

平成 21 年 4 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：平成 19 年度～平成 20 年度
課題番号：19590599
研究課題名（和文） ヒト CYP 遺伝子多型における個体感受性を定量化するモデルマウスの作成
研究課題名（英文） Quantification of susceptibility for xenobiotics using humanized CYP1A1 and its polymorphism
研究代表者
立道昌幸（TATEMICHI MASAYUKI）
昭和大学・医学部・教授
研究者番号：00318263

研究成果の概要：

ヒト型 CYP1A1 ならびに、ヒト型 CYP1A1 の遺伝子多型（exon7 Ile/Val）をノックインしたマウスを作成した。CYP1A1 は、多種の化学物質における第一相薬物代謝酵素として最も重要な酵素であるが、ヒトとマウスとの種差がマウスで得られるデータのヒトへの外挿化を困難にしている。このマウスを利用することにより、マウスの実験結果をヒトに外挿化することに極めて重要な情報を得ることができるようになった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
20 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：衛生学

キーワード：環境保健、遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

チトクローム 450 などの薬物代謝酵素は、薬物の作用ならびに副作用の発現に重要であるだけでなく、環境中に存在する多くの化学物質（環境変異物質 xenobiotics）を代謝的に活性化して、発癌に深く関与する。特に CYP1A1 は代表的な発がん物質活性化酵素であり、この酵素により多くの環境変異原物質が活性化を受ける。しかし、この酵素は動物差が存在し、これまで生化学的に *in vitro* での機能解析において、顕著に活性が異なることが知られている。従ってこの種差の影響

により、同じ発がん物質に曝露してもヒトとの間に発癌物質の感受性に差をもたらしている。このことにより、発がん物質の評価にマウス等の齧歯類が用いられているが、その結果が容易にヒトに外挿化できない大きな理由の一つであると考えられている。またこれらの遺伝子には遺伝子多型が存在し代謝活性に影響を及ぼすと考えられているが、実際 *in vivo* での検討は出来ていない。

2. 研究の目的

本研究は第一にヒト型の CYP1A1 を組み入れ

たマウスを作成すること、第2に遺伝子多型による個体差を *in vivo* で評価する系を確立するため、遺伝子多型を含んだヒト変異型 hCYP1A1 遺伝子(cDNA)と置換したマウスを作成し、環境変異物質に対する感受性の差異を定量化することを目的とした。

3. 研究の方法

1) targeting vector の構築

図1、2に示すごとく targeting vector を作成するため以下の作業を行った。

Human CYP1A1 clone の獲得

Invitrogen より Human CYP1A1 cDNA クローン(Clone ID 5123393)を購入し、全シーケンス解析を行った。その結果、Accession No. NM_000499.2 を基準としたとき、1箇所の mutation、1base の deletion、3base の deletion がクローン内に含まれた。そこで、1箇所の mutation、1base の deletion を修正し (TOYOBO KOD-Plus-Mutagenesis Kit) これを野生型とした。

次に、上記の野生型 Human CYP1A1 exon7 内に KOD-Plus-Mutagenesis Kit を用いて SNP を挿入し、これを変異型とした。SNP ; A1506G (Ile Val, refSNP ID:rs1048943)(図3)。

Human CYP1A1(野生型および変異型)knock-in マウス作製用 targeting vector の設計

マウスゲノム上 CYP1A1 遺伝子は、exon1-7 で構成され(図4) exon2 内に開始コドンが含まれる。この開始コドンから exon7 までイントロンを含めた全てを削り、human CYP1A1 CDS + 3 UTR を挿入することで、マウス由来の CYP1A1 の発現を knock-out し、human CYP1A1 を knock-in する。さらにその下流には、コンディショナルターゲティング Cre/loxP システムを利用するための loxp-Neo-loxp カセットを挿入するよう設計した。(図1、2)

