

# 博士論文

創薬における *in vitro* および *in vivo* ターゲット  
バリデーションに関する研究

加 藤 稔

## 目次

序論	p.4
----	-----

第一章 ヒト肝細胞増殖因子活性化因子 1 型阻害因子によるヒト気道トリプシン様プロ テアーゼ活性および活性化阻害作用に関する <i>in vitro</i> ターゲットバリデーショ ン研究	p.11
--	------

要約	p. 12
緒言	p. 14
材料および方法	p. 18
結果	p. 22
考察	p. 27
図表	p. 33

第二章 <i>In vitro</i> および <i>in vivo</i> ターゲットバリデーションに有用な mir-187 前駆体配列を 用いた siRNA 発現遺伝子の開発研究	p.41
--	------

要約	p. 42
緒言	p. 43
材料および方法	p. 46
結果	p. 53
考察	p. 56
図表	p. 60

### 第三章 *In vivo* ターゲットバリデーションに有用なトランスジェニック動物の作出効率

改善のための基礎研究	p. 68
要約	p. 69
緒言	p. 70
材料および方法	p. 72
結果	p. 75
考察	p. 77
図表	p. 80
総合考察	p. 85
引用文献	p. 89
謝辞	p. 105

## 序論

近年、創薬の成功確度は低下の一途をたどっている。1990年代では一つの新薬を創製するために6,000~12,000個の新規化合物合成が必要であったが、2006~2010年では30,000個の新規化合物合成が必要となっている(製薬協 DATA BOOK, 2002, 2007, 2012)。また、10億ドルの研究開発費に対する新薬開発数は、1970年代は10個であったのに対し、2010年には1個を切っている状況である(Scannel et al., 2012)。これらのことは、新薬を創製するために必要な労力およびコストが年々増加していることを示している。この理由の一つとして有望な創薬標的の枯渇化が挙げられている。2002年の調査において、低分子化合物の標的分子は約47%がプロテアーゼやホスホジエステラーゼなどの酵素、30%がGタンパク質共役型受容体(GPCR)、約15%がイオンチャネル、トランスポーター、またはその他の受容体であり、これらを合わせた90%以上は、いわゆるdruggable標的分子と呼ばれる分子群である(Hopkins and Groom, 2002)。この調査によるとdruggable標的分子はゲノム中に約3,000個存在しているが、その中で疾患修飾的な機能を有しており、治療薬の標的として妥当な分子は600~1,500個程度であろうと推測している。2006年時点で上市されている低分子医薬品が標的としている分子は324~604個と考えられており(Overington et al., 2006)、残されたdruggable標的分子の数は多くない。残された機能未知分子の創薬標的としての妥当性検証(ターゲットバリデーション)を迅速かつ効率的に行い、有望な創薬標的を見出さなければ低分子医薬品の標的分子は近い将来枯渇してしまう。従って、創薬標的の探索とターゲットバリデーションは新薬の創製において、極めて重要な課題の一つである。

近年では、従来の低分子医薬に加え抗体医薬、核酸医薬やペプチド医薬などの新たな創薬様式が登場している。これら高分子医薬と呼ばれる医薬品は、サイトカインや転写因子、アダプター分子など、従来低分子医薬が標的とすることができなかったnon-druggable標的分子を創薬標的とすることを可能とした。また、高分子医薬の開発

