

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2分野

創薬のための生体機能解析に関する研究

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 のコンディショナル・ノックアウト・マウスを作製した。胎仔由来の細胞全てで EAT を欠損するマウスは、胎齢 12.5 日頃に致死となった。心臓を含む循環器系の形成不全がその原因と考えられ、神経系の発育異常も観察された。

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する。

B. 研究方法

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した。平成 16 年度に作製した EAT の exon 1 を loxP で挟むような変異と選択マーカーを挿入されたマウス (EAT 3lox 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 (EAT null 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 (EAT flox マウス) を作製した。

EAT null マウス、EAT flox マウスと胎生 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) を交配した。現時点では、胎仔由来組織において EAT がノックアウトされたマウスは生まれていないため、胎齢 10.5 日、12.5 日の胎仔の形態、組織像を解析した。

(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って、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

平成 16 年度に作製した相同組換えにより EAT の遺伝子座に 3 個の loxP 配列と選択マーカーを導入したマウス、3 ラインのうち、2 ラインのマウスを Cre recombinase を発現するトランスジェニック・マウス (MeuCre40 マウス) と交配することにより 1) EAT の exon 1 が破壊されたマウス (EAT null マウス)、2) EAT の exon 1 の両端に loxP 配列が挿入されたマウス (EAT flox マウス) を作製した

(図 1)。EAT null マウスは、EAT 遺伝子の一方の対立遺伝子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。EAT null マウス同士の交配を行ったが、ホモ接合性のノックアウト・マウスは、生まれず、胎生致死と考えられた。

flox マウスと 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) を交配することによって、胚盤葉上層由来組織特異的に EAT をノックアウトした。本マウス作製により、着床や胎盤機能の欠損による致死を回避することが可能となる。現在のところ新生仔の解析では、コンディショナル・ノックアウトマウスは、生まれておらず、胚性致死と考えられた。そこで胎仔を解析したところ、胎生 12.5 日では、胎仔は、頭殿長 (CRL) が 4~5mm (通常は、8~9mm 程度) であり、正常の約 1/2 であった。また、外観上、正常マウスと大きく構造が異なり、通常の眼、四肢を同定することは不可能であった (図 2)。組織学的な解析の結果、複数の組織において、アポトーシスが著しく増加している像が観察された (図 3)。胎生 10.5 日では、ノックアウトマウスは、外観上、頭部がやや大型で、体部、尾部が小型であった (図 4)。組織学的な解析の結果、神経上皮が薄く、脳胞が拡張していることが明らかとなった。神経上皮と間葉組織にアポトーシスが観察された。心臓の壁も薄く、血管数が著しく減少していた。これらの結果から循環器系組織の形成不全による死亡と考えられたが、神経上皮の形成も不全であると考えられた。現在、さらに早期の週齢の胎仔を中心に、詳細に解析中である。

D. 考察

EAT のノックアウトマウスの作製に成功した。同マウスのヘテロ接合性のマウスの表現形は、形態学的には野生型と同様と考えられた。一方、ホモ接合性のマウスは生まれず、胚性致死と考えられた。

また、胚盤葉上層由来の全ての細胞で EAT をノックアウトしたコンディショナル・ノックアウト・マウスを作製した。同マウスは胚性致死と考えられたが、胎生 10.5 日では、神経上皮、間葉組織にアポトーシスの増加を認めた。このことから本遺伝子が、発生過程の複数の組織において、アポトーシスを制御していることが示唆された。また、循環器系の形成不全が観察され、この原因がアポトーシスであるかどうか、検討が必要である。本分子は、培養細胞を用いた解析では、抗がん剤や紫外線などによって誘導されるアポトーシスを抑制することが示されているが、発生過程においてもアポトーシスを抑制していると考えられた。さらに解析を進めることにより、胎仔の器官形成期の諸臓器における本分子の機能を明確にすることができる。

胚盤葉上層特異的 EAT コンディショナルノックアウトマウスは、胚性致死となるために、膵ランゲルハンス島 β 細胞における本遺伝子の機能を解析するためには、 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ことが明らかとなった。そのためインスリンプロモーターによって Cre recombinase を発現するトランスジェニック・マウスと EAT flox マウスを交配する計画である。また、EAT 欠失 ES 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膵ラ氏島等での 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作製に成功した。胎仔由来の組織全体において EAT を欠失するマウスの解析結果から、本遺伝子が器官形成過程に細胞の

viability を調節していることが示唆された。さらに詳細な解析を実施中である。更に、膵ランゲルハンス島における機能を解析するために、膵ランゲルハンス島特異的ノックアウトマウスを作製する計画である。

