

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 $\gamma$ 受容体を介した Dengue 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



## 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 を胎仔由来の全細胞で欠損するマウスを作製した。胎齢 9.5 日頃には発達遅延が観察され、間葉、神経などの臓器にアポトーシスの増加が観察され、12.5 日頃には致死となった。さらに EAT<sup>flox/flox</sup> 胚性幹細胞を作製した。

### 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考えられる。

### B. 研究方法

マウス作製：EAT 遺伝子の遺伝子座に 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<sup>3lox/wt</sup> マウス)、EAT の一方の対立遺伝子を欠失したマウス (EAT<sup>null/wt</sup> マウス)、EAT<sup>3lox/wt</sup> マウスにて 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<sup>flox/wt</sup> マウス) は、平成 16 年度及び平成 17 年度に作製した。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 (Mox2-Cre マウス; MORE マウス) は the Jackson Laboratory より入手した。ROSA26Cre レポーターマウスは、Dr. P Soriano (Fred Hutchinson Cancer Research Center) より提供された。

EAT<sup>null/wt</sup> マウスと Mox2-Cre マウスを交配することにより EAT<sup>null/wt</sup>/Mox2-Cre マウスを得た。同マウスを EAT<sup>flox/flox</sup> マウスと交配した。得られる胎仔のうち EAT<sup>flox/null</sup>/Mox2-Cre(+) が、胚盤葉上層由来組織特異的に EAT がノックアウトされたマウスとなる。同腹の EAT<sup>flox/wt</sup>/Mox2-Cre(+), EAT<sup>flox/null</sup>/Mox2-Cre(-), EAT<sup>flox/wt</sup>/Mox2-Cre(-) の genotype を示すマウスをコントロールとして使用した。

EAT ノックアウト ES 細胞の樹立：過排卵した EAT<sup>flox/flox</sup> マウス雌を EAT<sup>flox/flox</sup> マウス雄と交配、3.5 日胚 (胚盤胞) を培養することにより EAT<sup>flox/flox</sup>ES 細胞を得た。

胎仔の解析：胎齢 8.5 日、9.5 日、10.5 日、11.5 日、12.5 日の胎仔を子宮より摘出し、実体顕微鏡下で形態を観察した。4%PFA 固定し、パラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色を施し、組織像を解析した。常法に従って cleaved Caspase3 抗体 (Cell signaling 社)、phospho Histone H3 抗体 (Cell signaling 社) を用い、免疫染色を行った。対比染色はヘマトキシリン染色を行った。

$\beta$  ガラクトシダーゼ染色：胎齢 7.5 日、8.5 日の胚を子宮から摘出し、0.2% グルタルアルデヒドあるいは 0.4% パラホルムアルデヒドで固定した。0.01% デオキシコール酸ナトリウムと 0.02% NP-40 と 2mM MgCl<sub>2</sub> を含む 0.1M リン

酸緩衝液にて 3 回洗浄し、染色液 (5mM フェリシアン化カリウム、5mM フェロシアン化カリウムと 20mM の X-gal を含む上記洗浄液) にて 1~3 時間染色した。染色後、70% エタノールで保存した後、常法に従ってパラフィンに包埋し切片を作製した。ケルンエヒロートにて対比染色を行った。

(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。

遺伝子組換え実験にあたっては、遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律、国立成育医療センター研究所遺伝子組換え実験安全規程を遵守して行った。本研究課題において行う遺伝子組換え実験に関しては、国立成育医療センター研究所遺伝子組換え実験安全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

Mox2-Cre マウスによる、コンディショナル・ノックアウト効率を確認するために、ROSA26Cre レポーターマウスと Mox2-Cre マウスを交配し、胎齢 7.5 日及び 8.5 日の胎仔を  $\beta$  ガラクトシダーゼ染色にて染色した。その結果、図 1 のごとく、7.5 日胚では、胚盤葉上層由来組織のほぼ全ての細胞において Mox2-Cre によって loxP の組換えが生じていることが判明した。8.5 日胚においても、同様に胚盤葉上層由来組織のほぼ全ての細胞において Mox2-Cre によって loxP が組換えられた。



