

平成21年 4月 1日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390534
 研究課題名 (和文) 酸化ストレスタンパク質コンディショナルノックアウトマウスを用いた口腔病変の解析
 研究課題名 (英文) Analysis of oral diseases using oxidative stress inducible protein conditional knockout mouse
 研究代表者
 吉田 広 (YOSHIDA HIROSHI)
 筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授
 研究者番号：80014330

研究成果の概要：

口腔病変の解析をするために、組織特異的欠損 (コンディショナルノックアウト: CKO) マウスを制作と同時に、既存の *mull* ノックアウト (KO) マウスを用いて以下のように研究をおこなった。(1) CKO マウスの制作：A170 遺伝子に *LoxP* で第一エクソンを挟んだ *flox/flox* マウスを制作し、*Cre* マウスと掛け合わせて CKO マウスを完成させた。(2) 口腔病変における酸化ストレスの意義の解析：*Peroxiredoxin I* 遺伝子 KO マウスを用いて、シスプラチンの感受性の低下について解析した。また、A170 遺伝子 KO マウスのフェノタイプに解析を追加した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2007年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2008年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：口腔外科学

科研費の分科・細目：歯学外科系歯学

キーワード：A170, *Peroxiredoxin I*, p62, 酸化ストレスタンパク質

1. 研究開始当初の背景

口腔は食物と接する最初の場所で、口腔粘膜から顎骨まで、すべて、外界からの物理的刺激、化学的刺激など数多くのストレスを受けている。また、二次的に起こされた炎症で修飾された生体の応答でも、複雑に重なり合ったストレスが口腔病変に影響を与えている。これらの刺激の多くは、電離放射線の DNA 障害であれ炎症による好中球の免疫応答であれ、最後には活性酸素による酸化障害に帰結する。よって、以前より、我々のグループでは、とくに酸化ストレスに着目し、酸化ストレスタンパク質による応答を中心として、分子生物学的手法を用いて口腔病変の解析をおこなってきた。

2. 研究の目的

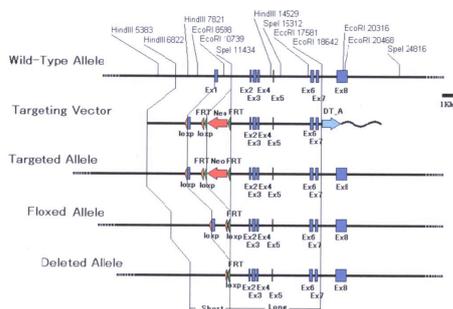
今回、当グループでクローニングした酸化ストレスタンパク質遺伝子の A170 や Peroxiredoxin I (Prx I) などの組織特異的欠損を起こさせることによって、口腔病変のメカニズムの解析をおこなうのが本研究の目的である。すなわち、プロモーターと Cre-LoxP システムを利用して酸化ストレスタンパク質のコンディショナルノックアウトマウスを制作し、組織特異的欠損ノックアウトマウスを完成させ、酸化ストレス刺激における応答を生化学的、病理学的に解析し、酸化ストレスタンパク質が口腔粘膜病変や骨病変に果たしている役割を解明する。

3. 研究の方法

本研究は(1)コンディショナルノックアウトマウスの制作と、マウス制作の間に、すでに完成している null ノックアウトマウスを利用した(2)口腔病変における酸化ストレスの意義の解析からなる。

(1) コンディショナルノックアウト(CKO)マウスの制作

CKO マウスの設計は下図の通り



LoxP で、A170 遺伝子のエクソン 1 をはさみ、ネオマイシン耐性遺伝子は FRT で消去する構造とした。

この設計の下、

① LoxP サイトを挿入したターゲティングベクターの制作

設計図のようにターゲティングベクターを制限酵素による切断と結合で制作する。

② エレクトロポレーション法による ES 細胞への遺伝子導入

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より ES 細胞に導入した。

③ ES 細胞のスクリーニング

5' , 3' プローブを用いて、サザンブロットイングにより ES 細胞にターゲティングベクターが遺伝子導入されたかをスクリーニングした。

⑤ ES 細胞のプラストシストインジェクションとキメラマウス作成

交配後 3.5 日のメスマウスの子宮からプラストシストを取り出し、実体顕微鏡下でインジェクションをおこなう。そののち偽妊娠させたマウスの子宮内にプラストシストを移植しキメラマウスを得た。

⑥ キメラマウスを掛け合わせて、LoxP マウスをえる。

⑦ FLP/FRT システムをもちいて flip トランスジェニックマウスと交配し Neo 遺伝子をフリップアウトし A170flox/flox マウスを完成させた。

⑧ Cre マウスと掛け合わせによるコンディショナルノックアウトマウスの完成。

まず、中枢特異的ノックアウトマウスとして Nestin-Cre トランスジェニックマウスとかけあわせて、中枢特異的ノックアウトマウスの制作をおこなった。

(2) 口腔病変における酸化ストレスの意義の解析

(CKO)マウス完成までの間に酸化ストレス応答について、null ノックアウトマウスを用いて解析をした。

① Peroxiredoxin I 遺伝子(null)ノックアウトマウス (Prx I KO マウス) の酸化ストレスとしてのシスプラチン抵抗性の解明

i) Prx I KO マウス胎児線維芽細胞(MEF)を採取し、ジェノトキシックストレスおよび酸

化ストレス剤としてシスプラチンを投与し、シスプラチンの抵抗性について濃度依存性 MTT アッセイを用いて調べた。96 穴プレートに 5000 個ずつ細胞を撒き、シスプラチンの感受性を評価した。また、35mm ディッシュに細胞を撒き、シスプラチン 5 μ g/ml を投与し、0, 24, 48, 72 時間で MEF 細胞 20000 個について、FACS を用いてアポトーシスの検索をおこなった。

ii) MAP キナーゼの活性化の検討

MAP キナーゼのうち p38MAPK, JNK, ERK1/2 のリン酸化をリン酸化抗体を用いて測定した。シスプラチン 5 μ g/ml をワイルド、KO の MEF 細胞に添加し、0, 0.5, 1, 2 時間のリン酸化をウェスタンブロットで評価した。

