

平成18年度

若手研究者奨励研究報告書

目 次

政策創薬総合研究

課題番号

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 …… 1
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 …… 12
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 …… 26
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 …… 37
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 …… 50
KH23331	寄生性原虫の生育に必須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 …… 60
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 …… 66
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 …… 79
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 …… 92
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ーの基礎的および応用的研究	川上浩司 …… 101
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 …… 105
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 …… 116
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 …… 126
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 …… 136
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 …… 150
KHC3361	C型肝炎ウイルス粒子産生制御による新規治療法の萌芽的研究	村上恭子 …… 156
KHC3362	高齢化社会に適応する歯の延命化を目指した歯髄・象牙質再生による新しい抜髄治療法の開発	庵原耕一郎 …… 162
KHC3363	HDL形成責任タンパク質ABCA1の代謝制御をターゲットとした新規動脈硬化治療法に関する研究	奥平桂一郎 …… 167

エイズ医薬品等開発研究

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 ……173
KAC3761	論理的創薬手法によるHIV-1プロテアーゼニ量体化を阻害す る低分子化合物の探索	中村寛則 ……186
KAC3762	HIV治療用合成siRNAの新規デリバリーシステムの開発	児玉耕太 ……191

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

ES 細胞を目的の細胞に分化させるには胚葉体 (EB) とよばれる中間体を介して行われる。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、EB に機能遺伝子を導入することにより、効率よく目的の細胞に分化させることが可能であることを明らかにした。

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。ES 細胞を目的の細胞に分化させるには胚葉体 (embryoid body; EB) とよばれる中間体を介する。昨年、アデノウイルス (Ad) ベクターを用いた EB への高効率遺伝子導入法について報告した。そこで、本年度はこの Ad ベクターを用いて EB に機能遺伝子を導入することにより、目的の細胞に効率よく分化させることが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 pHMCMV5 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 pHMVMV5-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-CMV-LacZ1、pAdHM4-CA-LacZ1、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

一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-CA-GFP、Ad-CA-PPAR γ を作製した。

(3) RT-PCR

mES 細胞および EB から total RNA を抽出し、G3PDH、CAR、Oct-3/4、Nanog、Brachyury(T) の各遺伝子発現を調べた。また、12 穴プレートに播種し、分化誘導培地で 12 日培養した細胞から、total RNA を抽出し、PPAR γ (PPAR γ 1 と PPAR γ 2 の両方を検出)、PPAR γ 2 (PPAR γ 2 のみ検出)、C/EBP α 、aP2、adiponectin、leptin、G3PDH の各遺伝子発現を調べた。PCR プライマー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' -TTCACCTCCAATCACTGGC-3'

Brachyury T(F) 5' -CAGGAGGATGTTCCCGGTGC-3'

Brachyury T(R) 5' -TCCGAGGTTCACTACTATGC-3'

PPAR γ 1(F): 5' -CCCTGGCAAAGCATTGTAT-3'

PPAR γ 1(R): 5' -AATCCTTGGCCCTCTGAGAT-3'

PPAR γ 2(F): 5' -ATGGGTGAAACTCTGGGAGA-3'

PPAR γ 2(R): 5' -CAACCATTGGGTCAGCTCTTG-3'

C/EBP α (F): 5' -CGCTGGTGATCAAACAAGAG-3'

C/EBP α (R) 5' -GTCACTGGTCAACTCCAGCA-3'

aP2(F) 5' -TGGAAGCTTGTCTCCAGTGA-3'

aP2(R) 5' -ACACATTCCACCACCAGCTT-3'

adiponectin(F) 5' -GTTGCAAGCTCTCCTGTTCC-3'

adiponectin(R) 5' -GCTTCTCCAGGCTCTCCTTT-3'

leptin(F) 5' -TGACACCAAAACCCTCATCA-3'

leptin(R) 5' -CTCAAAGCCACCACCTCTGT-3'

(4) LacZ アッセイ

Day5 の EB に対してハンギングドロップの状態、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 MgCl₂、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。

(5) Ad ベクターによる遺伝子導入

2 日間ハンギングドロップを行うことで ES 細胞から EB を形成させ、その後 3 日間浮遊培養した Day5 EB に対して 10,000 VP/cell の濃度で Ad-CA-GFP を 1.5 時間作用させ、下記に示すように GFP の発現を解析した。

Ad ベクターを連続で作用させる場合は、Day0、2、5 の 3 点で 10,000 VP/cell の濃度で各 Ad ベクターを 1.5 時間作用させた。なお、脂肪細胞へ分化誘導するときも同様に 3 点で遺伝子導入を行った。