Arms(long arm, short arm)の獲得

Targeting vector 内、5 側に mouse homology long arm を、3 側に short arm を挿入するため、理化学研究所にて arms の獲得を行った。CYP1A1 を含む BAC clone (B6 mouse 由来)を入手し、これを template とした long PCR を行った。特に long arm の獲得の際には、マウス CYP1A1 開始コドンに human CYP1A1 CDS を繋ぐための制限酵素サイトを人工的に挿入する目的で(図5) 5 側には Sall site、3 側には SpeI+NotI site を付加した primer で PCR 増幅し(約 6.4kb)、Sall/NotI で pBSK に挿入した。

long arm construct への human CYP1A1 の挿入

上記で作製した long arm construct に、human CYP1A1 CDS + 3 UTR を挿入するため、
で作製した human CYP1A1 クローン(野生型及び変異型)を template とし、5 側に SpeI、

3 側に NotI site を付加した primer で CYP1A1 CDS + 3 UTR 部分を PCR 増幅した(3 UTR の polyA 付近は、NM_000499.2 及び購入したクローンのシーケンスに従う)。Forward primer; CCTAGACTAGTCATGCTTTTCCCAATCTCC、Reverse primer; ATGGAGCGGCCGCATAGGATTTCTGAACAATATC。これらを、long arm construct に SpeI/NotI で挿入した。さらに、人工的に付加した SpeI site を潰し、余分な塩基を残すことなく、マウスゲノム上の ATG から human CYP1A1 CDS が開始されるようにした。最後に construct(野生型及び変異型)内の全シーケンス解析を行い、確認した。

targeting vector の構築

上記で作製した long arm + human CYP1A1 CDS+3 UTR construct に、loxP-Neo-loxP cassette 及び short arm 約 2.7kb (3 側)、薬剤感受性遺伝子ジフテリアトキシン A フラグメント(DT-A)(5 側)を挿入し、図1、図2に示す Human CYP1A1(野生型および変異型) knock-in マウス作製用 targeting vector を完成させた。

2) 相同組換え ES 細胞の単離・同定

この過程は、理化学研究所にて行った。

ES 細胞の培養

ES 細胞は C57BL/6 の雌と CBA の雄を交配させた F1 の 4 日目胚(胚盤胞)の内部細胞塊より樹立された TT2 細胞を使用した。

ターゲティングベクターの導入と選別

targeting vector は CsCl2 密度勾配による超遠心分離法で精製した後、エレクトロポレーション法によって ES 細胞に導入した。その 2 日後からポジティブ選択用薬剤 G418 により相同組換え細胞の選別を開始し、約 7 日間で薬剤耐性コロニーを得た。

相同組換え体の同定

上記で得られた ES クローンからゲノムを抽出し、サザンブロットスクローニング法により相同組換え ES 細胞の選別を行った。SpeI 処理したゲノムは、3 側プローブ(図6)および 5 側プローブ(図7)で、ApaI 処理したゲノムは Neo プローブ(図8)についてサザン解析を行い、相同組換え体を検出した。さらには陽性クローンへの Human CYP1A1(野生型および変異型)の挿入をシーケンス解析により確認した。これらの結果より、相同組換え ES 細胞の単離・同定に成功したと判断した。

3) 相同組み換え ES 細胞のインジェクションとキメラマウスの作製

この過程は、理化学研究所にて行った。得られた相同組換え ES 細胞を ICR8 細胞期胚に注入し、代理母マウスの子宮内に移植した。産まれた仔に、ES 細胞由来の細胞がどの程度寄与しているかは、毛色により判断した。毛の

大半が野ねずみ色である仔マウスを、TT2 細胞の寄与率の高いキメラマウスとして交配に用いることとした。出産により得られたキメラマウス「野生型：100%キメラ 1 匹、70%キメラ 2 匹(1/11/09 生まれ) 変異型：100%キメラ 1 匹、70% 1 匹(1/11/09 生まれ)」を、野性型 (C57BL/6) 雌マウスと交配させ、F1 マウスを得た。

4 . 研究成果

ヒト型 CYP1A1 ならびに、ヒト型 CYP1A1 の遺伝子多型 (exon7 Ile/Val) をノックインしたマウスを作成した。

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 9 件)