②A170 遺伝子(null)ノックアウト(KO)マウスを用いた解析

i) A170 遺伝子 KO マウスのフェノタイプの解析

体重、食事量、などを測定し、フェノタイプの解析をおこなった。

ii) CT による脂肪の測定をおこなった。

iii) A170 遺伝子 KO マウスをと ATG7 ノックアウトマウスとの掛け合わせ、オートファジーの解析に利用した。

4. 研究成果

(1) コンディショナルノックアウト(CKO)マウスの制作

前述の方法で A170flox/flox マウスを完成させ、まず、CKO マウスの効果を見るため、Nestin Cre トランスジェニックマウスと掛け合わせて、中枢特異的欠損の A170 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスを完成させた。

肥満のフェノタイプは 10 週現在 n=4 の観察で見られていない。今後、Tie-2 Cre などの造血系の CKO マウスを制作して骨に及ぼす変異を見る予定である。

(2) 口腔病変における酸化ストレスの意義の解析

①Prx I KO マウスの酸化ストレスとしてのシスプラチン抵抗性の解明

i) ワイルドタイプおよび Prx I KO MEF 細胞のシスプラチンの感受性を MTT アッセイで比較したところ、下図の通りだった。

また、FACS 解析を行ったところ、アポトーシスの割合は、0, 24, 48, 72 時間で有意に Prx I KO MEF 細胞で上昇していた。

以上から、Prx I KO 細胞はシスプラチンによる感受性が高く、アポトーシスを起こしやすいことがわかった。

ii) MAP キナーゼの活性化の検討

p38MAPK, JNK, ERK1/2 のリン酸化をリン酸化抗体を用いて測定したところ、p38MAPK, JNK, ではシスプラチン添加 0, 0.5, 1, 2 時間のリン酸化がワイルドタイプと比較し Prx I KO マウスで上昇していたが、ERK1/2 のリン酸化は抑制されていた。

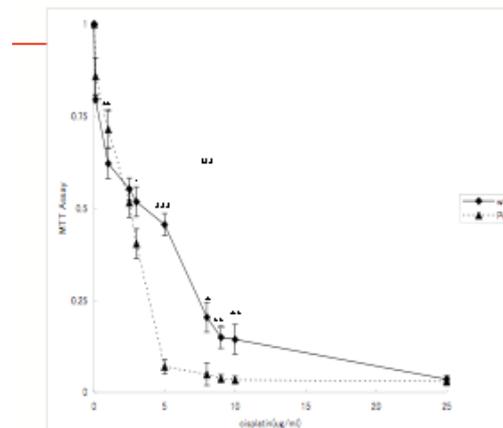


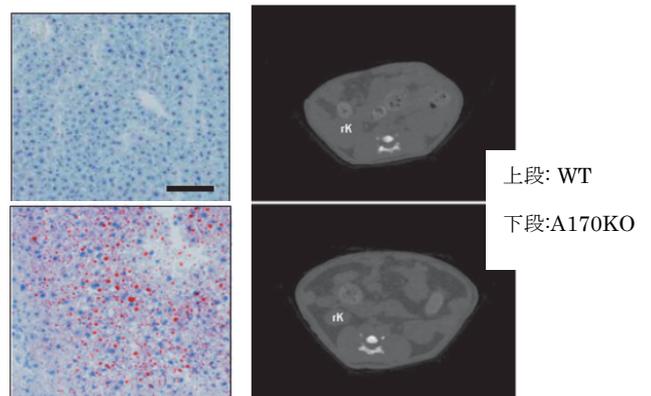
図.シスプラチン感受性の比較

②A170 遺伝子(null)ノックアウトマウスを用いた解析

i) A170 遺伝子ノックアウトマウスのフェノタイプの解析

体重、食事量とも有意に増大しており、過食による肥満が考えられた。

ii) CT による脂肪の測定をおこなったところ、ノックアウトマウスでは有意に脂肪の領域が増えていた。また、組織学的には脂肪肝を起こしていた (図)。



iii) オートファジーとの関連が判明し、A170

がインクルージョンボディを作る際に重要であることが解った。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2件)

① Kosuke Okada, Toru Yanagawa, Eiji Warabi, Keiko Yamastu, Junya Uwayama, Koichi Takeda, Hirotooshi Utsunomiya, Hiroshi Yoshida, Junichi Shoda and Tetsuro Ishii

The α -glucosidase inhibitor acarbose prevents obesity and simple steatosis in sequestosome 1/A170/p62 deficient mice
Hepatol Res. 2009 (in press)

査読の有無：有

② Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou YS, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J, Ezaki J, Murata S, Hamazaki J, Nishito Y, Iemura S, Natsume T, Yanagawa T, Uwayama J, Warabi E, Yoshida H, Ishii T, Kobayashi A, Yamamoto M, Yue Z, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K.

Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice.

Cell. 2007 131(6):1149-63

査読の有無：有

6. 研究組織

(1)研究代表者

吉田 広 (YOSHIDA HIROSHI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授
研究者番号：80014330

(2)研究分担者

石井哲郎 (ISHII TETSURO)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・教授
研究者番号：20111370

柳川 徹 (YANAGAWA TORU)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師
研究者番号：10312852

(3)連携研究者

なし