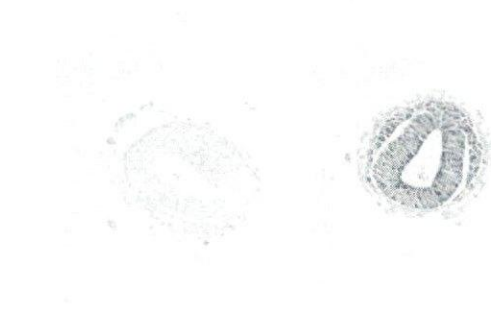


図1 7.5日胚の8ガラクトシダーゼ染色によるMox2-CreにおけるCreの活性を確認

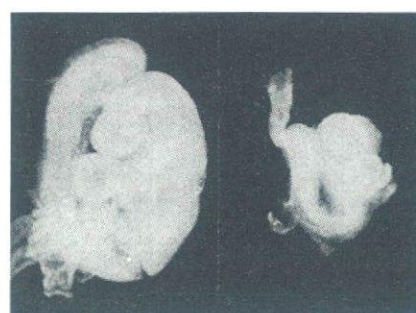
EAT<sup>flox/flox</sup> マウスと EAT<sup>null/wt</sup>/Mox2-Cre マウスを交配することによって、胎生5日目以降に、胚盤葉上層特異的にEATをノックアウトした。本マウス作製により、着床や胎盤機能の欠損による致死を回避することが可能となる。その結果、出生後の子マウスには、コンディショナル・ノックアウトマウスは、確認されず、胚性致死と考えられた(表1)。そこで胎齢8.5日~12.5日の胎仔を解析したところ、表1のごとく、予想される割合で、EATコンディショナル・ノックアウトマウスの存在が確認された。しかしながら、同マウスは、9.5日では、同腹仔と比較して、小型で、発生段階が遅れていた。さらに10.5日胚では、胚体の変性が認められ、10.5日~12.5日の間に胎仔は死亡するものと考えられた。

表1 EAT<sup>flox/flox</sup> と EAT<sup>null/wt</sup>/Mox2-Cre(+)交配による仔マウスの遺伝子型

Stage	No. with genotype				合計
	EAT <sup>flox</sup> / null/Mox x2-Cre	EAT <sup>flox</sup> / wt/Mox 2-Cre	EAT <sup>flox</sup> / null/Mox 2-Cre(-)	EAT <sup>flox</sup> / wt/Mox2 -Cre(-)	
E7.5	0	2	0	4	6
E8.5	12	10	14	11	47
E9.5	18	28	23	22	91
E10.5	9	14	12	9	44
E11.5	3	2	8	2	15
E12.5	4	5	2	5	16
生後	0	5	13	8	0

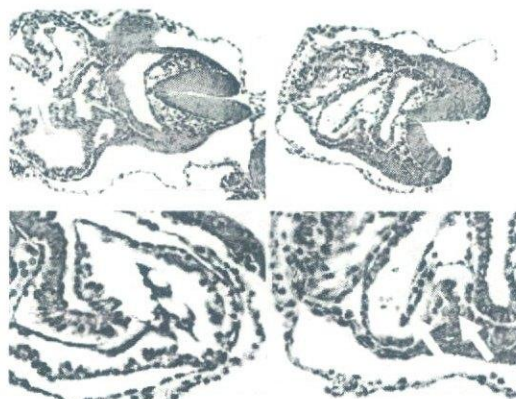
まず、9.5日胚を詳細に観察した。通常は9.5日胚では胚回転が終了しているが、大部

分のEAT<sup>null/wt</sup>/Mox2-Creマウスは、胚回転前の形態であった(図2)。概ね8.5日胚に相当する大きさで形態であった。神経、心臓、腸管、体節、allantoisなどの形態は概ね異常がないものと考えられた。しかしながら、組織学的には、間葉と神経、心臓壁等にアポトーシス小体様の細胞の増加が観察された(図3)。免疫染色の結果、cleaved Caspase3陽性のアポトーシスの初期段階の細胞が増加しており、アポトーシスが増加していると考えられた(図4)。一方、phospho Histone H3抗体でラベルされる増殖細胞の数に著変は認めなかった。



