSRSGGMV	S FV	TNFG	KA-F	-NH2
amylin	K	NFA	AT R	NFLVHSSNNEGALLSS	TNFG	NT-		-NH2

環状構造

図3 CGRP ファミリーペプチド群のアミノ酸配列

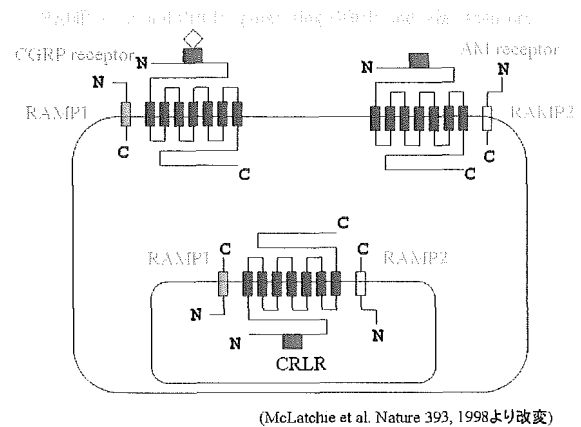


図4 CGRP ファミリーの受容体。肺には豊富に存在するが、その機能は未だに不明である。

**<本研究の意義>** 脂質性メディエーター、抗菌ペプチド、CGRP などの生理活性ペプチドは、呼吸器系炎症の発症・制御に寄与している可能性が高く、治療薬開発の標的として有望であることが期待される。本研究成果は、難治性の老年者呼吸器炎症性疾患に対する新治療薬開発の実現化に寄与することが予想される。本研究は、1)難治性炎症性疾患の病態解明、2)ゲノム創薬、を志向した

独創的なものであり、高齢者炎症性肺疾患治療の戦略的開発展開を目指している。社会的重要性の高い高齢者炎症性肺疾患に対する治療薬開発は、社会医学・医療福祉・医療経済的にも莫大な貢献をなすものであり、厚生行政に寄与することが期待される。

## B. 研究方法

### 1) 脂質性メディエーター：

#### <LTB<sub>4</sub> 受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成>

高齢者炎症性肺疾患において、白血球遊走・賦活化は極めて重要な位置を占めると考えられる。本研究では、白血球遊走に關与するロイコトリエン B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) 受容体の遺伝子ノックアウトマウスを新たに作成し、その機能解析を行う。

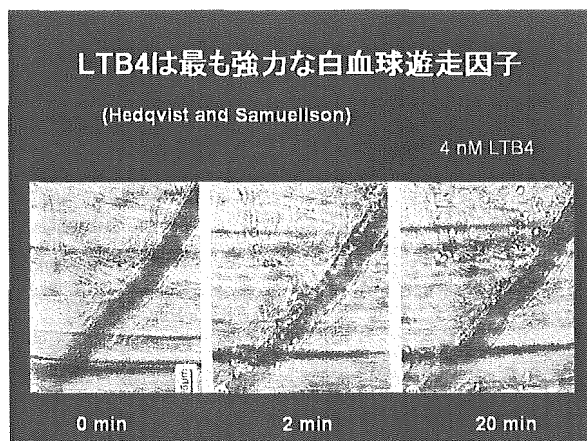


図5 ロイコトリエン B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) 投与により白血球遊走が生じる様子 (1982 年、Samuëllson が Nobel Lecture で提示)。

1997 年、東京大学の横溝らは、世界ではじめてロイコトリエン B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) 受容体のクローニングに成功し(*Nature* 1997)

した。そこで本研究グループは、LTB<sub>4</sub> 受容体遺伝子ノックアウトマウス (以下 LTB<sub>4</sub>R-KO マウス) の作成に着手した。本年度は発生工学的技術を用いて LTB<sub>4</sub>R-KO マウスを完成させ、LTB<sub>4</sub> 受容体遺伝子の疾患への寄与度を検索することを目指した。

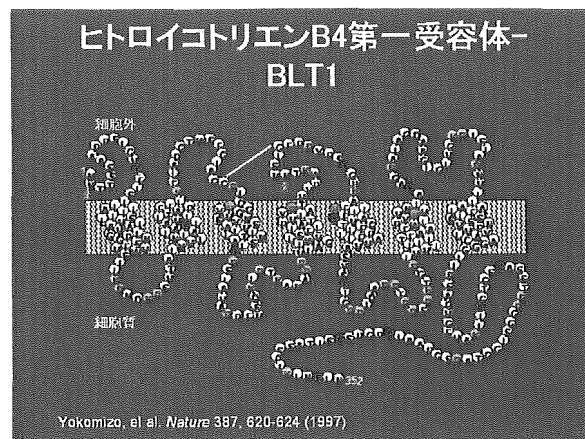


図6 ロイコトリエン B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) 第1受容体 (BLT1) の構造。

<炎症性肺疾患における LTB<sub>4</sub> 遺伝子発現の関与> 炎症性肺疾患モデルとして、ARDS、特発性間質性肺炎、気管支喘息の動物モデルを用いる (*T.Nagase, J.Clin.Invest.* 1999; *T.Nagase, Nature Immunology* 2000)。マウス各群に、塩酸気管内投与 (ARDS)、ブレオマイシン気管内投与 (特発性間質性肺炎)、抗原感作 (気管支喘息) などの処置を行い、生理学的、生化学的、免疫組織化学的、分子生物学的検討により、LTB<sub>4</sub> 遺伝子発現と炎症性肺疾患の關係について評価・検討を加える。

### 2) 抗菌ペプチド：

<未知の defensin の探索> マウスを中心に、未発見の defensin を探索する。

defensin 遺伝子は、クラスターを形成して存在することが推測されており、mBD1-6 遺伝子の近傍をスクリーニングし、未知の defensin 遺伝子を同定する。また、ヒトゲノム情報を参考に、マウス defensin に相同する未知のヒト defensin を探索し、発見された場合は、抗菌活性を含め生理学的意義を検討する。

### <加齢による mBD 発現の変化：LPS による誘導発現>

高齢者における innate immunity の変化を検討するため、加齢マウスを用いて beta defensin の発現を検討した。C57BL/6 若年群（4ヶ月令）および老年群（20ヶ月令）の2群を用い、LPS 投与による mBD 発現を各臓器において比較検討した。