- 1 . Tazawa H, Tatemichi M, Sawa T, Gilbert I, Ma N, Hiraku Y, Donehower LA, Ohgaki H, Kawanishi S, Ohshima H. Oxidative and nitrate stress caused by subcutaneous implantation of a foreign body accelerate sarcoma development in Trp53^{+/-} mice. *Carcinogenesis*. 28:191-8 2007
2. Numachi Y, Ohara A, Yamashita M, Fukushima S, Kobayashi H, Hata H, et al. Methamphetamine-induced hyperthermia and lethal toxicity: role of the dopamine and serotonin transporters. *Eur J Pharmacol*. 2007 ; 573 (2-3): 120-8
3. Tatemichi M, Sasazuki S. Inoue M, Tsugane S. Different etiological role of *Helicobacter pylori* (Hp) infection in carcinogenesis between intestinal and diffuse gastric cancers: Epidemiological assessment using IgG titer against Hp surface antigen. *Acta Oncologica*, 2008, 47(3):360-5
- 4 . Tatemichi M, Hata H, Tazawa H, Nakadate T. Lipopolysaccharide induces aberrant hypermethylation of Hic-1 in mouse embryonic fibroblasts lacking p53 gene. *Anticancer Res*. 2008;28:2101-8.
5. Sawa T, Mounawar M, Tatemichi M, Gilbert I, Katoh T, Ohshima H. Increased risk of gastric cancer in Japanese subjects is associated with microsatellite polymorphisms in the heme oxygenase-1 and the inducible nitric oxide synthase gene promoters. *Cancer Lett*. 2008,28;269(1):78-84

6. Fukushima S, Shen H, Hata H, et al. Methamphetamine-induced locomotor activity and sensitization in dopamine transporter and vesicular monoamine transporter 2 double mutant mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007 ; 193(1): 55-62
7. Shigeta Y, Kasai S, Han W, Hata H, et al. Association of morphine-induced antinociception with variations in the 5' flanking and 3' untranslated regions of the mu opioid receptor gene in 10 inbred mouse strains. *Pharmacogenet Genomics*, 2008.18: 927-36
8. Tatemichi M, Ogura T, Esumi H. Impact of inducible nitric oxide synthase on cancer progression. *Eur. J. Cancer Prev*. 2009, 18 : 1-8.
9. Tatemichi M, Sasazuki S, Inoue M, Tsugane S. Clinical significance of IgG antibody titer against *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2009. *in press*

[学会発表] (計 4 件)

1. 立道昌幸、畑春実、田澤大、中館俊夫. 炎症起炎物質(LPS)によるマウスHic1 遺伝子CpG islandのmethylationにおけるp53 の役割 第77回日本衛生学会総会 大阪、2007.3
2. 立道昌幸、久保明、中館俊夫. Microchannel array flow analyzeの測定意義 第80回日本産業衛生学会総会 大阪、2007.4
3. 立道昌幸、中野匡、中館俊夫. Frequency Doubling Technology 視野計による緑内障検診精度 (5 年間の追跡調査の結果より) 第81回日本産業衛生学会総会 札幌、2008.6
4. 立道昌幸、畑春実、田澤大、中館俊夫. 炎症によるメチル化と脱メチル化と発がん 第79回日本衛生学会総会 東京、2009.3

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
出願状況 (計 件)
出願準備中

取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立道昌幸 (TATEMICHl MASAYUKl)

