

アポトーシス関連分子EATの機能制御によるES細胞の増殖・分化培養法の開発

所属 国立成育医療センター研究所 発生・分化研究部
研究者 大喜多 肇

研究要旨：アポトーシス関連分子EATのヘテロ接合性のノックアウト・マウスを作製し、その表現形が野生型と同一であることを示した。さらに胎仔由来の細胞全てでEATが欠損するコンディショナル・ノックアウトマウスを作製・検討中である。

A. 研究目的

研究担当者らはヒト胎児性癌細胞からBcl-2関連分子でありアポトーシス抑制作用を有するEAT遺伝子を単離した。興味深いことに、ヒト胎児性癌細胞やマウス胚性幹細胞では、Bcl-2関連分子の中でEATの発現が特に高いことが判明しており、本分子が初期発生段階でのアポトーシス制御において中心的な役割を演じている可能性がある。一方、研究担当者らは、マウスのモデル系により本遺伝子が膵ランゲルハンス島β細胞の維持に重要であることを示してきた。これらの基礎成果をさらに発展させ、EAT分子の機能を、特に胚性幹細胞の増殖・分化ならびに膵β細胞への分化に着目して解明することを目指すことが、ヒト胚性幹細胞を含む幹細胞を用いた再生医療の推進に役立つと考えられる。特に、EATによる膵β細胞の維持に関わる情報は、糖尿病を対象とする再生医療への応用が期待できる。

糖尿病は若年期に発症しインスリンを補充しなければ死に至るI型と成人期に発症するII型に分けられる。I型糖尿病では、種々の原因によって膵ランゲルハンス島のβ細胞が破壊、消失することがその発症原因と考えられている。インスリンによる治療が行われているが、ランゲルハンス島の細胞移植は、現在最も可能性の高い再生医療と考えられている。しかしながら、β細胞は、元来、ストレ

スに弱く破壊されやすいことが知られ、移植したβ細胞も患者β細胞と同様の機序によって破壊される可能性が高い。従って、インスリン産生細胞の維持に関して細胞死（アポトーシス）の観点から研究することが必須である。

本研究により、EAT分子の機能制御による胚性幹細胞の増殖・分化培養法、膵β細胞分化培養法開発の基盤情報を整備する。このことは、胚性幹細胞を用いた新たな細胞遺伝子治療の確立へ直接的につながるものである。また、既に作製したEAT強制発現トランスジェニック・マウスに由来する膵β細胞培養系を確立する。糖尿病の細胞遺伝子治療のモデルとして利用することが可能であるとともに、糖負荷を含む生体内でのストレスや薬剤によるβ細胞死の機序解明のためのモデルとして使用することが可能である。得られた成果は、新たなマウス胚性幹細胞の培養技術体系の開発にとどまらず、ヒト胚性幹細胞の新たな培養技術の革新、工業化へ応用することが可能であり、再生医療を直接、推進するものである。これらは現在の薬剤による治療法とは全く異なる新たな治療法であり、あらたな創薬へもつながるものと考えられる。

B. 研究方法

1. EATノックアウト胚性幹細胞の作製

Cre-loxPシステムを用いてEAT遺伝子をマウス個体、胚性幹細胞においてコンディショナルにノックアウトする。EATのexon 1をloxPで挟むような変異と選択マーカーを有するターゲティング・ベクター（図1）を導入することにより胚性幹細胞の一方の対立遺伝子に変異を導入した。さらに胚性幹細胞の他方の対立遺伝子に変異を導入することによりEATノックアウト胚性幹細胞を作製する。

2. EATコンディショナル・ノックアウトマウスの作製

上述した1. において作製したEATの一方の対立遺伝子に変異を導入した胚性幹細胞をマウス初期胚（胚盤胞）へ注入しキメラマウスを作製する。作製したキメラマウスをC57BL/6マウスと交配することにより体細胞の全てが胚性幹細胞からなるマウスを得た。同マウスをMeuCre40マウス（Cre recombinaseを弱く発現するトランスジェニック・マウス）と交配することにより、1) EATの一方の対立遺伝子を欠失したマウス、2) EATの一方の対立遺伝子で選択マーカーのみが除去されたマウス（いわゆるfloxマウス）を作製した。これらのマウスを胎生5日目以降に、胚盤葉上層（将来、胎仔となる領域）特異的にCre recombinaseを発現するマウス（MOREマウス）と交配することにより、胎仔由来の細胞全てにおいてEAT遺伝子が欠損したマウスを作製する。

