

平成17年度

若手研究者奨励研究報告書

平成17年度

若手研究者奨励研究報告書

目 次

HS研究

第1分野

課題番号

KH13301	テーラーメイド医療に向けた不整脈誘起性薬剤の先端的スクリーニング系の開発に関する研究（総合研究報告）	西田基宏 ……	1
KH13301	テーラーメイド医療に向けた不整脈誘起性薬剤の先端的スクリーニング系の開発に関する研究（平成17年度報告）	西田基宏 ……	6
KH13302	再生医療を目的としたアデノウイルスベクターによるES細胞への効率的な遺伝子導入・発現系の開発	川端健二 ……	10

第2分野

KH23303	腎不全の進展・増悪因子の解明と腎機能保護法の開発に関する研究	増田智先 ……	15
KH23304	Toll様受容体（TLR3）を介したミクログリア活性化機序の解明と脳炎治療薬開発のためのハイスループット試験系への応用	中道一生 ……	22
KH23306	吸血昆虫唾液腺生理活性物質の特性解明と創薬への応用に関する研究	伊澤晴彦 ……	27
KH23307	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	大喜多 肇 ……	34
KH23331	寄生性原虫の生育に必要な脂質成分の代謝と輸送ならびに創薬探索に関する基礎的研究	中野由美子 ……	39

第3分野

KH33308	向精神薬のSNPs解析による有効性・安全性に関する研究	橋本亮太 ……	47
KH33309	ヒトの薬物体内動態の予測向上を目指した薬物代謝酵素および薬物トランスポーターの誘導に関するインシリコ予測	小林カオル ……	55
KH33310	薬剤排出トランスポーターの基質輸送メカニズムに関する研究	田辺公一 ……	60
KH33332	制癌分子標的療法の創薬と開発にかかわるブリッジングスタディの基礎的および応用的研究	川上浩司 ……	65

第5分野

KH53312	LEE遺伝子群非保有型腸管出血性大腸菌の疫学マーカーおよび新規治療薬の標的となる病原性遺伝子に関する基礎的研究	伊豫田 淳 ……	69
KH53313	遺伝子修飾による樹状細胞の機能強化に基づいた新規癌免疫療法の開発	岡田直貴 ……	74
KH53314	PET検査を用いた癌二次予防の診断アルゴリズムの開発、PET検診施設間のネットワーク構築および死亡率低下の検証研究	小島伸介 ……	84

KH53315	網羅的遺伝子破壊による真菌症病原性発現の分子機構の解明と新規抗真菌剤開発への応用に関する研究	梅山 隆 …… 89
KH53333	治療ターゲットとしてのFc γ 受容体を介したデング出血熱の病態形成機序の解析	林 昌宏 …… 94
エイズ研究		
第1分野		
KA13701	ヘルペスウイルス感染症の新規制御法の確立と潜伏感染機構の解明	藤室雅弘 …… 99

創薬等ヒューマンサイエンス研究

第1分野

先端的創薬技術の開発に関する研究

がる病態であると認識されるようになったこと、また心臓に作用する薬剤でなくても QT 間隔を延長させ心室頻拍から心室細動を経て突然死を引き起こすことからである。これらにより、開発の際に薬剤が薬剤誘起性の不整脈を引き起こすかどうか調べる必要性が認識されるようになった。この目的のために、*in vitro* および *in vivo* のスクリーニング系が開発されてきた。しかし、ラットなどの動物を使ったスクリーニングは、ヒトと心臓の再分極過程が異なるため、得られた結果をそのまま適用できないという問題があること、サルやイヌなどを使ったスクリーニングは不整脈の出現が心拍数に依存するという心拍数の問題があること、あるいはこれらの動物を入手する困難さなどから、いずれもベストの方法とはいえない。ヒトの遺伝子を使った場合も定量性の点で問題があるとされている。本研究は、個人差の遺伝情報をスクリーニング系に取り込むことのできる評価系である。すなわち、薬剤によって引き起こされる不整脈の出現をスクリーニングする方法であると共に、個人の遺伝情報を用いる副作用の軽減へ向けた一歩となる評価法でもある。遺伝情報の違いによって薬剤誘起性不整脈の出現頻度が異なる可能性を検討するために、HERG の SNP としてすでに報告されている一塩基置換をデータベースより得て、CFP と YFP をすでに導入しているキメラ HERG に変異を導入する。このチャンネルは、HERG に作用する薬剤による不整脈の誘起、すなわち薬剤による副作用発現の個人差を反映するはずである。SNP の変異を導入した変異型キメラ HERG を用いて、さまざまな薬剤を作用させ FRET がどのように影響を受けるか検討する。薬剤により不整脈が生じる時の特徴的な変化が観察されることを

