

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 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プロテアーゼ二量体化を阻害す 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

研究期間 平成16年4月～平成19年3月

研究要旨：アポトーシス関連分子 EAT を胎仔由来の細胞全てで欠損するノックアウト・マウスを作製した。胎齢 9.5 日頃に発育遅延、間葉、神経などのアポトーシスの増加が観察され、12.5 日頃に致死となった。さらに EAT^{flx/flx} 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（ES 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

ES細胞のターゲティング：マウスES細胞にEAT遺伝子の遺伝子座に exon 1 を loxP で挟むような変異と loxP にて挟まれた選択マーカーを挿入されたターゲティング・ベクターをエレクトロポレーション法にて導入した。抗剤で選択し、EAT の一方の対立遺伝子に上記、変異を導入したES細胞を11種類、得た (EAT^{lox/lox} ES細胞)。

マウスの作製：EAT^{lox/lox} ES細胞5種類をマウスの初期胚へ注入し、キメラマウスを作製した。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ES細胞に由来するマウスを得た (EAT^{lox/lox} マウス)。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 (EAT^{null/lox} 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^{lox/lox} マウス) を作製した。

EAT^{null/lox} 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 (Mox2-Cre マウス; MORE マウス) を交配することにより EAT^{null/lox}/Mox2-Cre マウスを得た。EAT^{lox/lox} マウス同士を交配することにより、EAT^{lox/lox} マウスを得た。EAT^{null/lox}/Mox2-Cre マウスと EAT^{lox/lox} を交配し、得られる胎仔のうち EAT^{lox/null}/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^{lox/lox}/Mox2-Cre (+)、EAT^{lox/null}/Mox2-Cre (-)、EAT^{lox/lox}/Mox2-Cre (-) の genotype を示すマウスをコントロールとして使用した。

なお、Mox2-Cre 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。MeuCre40 マウスは、Dr. Holzenberg より提供された。

EAT ノックアウト ES細胞の樹立：過排卵し

た EAT^{lox/lox} マウス雌を EAT^{lox/lox} 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^{lox/lox} 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。

β 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、0.4%PFA で固定した。常法に従って 20mM の X-gal を含む染色液にて 1~3 時間染色した。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。

ウェスタンブロット：EAT^{null/lox} マウスと EAT^{lox/lox} より脾臓と心臓を摘出し、蛋白質溶解バッファーにて蛋白質を溶解し抽出した。SDS 存在下に 10%アクリルアミドゲルにて分離し、ナイロンメンブレン (Hybond C) に転写した。抗マウス EAT ポリクローナル抗体にて反応させた。二次抗体としてペルオキシダーゼ標識した抗ウサギ IgG を用いて、ECL にて発色した。蛋白質の定量は、LAS1000 を用いて行った。

(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

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、選択マーカーと EAT の exon 1 を loxP で挟むような変異（いわゆる 3lox）を有するターゲットイング・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し、11 個の EAT^{3lox}ES 細胞を得た。そのうち 5 個のクローンをマウス初期胚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 EAT^{3lox} マウスのラインを確立した。このうち 2 ラインのマウスを Cre recombinase を弱く発現する MeucCre40 トランスジェニック・マウスと交配することにより EAT^{null/wt} と EAT^{fllox/wt} を得た。

EAT^{null/wt} マウスは、EAT の一方の対立遺伝子を欠損したノックアウトマウスであるが、外見上、ほぼ正常に成獣となるまで成長した。肉眼的、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/wt} マウスと EAT^{wt/wt} マウスより脾臓、心臓を摘出しウエスタンブロットにて検討したところ、EAT^{null/wt} では、EAT の発現レベルがほぼ半量となっていた。EAT^{null/wt} 同士を交配したが、EAT^{null/wt} と EAT^{wt/wt} は生まれたが、EAT^{null/null} は生まれなかった。従って、EAT^{null/null} が、胚性致死であることが確認された。

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 日の胎子を β ガラクトシダーゼ染色にて染色した。その結果、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

よる loxP の組換えが確認された。

EAT^{fllox/fllox} マウスと EAT^{null/wt}/Mox2-Cre マウスを交配することによって、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、出生後の子マウスの中に、コンディショナル・ノックアウトマウスは、同定されず、胚性致死と考えられた。そこで胎齢 8.5 日～12.5 日の胎子を解析したところ、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 日の間に胎子は死亡するものと考えられた。

9.5 日胚を詳細に観察したところ、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^{null/wt}/Mox2-Cre マウスは、胚回転前の形態であり、概ね 8.5 日胚に相当する大きさ形態であった。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。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。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。

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、神経上皮が薄く、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。心臓の壁も薄く、血管数も減少していた。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、心臓壁が薄かった。また、allantois に大きな異常はなく、10.5 日齢において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、胎盤への循環が確認された。また、8.5~9.5 日胚における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^{flox/flox} 雌マウス 5 匹を EAT^{flox/flox} 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

EAT の exon 1 を除去したノックアウトマウスはヘテロ接合性で表現形は、野生形と同様と考えられたが、ホモ接合性のマウスは胚性致死であった。

胚盤葉上層由来の全ての細胞で EAT を欠損させ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 日において死に至った。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、二次的な細胞死かどうかは、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、腓ラングルハンス島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、β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 の系の構築を目指している。既に EAT^{flox/flox} 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^{null/null} 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、腓ラ氏島、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

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ーである 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