

2008/1005A

厚生労働科学研究費補助金
創薬基盤推進研究事業
多因子疾患モデルマウスの効率的樹立法の開発

平成20年度 統括研究報告書

主任研究者 升井 伸治

平成21(2009)年 3月

目次

I. 統括研究報告

多因子疾患モデルマウスの効率的樹立法の開発

1

升井 伸治

(資料) なし。

II. 分担研究報告

分担者なし。

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

刊行物なし。

IV. 研究成果の刊行物・別刷

なし。

多因子疾患モデルマウスの効率的樹立法の開発

主任研究者 升井 伸治 国立国際医療センター研究所 室長

疫学研究などで蓄積された遺伝学的データから、多因子疾患を再構築するシステムを意図し、任意の多重遺伝子ノックダウンマウスの高効率樹立法を開発する。具体的には、多種類の shRNA を発現する ES 細胞を樹立し、これを用いて作製したヘテロマウスを使って病態解析を行ってモデルケースとする。他の疾患モデルマウスと異なり、ヒトでの多因子疾患の病因をもつ材料を提供できる。

A. 研究目的

生活習慣病など多くの疾患は多因子疾患であることが知られるが、そのモデル動物はほとんど整備されていない。現在知られている多因子疾患モデル動物は、変異導入や選抜による自然発症モデル動物であり、表現型は似ているものの、病因が同一でないためにヒトの病態を正確に反映しているとは言い難い。一方で近年、遺伝学的データは膨大に蓄積され、多因子疾患の原因遺伝子群の同定作業は急速に進んでいる。今後は、同定した変異が病因となるかを決定する目的と、ヒト多因子疾患に即したモデルマウスを作成する目的で、多種類の遺伝子を機能阻害（SNPs の大半は機能抑制的と考えられる）して病態解析する必要があるだろう。そこで、本研究では多重ノックダウンシステムを開発し、多因子疾患の再構築システムとして提案する。

従来、遺伝子の機能阻害はノックアウト

法などにより行われていたが、多種類を扱うには操作が煩雑に過ぎ、現実には多因子疾患を再構築することは不可能であった。本研究では shRNA によるノックダウン法を用いるが、一般的手法であるゲノム上へのランダム挿入では、位置効果によって発現がばらつき多種類を一定レベルに発現できないこと、多数の遺伝子座で挿入突然変異が起きるため副作用が無視できないことが問題である。

発現カセットの置換方法について

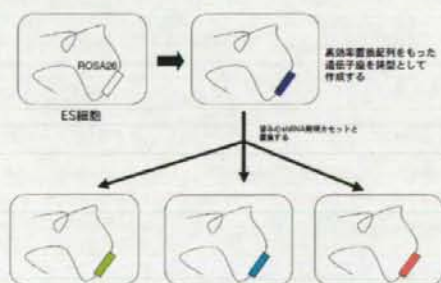


図1. 本研究のスキーム

そこで、本研究では全組織で均一に発現

する ROSA26 遺伝子座に多種類の shRNA 発現ユニットをノックインするシステムの開発を行う。そのための基盤技術として、これまでに私が ES 細胞において開発した、ROSA26 上で発現カセットを高効率で置換できるシステムを用いる (図 1; Nucl Acids Res. 33:e43, 2005)。

B. 研究方法

従来型プロモーターおよび新規プロモーターを用いて、哺乳動物細胞内において複数連結での転写能を検証した。具体的には、EGFP と DsRed をそれぞれのシステムにおいて発現させた。同時に発現することが確認できたものについて、shRNA 発現ユニットを作成した。マウス ES 細胞株は、ROSATET システムが導入されている EBRTcH3 と (Nucl Acids Res. 33:e43, 2005)、新規プロモーターからの発現をサポートする BZnTR1 を用いる。マウス ES 細胞はどちらもジャームライントランスミッションが広く確認されている E14tg2a 由来株であり、ゼラチンコートシャーレを用いて、フィーダー非存在下、LIF (ESGRO, Chemicon) 1000U/ml、10%血清存在下で培養を行った。