### 3) CGRP ファミリー：

#### <AM の気道過敏性発症機序への関与>

Shindoらによって確立された AM ノックアウトマウス（ヘテロ接合体）と、その littermate コントロールの野生型マウスを用いた。アレルギー性気管支喘息モデルとして、ovalbumin による抗原感作・吸入負荷を施行した。実験第15日に、気道反応性試験・気管支肺胞洗浄液サンプリング・肺組織サンプリングなどを施行した。

まず MCh 気道反応性を検討するため、MCh を aerosol 吸入投与し、反応性を検討した。別群において、気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid, BALF)を採取・遠心分離し、細胞成分・上清を得て解析した。肺組織については気道炎症を中心に評価した。

(倫理面への配慮)

動物実験に際しては、東京大学医学部動物実験施設内規に則して、動物愛護への配慮を最大限に行った。

## C. 研究結果

### 1) 脂質性メディエーター：

#### <LTB<sub>4</sub>R-KO マウスの作成>

LTB<sub>4</sub>R-KO マウスの作成プロセスは順調に進展した。キメラマウスの中で、germ line にノックアウト DNA コンストラクトが移行したものを選び、ヘテロ接合体を得た。このヘテロ接合体からさらにホモ接合体 LTB<sub>4</sub>R ノックアウトマウスが得られた。ホモ接合体 LTB<sub>4</sub>R ノックアウトマウスは、胎内死亡および周産期死亡を呈さず、生育も野生型マウスと差異を認めなかった。

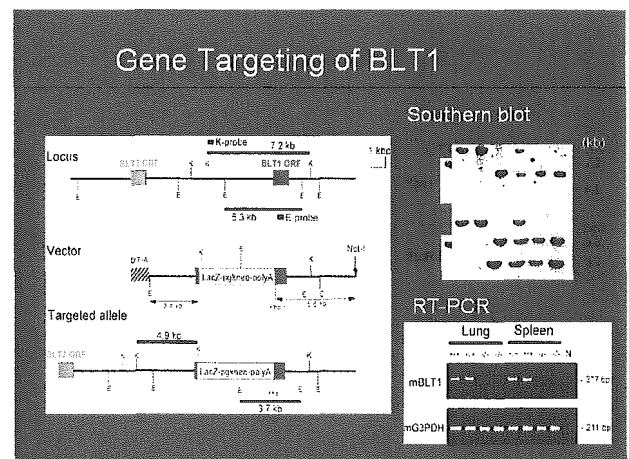


図7 ロイコトリエン B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) 第1受容体 (BLT1) ノックアウトマウスの作成。

確立された BLT1 ノックアウトマウス（ホモ接合体）と、その littermate コントロールの野生型マウスを用いて、気管支喘息モデルにおける検討を行った。アレルギー性気管支喘息モデルとして、ovalbumin による抗原感作・吸入負荷を施行した。その結果、LTB<sub>4</sub> ノックアウ



トマウスでは、感作されたノックアウトマウス群は、野生型群と比べて MCh 気道反応性が低下していることが示唆された。BALF 解析において、ノックアウトマウス群では eosinophilia が著明に軽減していることが認められた。BALF 中の Th2 サイトカイン(IL-5、IL-13)も、ノックアウトマウス群では著明に軽減していた。

### Reduced Methacholine Response in BLT1-null Mice

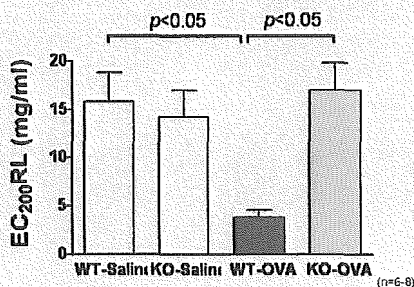


図8 Methacholine (MCh) 気道反応性。OA 感作・野生型群で認められる気道過敏性が、OA 感作・BLT1 ノックアウトマウス群では有意に抑制されている。

### Reduced Eosinophil Accumulation in BLT1-null Mice



No change in Eotaxin and MCP-1 $\alpha$  in BALF

図9 BALF 中の細胞。OA 感作・野生型群では好酸球が著明。OA 感作・BLT1 ノックアウトマウス群では好酸球を認めるが少ない。

### Inflammatory Cells in BALF

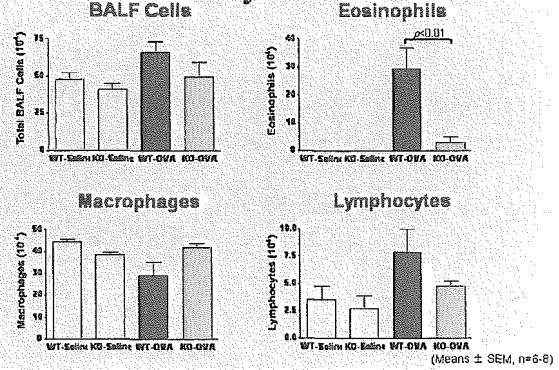


図10 BALF 中の白血球細胞分画。OA 感作・野生型群で認められる好酸球浸潤が、OA 感作・BLT1 ノックアウトマウス群では抑制されている。

### Th2 Cytokines Are Reduced in BALF

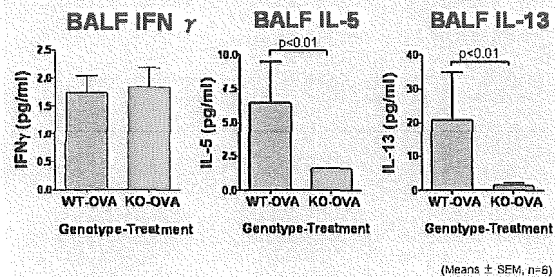


図11 Th2 サイトカイン(IL-5、IL-13)も、ノックアウトマウス群では著明に軽減。

## 2) 抗菌ペプチド:

<defensin の抗菌作用機序> hBD2 を中心に、defensin の抗菌メカニズムを探索した。defensin は、Na<sup>+</sup>の存在によって濃度依存的に抗菌活性を消失することが知られており、イオン環境が抗菌作用発現に重要と考えられる。今回、新たに Ca<sup>2+</sup>など陽イオンの存在が、hBD2 抗菌活性を減弱することを明らかにした。