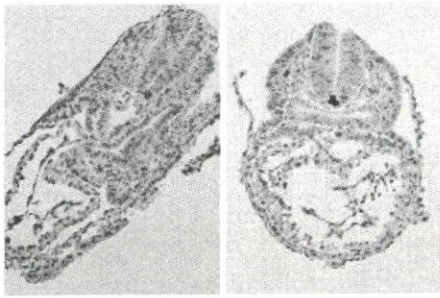
同腹仔 ノックアウト

図2 9.5日胚の肉眼形態



コントロール ノックアウト

図3 9.5日胚の組織像 矢印はアポトーシス小体を示す



コントロール ノックアウト

図4 9.5日胚における cleaved Caspase3 染色

さらに10.5日胚では、胚体の変性、脳室の拡大が観察された。組織学的には、間葉及び神経を中心とした組織に大量の細胞死が観察された。12.5日胚でもコンディショナル・ノックアウト胚は明らかに小型で、大量の細胞死が観察された。

妊娠中期に致死となることから、心血管系、胎盤—臍帯—胎仔循環、血球について着目した。形態学的には心の構造に明らかな異常は無いように思われた。しかしながら、上記のごとく9.5日胚では、心臓壁（内皮下）にアポトーシスが増加しており、10.5日胚では、心臓壁が薄く異常であった。また、allantois に大きな異常はなく、10.5日齢においては臍帯は通常に比し細いながらも形成されており、胎盤内に胎仔の有核赤血球が多数、認められ、胎盤循環が確認された。また、8.5~9.5日胚において胎仔の主要な造血である卵黄嚢造血は、組織学的に明らかな異常は同定できなかった。

また、EAT<sup>flx/flx</sup> 雌マウス5匹をEAT<sup>flx/flx</sup> 雄マウスと交配した。1ラインのES細胞を樹立した。さらに数ラインのES細胞の樹立を試みている。

#### D. 考察

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。同マウスにより胚発生初期の着床・胎盤形成にかかわる致死を回避することができ、EATの胎仔自身での機能

を解析することができた。胎齢7.5日から12.5日では、ほぼ期待される割合でEATノックアウトマウスは存在したが、胎齢10.5日~12.5日において致死であった。このことからEATは、胚盤葉上層形成以降、卵円筒胚など、初期胚での細胞のviabilityに必須ではないことが示唆された。

EATノックアウトマウスは、胎齢9.5日において、既に発生が遅延していた。通常、この日齢では、胚の回転が終了している時期であるが、EATノックアウトマウスは、胚の回転が終了しておらず、ほぼ胎齢8.5日の形態、大きさであった。さらに、小型で発生が遅延しているものの、胚の形態自体には顕著な形態の異常は認めなかった。すなわち、EATは特定の組織の分化に関与するというよりも、多くの組織において細胞の生存を支持している可能性が示唆された。

心臓の分化・形態には異常は無いようであったが、胎齢9.5日から10.5日では、壁の細胞のアポトーシスを認めた。ただし、胎齢8.5日相当の大きさの胚においてもアポトーシスの増加が認められることから、循環不全によるアポトーシスというよりは細胞自身のviabilityの低下の可能性が高いと考えられた。更に発生が進んだ胚10.5日~12.5日胚の観察では、胚の様々な部位で、顕著な細胞死が観察された。これらの細胞死が、細胞自律性の細胞死か、二次的な細胞死かは、更に検討が必要と考えられる。

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する機能を持つものと考えられた。

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、 $\beta$ 細胞特異的な EAT の機能を解析するために ES を利用した in vitro の系を構築を目指している。既に EAT<sup>flox/flox</sup> ES 細胞を作製しており、本 ES 細胞に、アデノウイルスベクターあるいは pMC1-Cre 発現ベクターなどを導入することにより、EAT<sup>null/null</sup> ES 細胞が作製可能である。これらの ES 細胞は、初期胚レベルのみならず、膵ラ氏島、血球系細胞、神経系細胞を含む多数の組織の分化誘導系を用いることにより、それぞれの組織における EAT の機能メカニズムを解明することが期待される。

#### E. 結論

胎児性癌分化関連分子 EAT のコンディショナル・ノックアウトマウスを作製した。胎仔由来の組織全体において EAT を欠失するマウスは、妊娠中期に発生の遅延が観察され、10.5 日～12.5 日に致死となることが明らかとなった。9.5 日胚ではアポトーシス様の細胞が増加しており、早期のアポトーシスの早期のマーカである cleaved Caspase3 が検出され、EAT がアポトーシスを抑制していること、特に間葉、神経などの細胞の viability を調節していることが示唆された。本マウスが胚性致死となったために膵ランゲルハンス島における機能を解析することができなかった。今後、Insulin promoter の制御化に Cre を発現するマウスと交配するなどして、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必要がある。

#### 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



---

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