は、低分子医薬の開発と比較して格段に早いといわれている (特許庁調査報告書, 2015)。この理由として、高分子医薬は核酸や抗体など生体が本来有している内在性分子が医薬品になるため、低分子医薬品創製で必須である、化合物特有の毒性や代謝安定性の問題を回避するための検討を最小限にできることが挙げられる。低分子医薬品ではこの毒性や代謝安定性の問題といったターゲットバリデーションとは異なる問題回避検討に多大な労力と時間が費やされることが多いため、この過程を回避できる高分子医薬品は低分子医薬品と比較して開発速度が格段に速いのである。そのため、ターゲットバリデーションも、これに対応すべく、できるだけ迅速に行うことが必要である。また、低分子医薬では、毒性や代謝安定性など、化合物特有の物性で医薬品の優劣をつけることが可能であり、先行する開発品が存在していても物性面で上回る化合物を開発することでより良い医薬品の開発が可能である。一方、高分子医薬の場合、物性面での差異化は困難であり、標的分子の優劣がそのまま医薬品の優劣につながると考えられる。これはすなわちターゲットバリデーションの重要性が増していることを意味しており、標的とする分子の多様性が増加した分、治療効果の高い標的をより迅速かつ効率的に同定することがターゲットバリデーションに求められている極めて重要な課題となってきたのである。

以上述べたとおり、機能未知な標的分子に対して迅速なターゲットバリデーションを行い、治療効果の高い有望な新規標的分子を見極めて開発プロセスに乗せることが国際的な創薬開発の競争に打ち勝つために必要なことであり、治療薬を待つ患者のために必要である。すなわち、多くの標的候補分子に対するターゲットバリデーションの迅速化と効率化が、現在の医療・創薬分野において求められる最重要項目に位置づけられるものである。

非臨床創薬研究におけるターゲットバリデーションは、大きく分けて *in vitro* ターゲットバリデーションと *in vivo* ターゲットバリデーションの二つに分けることができ

る。 *In vitro* のターゲットバリデーションでは、酵素活性測定などの生化学的検証、培養細胞を用いた遺伝子過剰発現やノックアウト・ノックダウンによる標的分子の生理的機能検証、相互作用分子の同定、病態を模した細胞培養系における標的分子の発現解析、および薬理学的な機能解析などが行われる。これらの *in vitro* ターゲットバリデーションにより、標的分子の生化学的性質や細胞における生理的役割、病態関連刺激に対する応答性などが明らかとなり *in vivo* における役割を推定することが可能となる。この点については、本論文の第 1 章において、*in vitro* ターゲットバリデーションの例を挙げ、その可能性と課題について考察してみたい。

一方、*in vivo* におけるターゲットバリデーションは単一な細胞を用いた *in vitro* の検証とは異なり、動物個体を対象としているため本来の生体応答を検証できる点で標的分子の機能検証法として極めて優れている。*In vivo* ターゲットバリデーションの方法としては、標的分子の機能を調節する低分子化合物や抗体が既に存在している場合、それらを用いて病態モデルにおける治療効果等を評価することが多い。しかし、標的分子の新規性が高い場合には、このような低分子化合物や抗体といったツールが存在していないことが多く、その場合、標的分子の過剰発現やノックアウト・ノックダウンを動物個体に生じさせた遺伝子改変動物作製技術は極めて有用な手段となる。

遺伝子改変動物作製技術として、遺伝子断片を受精卵に注入することにより作製されるトランスジェニック (tg)動物作製技術 (Pinkert, 2002)、ES 細胞を用いたノックアウト・ノックイン動物作製技術 (Capecchi et al., 1989)、ウィルスベクターの注入による遺伝子導入技術 (Lois et al., 2002)、および近年注目されている人工ヌクレアーゼを用いたゲノム編集技術によるノックアウト・ノックイン動物作製技術 (Yang et al., 2014) が挙げられる。特に、ノックアウト動物作製技術は、標的分子を欠損した動物の表現型を解析することで当該分子の生体内における生命現象の寄与度が明らかになる点で有用であり、しばしば用いられてきた。しかしながら、一般的なノックアウト動物は