<defensin の誘導・発現分子機構> hBD2 の誘導・発現分子機構を、ヒト気

道培養細胞を用いて検討した。hBD2-mRNA 発現等を指標として、LPS による hBD2 発現を検討した。その結果、1) 転写因子 (AP-1, NFκ-B) が hBD2 誘導・発現に必須であること、2) steroid が hBD2 誘導・発現を減弱すること、3) COX inhibitor は hBD2 誘導・発現に影響を与えないことを明らかにした。

**<マウス defensin の探索>** 新たに 6 番目のマウス beta defensin を発見し、mBD6 と命名、発表した。mBD6 は、筋肉に多く分布し抗菌活性を呈した。さらに、ヒトおよびマウスの精巣上体において特異的に発現する defensin (hBD5,6 および mBD11,12) を発見し、やはり抗菌活性を有することを報告した。本知見より、defensin の多彩な生理学的機能が推測される。

**<加齢による mBD 発現の変化：LPS による誘導発現>**

C57BL/6 若年群 (4 ヶ月令) および老年群 (20 ヶ月令) における LPS 誘導性 mBD 発現を各臓器において比較検討した。

mBD-3 は、LPS 投与群において舌で強い発現が認められ、誘導型の β-defensin であることが確認された。その発現は高齢マウスにて減少傾向が認められた。

一方、mBD-11、mBD-12 および mEP2e は、精巣上体に特異的に発現しており、その発現強度は LPS 投与の影響を受けなかった。

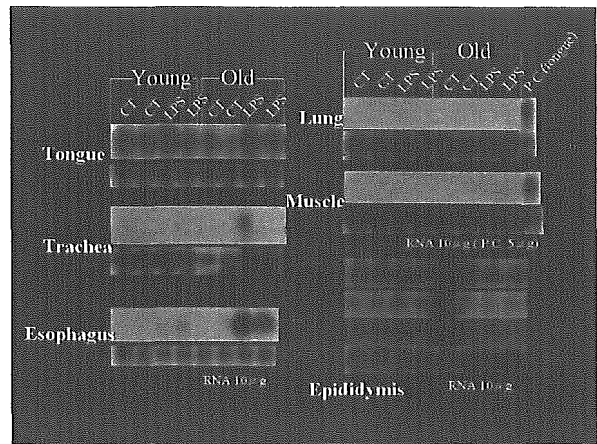


図 1 2 C57BL/6 若年群 (4 ヶ月令) および老年群 (20 ヶ月令) における LPS 誘導性 mBD 遺伝子発現。

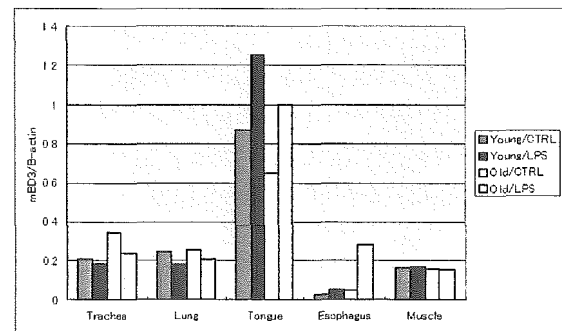


図 1 3 C57BL/6 若年群 (4 ヶ月令) および老年群 (20 ヶ月令) における LPS 誘導性 mBD 遺伝子発現。mBD-3 は、LPS 投与群において舌で強い発現が認められた。その発現は老年群にて減少傾向が認められた。

**3) CGRP ファミリー：**

**<AM の気道過敏性発症機序への関与>**

MCh 気道反応性において、感作された野生型群では、saline 群に比べ有意に肺抵抗が増加していた。一方、感作された AM ノックアウトマウス群は、野生型群と比べて有意に肺抵抗が上昇しており、MCh 気道反応性が亢進していることが

示唆された。

BALF 細胞分画解析において、感作により著明な eosinophilia が認められたが、野生型・ノックアウトマウス両群間において有意差は認めなかった。また両群間で BALF IgE 濃度の有意差は認めず、

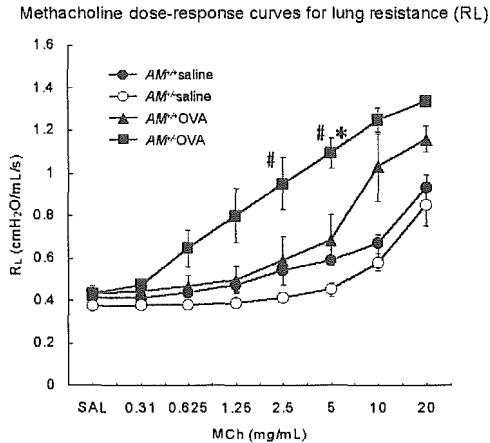


図 1 4 Methacholine (MCh) 投与における肺抵抗の反応

MCh 吸入投与において、ovalbumin (OA) 感作・AM ノックアウトマウス群は、肺抵抗 ( $R_L$ )が他群よりも有意に高い。

# $P < 0.05$  vs the other groups.

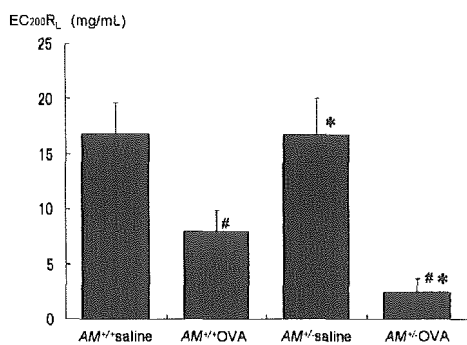


図 1 5 Methacholine (MCh) 気道反応性。

OA 感作・AM ノックアウトマウス群は、気道反応性が他群よりも有意に高い。

# $P < 0.05$  vs saline groups.

抗原感作レベルも同等であることが示唆された。

組織所見では、感作により著明な気道炎症が認められたが、野生型・ノックアウトマウス両群間において有意差は認めなかった。

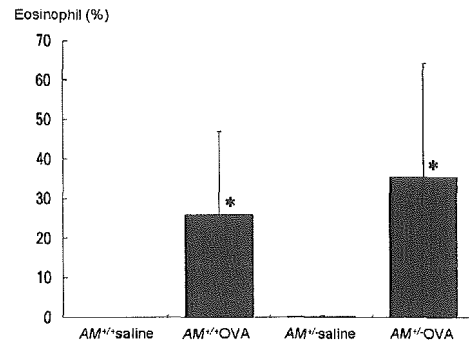


図 1 6 OA 感作による肺内好酸球浸潤。

BALF 好酸球は、OA 感作群で、saline 群に比べ有意に上昇していた。一方、野生型・ノックアウトマウス群の両群間に有意差は認められなかった。

\* $P < 0.05$  vs the saline groups.