SNP の変異を導入した変異型キメラ HERG にて電気生理学的に確認する。これにより、特定の遺伝子型を持つヒトには、どのような薬剤を用いるべきか明らかになると期待される。

E. 結論

本年度は、キメラ HERG タンパクが、野生型 HERG と同様のチャンネル特性を保持していることを明らかにし、FRET 解析可能なコンストラクトであることを示した。しかし、これらキメラ HERG は薬物のスクリーニングに使用できる程度の FRET 現象を起こすことができず、今後更なる検討の余地があることがわかった。本システムの開発は、ただ動物を使わないスクリーニングの代替法の確立のみならず、薬剤による副作用を軽減するという患者への直接的な効果、新規薬剤を開発する際のスクリーニングコストを下げる効果、あるいは副作用により生じる個人の社会活動の喪失からくる社会的生産性の低下を防ぐ効果といった成果につながると期待できる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

再生医療を目的としたアデノウイルスベクターによる ES細胞への効率的な遺伝子導入・発現系の開発

所 属 独立行政法人医薬基盤研究所
遺伝子導入制御プロジェクト
研究者 川端 健二

再生医療のための有力な細胞ソースとして注目されている ES 細胞の分化を自由に制御するには効率の良い遺伝子導入法の開発が必須である。本研究では高効率に遺伝子導入できることが知られているアデノウイルスベクターを用いて、ES 細胞の分化制御を試みた。

A. 研究目的

胚性幹細胞 (embryonic stem cells; ES 細胞) は無限増殖能および分化多能性を有する細胞であり、1981 年にマウス胚から初めて樹立された。それ以来、ES 細胞は遺伝子欠損マウス作成のための発生工学的材料として重用されてきたが、1988 年にヒト胚から ES 細胞が樹立されて以来、再生医療への応用が考えられるようになった。しかし、ES 細胞を目的の細胞に自由に分化させる技術は未だ完成していない。この理由の一つに、これら幹細胞への遺伝子導入技術が確立されていないために、外来遺伝子導入による細胞分化の研究が行えないことが考えられる。昨年、マウス ES (mES) 細胞はアデノウイルス受容体 coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) を発現しており、ES 細胞への高効率遺伝子導入には EF-1 α プロモーターを有した従来型 Ad ベクターが最適であることを報告した。そこで、このベクターを用いて機能遺伝子を導入することにより、ES 細胞の分化を自由に制御可能かどうかについて検討した。

B. 研究方法

(1) マウス ES 細胞の培養

E14 マウス ES 細胞 (mES 細胞) は LIF 含有培地にてフィーダー細胞 (embryonic fibroblast) 上

で培養し、3-5 日ごとに継代した。胚様体 (EB; embryoid body) は mES 細胞をペトリディッシュの蓋に 3000 cells/30 μ l で付着させ (ハンギングドロップ法)、5 日間培養することにより作製した。

(2) Ad ベクターの作成

Ad ベクターの作成は improved in vitro ライゲーション法により行った。シャトルプラスミド pHCMV5 およびそのプロモーターを CA プロモーター、EF-1 α プロモーターで置換したプラスミド pHMCA5、pHMEF5 を作成した。それぞれのマルチクロニング部位に β -ガラクトシダーゼ (LacZ) 遺伝子を挿入し、LacZ 発現シャトルプラスミド pHMVM5-LacZ、pHMCA5-LacZ、pHMEF5-LacZ を作成した。次に、それぞれのシャトルプラスミドを I-Ceu I と PI-Sce I で消化し、同酵素で消化したベクタープラスミド pAdHM4 とライゲーションを行うことにより LacZ 発現ベクタープラスミド pAdHM4-CMVLacZ1、pAdHM4-CALacZ1、pAdHM4-EFLacZ1 を得た。また、ファイバー改変 Ad ベクターを作成するため、pHMEF5-LacZ については pAdHM15-RGD、pAdHM41-K7 とともにライゲーションを行い、pAdHM15-RGD-EFLacZ1、pAdHM41-K7-EFLacZ1 を作成した。

作製したベクタープラスミドを Pac I で消化し、

SuperFect (キアゲン社) を用いて 293 細胞にトランスフェクトすることにより、LacZ 発現 Ad ベクター Ad-CMV-LacZ、Ad-CA-LacZ、Ad-EF-LacZ、AdRGD-EF-LacZ、AdK7-EF-LacZ を得た。定法により Ad ベクターの増殖、精製を行った。精製したベクターの物理学的力価は分光学的方法により測定し、生物学的力価は Adeno-X Rapid Titer Kit (クロンテック社) を用いて測定した。また、同様に Ad-EF-Oct3/4、Ad-EF-Nanog、Ad-EF-STAT3F を作成した。