(6) GFP の発現解析

EB に対して Ad-CA-GFP を感染させ、2 日後に GFP の発現部位を共焦点レーザー顕微鏡により観察した。さらに、EB をトリプシンでシングルセルにしてフローサイトメーターにより GFP 陽性細胞の割合を調べた。

(7) 脂肪細胞への分化誘導

ハンギングドロップを 2 日間行って EB を形成させ、続いて 3 日間 all-*trans*-retinoic acid (RA) 含有培地で培養した。その後 RA を除いた培地で 2 日浮遊培養して、7 日目にゼラチンコートした 12 穴プレートに 4EB/well で播種して分化誘導培地 (100 μ M 3-isobutyl-1-methylxanthine、100 nM

insulin、1 μ M dexametasone、2 nM triiodothyronine) で培養した。

(8) GPDH アッセイ

12 穴プレートに播種し、分化誘導培地で 12 日、24 日培養した細胞を回収し、セルガレージ社の GPDH Assay kit を用いて GPDH (glycerol-3-phosphate dehydrogenase) の酵素活性を測定した。

(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

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。ES 細胞およびハンギングドロップ後 2、5 日目の EB を用いて、遺伝子発現を RT-PCR にて検討した結果、ES 細胞および EB の両者においてアデノウイルス受容体 CAR (coxsackievirus and adenovirus receptor) の発現が認められた (Fig. 1)。また、ES 細胞の未分化維持に必須の転写因子である Oct-3/4 や Nanog は ES 細胞で高発現しており、EB に分化するにつれ発現は低下していた (Fig. 1)。さらに、EB では中胚葉マーカーである brachyury (T) の発現がみとめられた。

次に、RSV、CMV、CA、EF-1 α 各 4 種のプロモーターを有する LacZ 発現 Ad ベクターを、ハンギングドロップ後 5 日目の EB に対し、3,000 VP/cell の濃度で作用させた結果、CA プロモーターを有した Ad ベクターを作用させた場合に最も高い遺伝子発現を示し、EB には CA プロモーターを有する Ad ベクターが最適であることが示された (Fig. 2)。

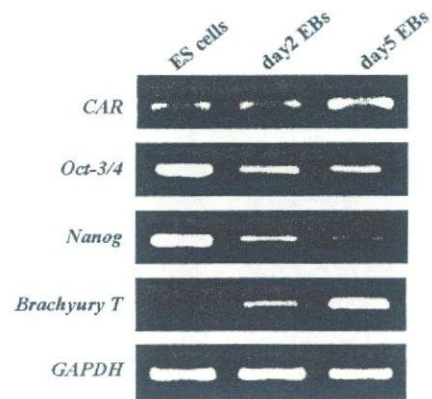


Fig. 1 RT-PCR analysis in ES cells and EBs.

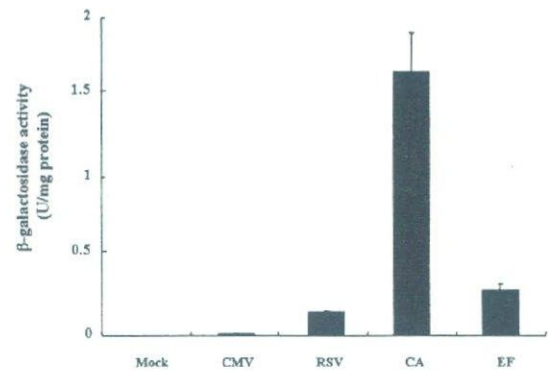


Fig. 2 β -galactosidase activity of Ad vector-transduced EBs. EBs were transduced with 3000 VP/cell Ad-CMV-LacZ, Ad-RSV-LacZ, Ad-CA-LacZ, or Ad-EF-LacZ. Two days after infection, β -galactosidase activity was measured.

EB は分化した ES 細胞の凝集体であるため、1 回の作用でその内部にまで Ad ベクターを感染させるのは困難であると考えられる。そこで、これまでの 1 回作用に対し、EB 作製後 0、2、5 日目の計 3 回 CA プロモーターを有した GFP 発現 Ad ベクターを作用させ、1 回作用と 3 回作用の遺伝子導入効率について検討した (Fig. 3)。その結果、1 回作用させた場合、24% の細胞に遺伝子に GFP の発現がみとめられたのに対し、3 回作用させた場合では 38% の細胞に GFP の発現がみとめられ、EB 形成中に Ad ベクターを作用させることにより、発現効率

の上昇ならびに EB 内部での発現がみとめられることが明らかとなった。

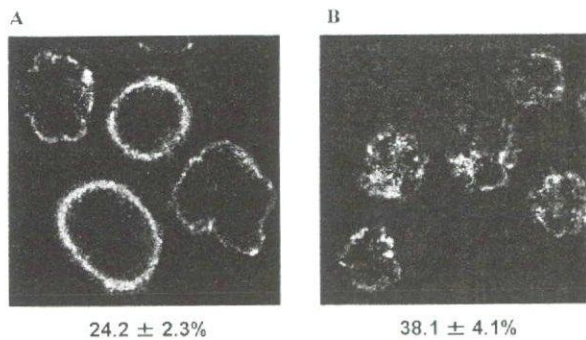


Fig. 3 GFP expression in EBs after once (A) or three times (B) infection of Ad-CA-GFP. The percents mean the transduction efficiency measured by flowcytometry analysis. Note that EBs, which are transduced with three times infection of Ad vectors, express GFP not only in marginal cells but also inner cells (B).