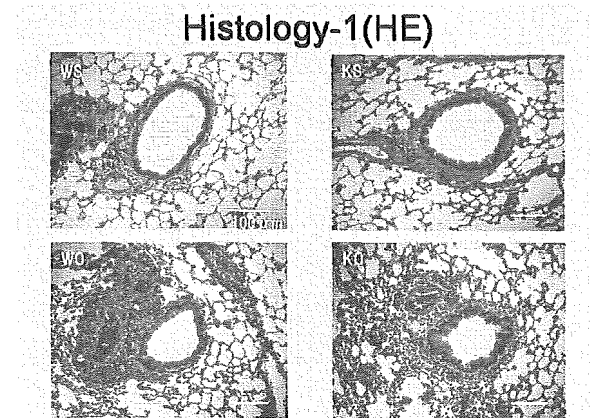


図 1 7 OA 感作による気管支周囲炎症

細胞浸潤。OA 感作群で、気管支周囲炎症細胞浸潤を認めるが、野生型・ノックアウトマウス群の両群間に差は認められなかった。

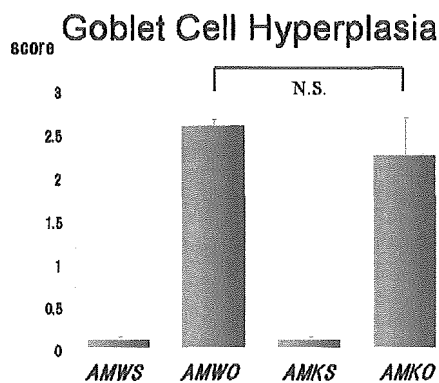


図18 OA感作による気道上皮杯細胞過形成。OA感作群で、杯細胞過形成を認めるが、野生型・ノックアウトマウス群の両群間に差は認められなかった。

#### D. 考察

##### 1) 脂質性メディエーター:

##### <LTB<sub>4</sub>受容体遺伝子ノックアウトマウス>

PAF、プロスタグランジン、トロンボキサン、ロイコトリエンなどは、多彩な生理活性作用を有するメディエーターであり、呼吸器系炎症性疾患の発症メカニズムに寄与している可能性が極めて高い。特に、高齢者炎症性肺疾患において、白血球遊走・賦活化は極めて重要な位置を占めると考えられる。本研究では、白血球遊走に関与するロイコトリエン B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) 受容体の遺伝子ノックアウトマウスを新たに作成し、その機能解析を目指した。

1997年、東京大学の横溝らは、世界ではじめてLTB<sub>4</sub>受容体のクローニングに成功し(*Nature* 1997)した。LTB<sub>4</sub>受容体は、G-protein coupled receptor (GPCR) 群のひとつであり、系統樹としてはPAF受容体やCysLT1受容体からはやや遠い位置にある。

Phylogenetic Tree of various GPCRs

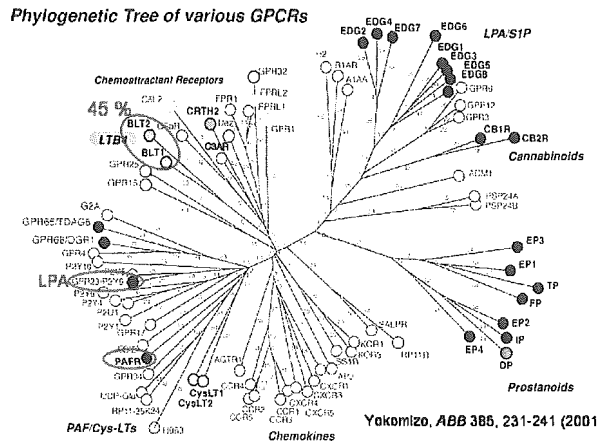


図19 GPCRの系統樹。

本研究グループは、LTB<sub>4</sub>受容体遺伝子ノックアウトマウスの作成に着手し、LTB<sub>4</sub>受容体遺伝子の疾患への寄与度を検索することを目指した。その結果、ホモ接合体LTB<sub>4</sub>Rノックアウトマウスは、胎内死亡および周産期死亡を呈さず、生育も野生型マウスと差異を認めなかった。この知見は、LTB<sub>4</sub>が生殖・発達に大きく寄与しない可能性を提示するものである。

LTB<sub>4</sub>Rノックアウトマウスが出生時形態的奇形を呈しておらず、発育・成長においてもコントロールの野生型マウスと比べ全く差を認めていないという知見は、たとえばLTB<sub>4</sub>拮抗薬治療薬の開発・実用化の見通しに寄与すると考えられる。

また、LTB<sub>4</sub>R-KOマウスを用いて、気管支喘息モデルにおける検討を行った。その結果、LTB<sub>4</sub>ノックアウトマウスでは、感作されたLTB<sub>4</sub>R-KOマウス群は、野生型群と比べてMCh気道反応性が低下していることが示唆された。またBALF解析において、ノックアウトマウス群ではeosinophiliaが著明に軽減していることが認められた。BALF中のTh2

サイトカイン(IL-5、IL-13)も、ノックアウトマウス群では著明に軽減していた。この実験結果より、LTB<sub>4</sub>受容体が気管支喘息モデルにおいて、気道過敏性および好酸球浸潤の発現に決定的な意義を有していることが示唆された。