(3) RT-PCR

フィーダー細胞およびフィーダー細胞上で培養した mES 細胞から total RNA を抽出し、G3PDH、CAR、Oct-3/4、Nanog、FGF5、Brachyury(T)、GATA6 の各遺伝子発現を調べた。PCR プライマーには以下のものを用いた。

G3PDH(F): 5' -ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
G3PDH(R): 5' -TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'
CAR(F): 5' -TGATCATTTTGTATTCTGGA-3'
CAR(R): 5' -TTAACAAGAACGGTCAGCAG-3'
Oct-3/4(F): 5' -GTTTGCCAAGCTGCTGAAGC-3'
Oct-3/4(R): 5' -TCTAGCCCAAGCTGATTGGC-3'
Nanog(F): 5' -ATGGTCTGATTCAGAAGGGC-3'
Nanog(R): 5' -TTCACCTCCAAATCACTGGC-3'
FGF5(F): 5' -GAAGCGGCTCGGAACATAGC-3'
FGF5(R): 5' -GGACGCATAGGTATTATAGC-3'
Brachyury T(F): 5' -CAGGAGGATGTTCCCGGTGC-3'
Brachyury T(R): 5' -TCCGAGGTTCATACTTATGC-3'
GATA6(F): 5' -GCCAAACTGAGCCCTTCGC-3'
GATA6(R): 5' -GGGGGCTGTCGGCGGAGGC-3'

(4) アルカリホスファターゼ染色

mES 細胞を 12 穴プレートに 1×10^4 cells/well で播種し、翌日、各 Ad ベクターを 3000 VP/cell の濃度で作用させた。播種 3 日目に再度同ベクターを作

用させた後、5 日目にアルカリホスファターゼ染色をケミコン社の ES Cell Characterization Kit を用いて行った。

(5) LacZ アッセイ

Day5 の EB に対してハンギングドロップの状態で、3000 VP/cell で各 Ad ベクターを感染させ、2 日後に細胞を 0.5% glutaraldehyde で固定し、X-gal 染色液 (1.3 mM $MgCl_2$ 、15 mM NaCl、44 mM hepes、3 mM potassium ferricyanide、3 mM potassium ferrocyanide、0.05% X-gal) にて染色を行った。定量はクロンテック社の Luminescent β -Gal Kit を用いて行った。

(倫理面への配慮)

今年度は動物実験を行わなかった。また、ヒト由来の生体試料等を用いた実験も行わなかった。

C. 研究結果

これまでに、ES 細胞への高効率遺伝子導入には EF-1 α プロモーターを有した従来型 Ad ベクターが最適であることを見出した。そこで、このベクターを用いて機能遺伝子を導入することにより、ES 細胞の分化を自由に制御可能かどうかについて検討した。mES 細胞では LIF (leukemia inhibitory factor)/STAT3 シグナルや、Oct-3/4、Nanog (共に転写因子) などが多能性維持に必要であることが知られている。そこで、EF-1 α プロモーターを有した STAT3F (STAT3 dominant-negative mutant)、OCT-3/4、Nanog 発現 Ad ベクターを作製し、これらベクター作用後の ES 細胞の分化について検討した。その結果、コントロールと比較し (Fig. 1A-B)、STAT3F および Oct-3/4 を導入した mES 細胞では LIF 存在下においても大部分の細胞が分化し (Fig. 1C-D)、三胚葉各マーカー (外胚葉: FGF5、中胚葉: brachyury(T)、内胚葉: GATA6) の発現を RT-PCR