遺伝子導入法は Lipofectoamin2000 (Invitrogen) を用いたリポフェクション法にて行った。ノックダウン効率の検証として、SYBR Premix ExTaq (Takara) を用いた定量的 RT-PCR を行い、リアルタイム PCR 装置は MyiQ リアルタイム PCR 解析システム (BioRad) を用いた。

(倫理面への配慮)

マウスを用いた実験に関しては、厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針に従い実施する。また、遺伝子組み換え実験を行うが、P2 レベルで申請は受理されている。

C. 研究結果

i) 従来型プロモーターを用いて、2つの転写ユニットから同時発現する ES 細胞について、開発に成功している。CMV 由来の最小プロモーターと、ヘルペスウイルス由来 TK 遺伝子最小プロモーターを用いて、直列方向および反対方向に連結することで EGFP および DsRed の発現を検証した。その結果、反対方向につないだもので強い同時発現を確認した (図 2)。



図 2. 2 種遺伝子同時発現系の確立

つぎに、ROSA26 遺伝子座において正逆両方向の転写 (すなわちノックダウン効果として得られる) が起きるかどうかを、それぞれの方向にノックインされた独立の 2 クローンを取得し、テトラサイクリン除去した場合の定量的 RTPCR 法を用いたノックダウン効果の解析を行った。その結果、いずれの方向においても同程度のノックダウン効果が得られたことから、

2種ノックダウン系が機能することがわかった。

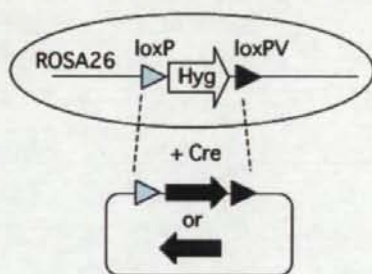
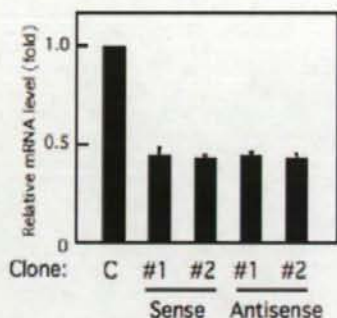


図3. ROSA26ではどちらの向きでもノックダウンコンストラクトが転写される

2種ノックダウン系を用いた解析例として、2型糖尿病関連遺伝子 *Hnf4a* と *Tcf712* (Nature 445:881-5, 2007、これらのノックアウトマウスは胚性致死であるためノックダウンでのモデルマウスが必要とされる) のダブルノックダウンマウス作成を意図し、機能する shRNA の選定を行った。ここでは miRNA (生理的 shRNA) を採用しており、RNA ポリメラーゼ II により転写されるため、将来的に組織特異的プロモーターを利用した多重ノックダウンシステムへと応用できる。

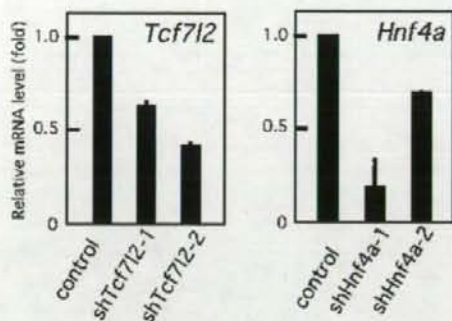


図4. shRNA の選定。それぞれの遺伝子について4種調査した内の、効果が確認できた2種を示す。

それぞれの遺伝子について、4種の miRNA 発現ユニットを作成し、ES 細胞へ導入した。24時間後に RNA を回収し、定量的 RTPCR 解析に供した。その結果、それぞれ2種の miRNA がマイルドなノックダウン効果を示した (図4)。これらの miRNA を反対方向に連結し、EBRTcH3 細胞に導入した。ES 細胞クローンの名称は、sh*Tcf712*-2 + sh*Hnf4a*-1 を RTH6-1、sh*Tcf712*-1 + sh*Hnf4a*-2 を RTH6-2 とした。取得したそれぞれの ES 細胞クローンからキメラマウス作成を行ったところ、RTH6-1 から15匹、RTH6-2 から6匹のキメラマウスが得られたので、21年度はこれらのヘテロマウスを作成し病態解析を行う。