なお今後は、本研究により確立されたLTB<sub>4</sub>R -KO マウスを用いて ARDS モデル (Nagase, *Nature Immunol*, 2000)や肺線維症 (特発性間質性肺炎) モデル (Nagase, *Nature Medicine*, 2002)の検討を進める予定である。今後、LTB<sub>4</sub>を含めて各々のエイコサノイドがもつ生理的意義・重要性が解明されることにより、高齢者の難治性呼吸器疾患に対する有効な治療法・治療薬の開発および実用化が期待される。

## 2) 抗菌ペプチド :

<defensin の抗菌作用発現機構> ヒトにおいて human beta defensin-2 (hBD2) が発見され、皮膚や呼吸器系において感染防御および炎症調節機序に重要な役割を果たしている可能性が報告されてから (*Nature*, 1997)、defensin は、感染防御機構の重要な構成因子として急速に注目されつつある。さらに hBD2 が、ケモカイン CCR6 を介して T cell を遊走させ、免疫機序活性化にも関与することが報告され (*Science* 1999)、免疫学的にもその重要性が着目されている。しかしながら、defensin の抗菌メカニズムをはじめ、その発現機構は未だ解明されていない。たとえば、defensin は、Na<sup>+</sup>の存在によって濃度依存的に抗菌活性を消失することが知られており、イオン環境が抗菌作用発現に重要と考えられるが、生体内における defensin の抗菌作用は全く未知であり、

生体内イオン環境における抗菌活性の検討が必須である。また、TNF などの炎症誘起性サイトカインが defensin の誘導・産生に寄与することが報告されているが、その他の主要な炎症促進・制御メディエーター (エイコサノイド、PAF など) の defensin の誘導・産生への関与に関しては不明であり、現在、本研究グループが着手しつつある。

## <加齢による mBD 発現の変化 : LPS による誘導発現>

加齢による innate immunity への影響を検討するため、加齢マウスを用いて beta defensin の発現を検討した。その結果、複数のマウス  $\beta$ -defensin は舌、精巣上体、食道、気管など広範に発現を認めた。特に、舌において最も強い発現を確認した。抗菌ペプチドである  $\beta$ -defensin の舌における発現は、口腔内常存菌の制御に関与している可能性が示唆される。さらにその発現は加齢にて減少傾向がみられたことより、高齢者の肺炎における局所関連因子の可能性も考えられる。

今後さらに症例を重ねた検討および組織発現分布などの検討が必要と思われる。また、PAFR-KO などを用いた加齢マウス実験の検討を行うことにより、加齢現象と innate immunity の関係および疾患発症メカニズムについて、さらに明らかになることが予想され、現在、マウスの加齢化を進行させつつある。

## 3) CGRP ファミリー :

### <AM の気道過敏性発症機序への関与>

CGRP ファミリーの一員である adrenomedullin (AM)も循環器・呼吸器系に豊富に存在し、強力な生理活性作用を有することが報告されている。AM は、

血管平滑筋を弛緩させることが報告されるが、多量に存在するにもかかわらず呼吸器系における病態生理学的意義は不明であった。近年、AM 遺伝子欠損マウスが作成され、AM が発生や循環動態に重要であることが報告されている。AM 遺伝子欠損マウスのホモ接合体は、胎内において死亡するため、生存個体を得ることが不可能である。このため本研究では、ヘテロ接合体の AM 遺伝子欠損マウスを用いて、AM の気道過敏性発症機序への関与について検討した。その結果、AM 遺伝子欠損マウスにおいて気道過敏性が亢進することが明らかとなった。一方、感作により著明な気道炎症が認められたが、野生型・ノックアウトマウス両群間において有意差は認めなかった。

このことより内因性 AM の減少が気道過敏性の亢進に関与することが示唆され、そのメカニズムの解明を進行中である。

#### <本研究成果の重要性>

高齢者における炎症性肺疾患は、社会的に極めて重大な疾患となっている。特に、ARDS、特発性間質性肺炎は、難治性、致死性において他に類をみない程、重篤な疾患であり、治療薬の開発が切実に待たれている。肺炎や気管支喘息は、世界的にも発症頻度、死亡率が増大しつつあり、画期的な治療薬の開発が期待されている。これら炎症性呼吸器疾患の発症分子機構は、極めて複雑であり、より一層の研究が必要である。また、感染症が重要な病態悪化因子となっており、defensin を含めた感染防御の視点も必須と考えられる。

PAF およびエイコサノイド（プロスタグランジン、トロンボキサン、ロイコトリエン）は、多彩な生理活性作用を有す

るメディエーターであり、気管支喘息やARDSなど呼吸器系炎症性疾患の発症メカニズムに寄与している可能性が極めて高い。特に、アラキドン酸カスケードの起点となる酵素である cPLA<sub>2</sub> は、治療薬開発のターゲットとして有望であることが期待される。また、LTB<sub>4</sub> ノックアウトマウスからの知見により、LTB<sub>4</sub> の阻害薬が実用化されることも期待される。

以上より本研究の成果は、難治性の高齢者呼吸器系炎症性疾患に対する新しい治療薬開発の実現化に寄与することが予想される。

本研究の成果により、LTB<sub>4</sub>、cPLA<sub>2</sub> や defensin、CGRP、AM などをはじめとして、炎症抑制治療の標的を明確にした場合、有効な治療法・治療薬の開発および実用化は近いと思われる。発生工学的手法を用いたアプローチは、難治性炎症性疾患の病態解明および未知の遺伝子機能解析において新しい視点を提供する独創的なものであり、本研究の成果は炎症性肺疾患治療の展開に重要な寄与をなすものと考えられる。また発生工学的技術を用いた研究は、薬剤開発のプロセスを短縮し、実用化に大きく寄与することが予想される。高齢者における重症肺炎、ARDS、特発性間質性肺炎、難治性気管支喘息に対する治療薬の開発は、社会医学的にも医療福祉・医療経済的にも莫大な貢献をなすことが期待される。

#### E. 結論

1) 白血球遊走に関与するロイコトリエン B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) 受容体の遺伝子ノックアウトマウスを新たに作成し、LTB<sub>4</sub> 受容体遺伝子ノックアウトマウスのホモ接合体・

生存個体が得られた。

2) LTB<sub>4</sub>受容体遺伝子ノックアウトマウスを用いた解析により、気管支喘息モデルにおける気道過敏性、炎症細胞浸潤に LTB<sub>4</sub> 受容体が関与することが示唆された。