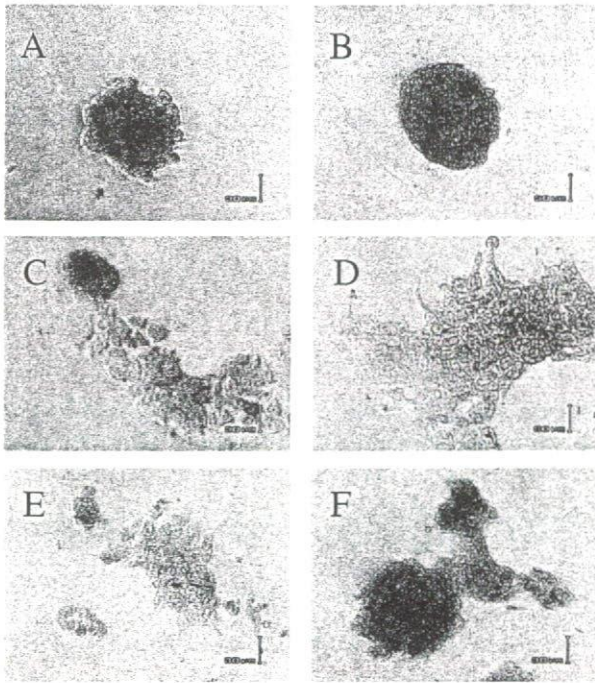


Fig. 1 Introduction of functional genes into mES cells by Ad vectors containing EF-1 α promoter. mES cells (1×10^4 cells) were seeded, and on the following day, the cells were transduced with 3000 VP/cell of none (A), Ad-EF-LacZ (B), Ad-EF-Oct3/4 (C), or Ad-EF-STAT3F (D) for 1.5 hr. mES cells were also co-infected with 3000 VP/cell of Ad-EF-STAT3F and 3000 VP/cell of Ad-EF-lacZ (E) or Ad-EF-Nanog (F) for 1.5 hr. On day 3, each cell was infected again by the same vectors. On day 5, alkaline phosphatase staining was performed. Alkaline phosphatase-positive red cells indicate undifferentiated ES cells.

にて調べた結果、三胚葉いずれにも分化していることが明らかとなった (Fig. 2)。さらに、STAT3F による分化は Nanog を共発現することによりレスキューされ、未分化を維持し (Fig. 1E-F)、Ad ベクターを用いて機能遺伝子を導入することにより分化を自由に制御できる可能性が示された。

ES 細胞を *in vitro* で目的の細胞に分化させるには、まず、胚様体 (EB) とよばれる発生初期胚に似た構造を有する細胞集合体を形成させ、その後液性因子などを加えることにより目的の細胞に分化させるという手法がとられる。そこで次に、EB への遺伝子導入に最適な Ad ベクターを開発するため、ど

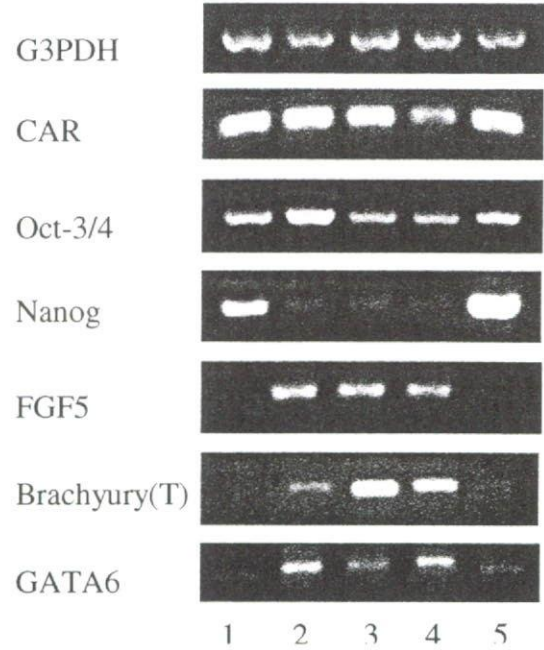


Fig. 2 RT-PCR analysis of germ layer markers. Total RNA was isolated from mES cells transduced with Ad-EF-LacZ (lane 1), Ad-EF-Oct3/4 (lane 2), Ad-EF-STAT3F (lane 3), Ad-EF-STAT3F and Ad-EF-LacZ (lane 4), or Ad-EF-STAT3F and Ad-EF-Nanog (lane 5).

のプロモーターが EB に適しているかについて検討した。その結果、CA プロモーターを有した Ad ベクターが最も効率よく遺伝子導入可能であった (Fig. 3)。次に、ES 細胞でのさらなる遺伝子発現の上昇を調べるために 2 種のファイバー改変型アデノウイルスベクターを作製した。すなわち、AdRGD-EF-LacZ はウイルスのファイバーノブの HI ループ部位にインテグリンと高親和性を有する RGD 配列のペプチドを挿入したベクターであり、AdK7-EF-LacZ はファイバーノブの C 末端に 7 つのリジン残基を挿入したベクターであり、それぞれの受容体は αv インテグリン、ヘパラン硫酸である。

従来型を含めたこれら3種のベクターのうち、いずれのベクターもほぼ同程度の遺伝子発現効率を示した (Fig. 4)。以上より、EBにはCAプロモーターを有した、従来型の Ad ベクターが最適であることが明らかとなった。