初期発生期時点からゲノム配列に改変を加えるため、標的分子の発現量に応じた表現型解析は困難であることに加え、発生期に必須な標的分子のノックアウトは胎生致死となり出生してこないという問題点がある。そのため、そのような標的分子の成体動物における遺伝子機能解析をノックアウト法により行う場合、薬剤誘導型プロモーターや Cre-loxP システムを用いた時期・組織特異的発現調節技術 (Jiang et al., 2001, Lewandski, 2001)を組み合わせる必要がある。例えば、時期・組織特異的発現プロモーター制御下に Cre リコンビナーゼを発現させた tg 動物と、2つの loxP 配列を標的分子の遺伝子配列を挟む形でノックインさせた動物を別々に取得して交配させる必要があり、動物取得だけでなく交配による組み合わせに多大な労力、時間とコストがかかってしまう。そのため、迅速かつ効率的な *in vivo* ターゲットバリデーション法としては、ノックアウト法以外の新たな方法の開発も考慮していく必要があると考えられる。

ノックアウト法に関する、これら課題を補完する技術として、遺伝子断片の導入による tg 法と RNA interference (RNAi)法によるノックダウン (Shinagawa and Ishii, 2003)を組み合わせた RNAi tg 法を挙げることができる。RNAi は、完全な遺伝子発現抑制ではなく、small interfering RNA (siRNA)と呼ばれる、標的分子に特異的な二本鎖低分子 RNA の発現量や配列に依存して遺伝子発現抑制率が異なるため、標的分子の発現量と表現型との相関を評価することが可能である。また、完全なノックアウトがなされないため、胎生致死遺伝子の機能解析を成体動物で行うことも可能である。さらに RNAi では、ノックアウト法でしばしば問題となる、均質なホモ動物を作製するための複数回の交配が必要ないため、迅速な *in vivo* ターゲットバリデーションを行うという観点からも優れた特徴を兼ね備えていると考えられる。本論文では第2章において、*in vivo* ターゲットバリデーションの手法として、この RNAi tg 法に着目し、迅速かつ効率的な手法の開発を検討する。

さて、*in vivo* ターゲットバリデーションを行うための遺伝子改変動物作製技術、とりわけ遺伝子顕微注入による tg 動物作製法には改善すべき重要な点がある。それは作出効率であり、一般的にマウスでは遺伝子注入卵に対し遺伝子が導入される効率は 10~20% 程度であるがラット、ウサギ、ブタなどはそれよりも低く、反芻動物に至っては極めて低い (Houdebine et al., 2007)。そのため、有用な遺伝子改変動物を作製するためには多くの労力を必要とし、大動物では移植できる胚数も限られるためさらなる労力・動物数が必要となり倫理的な観点からも問題である。これを解決するための方法として、遺伝子導入効率の改善による作出効率改善は従来から検討されてきた。その一例として レンチウイルスベクターを用いた受精卵への遺伝子導入が挙げられ、ニワトリ (McGrew et al., 2004)、ブタ (Hofmann et al., 2003)、ヒツジ (Whitelaw et al., 2004)、ウシ (Hofmann et al., 2004)、コモンマーモセット (Sasaki et al., 2009) において成功例の報告があり、遺伝子改変効率は顕微注入法と比較して高効率であることが示されている。しかしながら、ウイルスベクターを用いた場合、ウイルスの構築に技術、設備、時間を要する点、導入できる遺伝子の大きさが限定されてしまう点、およびウイルスベクターに存在する長い末端反復配列 (long terminal repeat: LTR) が、導入遺伝子プロモーターの発現制御に干渉することで特異的発現に影響を及ぼす点などの課題が挙げられており (Houdebine et al., 2007)、有効な解決策には至っていない。前述のようなこれまでの多くの努力にもかかわらず、遺伝子導入効率を向上させる有効な手法は未だ見いだせていないのが現状である。

一方、別の解決策として遺伝子改変胚を移植前に早期選抜する方法があり、移植前の胚でマーカー遺伝子を発現させて選別する方法が古くより行われている (Ueno et al., 1987)。また、近年では様々な種類の蛍光タンパク質の開発 (Cormack et al., 1996) により、非侵襲的かつ簡便に選別することが可能となった。この方法では、労力とコストの改善に多大な貢献をもたらすと考えられる。本論文では第 3 章において、この遺伝