3) 加齢による innate immunity への影響を検討するため、加齢マウスを用いて beta defensin の発現を検討した。その結果、マウス β-defensin は舌、精巣上体、食道、気管など広範に発現を認めた。特に、舌において最も強い発現を確認した。さらにその発現は加齢にて減少傾向がみられたことより、高齢者の肺炎発症における局所関連因子の可能性も考えられる。

4) AM 遺伝子欠損マウスにおいて気道過敏性が亢進することが明らかとなった。このことより内因性 AM の減少が、気道過敏性の亢進に関与することが示唆される。

以上の知見は、難治性の老年者呼吸器系炎症性疾患に対する新しい治療薬開発の実現化に寄与することが期待される。

## F. 健康危険情報

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1). Ishii S, Nagase T, Shindou H, Takizawa H, Ouchi Y, Shimizu T. Platelet-activating factor receptor develops airway hyperresponsiveness independently of airway inflammation in a murine asthma model. **J Immunol** 2004; 172: 7095-7102.
- 2). Takai D, Nagase T, Shimizu T. New therapeutic key for cystic fibrosis: a role for lipoxins. **Nature Immunol** 2004; 5:

357-8. (News and Views) (論文解説)

- 3). Jo T, Nagata T, Iida H, Imuta H, Iwasawa K, Ma J, Hara K, Omata M, Nagai R, Takizawa H, Nagase T, Nakajima T. Voltage-gated sodium channel expressed in cultured human smooth muscle cells: Involvement of SCN9A. **FEBS Lett** 2004; 567: 339-43.
- 4). Nagase T, Uozumi N, Aoki-Nagase T, Terawaki K, Ishii S, Tomita T, Yamamoto H, Hashizume K, Ouchi Y, Shimizu T. A potent inhibitor of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub>, arachidonyl trifluoromethyl ketone, attenuates LPS-induced lung injury in mice. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 2003; 284: L720-L726.
- 5). Ohga E, Tomita T, Wada H, Yamamoto H, Nagase T, Ouchi Y. The effects of obstructive sleep apnea on circulating ICAM-1, IL-8 and MCP-1. **J Appl Physiol** 2003; 94: 179-184.
- 6). Aoki-Nagase T, Nagase T, Oh-hashii Y, Shindo T, Kurihara Y, Yamaguchi Y, Yamamoto H, Tomita T, Ohga E, Nagai R, Kurihara H, Ouchi Y. Attenuation of antigen-induced airway hyperresponsiveness in CGRP-deficient mice. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 2002; 283: L963-L970.
- 7). Yamaguchi Y, Nagase T, Makita R, Fukuhara S, Tomita T, Tominaga T, Kurihara H, Ouchi Y. Identification of multiple novel epididymis-specific beta-defensin isoforms in the humans and mice. **J Immunol** 2002; 169: 2516-2523.
- 8). Tomita T, Nagase T, Ohga E, Yamaguchi

- Y, Yoshizumi M, Ouchi Y. Molecular mechanisms underlying human beta-defensin-2 gene expression in a human airway cell line (LC2/ad). **Respirology** 2002; 7: 305-310.
- 9). Nagase T, Uozumi N, Ishii S, Kita Y, Yamamoto H, Ohga E, Ouchi Y, Shimizu T. A pivotal role of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **Nature Medicine** 2002; 8: 480-484.  
(新聞各紙誌上にて紹介される)
- 10). Nagase T, Ishii S, Shindou H, Ouchi Y, Shimizu T. Airway hyperresponsiveness in transgenic mice overexpressing platelet-activating factor receptor is mediated by an atropine sensitive pathway. **Am J Respir Crit Care Med** 2002; 165: 200-205.
- 2004.
- 2). アレルギーの臓器特異性と臓器過敏性：気道領域. 第 54 回日本アレルギー学会総会 (発表者：長瀬隆英、シンポジウム), 2004.
- 3). Roles of lipid mediators in respiratory diseases. 第 42 回日本呼吸器学会総会 (発表者：長瀬隆英、Leading Lecture), 2002.
- 4). 炎症性肺疾患発症分子機構の解明による新治療法開発の戦略的展開. 第 42 回日本呼吸器学会総会 (発表者：長瀬隆英、熊谷賞受賞講演), 2002.
- 5). 気道過敏性の構成要素：遺伝子操作マウスモデルから得られたアイディア. 第 52 回日本アレルギー学会総会 (発表者：長瀬隆英、シンポジウム), 2002.

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 番号： 特願 2003-034885

発明者：栗原裕基、大内尉義、長瀬隆英、山口泰弘

発明の名称： 筋ジストロフィー症の病態モデル哺乳動物、及びその製造方法

出願人：財団法人くまもとテクノ産業財団

出願日： 平成15年2月13日

## 2. 学会発表

- 1). ロイコトリエン研究： 最近の進歩. 第 16 回日本アレルギー学会春季臨床大会 (発表者：長瀬隆英、教育講演),



厚生労働科学研究費補助金 (長寿科学総合研究事業)  
分担研究報告書

炎症性疾患における defensin 発現異常の関与に関する研究  
分担研究者 栗原裕基 東京大学 教授

研究要旨

- 1) マウス $\beta$ -defensin-6 過剰発現マウスにおいて、筋ジストロフィーに相当する骨格筋線維の壊死、再生の所見と筋力低下を認めた。その機序に NF- $\kappa$ B 系の関与が推定される。
- 2) 抗菌ペプチドによる組織傷害性作用を個体レベルで明らかにした初めての研究であり、肺を含む全身の炎症性疾患においても defensin の関与の可能性を示唆する所見である。

A. 背景

1981年、蛾の抗菌ペプチド、*cecropin* が同定されたのを始めに、昆虫に多くの抗菌ペプチドの産生されることが知られてきた。昆虫は、高度な免疫機構をもたず、先天的、非特異的な防御機構である自然免疫によって微生物から身を守っており、抗菌ペプチドはその中心的な位置にあると推測される。すべての動物の抗菌ペプチドをあわせると、その種類は、数百に及ぶことが報告されている。