（倫理面への配慮）

動物実験に際しては、動物愛護の観点にたつて、麻酔等により動物への苦痛を最小限に留める。また、不必要な飼育はないか、求める成果を出すために必要最小限の匹数を使用しているか等を常に確認しながら実験を行った。本研究課題において行う動物実験に関しては、国立成育医療センター研究所の動物実験委員会の承認を得た。

本研究においてはヒト胚性幹細胞あるいはヒト試料を用いた研究は行っていない。

C. 研究結果

本年度は、EATノックアウト胚性幹細胞及び、EATのコンディショナル・ノックアウトマウス作製において特に成果が得られた。

1. EATノックアウト胚性幹細胞の作製

Cre-loxPシステムを用いてEAT遺伝子をマウス個体、胚性幹細胞においてコンディショナルにノックアウトするために、選択マーカーである抗生剤耐性遺伝子とともにEATのexon 1をloxPで挟むような変異（いわゆる3lox）を有するターゲティング・ベクターを導入することにより胚性幹細胞の一方の対立遺伝子に変異を導入することに成功した。11個の胚性幹細胞のクローン（相同組換え体）が得られた。現在、他方の対立遺伝子に変異を導入する準備を行っている。

2. EATコンディショナル・ノックアウトマウスの作製

1. にて得られた5個の胚性幹細胞のクローン（相同組換え体）をマウス初期胚（胚盤胞）へ注入することによりキメラマウスを得た。それらより3ラインのマウスのラインを確立した。これらのマウスをCre recombinaseを発現するトランスジェニック・マウス（MeuCre40マウス、CAG-Creマウス）と交配することによりEATのexon 1が破壊されたマウスを得た。本マウスは、EAT遺伝子の一方の対立遺伝子のみが破壊されたヘテロ接合性のノックアウト・マウスである。このマウスは、外見上、ほぼ正常に成獣となるまで成長した。成獣を解剖したところ肉眼レベルで臓器の形態、大きさ等に明らかな異常は認められず、また、病理組織学的にも特に野生型と異なった点は認められなかった。また、同様に3loxマウスとMeuCre40マウスを交配することにより、EATのexon 1の両端にloxP配列が挿入されたマウスが得られた（floxマウス）。このマウスは、両アレルとも正常なEATを有するが、このマウスを臓器特異的Creトランスジェニック・マウスと交配することにより、コンディショナル・ノッ

クアウトを作成することが可能となる。同マウスも野生型とほぼ同じ表現形を示した。

また、MOREマウス（胎生5日目以降に、胚盤葉上層（将来、胎仔となる領域）特異的に Cre recombinaseを発現するマウス）の導入を終了した。以上の成果をふまえ、コンディショナル・ノックアウト・マウスを作製中である。

D. 考察

EATのexon 1を除去したマウスの作製に成功した。このマウスはEAT遺伝子の一方の対立遺伝子のみ破壊されたヘテロ接合性のノックアウトマウスであり、表現形は、現在のところ、形態学的には野生形と同様と考えられる。このことはEATの発現量が通常の1/2であってもマウスは、正常に発生・分化することを示している。現在、ホモ接合性のマウスの表現形に関して検討中である。また、EATのexon 1の両端にloxP配列が挿入されたマウスの作製を終了した。このマウスは、両アレルとも正常なEATを有するが、臓器特異的Creトランスジェニック・マウスの交配により、コンディショナル・ノックアウトを作成することが可能である。

本年度に作製したマウスをMOREマウスと交配することにより胚盤葉上層由来の全ての細胞でEATをノックアウトしたマウスを作製することが可能となり、胎仔の器官形成期の諸臓器における本遺伝子の機能を明確にすることができる。特にEATが発現する造血組織や神経組織、脾ランゲルハンス島において欠損が生じることが推測される。また、造血組織の欠損により早期に胚性致死となる場合は、脾ランゲルハンス島 β 細胞特異的なノックアウト・マウスを作製して β 細胞での機能を解析する必要がある。また、EAT欠失胚性幹細胞を作製することにより、初期胚レベルでのEATの機能の解析や分化誘導により脾ラ氏島等でのEATの機能を解析することが必要である。

