

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：14301	
研究種目：挑戦的萌芽研究	
研究期間：2011～2012	
課題番号：23659469	
研究課題名（和文）	ヒトハプロイド細胞を用いた遺伝子トラップ法による脂質異常症治療法の開発
研究課題名（英文）	Elucidation of the target genes for the treatment of lipid disorder by gene-trap method in human haploid cells.
研究代表者	
	尾野 亘 (ONO KOH)
	京都大学・医学研究科・講師
	研究者番号：00359275

研究成果の概要（和文）：

我々はこれまでに遺伝子トラップ技術の改良を続け、脂肪細胞分化に必須の遺伝子の検索を行ってきた。癌細胞を含む哺乳類の細胞は2倍体以上であることから、対立遺伝子の1つが無い状態で形質変化を示すような遺伝子しか得ることができないという欠点があった。ヒトの1倍体の細胞を用いて、従来の遺伝子トラップ法の欠点を克服するシステムを立ち上げ、マイクロ RNA-33 の低下に関わる遺伝子を得た。

研究成果の概要（英文）：We have developed gene-trap method and applied it to adipocyte differentiation. However, mammalian cells are diploid and only such genes which have haploid insufficiency can be obtained by this method. This time we utilized P1-55 cells, which is a human haploid cell line, and enabled to screen all genes by gene-trap method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：遺伝子トラップ、ハプロイド、マイクロ RNA

1. 研究開始当初の背景

遺伝子トラップ法はランダムな遺伝子挿入をもとに、機能的な遺伝子を探索する方法である。遺伝子改変マウスを作成しなくても、細胞レベルで目的とする機能を司る遺伝子を網羅的に探すことができるという特徴がある。我々はこれまでに遺伝子トラップ技術の改良を続け、脂肪細胞分化、細胞死に必須の遺伝子の検索を行ってきた。しかしながら、癌細胞を含む哺乳類の細胞は2倍体以上であることから、対立遺伝子の1つが無い状態で形質変化を示すような遺伝子しか得ることができないという欠点があった。

2. 研究の目的

今回我々は、ヒトの1倍体 (haploid) 細胞株 P1-55 細胞(Ex Cell Res 252;273-280:1999) に対して遺伝子トラップ法を応用し、

miRNA の発現変化を及ぼす遺伝子を網羅的に得る方法を開発することを目標とする

3. 研究の方法

以下の3つの検討を軸に研究を展開する。

1) haploid cell の安定性の検討

P1-55 細胞はヒト白血病由来であるが、8 番染色体以外は、1 倍体であることが知られている。予備的検討から、8 週間以上、1 倍体で安定して増殖すること、miR-33 を発現していること、レトロウイルス、レンチウイルス導入も問題なく行えることを確認している。この細胞は通常の培養方法によって約 12-30 時間の倍加時間で増殖する。従って、ヒトの培養細胞においては、1 コピー以上の存在が生存に必須であるような遺伝子は、あってもごく少数であると考えられる。遺伝子トラップにおいては、挿入変異が安定であること、

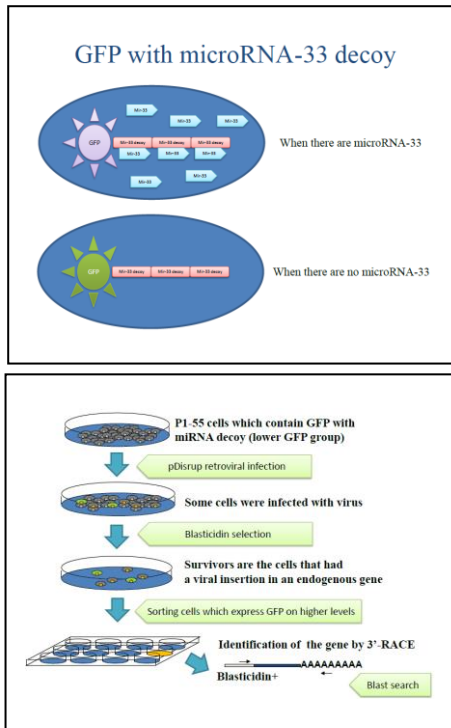
さらに培養中に2倍体に戻らないことが大事であるため、この細胞の安定性について、まず検討を行う。

フローサイトメトリー (FCM) 法により、細胞周期解析を行う。細胞の膜透過性の確保後、RNase 処理を行い、PI 染色を行って、FCM で測定する。すでに8週間培養を繰り返した場合でも haploid を維持できることを確認している。さらに長期間安定かどうかを検討する。

2) 恒常的にレポーター遺伝子を発現させた P1-55 細胞の作成と遺伝子トラップ法の応用
我々は、これまでに、miRNA の相補配列を遺伝子の 3' UTR に結合させることで、内因性の miRNA を制御できることを示した (Horie-T, Ono-K et al. Biochem Biophys Res commun. 2009)。

そこで今回、GFP を用いた miR-33 デコイ遺伝子 (GFP-miR-33 decoy) を恒常的に発現させ、内因性の miR-33 の発現を GFP でモニターできるシステムを作成する。

まず GFP-miR-33 decoy が恒常的に P1-55 細胞に発現する細胞株を得る。さらにここに遺



伝子トラップベクターをレトロウイルスで導入する。このベクターにおいては、ポリ A 配列のない薬剤 (Blasticidin) 耐性遺伝子がゲノムにランダムに挿入される。その結果、薬剤耐性遺伝子を発現している細胞 (Blasticidin に対して耐性を示す細胞) は、すべてレトロウイルスが内因性の遺伝子近傍に挿入され、内因性の遺伝子に変異をおこした細胞となっている。その中から、GFP が上昇している細胞を FACS にてソーティングする。この P1-55 細胞は、浮遊細胞であるた

め、限界希釈法により、シングルクローンを得る。個々のクローンを増殖させ、total RNA を抽出する。3' RACE 法により、挿入変異を起こした遺伝子を確認する。

3) 得られた遺伝子欠損マウスの表現型の確認とその役割の検討

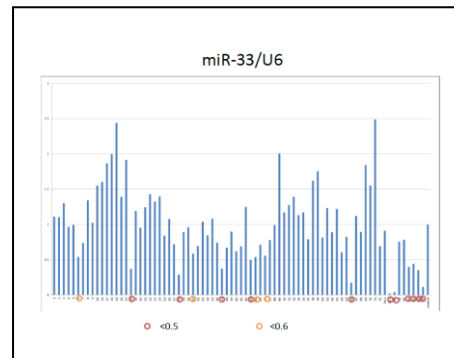
上記の方法によって得られた遺伝子の生体内での役割につき検討する。

4. 研究成果

今回の検討により、GFP-miR-33 decoy が恒常的に P1-55 細胞に発現する細胞株を得た。

さらにここに遺伝子トラップベクターをレトロウイルスで導入した。このベクターにおいては、ポリ A 配列のない薬剤 (Blasticidin) 耐性遺伝子がゲノムにランダムに挿入されるため、薬剤耐性遺伝子を発現している細胞 (Blasticidin に対して耐性を示す細胞) は、すべてレトロウイルスが内因性の遺伝子近傍に挿入され、内因性の遺伝子に変異をおこした細胞となっている。

miR-33 が低下している細胞を得るために、それらの細胞から GFP が上昇している細胞を FACS にてソーティングした。この P1-55 細胞は、浮遊細胞であるため、限界希釈法により、シングルクローンを得た後、3' RACE 法により、挿入変異を起こした遺伝子を確認した。



複数の遺伝子の変異が得られたが、なかでも downstream of tyrosin kinases 1 (DOK1) 遺伝子について着目した。

Result of 3'-RACE

Pick up No.	Gene name	miR-33/U6
6	Homo sapiens erythrocyte membrane protein band 4.2 (EPH4)	0.55702767
11	shd1gk protein 1, C20G (downstream of tyrosine kinase 1000G1)	0.35708801
28	KLF18 Kruppel-like factor 18	0.218952819
31	shd1gk protein 1, C20G (downstream of tyrosine kinase 1000G1)	0.357703208
37	Homo sapiens erythrocyte membrane protein band 4.2 (EPH4)	0.45346482
43	CTP synthetase beta (CTP synthetase, member 3) (Homo sapiens)	0.002502404
44	Homo sapiens erythrocyte membrane protein band 4.2 (EPH4)	0.687687225
46	RUNX2 runt-related transcription factor 2	0.598802293
66	CLEC2B C-type lectin domain family 2, member B	0.274897234
79-2	RUNX2 runt-related transcription factor 2	0.091441296
80	Homo sapiens erythrocyte membrane protein band 4.2 (EPH4)	0.114412009
83	-	0.497086204
84	CLEC2B C-type lectin domain family 2, member B	0.454546451
85	Homo sapiens erythrocyte membrane protein band 4.2 (EPH4)	0.325540628
87	-	0.214308058

実際にこの DOK1 遺伝子欠損細胞においては miR-33 の発現が低下しており、miR-33 の宿主遺伝子である steroid response element binding protein 2 (Srebp2) 遺伝子の発現も低下していた。さらに、DOK1 遺伝子欠損マウスにおいては、野生型のマウスと

比較して、やせ形であり、脂肪細胞の分化が抑制されている一方、耐糖能が改善されていた。この表現型が miR-33、Srebp2 とどのような関係にあるかを詳細に検討する予定である。本法によって、従来の遺伝子トラップ法を改良することができ、目標とする遺伝子を簡便に同定することができることが示された。今後、疾患の本態解明に応用していく予定である。

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 12 件)

- ① Tamaki Y, Iwanaga Y, Niizuma S, Kawashima T, Kato T, Inuzuka Y, Horie T, Morooka H, Takase T, Akahashi Y, Kobuke K, Ono K, Shioi T, Sheikh SP, Ambartsumian N, Lukanidin E, Koshimizu TA, Miyazaki S, Kimura T. Metastasis-associated protein, S100A4 mediates cardiac fibrosis potentially through the modulation of p53 in cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;57:72-81.査読有
- ② Horie T, Baba O, Kuwabara Y, Chujo Y, Watanabe S, Kinoshita M, Horiguchi M, Nakamura T, Chonabayashi K, Hishizawa M, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T, Ono K. MicroRNA-33-deficiency reduces the progression of atherosclerotic plaque in apoE^{-/-} mice. *J Am Heart Assoc.* 2012;1:e003376.査読有
- ③ Ono K. Current concept of reverse cholesterol transport and novel strategy for atheroprotection. *J Cardiol.* 2012 ;60:339-43.査読有
- ④ Satoh-Asahara N, Shimatsu A, Sasaki Y, Nakaoka H, Himeno A, Tochiya M, Kono S, Takaya T, Ono K, Wada H, Suganami T, Hasegawa K, Ogawa Y. Highly Purified Eicosapentaenoic Acid Increases Interleukin-10 Levels of Peripheral Blood Monocytes in Obese Patients With Dyslipidemia. *Diabetes Care.* 2012;35:2631-9.査読有
- ⑤ Sowa N, Horie T, Kuwabara Y, Baba O, Watanabe S, Nishi H, Kinoshita M, Takanabe-Mori R, Wada H, Shimatsu A, Hasegawa K, Kimura T, and Ono K. MicroRNA 26b Encoded by the Intron of Small CTD Phosphatase (SCP) 1 Has an Antagonistic Effect on its Host Gene. *Journal of Cellular Biochem.*

2012 ;113:3455-65.査読有

- ⑥ Wada H, Ura S, Satoh-Asahara N, Kitaoka S, Mashiba S, Akao M, Abe M, Ono K, Morimoto T, Fujita M, Shimatsu A, Takahashi Y, Hasegawa K. α 1-Antitrypsin-low-density-lipoprotein Serves as a Marker of Smoking-specific Oxidative Stress. *J Atheroscler Thromb* 2012;19:47-58.査読有
- ⑦ Kuwabara Y, Ono K, Horie T, Nishi H, Nagao K, Kinoshita M, Watanabe S, Baba O, Kojima Y, Shizuta S, Imai M, Tamura T, Kita T, Kimura T. Increased microRNA-1 and microRNA-133a Levels in Serum of Patients with Cardiovascular Disease Indicate the Existence of Myocardial Damage. *Circulation: Cardiovascular Genetics.* 2011;4:446-454.査読有
- ⑧ Ono K. MicroRNA links obesity and impaired glucose metabolism. *Cell Res.* 2011;21:864-6.査読有
- ⑨ Ono K, Kuwabara Y, Han J. MicroRNAs and Cardiovascular Diseases. *FEBS J* 2011;278:1619-33.査読有
- ⑩ Nishi H, Ono K, Horie T, Nagao K, Kinoshita M, Kuwabara Y, Watanabe S, Takaya T, Tamaki Y, Takanabe-Mori R, Wada H, Hasegawa K, Iwanaga Y, Kawamura T, Kita T, Kimura T. MicroRNA-27a regulates beta cardiac myosin heavy chain gene expression by targeting thyroid hormone receptor beta 1 in neonatal rat ventricular myocytes. *Mol Cell Biol.* 2011;31:744-55.査読有
- ⑪ 尾野 亘、堀江貴裕、木村 剛、北 徹 miRNA-33 は生体内でコレステロールを制御する 実験医学 2011;29:575-578.
- ⑫ 尾野 亘 マイクロ RNA と循環器疾患 最新医学 2011;66:2580-2586.

[学会発表] (計 15 件)

- ① Cold spring harbor laboratory meeting. Regulatory and non-coding RNA Aug. 28th to Sep 1st in 2012 (NY, U.S.A.) Ono K. MicroRNA-33-deficiency reduces the progression of atherosclerotic plaque in apoE^{-/-} mice
- ② 25th Spring Congress of Korean Diabetes Association May 11th, 2012. Hotel Inter-Burgo Exco, Daegu(Korea) Ono K. Symposium 6 (Insulin

- resistance) MicroRNA regulation of lipid homeostasis.
- ③ European Society of Cardiology Congress 2012, 25 Aug 2012 - 29 Aug, Munich(Germany) Baba O, Horie T, Nakamura T, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T, and Ono K. MicroRNA 33 Deficiency Reduces Atherosclerotic Plaque progression in ApoE Knockout Mice.
 - ④ European Society of Cardiology Congress 2012, 25 Aug 2012 - 29 Aug, Munich(Germany) Tamaki Y, Iwanaga Y, Ono K, Shioi T, Sheikh SP, Ambartsumian N, Lukanidin E, Koshimizu T, Miyazaki S, Kimura T. Interaction of S100A4 with p53 in fibroblasts modulates cardiac fibrosis through two distinct mechanisms.
 - ⑤ American Heart Association Annual Scientific Sessions 2012, November 3-7, Los Angeles Convention Center Los Angeles(U.S.A.)Baba O, Horie T, Kuwabara Y, Izuhara M, Usami S, Nakao T, Nishiga M, Nishino T, Sowa N, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T, and Ono K. MicroRNA 33 Deficiency in Leukocytes Reduced the Lipid Accumulation in Atherosclerotic Plaque in ApoE Knockout Mice.
 - ⑥ American Heart Association Annual Scientific Sessions 2012, November 3-7, Los Angeles Convention Center Los Angeles(U.S.A.) Horie T, Baba O, Ono K, Kuwabara Y, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, and Kimura T. MicroRNA-33 Deficiency Reduced Atherosclerosis Formation In Vivo.
 - ⑦ American Heart Association Annual Scientific Sessions 2011, November 12-16, Orland(U.S.A.) Sowa N, Ono K, Horie T, Hasegawa K, Kimura T: MicroRNA 26b encoded by the introns of small CTD Phosphatases (SCPs) 1 has an antagonistic effect on its host gene and suppresses cardiac hypertrophy.
 - ⑧ American Heart Association Annual Scientific Sessions 2011, November 12-16, Orlando(U.S.A.)Kuwabara Y, Ono K, Horie T, Nishi H, Watanabe S, Kinoshita M, Baba O, Chujo Y, Nagao K, Kojima Y, Kita T, Kimura T: MicroRNA-1 and microRNA-133a elevations in serum of patients with cardiovascular disease indicate the existence of myocardial damage.
 - ⑨ American Heart Association Annual Scientific Sessions 2011, November 12-16, Orlando(U.S.A.) Wada H, Ura S, Masunaga N, Akao M, Abe M, Funatsu J, Nakajima Y, Kanasaki M, Nakano T, Ono K, Morimoto T, Shimatsu A, Hasegawa K: Soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 serves as a marker of cardiovascular risk in chronic kidney disease patients.
 - ⑩ 2011AVDRC International Symposium, Intervention of Vascular Aging: New Frontiers 平成 23 年 9 月 22 日 College of Medicine, Yeungnam University, Daegu(Korea) Koh Ono, MicroRNA-33 Encoded by an Intron of Srebp2 Regulates HDL in vivo.
 - ⑪ 第 76 回日本循環器学会 福岡 平成 24 年 3 月 18-20 日 Ono K. Symposium 6 (SY6) (HF) Diagnosis of Heart Failure Using Genetic Biomarker Increased MicroRNA-1 and MicroRNA-133a Levels in Serum of Patients with Cardiovascular Disease Indicate the Existence of Myocardial Damage
 - ⑫ 第 76 回日本循環器学会 福岡 平成 24 年 3 月 18-20 日 Horie T, Baba O, Ono K, Watanabe S, Nishi H, Kinoshita M, Kuwabara Y, Chujo Y, Sowa N, Hasegawa K, Kume N, Yokode M, Kita T, Kimura T. MicroRNA-33 regulates atherosclerosis formation.
 - ⑬ 第 76 回日本循環器学会 福岡 平成 24 年 3 月 18-20 日 Kuwabara Y, Ono K, Horie T, Nishi H, Watanabe S, Kinoshita M, Baba O, Chujo Y, Kita T, Kimura T. Circulating microRNA derived from damaged cardiomyocytes can regulate the gene expression in recipient cells.
 - ⑭ 第 76 回日本循環器学会 福岡 平成 24 年 3 月 18-20 日 Sowa N, Ono K, Horie T, Hasegawa K, Kita T, Kimura T. MicroRNA 26b encoded by the intron of SCP1 has an antagonistic on its host gene and cardiac hypertrophy.
 - ⑮ 第 75 回日本循環器学会。以下の通り開催予定であったが、東日本大震災により中止となった。開催地：横浜市開催日：発表予定日 (3/18-20) 夏期開催 2011 年 8 月 3-4 日 Ono-K. Plenary session. MicroRNA-33 Encoded by an Intron of Srebp2 Cooperates to Control HDL in

Vivo

〔図書〕(計4件)

- ① 尾野 亘、秀潤社、細胞工学 疾患エクソソーム、2013、27-31
- ② 尾野 亘、中外医学社、Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌 2012、2012、80-85
- ③ Tomohide Takaya、Roles of MicroRNAs and Myocardial Cell Differentiation、Burlington: Academic Press、2012、139-152
- ④ 尾野 亘、中外医学社、Annual Review 糖尿病・代謝・内分泌 2012、2011、240

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：大動脈瘤および大血管の炎症抑制治療製材

発明者：尾野 亘

権利者：尾野 亘

種類：特許

番号：61/720,570

出願年月日：2012年10月31日

国内外の別：外国

○取得状況(計0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://kyoto-u-cardio.jp/kisokenkyu/metabolic/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾野 亘 (ONO KOH)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：00359275