昭和大学・医学部・准教授

研究者番号：00318263

(2) 研究分担者

なし

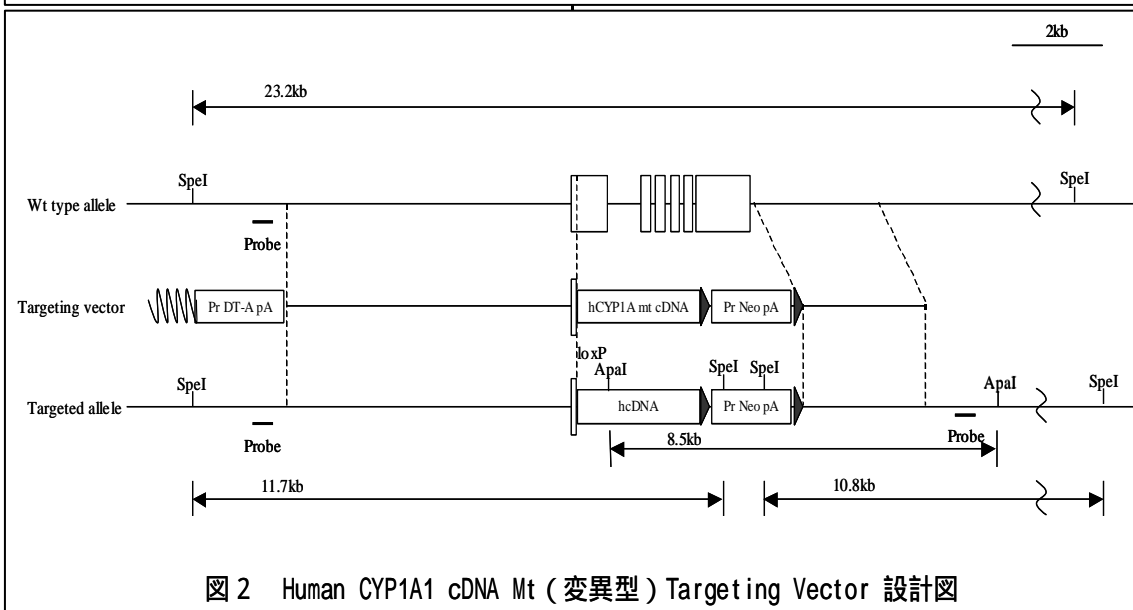
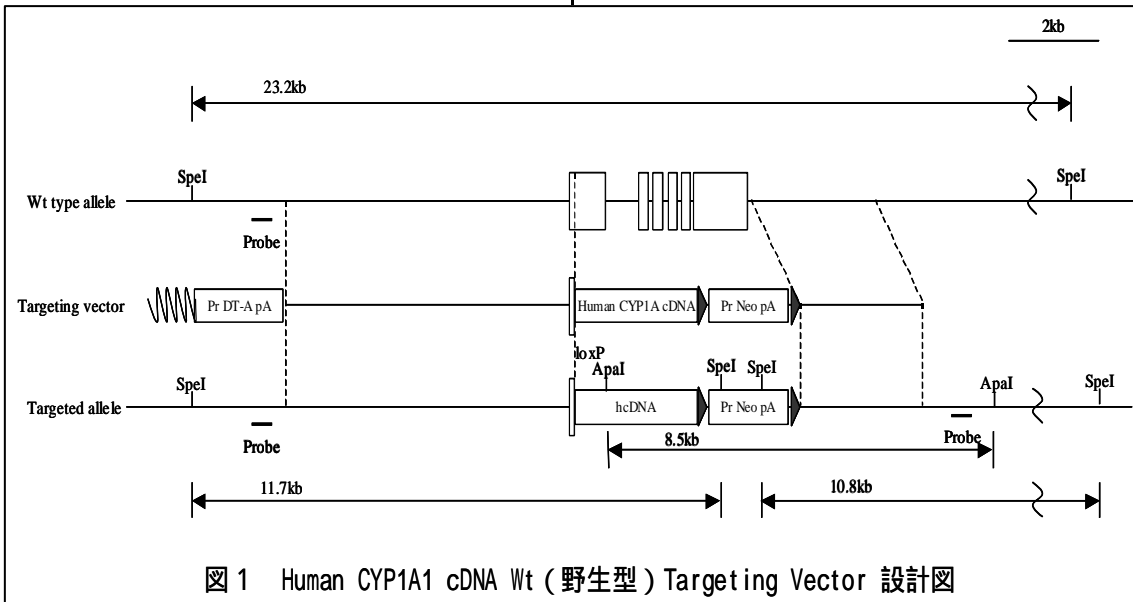
(3) 連携研究者