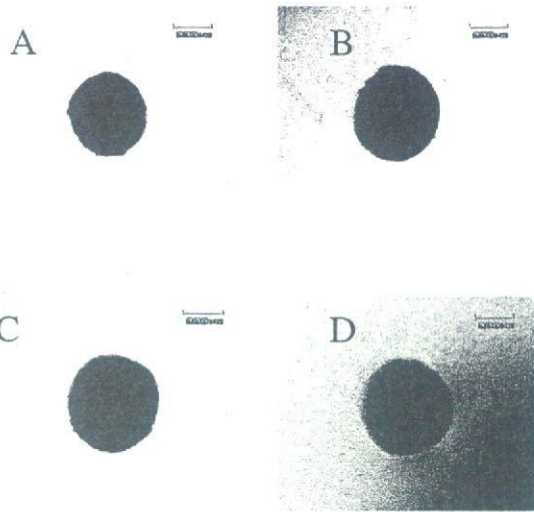


Fig. 3 X-gal staining of Ad vector-transduced EBs. EBs were transduced with 3000 VP/cell Ad-EF-LacZ (A), Ad-CA-LacZ (B), Ad-RSV-LacZ (C), or Ad-CMV-LacZ (D). Two days after infection, X-gal staining was performed.

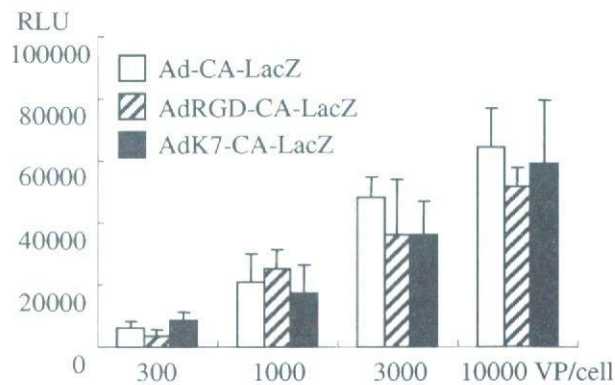


Fig. 4 Dose dependent LacZ expression by fiber-modified Ad vectors in EBs.

D. 考察

以前、ES細胞にはEF-1 α プロモーターを有した従来型の Ad ベクターが最も効率よく遺伝子導入できることを明らかにした。そこで、本研究では、このベクターを用いて ES 細胞に機能遺伝子を導入し、実際に細胞の分化を制御できるかどうかについて検討した。その結果、分化を誘導すると考えられている遺伝子 (Oct-3/4 および STAT3F) を導入することで、大部分の ES 細胞を三胚葉全てに分化させることに成功した。また、この細胞分化は ES 細胞の未分化維持に必須の遺伝子 (Nanog) を共導入することにより抑制できることも明らかにし、我々の開発した Ad ベクターを用いることで、ES 細胞の分化を自由にコントロールできる可能性を示した。

ES 細胞を *in vitro* で分化させる過程において、中間体として EB を形成することが一般的に行われている。そこで次に、EB への遺伝子導入に最適な Ad ベクターの開発を行った。ES 細胞とは異なり、EBにはCAプロモーターを有した Adベクターが最も効率よく遺伝子導入可能であった。したがって、再生医療への応用を考えた場合、このベクターを用いることで、ES 細胞から目的の治療用細胞に分化させることも可能であると考えられ、現在、血液細胞など特定の細胞へ分化させる実験を行っているところである。

E. 結論

(1) 最適化された Ad ベクターを用いて機能遺伝子を導入することにより、ES 細胞の分化を自由に制御できる可能性を示した。

(2) ES 細胞を *in vitro* で分化させる際の中間体である EB へ高効率に遺伝子導入可能な Ad ベクターを開発した。

F. 研究発表

1. 論文発表

K. Kawabata, F. Sakurai, T. Yamaguchi, T. Hayakawa, and H. Mizuguchi. Efficient gene transfer into mouse embryonic stem cells with adenovirus vectors. *Mol. Ther.*, 12, 547-554, 2005

K. Kawabata, F. Sakurai, N. Koizumi, T. Hayakawa, H. Mizuguchi. Adenovirus vector-mediated gene transfer into stem cells. *Mol. Pharm.*, in press.

2. 学会発表

川端健二, 水口裕之, 櫻井文教, 山口照英, 早川堯夫. ES 細胞に対する高効率アデノウイルスベクターの開発. 日本薬学会第 125 年会, 東京, 2005 年 3 月

田代克久, 川端健二, 櫻井文教, 早川堯夫, 水口裕之. マウス胚性幹細胞及び胚葉体に対する高効率アデノウイルスベクターの開発. 第 28 回日本分子生物学会年会, 福岡, 2005 年 12 月

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成17年度

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成18年7月31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