ii) 3種以上ノックダウンのために、RNA ポリメラーゼ III 系プロモーターを用いたノックダウンコンストラクト作成を行った。

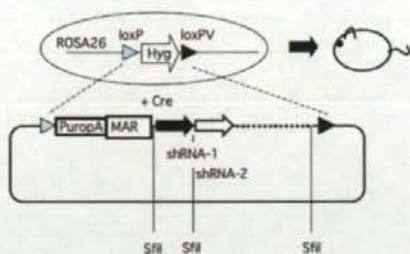


図5. 3種以上のノックダウンコンストラクトを搭載するスキーム

上記 i) の RNA ポリメラーゼ II 転写系では、直列 (タンデム) に連結した発現ユニットは転写干渉を起こして発現しないことが知られる。3種以上の転写ユニットを並べる場合、必ずどこかで直列に配置されてしまうことから、より多数の shRNA 同時発現のためにはタンデム連結でも転写干渉しないシステムが必要である。そこで、RNA ポリメラーゼ III 系プロモーターを採用した (図5)。最近の海外の知見から、RNA ポリメラーゼ III 系プロモーターである H1 プロモーターによる3個連結したノックダウン細胞が報告されており (Nat Cell Biol. 2008, 10:353-60)、このシステムで3種以上のノックダウンマウス作成が可能であることはほぼ間違いないといえる。MAR (Matrix Attachment Region; より確実なトランスジーン発現を保証するために挿入してある) 近傍の SfiI サイトへ、ワンステップで4断片を順列特異的に導入できる (つまり望みの4種が入ったプラスミドを選択する必要が無い) システムを

構築した (図6)。これにより、ノックダウンする遺伝子の種類数が n 個に増加しても、 n 回コンストラクション操作 (1回のコンストラクションに1週間かかるとすると、 n 週間かかることになる) を経ることなく迅速に多重ノックダウンコンストラクトが作成できる。



図6. SfiI断片による順列特異的連結

20年度までに H1 プロモーターによる Tcf712 と Hnf4a ノックダウンコンストラクトを作成終了し (図7)、これを ES 細胞へ導入した。21年度はこれを用いてマウス作成に進む。

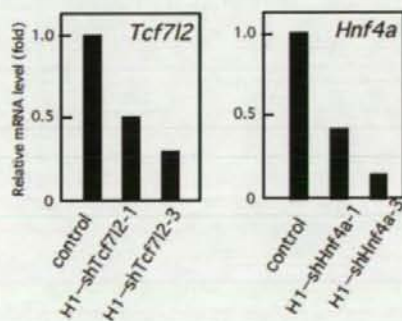


図7. H1によるshRNAの選定

iii) 上記 ii) のシステムの場合、遺伝子抑制型の SNP には対応可能なのだが、遺伝子過剰発現型を反映した変異状態を作成できない。多種類のノックダウンコンストラクトとタンパク質が同時に発現できる新規システムの開発を意図し、原理的に新しいシステムの構築を行った。上記 i) の結果から、タンパク質を発現できるシステムならば microRNA 型ノックダウンコンストラクトの作成が可能であることから、連結した場合のタンパク質の発現能を指標にアッセイを行った。試行錯誤の結果得られた新規プロモーターからの発現をサポートする ES 細胞 BZnTR1 へ、EGFP と DsRed 発現ユニットを直列および反対方向に連結したプラスミドを導入し、24 時間後に蛍光を観察した。その結果、直列につないだものでも両蛍光タンパク質の発現が確認できた (図 8)。

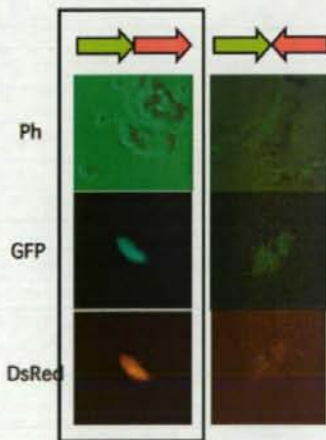


図 8. 新規発現系による 2 種遺伝子同時発現の確認。

次に、GFP と DsRed に加えてネオマイシン耐性遺伝子、ハイグロマイシン耐性遺伝子の計 4 種の遺伝子を搭載し同時発現を試みた。その結果、両蛍光タンパク質は同細胞で発現しており、また両薬剤耐性遺伝子も同時に発現していることが確認できた。したがって、原理上は無制限の遺伝子を連結・発現できるシステムが構築できたといえる (図 9)。