畑春実 (HATA HARUMI)

昭和大学・医学部・助教

研究者番号：00396441

理化学研究所発生再生科学総合研究センター
—動物資源開発室変異マウス開発ユニット



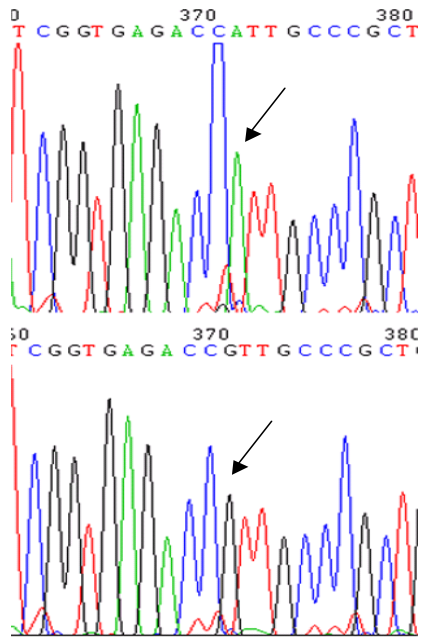


図3 exon7 の Ile->Val 型への SNP の挿入確認 (上段: 野生型、下段: 変異型)

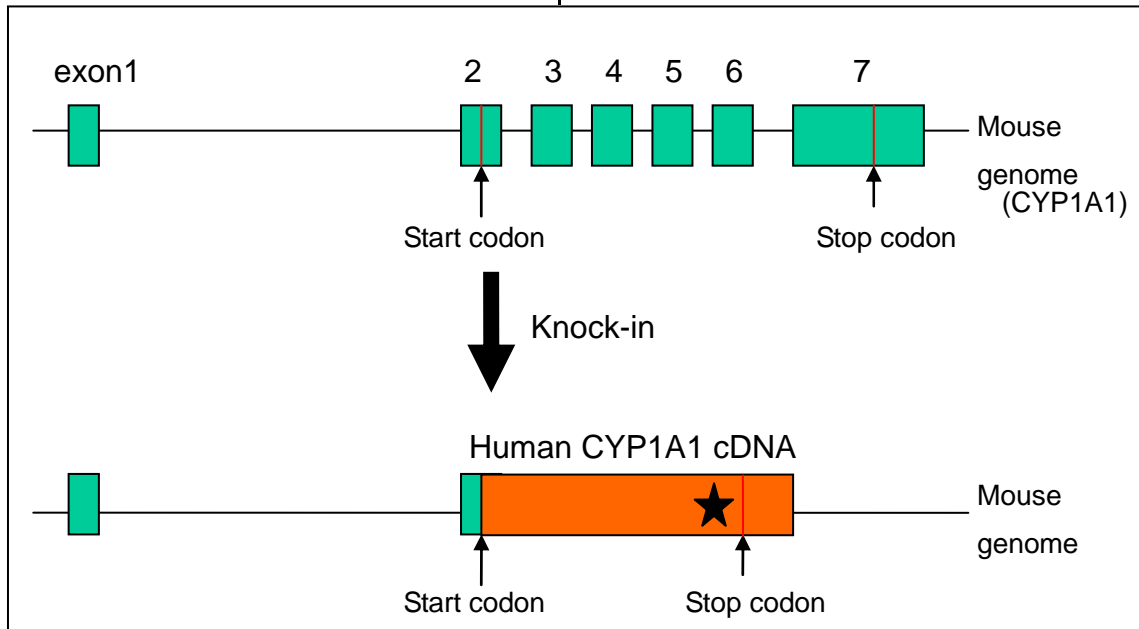


図4 Human CYP1A1 knock-in マウス作製用 targeting vector の概要