以上より、Ad ベクターを用いた EB への高効率遺伝子導入法が確立できたので、次にこの手法を用いて機能遺伝子を EB に導入し、目的の細胞に分化させることを試みた。

In vitro で成熟脂肪細胞を作製することは脂肪細胞分化に関する基礎研究および再生医療にとって極めて重要である。そこで、脂肪細胞分化のマスターレギュレーターである PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ) 遺伝子を Ad ベクターを用いて EB に導入し、ES 細胞から脂肪細胞に分化させた。一般に in vitro で脂肪細胞に分化させる場合、4 種の液性因子 (3-isobutyl-1-methylxanthine、insulin、dexametasone、triiodothyronine) を培地に加えることにより行われる。まず、これらの液性因子非存在下で PPAR γ cDNA を導入したところ、脂肪細胞分化の指標である GPDH (glycerol-3-phosphate dehydrogenase) 活性が有意に上昇した (Fig. 4A)。

ただし、その効果は低いものであったことから、次に液性因子存在下で PPAR γ cDNA を導入した。その結果、PPAR γ と液性因子の両者を作用させた場合、液性因子単独作用時と比較し有意に GPDH 活性が上昇した (Fig. 4B)。したがって、Ad ベクターを用いて PPAR γ 遺伝子を EB に導入することにより、従来の方法と比較し効率良く脂肪細胞へと分化誘導できることが示された。

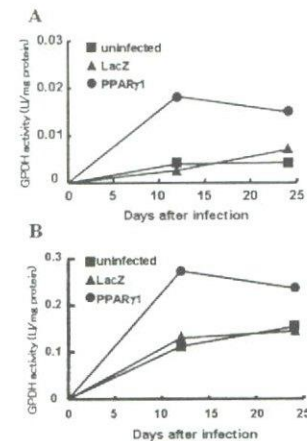


Fig. 4 Adipocyte differentiation from ES cells after infection of Ad-CA-PPAR γ . EBs were transduced with none, Ad-CA-LacZ, or Ad-CA-PPAR γ in the absence (A) or presence (B) of soluble differentiation factors. After infection of Ad vectors, GPDH activity was measured.

D. 考察

Ad ベクターは煩雑な操作を経ずに効率よく外来遺伝子を導入できる系であり、遺伝子治療臨床応用研究や基礎研究における遺伝子導入実験に繁用されてきた。本研究では、in vitro で ES 細胞から目的の細胞に分化誘導する場合の中間体である EB に対し、高効率に外来遺伝子を導入する技術の開発を試み、CA 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明らかにした。また、EB 形成過程で Ad ベクターを感染させることにより、EB 内部にも遺伝子を発現させることが可能であった。さらに、この Ad ベクターを用いて PPAR γ 遺

伝子を EB に導入することにより、効率よく脂肪細胞に分化誘導が可能であった。今後、この技術を用いて他の機能遺伝子を導入することにより、血液細胞や骨芽細胞などにも分化させることが可能であると考えられ、再生医療への応用に向けたさらなる研究進展が望まれる。

E. 結論

(1) 最適化された Ad ベクターを用いることにより、EB に対し高効率に遺伝子導入できることが明らかとなった。

(2) 最適化された Ad ベクターを用いて PPAR γ 遺伝子を EB に導入することにより、効率よく脂肪細胞に分化させることが可能であった。

F. 研究発表

1. 論文発表

K.Kawabata, F.Sakurai, N.Koizumi, T.Hayakawa, H.Mizuguchi. Adenovirus vector-mediated gene transfer into stem cells. Mol. Pharm., 3, 95-103, 2006.

川端健二, 櫻井文教, 水口裕之. 改良型アデノウイルスベクターを用いた各種幹細胞への遺伝子デリバリー. DDS. in press.

2. 学会発表

田代克久, 川端健二, 櫻井晴奈, 倉知慎之輔, 櫻井文教, 中川晋作, 早川堯夫, 山西弘一, 水口裕之. アデノウイルスベクターを用いたマウス胚様体への遺伝子導入法の確立. 日本薬学会第127年会, 富山, 2007年03月

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

平成18年度

政策創薬総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成19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