高等脊椎動物には、後天的、特異的な獲得免疫機構が備えられているが、侵入する微生物に対して常に最も迅速に反応しているのは、複雑で巧妙な獲得免疫機構よりも自然免疫機構であると考えられる。例えば、気道では、粘液輸送という物理的作用と、抗菌物質による化学的作用が、空気中の微生物を常に有効に排除し続けている。そして、後者の化学的作用の担い手として、リゾチームやラクトフェリンのような分子量の比較的大きな抗菌物質に加えて、高等脊椎動物にも数 kD の小さな抗菌ペプチドが存在することが明かとなった。脊椎動物の

抗菌ペプチドの発見は、アフリカツメガエルの皮膚から分泌される *magainin1* と *magainin2* の同定に始まる。その後、ヒトの代表的な抗菌ペプチドとして、*defensin* や *cathelicidin* が知られるようになった。

抗菌ペプチドの多くは、塩基性アミノ酸により陽性に帯電している。一方、微生物の細胞膜は、ホスファチジルグリセロールやカルジオリピンといった酸性脂質により負に帯電しており、抗菌ペプチドは、静電的な力により微生物膜に結合する。微生物膜に結合した *cecropin* や *magainin* のような小さなペプチドは、細胞膜の表面をカーペットのように覆いつくし、細胞膜脂質成分を抱きこむようにして穴をつくり、最終的に膜を完全に破壊してしまうと推測されている。一方、哺乳類の代表的な抗菌ペプチドである *defensin* は膜様構造のなかで多量体を形成することが知られている。すなわち、微生物膜に結合した *defensin* は、ペプチド同士の複合体を形成して細胞膜内にとりこまれ、細胞膜を横断する穴をつくると考えられている。この穴により、イオン透過性が亢進

し、細菌は最終的に死に至ると推測される。

defensin は、前述した多くの抗菌ペプチドと同様に、塩基性アミノ酸により陽性に帯電している。加えて、defensin は、特異的な6つのシステイン配列と3つの分子内ジスルフィド結合を保存している。このシステイン配列の相違から、 $\alpha$ -defensin と  $\beta$ -defensin の二つのファミリーに分類されている。そのほか、サルでは2分子が3つの分子間ジスルフィド結合をつくり defensin と同じ構造をつくる環状  $\theta$  defensin が知られている。ヒト  $\alpha$ -defensin ファミリーとしては、好中球の顆粒中に存在する human neutrophil peptide-1, 2, 3, 4 (HNP-1, 2, 3, 4) と腸管のパネス細胞に存在する human defensin-5, -6 が知られている。これらについて、細菌、真菌、ウイルスへの抗菌作用、抗ウイルス作用が報告されている。

ヒトの  $\beta$ -defensin としては、1995年に human  $\beta$ -defensin-1 (hBD-1) が、1997年に human  $\beta$ -defensin-2 (hBD-2) が報告され、その後、human  $\beta$ -defensin-3, 4 (hBD-3, 4) が報告された。そのほか、HE2 $\beta$ 1 は、精巣上体に発現する EP2 ファミリーの選択的スプライシングの一つとして報告されたが、 $\beta$ -defensin に特異的なシステイン配列を保つことが後に明らかとなった。さらに、我々は、2002年に精巣上体に特異的に発現する新規のヒト  $\beta$ -defensin である human  $\beta$ -defensin-5 (hBD-5)、human  $\beta$ -defensin-6 (hBD-6) を同定し報告した。

また、マウスの  $\beta$ -defensin としては、4つのアイソフォーム、mouse  $\beta$ -defensin-1, -2, -3, -4 (mBD-1, -2, -3, -4) が報告された。mBD-1、mBD-3 は、

それぞれ hBD-1、hBD-2 のマウスホモログであり、いずれもグラム陰性細菌に対して、Na 濃度依存性に殺菌作用を示すことが確認された。さらに我々は、2001年に mouse  $\beta$ -defensin-6 (mBD-6) を同定し、その抗菌活性を証明した。また、2002年にヒトの HE2 $\beta$ 1、hBD-5、hBD-6 のマウスホモログとして mouse EP2e (mEP2e)、mouse  $\beta$ -defensin-12 (mBD-12)、mouse  $\beta$ -defensin-11 (mBD-11) について報告した。

hBD-1 は、主に尿路生殖器系に発現しているが、脾や肺、皮膚、腸管にも発現が認められた。hBD-2 は、ヒトの皮膚、肺、気管で発現しており、腸管の上皮でも発現誘導が確認された。hBD-3 もヒトの皮膚から単離されたが、男性生殖器や胎盤に強く発現していることが後に明らかとなった。また、我々の報告した hBD-5、hBD-6 は、ヒト精巣上体に特異的に発現していた。

マウス  $\beta$ -defensin も、肺、気管、食道、舌、腎臓のような様々な器官での発現が報告されている。さらに、我々は、マウスにも、mBD-11、mBD-12、mEP2e など、精巣上体に特異的に発現する  $\beta$ -defensin の一群の存在することを明らかにした。また、我々の報告した mBD-6 は、舌や食道に加えて骨格筋でも発現が観察された。このように、複数の  $\beta$ -defensin アイソフォームの相次ぐ同定とともに、その発現分布は、予想以上に幅広いことが明らかとなった。

これまで、 $\beta$ -defensin の機能解析については、in vitro での抗菌活性の証明が主体であった。hBD-1、hBD-2、hBD-4 は、Na 濃度依存性に殺菌作用を示し、hBD-3 は、Na 濃度非依存性に殺菌作用を示すと

報告されている。我々も、mBD-6、mBD-12の Na 濃度依存性の殺菌作用を証明した。さらに、hBD-2 は、CCR6 受容体を活性化することにより、未分化な樹状細胞やメモリーT細胞に対してケモアトラクタントとして機能することが報告されている。また、同様に、mBD-2 は、toll-like receptor 4 の内因性のリガンドとして、樹状細胞の成熟を促す。すなわち、抗菌ペプチドは、その抗微生物作用によりエフェクター因子として機能しているだけでなく、炎症反応の制御因子としても機能している。

近年、個体レベルでの抗菌ペプチドの機能の解析も進んできた。defensin とともに代表的な抗菌ペプチドである cathelicidin の欠損マウスでは、皮膚感染症の悪化することが知られている。