子改変動物胚選別法の改善に取り組んだ。

本研究では、ターゲットバリデーションの入り口となる *in vitro* ターゲットバリデーションの実際と、遺伝子改変動物を用いた *in vivo* ターゲットバリデーション技術の応用・改良法を以下の通り提示した。

第1章では、*in vitro* ターゲットバリデーションの実例として、ヒト肺上皮細胞に多く発現が認められ、呼吸器疾患やインフルエンザウィルスの感染に関与が報告されている膜型セリンプロテアーゼのヒト気道トリプシン様プロテアーゼ (human airway trypsin-like protease: HAT) を標的分子として着目し、HAT が関与する疾患に対する治療薬創製を目指す目的で、HAT の酵素活性に対するインヒビターと想定される肝細胞増殖因子 (HGF)活性化因子1型阻害因子 (hepatocyte growth factor activator inhibitor type-1: HAI-1)の酵素阻害活性および、活性化調節作用に関して検討した内容を示す。本研究において、HAT の酵素活性阻害化合物や活性化阻害化合物、または HAI-1 そのものが呼吸器疾患治療薬となりうる可能性を示すとともに、*in vitro* ターゲットバリデーションの可能性と課題について考察する。

第2章では、*in vitro* ターゲットバリデーションだけでなく、*in vivo* ターゲットバリデーションにも有用な RNAi 発現遺伝子構築の開発を行った。ヒトマイクロ RNA の一つである miR-187 の前駆体配列を利用した siRNA 発現遺伝子を構築し、その有用性を検証した。本研究では、マウス4型メラノコルチン受容体を標的とした RNAi tg マウスを作製し、その表現型がノックアウトマウスと類似することを明らかにした。本方法により、標的候補遺伝子の *in vitro* および *in vivo* ターゲットバリデーション研究を加速することができる可能性を示した。

第3章では、緑色蛍光タンパク質 (enhanced green fluorescent protein: EGFP)をマーカーとした遺伝子改変胚の早期選抜法の開発を行った。本研究により、マーカー遺伝子の発現様式を見分けることで極めて高効率に遺伝子改変胚を選抜することが可能とな

り， *in vivo* ターゲットバリデーションの効率を改善できる可能性を示した．

以下，これらについて章ごとに順を追って記述し，最後に総合的に考察を行った．

## 第一章

ヒト肝細胞増殖因子活性化因子 1 型阻害因子によるヒト  
気道トリプシン様プロテアーゼ活性および活性化阻害作用  
に関する *in vitro* ターゲットバリデーション研究

## 要約

創薬研究において標的候補分子に対する *in vitro* ターゲットバリデーションは、標的分子の基本的な機能及び活性を明らかにする点で極めて重要である。第1章では、肝細胞増殖因子 (HGF) 活性化因子1型阻害因子 (HAI-1) とヒト気道トリプシン様プロテアーゼ (HAT) に対して *in vitro* ターゲットバリデーションを行った例を示す。HAI-1 は2個の Kunitz ドメインを持つセリンプロテアーゼ阻害因子であり、膜貫通型タンパク質として発現され、HGF 活性化因子の強力な内在性阻害因子として同定された。また、HAT は主に肺上皮細胞に発現が認められる膜型セリンプロテアーゼであり、遊離型 HAT は慢性気管支炎患者や喘息患者の喀痰中に多く発現が認められ、呼吸器疾患治療薬の標的として注目されている。本章では、HAI-1 が HAT のプロテアーゼ活性を阻害し得るかについて、その分子機構とともに検証した。その結果、Kunitz ドメインを1つだけ持つ遊離型の組換え HAI-1 タンパク質は HAT のプロテアーゼ活性を阻害すること、また膜結合型の HAI-1 は HAT の活性化も阻害することを明らかとした。すなわち、HAT 発現ベクターを哺乳類細胞に導入すると活性化型 HAT が培養上清中に遊離され、活性部位への点変異導入実験によりこの活性化は HAT 自身のプロテアーゼ活性に依存的であることが判明した。これに対し HAT と膜発現型の全長 HAI-1 を共発現させると HAT の活性化が阻害されることが明らかとなった。さらに HAT は他の HAI-1 標的プロテアーゼと同様、HGF 前駆体タンパク質を活性化させることも示された。これらの結果より、HAT の生理的な活性化機構、内在性阻害因子としての HAI-1 との関連、および HGF 前駆体タンパク質を活性化させることによる病態形成への寄与を示唆することができた。本章の研究により、標的分子およびその変異体を自在に発現でき、酵素活性測定などの生化学的検証や培養細胞を用いた遺伝子過剰発現等による生理的機能検証、相互作用分子の同定などが容易な現行の *in vitro* ターゲットバリデーションは、創薬において極めて大きな威力を発揮することを実例により示すことが出来