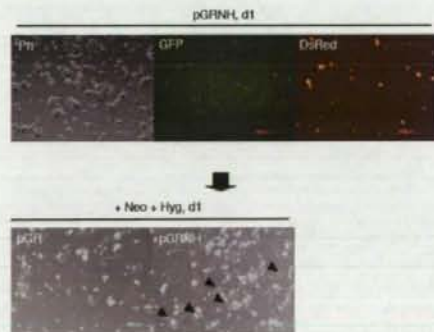


図 9. 4 種遺伝子の同時発現

D. 考察

従来型プロモーターシステムを用いて、2 種遺伝子のノックダウンマウスを作成

できるめどがついた。ROSA26 遺伝子座への高効率置換を可能にする ROSATET システムをベースとしているため、複数の shRNA 発現ユニットを全て同一遺伝子座に導入でき、確実に多重ノックダウン細胞がとれるほか、それぞれの shRNA を一定レベルに発現するクローンを選抜する必要はなく手間がかからないことがわかった。また異なる組み合わせの shRNA セットを簡便に導入できるため、疾患候補遺伝子のスクリーニングを迅速に行えるだろう。さらに、shRNA のメリットは、配列を変えるか又はプロモーター強度を弱めることでノックダウン効率を弱めることが容易な点であり、マイルドな機能阻害の集積効果としての多因子疾患により近づくことができるシステムであるといえる。ここではそれぞれの遺伝子について4種の miRNA を調査したが、ノックダウン効率について様々なバリエーションをもつものがとれることが実証できた。以上から、有効なシステムといえるだろう。しかし従来型プロモーターシステムでは、ノックダウンコンストラクトとタンパク質が同時に発現可能なものの、3種以上の同時発現には対応できない。3種以上のノックダウンシステムとして H1 プロモーター系を採用した。搭載するベクターのサイト構造と薬剤選択マーカーを誰もが操作しやすい形に至適化するため、SfiI サイトを利用したワンステップクローニングプロトコルを作成できたので、ノックダウンする遺伝子の種類数

が増えても簡便に効率良くノックダウンマウスが作成できるだろう。RNA ポリメラーゼ III 系では3種以上のノックダウンコンストラクトを発現できるものの、タンパク質が発現できなかった。両者を同時に多種類発現すべく考案された新規プロモーターシステムでは、直列の4種タンパク質遺伝子を発現させることができた。これで原理的には無限個を同時に発現できることになり、より複雑な多因子疾患モデルマウスの構築が期待できる。

E. 結論

本研究によって、多重遺伝子ノックダウンマウスの効率的樹立法が確立されるめどがついた。これは世界初であるため、多因子疾患の再構成モデルマウスの必要性を感じながらも作成できなかった多くの研究者が利用することは間違いない。大規模 SNP 解析で疾患との相関が発見された多数の SNPs/遺伝子については、それが機能的かどうかを簡便に検証する方法が必要であった。本システムを用いて簡便に SNPs の機能確認を行えば、SNPs を体質診断等に用いる場合において、遺伝子機能知見に基づく確度の高い予言が可能になる。多くの研究者がこれを用いて様々な多重遺伝子ノックダウンマウスを作製し、病因候補遺伝子セットのスクリーニングを行うことで、多くの新規多因子疾患モデルマウスの樹立につながることを願う。

さらに間接的な波及効果として、ヒト多

因子疾患に即したモデルマウスが樹立されれば、薬剤のスクリーニングや治療法の開発に多大な貢献を果たすことが期待でき、国民の健康増進に寄与するだろう。また、こうしたモデルマウスによって多因子疾患の予防法の研究も促進され、ヒトに適用されることで医療費の削減に貢献すると期待できる。

F. 健康危険情報

なし。

G. 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

升井伸治・大河内仁志・浜崎辰夫 「複数の遺伝子発現を行うための発現ベクター」、出願番号 2008-260553、2008年10月7日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし