

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700435

研究課題名(和文)HLA依存性薬剤副作用における候補分子検証の為のモデル細胞・マウスの作製と応用

研究課題名(英文)Development and application of mouse and cell models for analyses of HLA-dependent adverse drug reactions

研究代表者

三浦 浩美(MIURA, Hiromi)

東海大学・医学部・特定研究員

研究者番号：90599523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、特定のHLA多型と強く相関する薬剤副作用の発症機序解明を目指し、その基盤となるべき研究材料である、HLA発現細胞及びHLA発現トランスジェニック(Tg)マウスの作製を行った。細胞については、piggyBacトランスポゾンを利用しHLA-A*33:03、A*31:01、B*15:02、B*58:01発現細胞を、Tgマウスについては独自のTgマウス作製法を用いてHLA-A*33:03とA*31:01発現マウスを作製することに成功した。薬剤投与による肝障害への影響を調べているが、現時点までに有意な結果は得られていない。今後、薬剤代謝産物候補の投与を行うなどして更なる解析を進めたい。

研究成果の概要(英文)：Recently, it has been revealed that adverse drug reaction is highly associated with specific HLA alleles. However, its pathogenic mechanism has still not been elucidated and the resources such as HLA-expressing cell lines and mice remained to be developed. This study established systems for high-throughput generation of cell and mouse resources suitable for analyses of HLA-dependent adverse drug reactions. Utilizing original vector and piggyBac transposon system, several cell lines each expressing HLA-A*33:03, A*31:01, B*15:02, and B*58:01 were established. The resultant cell lines exhibited high and stable expression of HLA. We also generated HLA class I transgenic (Tg) mice with pronuclear injection-based targeted transgenesis (PITT) method established in our laboratory. By using cloning vector developed by BAC modification, we generated HLA-A*33:03 and HLA-A*31:01 Tg mice. The experiments addressing pathogenic mechanism of HLA-related adverse drug reactions are currently underway.

研究分野：遺伝子工学・実験動物学

キーワード：トランスジェニックマウス 薬剤副作用 HLA 肝障害

1. 研究開始当初の背景

HLA (Human Leukocyte Antigen: ヒト白血球型抗原; ヒト MHC) は、4000 を超える対立遺伝子 (アレル) を持つ極めて多型性に富んだ特殊な遺伝子である。HLA 分子は生体内で分解された外来抗原ペプチド (8~23 アミノ酸) と結合し、T 細胞へ抗原提示することによって免疫応答を誘導する。各 HLA アレル間で提示するペプチドの種類に多様性があることも、HLA 分子の特徴といえる。遺伝学的解析から、特定の HLA アレルが自己免疫疾患、及び薬剤副作用と相関する例が数多く知られている。特に薬剤副作用に関しては高いオッズ比 (4.0-960) を示していることから、HLA の寄与度は極めて高いと考えられている。しかし、特定の HLA 分子がどのようなメカニズムで自己免疫疾患、及び薬剤副作用を引き起こしているのかの分子機構については不明であり、その解明が今後の大きな課題である。そのためには、まず HLA アレルが提示する原因候補分子を探索し、それらが実際に HLA 分子に結合すること、及び炎症等を引き起こすことを証明する必要がある。しかし、技術的制約、及び解析ツールの不足から、未だ解明には至っていない。特に、各種解析の基盤となるべき研究材料 (細胞モデル、及び個体モデル) が絶対的に不足している。

2. 研究の目的

上述した研究背景のもと、「HLA 発現細胞・マウスをハイスループットで作製する技術」を確立することは非常に重要であり、またそれらリソースのクオリティが当該研究分野の進捗を大きく左右するものと考えられた。そこで本研究では、HLA 解析ツール (HLA 発現細胞・マウスリソース) をハイスループットに作製可能なシステムの確立を目指すと共に、これらリソースを利用し、HLA と強く相関する薬剤副作用の機序解明を目指すこととした。そのために、1) トランスポゾンを利用した HLA 安定発現細胞株の作製と解析、2) BAC 改変による HLA 発現コンストラクトの作製と独自の技術 (PITT 法) を用いた HLA トランスジェニックマウスの作製、3) これらのリソースを利用した薬剤副作用解析への応用、を行う計画を立てた。

3. 研究の方法

(1) HLA 発現培養細胞の作製

日本人で頻度の高い HLA-A*33:03 (チクロピジンによる肝障害と相関)、薬剤副作用との相関が非常に高い HLA-B*15:02 と HLA-A*31:01 (カルバマゼピンによる Steavens-Johnson 症候群と相関)、HLA-B*58:01 (アロプリノール高感受性) 遺伝子について、不死化 B 細胞より調製した mRNA をもとに cDNA を合成し、コード領域の全長を PCR で増幅した。増幅された PCR 産物は、Type IIS 制限酵素によるクローニング系を応用し、我々が開発した独自の piggyBac トランスポゾンベクター (CAG promoter - cloning site - IRES - eGFP - polyA カセットが) にクローニングした (図 1)。

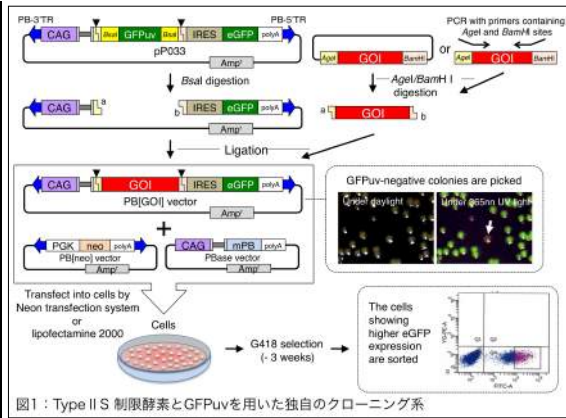


図1: Type IIS 制限酵素と GFPuv を用いた独自のクローニング系

作製した各ベクターは、Neon トランスフェクションシステムを用いて、piggyBac トランスポゼース発現ベクターとともに 1×10^6 個の C1R 細胞に導入した。eGFP 発現を指標にセルソーターを用いて分離選別し、各 HLA 発現細胞を樹立した。HLA 遺伝子の発現については、W6/32 抗体を用いて FACS で確認した。

(2) BAC 改変による HLA 発現コンストラクト用ベクターの作製と PITT 法を用いた HLA トランスジェニックマウスの作製

マウス H2-K1 領域を含む BAC クローンを入手し、大腸菌内での相同組換えを利用した BAC 改変手法、及び様々な制限酵素を用いた複雑なクローニングステップを経て、HLA クラス I Tg マウス作製のベースとなるコンストラクトを作製した。本コンストラクトは、後のハイスループット化を見据え、ペプチドの結合に重要な $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ ドメイン (エキソン 2, 3) の部分を容易にすり替えられるものとした (図 2)。

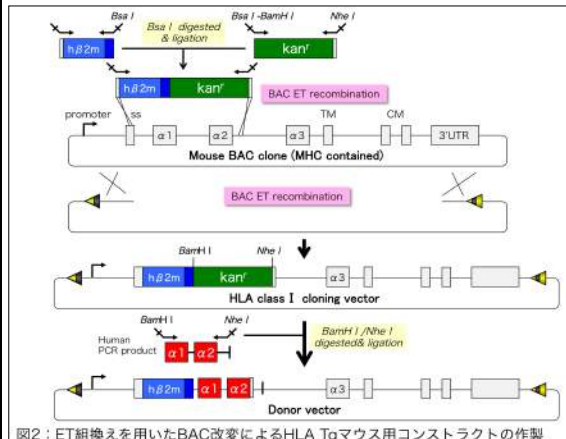


図2: ET組換えを用いたBAC改変によるHLA Tgマウス用コンストラクトの作製

$\alpha 1-2$ ドメインの上流をヒト $\beta 2m$ と融合し、 $\alpha 3$ ドメインはマウス由来 (マウスのキラー T 細胞との相互作用を考慮) のものを用いた。本コンストラクトは、PITT 法による Tg マウス作製に用いるため、変異 loxP タグ (lox2272/JT217) を両端に付加してある。HLA-A*33:03、及び A*31:01 発現 Tg マウスを作製するために、本コンストラクトの BamHI / NheI サイトに、各 HLA アレルの $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ ドメインを挿入した。

これまで所属研究室で確立してきた PITT 法を用いて、HLA-A*33:03 と A*31:01 Tg マウスの作製を行った。具体的には、PITT 用種マウス同士、あるいは種マウスの雄と野生型の雌を交配し (また

は体外受精[IVF]し、変異 loxP (および attP) タグ配列が *Rosa26* 遺伝子座位に存在する受精卵を得た。作製した Tg マウス用コンストラクトと、iCre(および PhiC31)-mRNA 組換え酵素を受精卵に注入した。HLA-A*33:03 Tg マウス作製には従来の PITT システム (Ohtsuka et al. 2010) を、HLA-A*31:01 Tg マウス作製には改良型の i-PITT システム (Ohtsuka et al. 2015) を利用した。HLA-A*33:03 Tg マウスについては、ベクターを含む余分な配列を除去するために FLPe Tg マウスとの交配を行った。

(3) 作製した Tg マウスを用いた解析 (薬剤投与実験等)

HLA-A*33:03 Tg マウスについて、eGFP 遺伝子の発現を FACS にて解析した。また、HLA 分子の膜表面上における発現を確認するために、マウス脾臓細胞を単離し、抗 HLA 抗体(B9.12.1)による HLA 分子の検出を試みた。

HLA-A*33:03 Tg マウス個体の腹腔内へチクロピジン投与した。薬剤投与開始 10 日後、2 回目以降の薬剤投与では、翌日、翌々日に、マウス頬から血液を採取した。得られた血漿成分について、トランスアミナーゼ CII・テストを用いて GPT、及び GOT の測定を行った。

4. 研究成果

(1) トランスポゾンを利用した HLA 安定発現細胞株の作製と解析

当初は、TAP 欠損細胞 (RMA-S 細胞: マウス B 細胞由来) を使用する予定であったが、実際には HLA クラス I ネガティブ細胞 (C1R 細胞: ヒト B 細胞由来) を用いて細胞株の樹立を進めた。理由は、これまで HLA 分子とペプチドの結合に関する実験は RMA-S 細胞も多く使用されていたが、近年、HLA 分子と薬剤の結合評価に C1R 細胞が用いられた報告があったためである。

HLA-A*33:03 遺伝子の C 末端に各種タグを付加したものを *piggyBac* トランスポゾンベクターにクローニングし、細胞に導入して遺伝子発現を調べたところ、HA タグのみを付加したものが最も発現効率が良い結果が得られた (図 3A, B)。そこで、他のアレル (B*15:02, A*31:01, B*58:01) については HA タグのみを C 末端に付加して *piggyBac* トランスポゾンベクターに挿入した。また、それらを用いて、実際に各種アレルの安定発現細胞株の樹立に成功した。抗体染色にて HLA 発現を調べたところ、樹立した全ての細胞において HLA が強発現していることを確認できた (図 3C, D)。

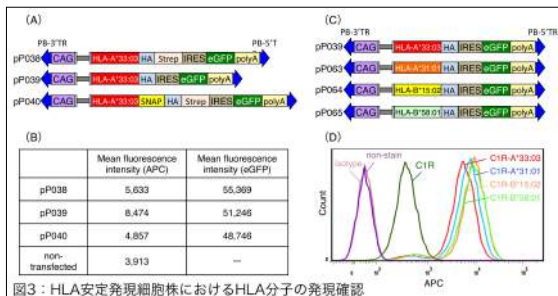


図3: HLA安定発現細胞株におけるHLA分子の発現確認

(2) BAC 改変による HLA 発現コンストラクト用ベクターの作製と PITT 法を用いた HLA トランスジェニックマウスの作製

HLA-A*33:03 Tg マウスについては、コンストラクト (pBFG) と、iCre-mRNA 組換え酵素を受精卵の雄性前核に注入した (図 4A)。その際、iCre-mRNA 濃度を 0.75ng/μl、1.5ng/μl とし、それぞれ約 150 個ずつの受精卵に注入した。最終的に得られた 15 個体のマウスに関して、PCR タイピングを行った結果、1 個体のファウンダーマウスを得ることが出来た (図 4B, C)。

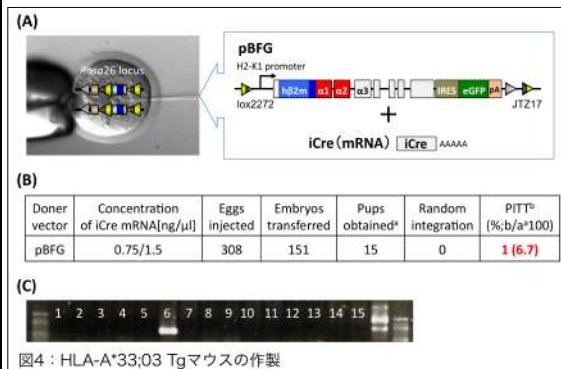


図4: HLA-A*33:03 Tgマウスの作製

次に、ファウンダーマウスを FLPe Tg マウスと交配することで、余分配列の除去を行うと同時に、目的遺伝子が次世代に伝搬するか否かの確認を試みた (図 5A)。その結果、得られた 8 個体の F1 のうち、3 個体で目的遺伝子の伝搬が確認され、うち 2 個体で余分配列が一部除去されていることが確認できた (図 5B)。

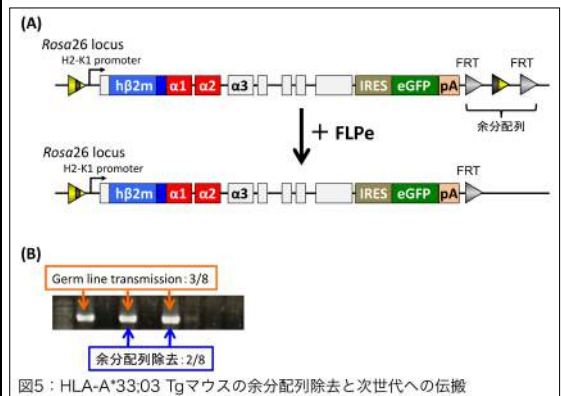


図5: HLA-A*33:03 Tgマウスの余分配列除去と次世代への伝搬

HLA-A*31:01 Tg マウス作製は、改良型 PITT 法 (i-PITT 法) を利用した。作製したベクター (pP132) を受精卵 (154 個) に顕微注入し、HLA Tg マウスの作製を試みた。16 個体の産仔数のうち、2 個体が目的の Tg マウスであることが確認出来た (図 6)。

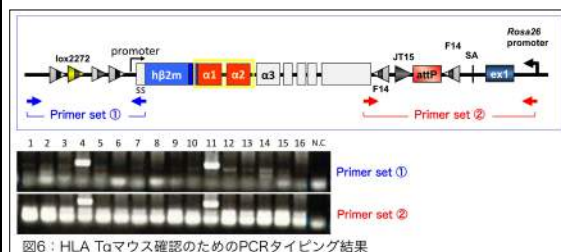


図6: HLA Tgマウス確認のためのPCRタイピング結果

(3) 作製した Tg マウスを用いた解析

HLA-A*33:03 Tg マウスは、HLA 遺伝子の下流(3' UTR 内)に IRES-eGFP-pA が挿入されている。そのため、HLA 遺伝子は eGFP 遺伝子とバイシストロニックに発現することが期待される。脾臓細胞を単離し、FACS 解析によって eGFP 発現を調べた結果、期待通りに eGFP が発現していることが確認できた。また、HLA 分子の膜表面上における発現を確認するために、同様に単離した脾臓細胞を抗 HLA 抗体(B9.12.1)で反応させた。本 Tg マウスで使用している抗体の定常部はマウス IgG2a からなる。そのため、二次抗体としては抗マウス IgG2a を用いることは出来ない。そこで、抗 HLA 抗体を直接ラベル(Alexa647)することにより、その問題を回避することとした。しかしながら、HLA Tg マウスだけでなく、野生型においても、Alexa647 が検出されてしまった。この理由として、抗 HLA 抗体(B9.12.1)がマウス H2 にもクロスしてしまっている可能性、またはラベル分子等がマウスに存在する何らかの膜表面上のタンパク質に非特異的に結合してしまっている可能性が考えられた(図7)。今後は、h β 2 ミクログロブリン抗体を用いて、HLA 分子の発現確認を行っていきたい。

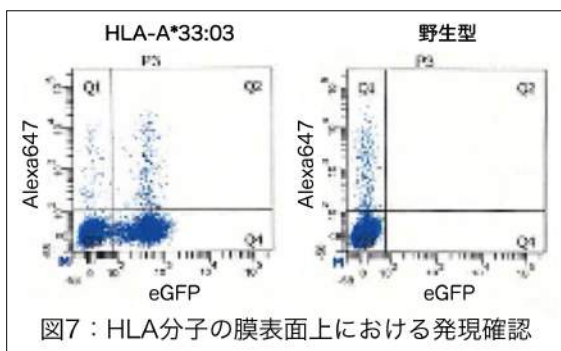


図7: HLA分子の膜表面上における発現確認

HLA-A*33:03 Tg マウス個体を用い、チクロピジン投与実験を行った。投与にあたり、その薬剤濃度を検討するため、まず 300、90、9mg/kg の薬剤をマウス腹腔内へ投与した。その結果、300mg/kg では投与直後に、体の震え、衰弱が見られ、その2日後に死亡してしまった。その為、以降の実験は、90、9mg/kg、生理食塩水(コントロール)を用いて行うこととした。投与個体について GPT、及び GOT 測定の結果、GPT 活性値に大きな変化は見られないものの(図8A)、GOT 活性値に関しては、野生型で高くなる傾向が見られた(図8B)。しかしながら、現段階ではサンプル数、及び実験回数が少ないことから、今後サンプル数を増やし、薬剤投与による影響を更に検討していきたい。また、チクロピジンそのものではなくその代謝産物が副作用発症に関与する可能性もあることから、代謝産物候補の投与も検討したい。

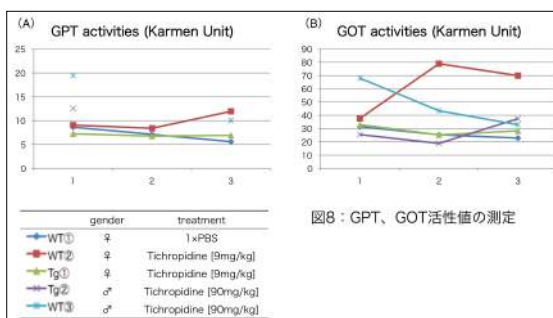


図8: GPT、GOT活性値の測定

HLA-A*31:01 Tg マウスについては、ファウンダーマウス2個体(共に雄)が得られた。これらを C57BL/6N の雌と交配した結果、いずれのファウンダーマウスからも子孫が得られず、別個体の雌を購入して交配を続けても、全く妊娠する個体が見られなかった。HLA-A*33:03 Tg マウスでは同様の現象が確認されなかったこと(正常に次世代にトランスジーンを伝搬する)、PITT 法で得られた他の遺伝子の Tg マウスでは2匹のファウンダーマウスが共に不妊雄である経験がないことから、これは HLA-A*31:01 Tg マウス特有の現象である可能性が示唆された。そこで、ファウンダーマウス精巢のパラフィン切片を作製して観察し、また精子についても確認を行った。その結果、精巢は両ファウンダーマウス共に小さいものの、組織的な異常は認められなかった。また、精子数は少ないが運動能は有していた。受精能の有無は不明であるが、今後個体に戻す可能性を考慮して精子の一部を凍結保存した。また、肝臓と大腿骨から mRNA を抽出して cDNA を合成し、現在 mRNA 発現を確認しているところである。

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8件)

- Ohtsuka M., Miura H., Mochida K., Hirose M., Hasegawa A., Ogura A., Mizutani R., Kimura M., Isotani A., Ikawa M., Sato M. and Gurumurthy C. B. One-step generation of multiple transgenic mouse lines using an improved Pronuclear Injection-based Targeted Transgenesis (*i*-PITT). BMC Genomics (in press) 査読有
- Furukawa S., Kuwajima Y., Chosa N., Satoh K., Ohtsuka M., Miura H., Kimura M., Inoko H., Ishisaki A., Fujimura A. and Miura H. Establishment of immortalized mesenchymal stem cells derived from the submandibular glands of tdTomato transgenic mice. Exp. Ther. Med. (in press) 査読有
- Sato M., Inada E., Saitoh I., Matsumoto Y., Ohtsuka M., Miura H., Nakamura S., Sakurai T. and Watanabe S. A combination of targeted toxin technology and the piggyBac-mediated gene transfer system enables efficient isolation of stable transfectants in nonhuman mammalian cells. Biotechnol. J., 10, 143-153 (2015) 査読有

4. Ohtsuka M., Miura H., Hayashi H., Nakaoka H., Kimura M., Sato M., Gurumurthy C. B. and Inoko H. Improvement of pronuclear injection-based targeted transgenesis (PITT) by iCre mRNA-mediated site-specific recombination. *Transgenic Res.*, 22, 873-875 (2013) 査読有
5. Miura H., Inoko H., Inoue I., Okada Y., Tanaka M., Sato M. and Ohtsuka M. piggyBac-mediated generation of stable transfectants with surface HLA expression from a small number of cells. *Anal. Biochem.*, 437, 29-31 (2013) 査読有
6. Ohtsuka M., Miura H., Sato M., Kimura M., Inoko H. and Gurumurthy C. B. PITT: Pronuclear Injection-based Targeted Transgenesis, a Reliable Transgene Expression Method in Mice. *Exp. Anim.* 61, 489-502. (2012) 査読有
7. Ohtsuka M., Miura H., Gurumurthy C. B., Kimura M., Inoko H., Yoshimura S. and Sato M. Fluorescent transgenic mice suitable for multi-color aggregation chimera studies. *Cell Tissue Res.* 350, 251-260 (2012) 査読有
8. Sato M., Ohtsuka M., Miura H., Miyoshi K. and Watanabe S. Determination of the optimal concentration of several selective drugs useful for generating multi-transgenic porcine embryonic fibroblasts. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 759-765 (2012) 査読有

[学会発表] (計 11 件)

1. 田村 沙亜希、大塚 正人、三浦 浩美、松阪 泰二、安岡 有紀子 *Rosa26*遺伝子座位における組織特異的プロモーター活性の検証 第37回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)、2014年11月25日～27日
2. 三浦 浩美、大塚 正人 薬剤副作用の発症機序解明の為の、HLA遺伝子発現細胞とHLAトランスジェニックマウスの作製 第37回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)、2014年11月25日～27日
3. 佐藤 正宏、稲田 絵美、齋藤 一誠、松本 祐子、大塚 正人、三浦 浩美、中村 伸吾、桜井 敬之、渡部 聡 標的細胞破壊法とpiggyBacの組み合わせは遺伝子導入安定株の効率的取得を可能とする 第37回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)、2014年11月25日～27日
4. Masato Ohtsuka, HiroMi Miura, Minoru Kimura, Ayako Isotani, Masahito Ikawa, Masahiro Sato, Channabasavaiah Gurumurthy Concurrent production of multiple targeted transgenic mouse lines with C57BL/6N genetic background by improved PITT. 12th Transgenic Technology Meeting (TT2014), Scotland (Edinburgh), October 6-8, 2014
5. 大塚 正人、三浦 浩美、磯谷 綾子、伊川 正人、佐藤 正宏、木村 穰 C57BL/6Nを遺伝的背

景に持つターゲットトランスジェネシス用種マウスの作製と評価 第61回日本実験動物学会総会(日本実験動物科学技術)、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)、2014年5月15日～17日

6. HiroMi Miura, Masato Ohtsuka Generation of Knockdown Mice Using Pronuclear Injection-Based Targeted Transgenesis: Advantages and Limitations. The 27th International Mammalian Genome Conference, Salamanca (Spain), September 15-18, 2013
7. 郡山美優、稲田絵美、齋藤一誠、三浦浩美、大塚正人、中村伸吾、桜井敬之、渡部聡、三好和睦、佐藤正宏 トランスポゾンPiggyBacシステムによる複数遺伝子のブタ細胞への同時導入 第106回日本繁殖生物学会、東京農工大学農学部府中キャンパス(東京都・府中市)、2013年9月12日～14日
8. 大塚正人、三浦浩美、佐藤正宏、木村穰 受精卵へのiCre mRNA注入によるターゲットトランスジェネシス法(PITT法)の効率改善 第60回日本実験動物学会総会、つくば国際会議場(茨城県・つくば市)、2013年5月15日～17日
9. 三浦浩美、佐藤正宏、大塚正人 PITT法を利用して作製したノックダウンマウスにおけるノックダウン効果の比較解析 第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)、2012年12月11日～14日
10. 大塚正人、佐藤正宏、三浦浩美 iCre mRNA注入による次世代型トランスジェニックマウス作製法(PITT)の効率改善 第35回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡(福岡県・福岡市)、2012年12月11日～14日
11. 大塚正人、三浦浩美、木村穰、猪子英俊 Recombinase及びIntegraseによる部位特異的遺伝子導入効率の比較検討 第59回日本実験動物学会総会、別府国際コンベンションセンター(大分県・別府市)、2012年5月24日～26日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 浩美 (MIURA, HiroMi)

東海大学・医学部・特別研究員

研究者番号：90599523