た。一方、本研究で用いられた HEK293 細胞は HAI-1, HAT いずれも内在性に発現していないヒト胎児腎臓由来細胞であり、人工的に強制発現させたものである。 *In vitro* で生体内における標的分子の役割がより反映された検証を行い、 *in vivo* バリデーションへとつなげるためには、標的分子を内在性に発現する細胞を用いる必要があることも示唆された。

## 緒言

本章では、創薬標的分子の妥当性検証の入り口である *in vitro* ターゲットバリデーションの実例を示し、その可能性と課題について考察する。本研究では慢性気管支炎患者、気管支喘息などの慢性呼吸器疾患患者の喀痰中から精製されたセリンプロテアーゼであるヒト気道トリプシン様プロテアーゼ (human airway trypsin-like protease: HAT, TMPRSS11D) (Yasuoka et al., 1997)の活性を阻害する因子を創薬の標的とした。

HAT は、現在までに基質としていくつかのタンパク質が同定されており、まず、プロテアーゼ活性化型受容体 2 (protease-activated receptor-2: PAR-2) がその一つとしてあげられる (Chokki et al., 2005)。PAR-2 の活性化はヒト気道における線維芽細胞の増殖を生じさせ (Matsushima et al., 2006)、上皮細胞のムチンタンパク質発現を上昇させる (Chokki et al., 2003)。このことは慢性呼吸器疾患における線維症や痰の過剰分泌につながり、病態形成へ関与していることが考えられる。また、HAT はウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベータ受容体 (urokinase-type plasminogen activator receptor: uPAR) を基質として切断する活性を有しており、uPAR の切断は細胞接着や生存性を制御し、気道の炎症に伴う組織修復にも関与していると考えられる (Beaufort et al., 2007)。さらに、インフルエンザウィルスの感染に必要な血球凝集素 (hemagglutinin: HA) (Bottcher et al., 2006)や重症急性呼吸器症候群 (severe acute respiratory syndrome: SARS) コロナウィルスの感染に必要な SARS-S タンパク質 (Bertram et al., 2011)を切断し、感染性の獲得に寄与していることが示されている。これらの報告より、HAT は炎症を伴う慢性気管支疾患の病態形成やインフルエンザウィルス感染、SARS コロナウィルス感染に関与していることが示唆され、そのプロテアーゼ活性阻害薬はこれら疾患の治療薬になる可能性がある。

HAT は 2 型膜貫通タンパク質であり (Yamaoka et al., 1998)、N 末端側に細胞内ドメインと膜貫通ドメイン、C 末端側に細胞外プロテアーゼドメインを有し (Szabo et al.,

2003), さらにプロテアーゼドメインと膜貫通ドメインの間に SEA (sperm protein, enterokinase and agrin)ドメインと呼ばれる部位が有る. 多くの膜型タンパク質で認められる SEA ドメインは, タンパク質開裂が生じる部位とされている (Wreschner et al., 2002). HAT は膜型の前駆体タンパク質として発現され, プロテアーゼによる切断による活性化を受けて遊離型の活性型 HAT タンパク質が分泌されると考えられているが (Yamaoka et al., 1998), その活性化機構は不明である. よって, HAT の活性化機構を解明することで, HAT のプロテアーゼ活性阻害剤の探索と同様, 前に述べた HAT が関与する疾患に対する治療薬創製に役立つと考えられる.