F. 研究発表

1. 論文発表

該当無し

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

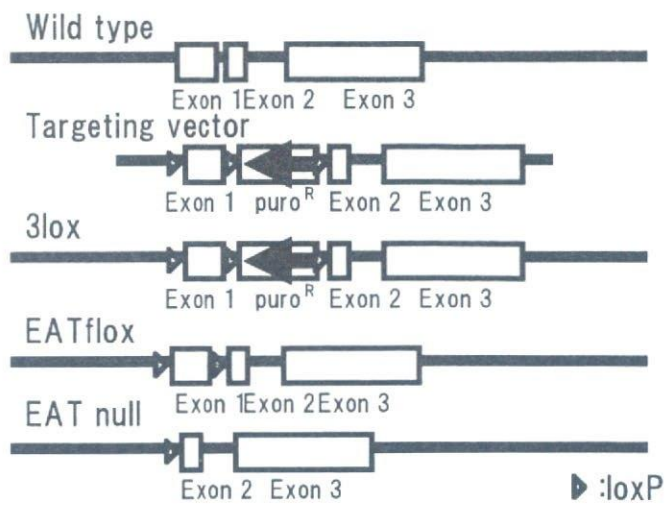


図1 EATのゲノムとターゲティングベクター

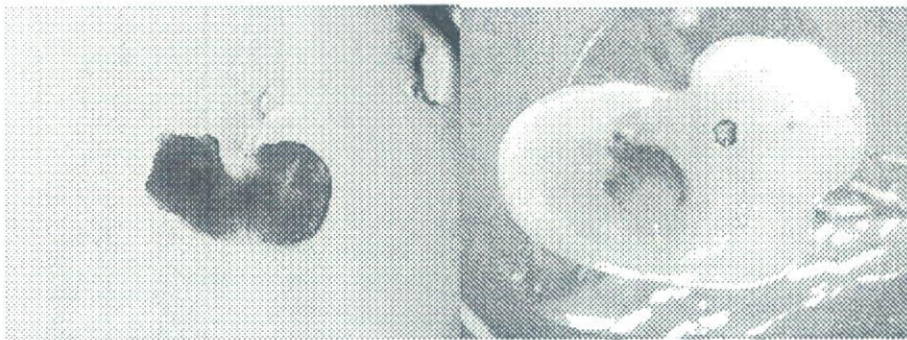


図2 12.5日胚 (左:ノックアウトマウス、右:同腹仔)

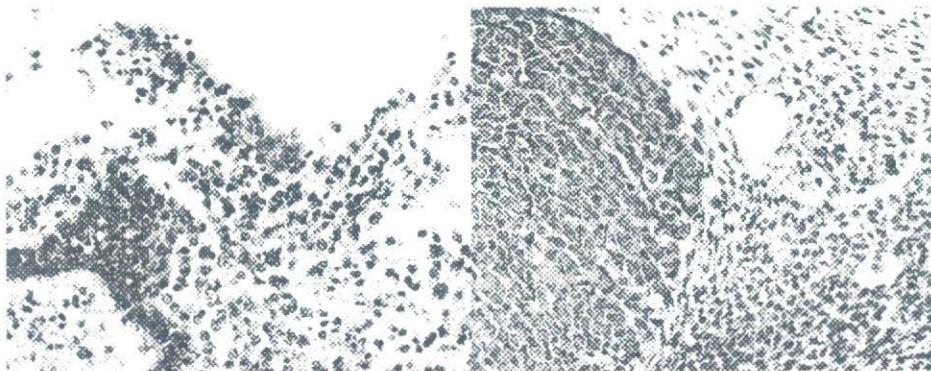


図3 12.5日胚の組織像 (左:ノックアウトマウス、右:同腹仔)

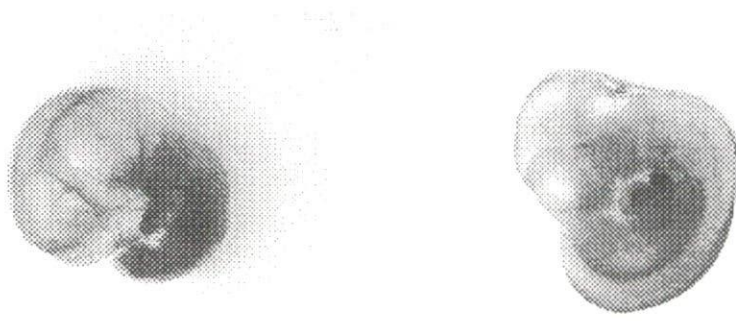


図4 10.5日胚（左：ノックアウトマウス、右：同腹仔）

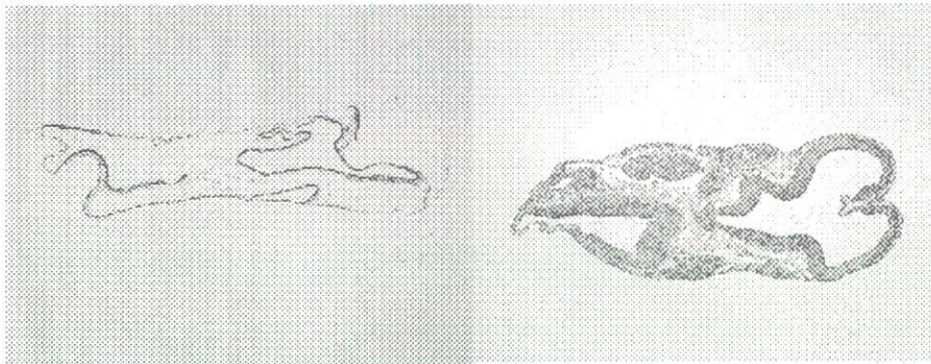


図5 10.5日胚の組織像（左：ノックアウトマウス、右：同腹仔）

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