E. 結論

胚性幹細胞に高発現でありアポトーシスを調節する分子であるEATのコンディショナル・ノックアウトマウスを作製している。EATのヘテロ接合性のノックアウト・マウスは、ほぼ正常の表現形を示し、EATは一方の対立遺伝子のみで発生、分化に充分と考えられた。作製したマウスを用いて、胎仔由来組織全てにおいてEATを欠失したマウスを作製・検討中である。また、EATに変異を導入した胚性幹細胞を作製しEATの胚性幹細胞における機能を解析中である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tang W, Kiyokawa N, Eguchi T, Matsui J, Takenouchi H, Honma D, Yasue H, Enosawa S, Mimori K, Itagaki M, Taguchi T, Katagiri YU, Okita H, Amemiya H, Fujimoto J. Development of novel monoclonal antibody 4G8 against swine leukocyte antigen class I α chain. *Hybridoma Hybridom* 23: 187-191, 2004.
- 2) Taguchi T, Kiyokawa N, Takenouchi H, Matsui J, Tang W, Nakajima H, Suzuki K, Shiozawa Y, Saito M, Katagiri YU, Takahashi T, Karasuyama H, Matsuo Y, Okita H, Fujimoto J. Deficiency of BLNK hampers PLC- γ 2 phosphorylation and Ca²⁺ influx induced by the pre-B cell receptor in human pre-B cells. *Immunology* 112: 575-582, 2004.
- 3) Matsui J, Kiyokawa N, Takenouchi H, Taguchi T, Suzuki K, Shiozawa Y, Saito M, Tang W-R, Katagiri YU, Okita H, Fujimoto J. Dietary bioflavonoids induce apoptosis in human leukemia cells. *Leukemia Research* (in press).

2. 学会発表

該当無し

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当無し

2. 実用新案登録

該当無し

3. その他

該当無し

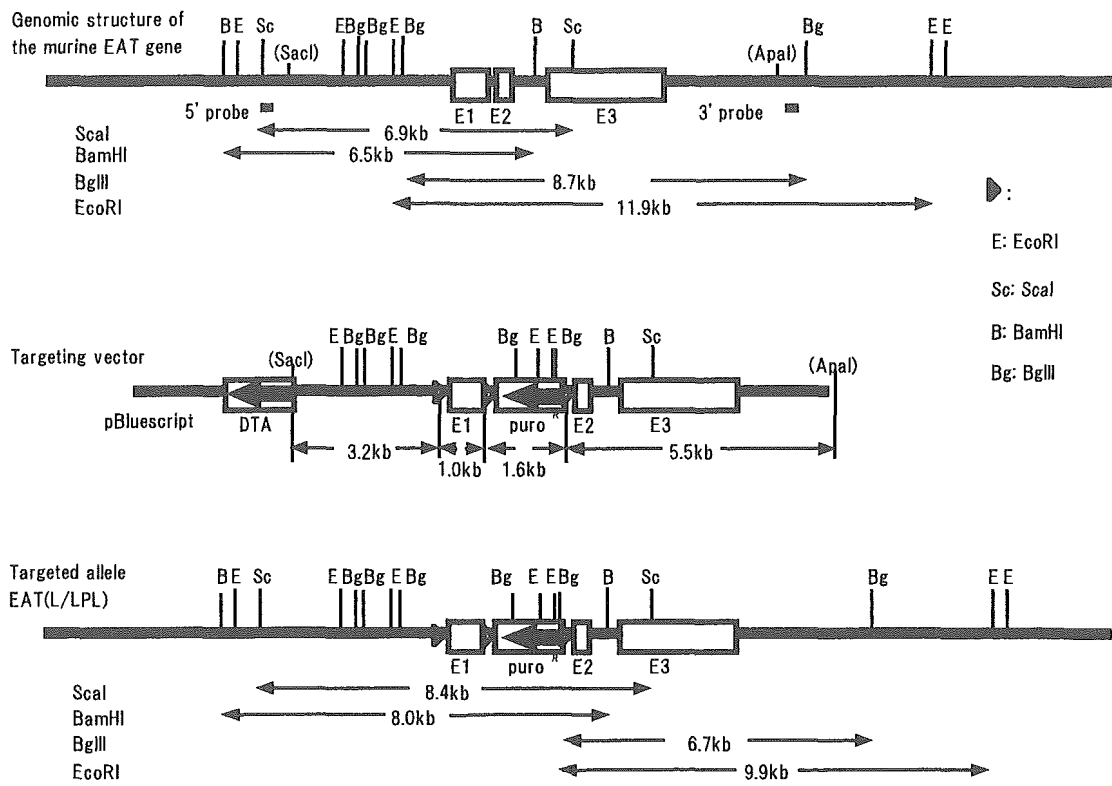


図1 murine EAT geneのgenomeとtargeting vectorの構造