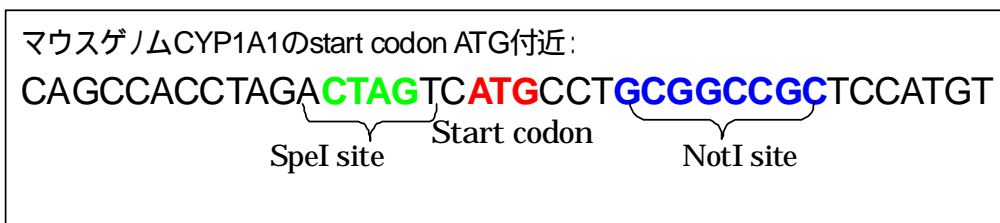


図5 Human CYP1A1 挿入のため、マウス CYP1A1 開始コドン付近に付加した配列

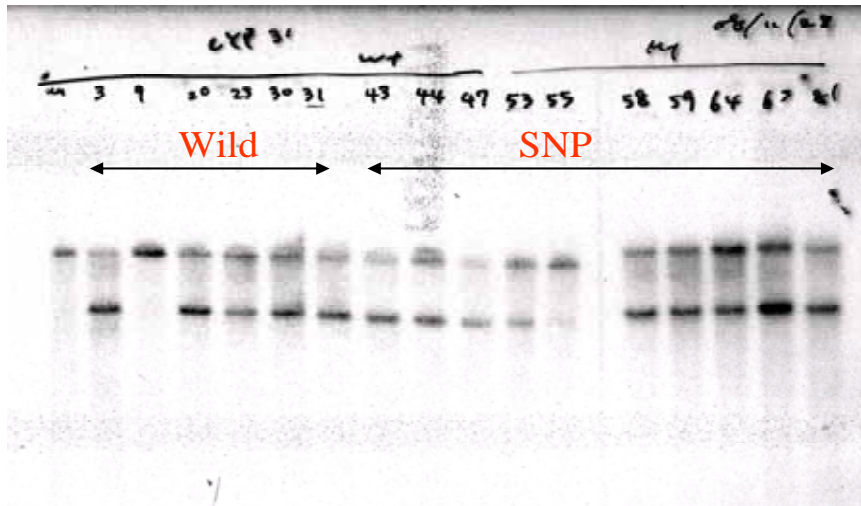


図6 ES細胞のゲノムを用いたサザン解析の結果(3'probe)

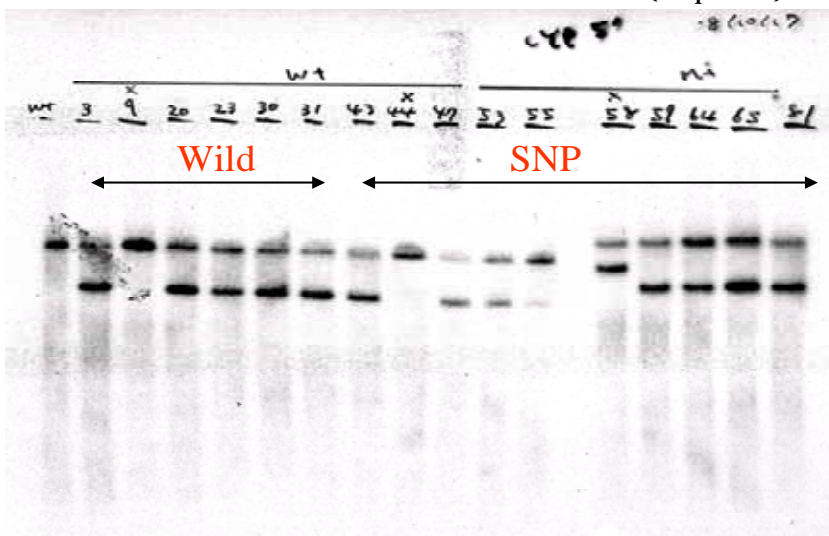


図7 ES細胞のゲノムを用いたサザン解析の結果(5'probe)



図8 ES細胞のゲノムを用いたサザン解析の結果(Neo probe)