また腸管の  $\alpha$ -defensin の機能が、matrilysin 欠損マウスの解析により明らかとなった。このマウスは、マウス腸管の  $\alpha$ -defensin に相当する cryptdin の前駆体から pro segment を切断できないことが明らかとなった。このように機能的に cryptdin を欠いた matrilysin 欠損マウスは、腸管において細菌に対する易感染性を示した。また、ヒト腸管の  $\alpha$ -defensin である HD-5 を発現するトランスジェニックマウスにおいて、HD-5 が、サルモネラ症への抵抗性に寄与することも報告された。

$\beta$ -defensin に関しては、mBD-1 の欠損した遺伝子改変マウスの解析が報告された。このマウスでは、インフルエンザ桿菌の肺への感染が長びくことや、尿路の常在菌数の増加することが明らかにされた。

しかし、炎症反応は、対異物作用の総体であると同時に、コントロールの異常によ

り宿主自身への傷害性を有しうる。これまでの遺伝子改変マウスの評価では、defensin の感染防御上の重要性が明らかにされてきたが、炎症反応の一翼を担う defensin 発現の異常が、同時に様々な炎症性疾患の病態生理に関わることも予想される。

我々は、mBD-6 を過剰発現する遺伝子改変マウスを作製し、未知の病態との関与を検討した。

## B. 研究方法

### 1) mBD-6 cDNA のクローニング

成熟した ICR マウスから ISOGEN (Nippon Gene) を用いて食道の全 RNA を抽出した後、5  $\mu$ g の RNA をランダムプライマーにより superscript II (Invitrogen) を用いて逆転写した。mBD-6 遺伝子の蛋白発現を増強するために、mBD-6 遺伝子の開始コドンの前に kozak シークエンスを連結した DNA プライマー (5'-ACCATGAAGATCCATTACCTG-3') を作製した。また、mBD-6 遺伝子の 3' 端非転写領域にアンチセンスプライマー (5'-TGTGTCATATTCACGAAGAAG-3') を作製し、Advantage-HF2 PCR kit (Clontech) により、mBD-6 cDNA を増幅した。PCR の条件は、94  $^{\circ}$ C 15 秒、68  $^{\circ}$ C 3 分である。得られた DNA フラグメントを、TA クローニングの手法により、PCR4TOPO ベクター (Invitrogen) に挿入し、大腸菌内で増幅した。なお、この大腸菌より抽出したプラスミドのシークエンスにより、増幅された mBD-6 cDNA の塩基配列に変異の存在しないことを確認した。

## 2) トランスジーン の 作 製

得られた mBD-6 cDNA を、pCAGGS ベクターに挿入した。このベクターでは、挿入された mBD-6 は、human cytemogalovirus immediate-early enhancer とそれに続く chicken  $\beta$ -actin promoter により駆動される。蛋白発現の効率をあげるために、chicken  $\beta$ -actin の第一エクソンおよびイントロンに続いて、mBD-6 cDNA が位置し、mBD-6 自身のストップコドンの後、rabbit  $\beta$ -globin poly(A) sequence が、その下流に位置するように設計されている (図 1)。

PCR4TOPO ベクターに mBD-6 cDNA を挿入したプラスミドを EcoRI にて切断後に電気泳動し、mBD-6 cDNA を含む DNA 断片をアガロースゲルより抽出した。EcoRI にて直鎖状にした pCAGGS ベクターと、上記で得られた DNA 断片をライゲーションし、大腸菌内で増幅した。pCAGGS ベクターへの mBD-6 cDNA の挿入とその方向は、抽出したプラスミドのシーケンスにより確認した。

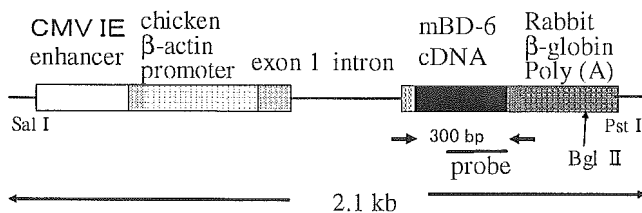


図 1 トランスジーン の 構 成。

mBD-6 を過剰発現するために、pCAGGS ベクターを利用した。矢印は、スクリーニングに使用した PCR プライマーの位置を示す。Probe は、サザンブロットに利用したプローブの位置を示す。

CMV IE enhancer;

cytemogalovirus immediate-early enhancer

この mBD-6 cDNA を含む pCAGGS ベクター 100  $\mu$ g を、BamH I, Dra I, Sal I, Pst I により切断し、0.8% アガロースゲルにて電気泳動し、mBD-6 cDNA を含む 2.1 kb の DNA 断片を抽出した。この DNA 断片を精製し、トランスジーンとして T<sub>10</sub>E<sub>0.1</sub> 液に溶解した。

## 3) トランスジェニックマウスの作製

上記のトランスジーンを C57BL/6 マウスの受精卵に注入し、それを仮親マウスの卵管内に移植して出産させた。これらの操作は、熊本大学動物資源開発研究センターとの共同で行われた。得られたマウスの尾よりゲノム DNA を Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega) を用いて抽出し、PCR 法によりスクリーニングを行った。

我々は、まず、トランスジーン の rabbit  $\beta$ -globin 遺伝子上にセンスプライマー (5'-GGTTATTGTGCTGTCTCATC-3') およびアンチセンスプライマー (5'-ATTTGTGAGCCAGGGCATTG-3') を mBD-6 cDNA を挟むように作製した (図 1)。抽出したゲノム DNA をテンプレートとして、Taq polymerase (TAKARA) を用いて、94  $^{\circ}$ C 30 秒、58  $^{\circ}$ C 45 秒、72  $^{\circ}$ C 1 分、35 サイクルの条件で PCR を施行した。

さらに、我々は、サザンブロット法により、トランスジーンを確認し、そのコピー数の推定を行った。すなわち、マウスのゲノム DNA 5  $\mu$ g を Bgl II により切断し、0.8% アガロースゲルに電気泳動した後、Hybond-N+ (Amersham) にトランスファーした。サザンブロットのためのプローブ