今回, 創薬標的とする HAT の阻害因子候補の 1 つが肝細胞増殖因子 (HGF)活性化因子 1 型阻害因子 (HGF activator inhibitor type 1: HAI-1)である. HAI-1 は, タンパク質分解酵素の阻害ドメインである Kunitz ドメインを持つセリンプロテアーゼインヒビターであり, HGF 活性化因子(HGFA) や血液凝固に関与する第 12 因子様セリンプロテアーゼなど, HGF 前駆体タンパク質を活性化させるセリンプロテアーゼの強力な阻害タンパク質として発見された (Shimomura et al., 1997). その後, HAI-1 はマトリプターゼ/MT-SP1 (Lin et al., 1999), ヘプシン (Kirchhofer et al., 2005) やプロスタシン (Herter et al., 2005)などのセリンプロテアーゼの阻害活性を有していることが明らかとなった.

HAI-1 は, 単純円柱上皮, 尿細管, 様々な粘膜上皮において発現が認められ (Kataoka et al., 1999), これら上皮細胞におけるプロテアーゼ活性を制御している可能性が考えられる. さらに, HAI-1 は初代気管支上皮細胞において mRNA 発現が報告されていたが (Tarran et al., 2006), 近年, ヒト肺の気管支上皮における発現が免疫染色法により明らかとなった. この報告では, HAI-1 は組織傷害に応答して, 気管支纖毛上皮細胞において発現上昇することが示されている (Tanaka et al., 2009). また, HAT と HAI-1 の気管支纖毛上皮細胞における発現局在は極めて類似している (Takahashi et al.,

2001). これらのことより, HAI-1 は HAT のプロテアーゼ活性を制御している可能性が考えられる. そこで先ず, HAI-1 が実際に HAT の阻害因子となり得るかを検証することにした. なお, HAI-1 は膜結合ドメインを持つ 66 kDa の膜タンパク質として発現され, 細胞外ドメインが切断を受けて 2 種類の主要な可溶性タンパク質として細胞外に遊離される. 創薬の対象とする場合には遊離性の可溶性タンパク質の機能を知る必要があるため, 全長の膜結合型 HAI-1 に加え可溶性タンパク質についても遺伝子組換え技術により発現・精製し同様に検証を行った.

現在までに知られている HAI-1 の標的プロテアーゼであるマトリプターゼも HAT 同様, 2 型の膜型セリンプロテアーゼであり, 前駆体の 1 本鎖タンパク質から自己のプロテアーゼ活性依存的に細胞膜上で活性化を受け, 二本鎖の活性型タンパク質に変換され遊離する (Oberst et al., 2003). 可溶性 HAI-1 は, 活性化マトリプターゼのプロテアーゼ活性を阻害するが, 一方でマトリプターゼの活性化には膜結合型 HAI-1 との共発現が必要とされることが知られている (Oberst et al., 2003). したがって, HAI-1 は HAT の活性化機構に対しても何らかの制御機構を有している可能性が考えられる. そこで次に, HAT の活性化機構とそれに対する HAI-1 による制御について検討した.

HAI-1 は当初 HGF 前駆体タンパク質を活性化させるセリンプロテアーゼの強力な阻害タンパク質として発見された (Shimomura et al., 1997). HGF 前駆体タンパク質はプロテアーゼによる限定消化を受けて成熟型 HGF へと変換される (Naka et al., 1992)が, この作用を有することが知られている HGFA, マトリプターゼ, およびヘプシンのプロテアーゼ活性は全て HAI-1 で阻害されることが明らかとなっている (Shimomura et al., 1997, Lin et al., 1999, Kirchhofer et al., 2005, Herter et al., 2005). HAT が HAI-1 による阻害標的となる場合, これらのプロテアーゼと同様に, HGF 前駆体タンパク質を活性化させる作用を有している可能性がある. HAT が線維芽細胞の増殖に関与するという報告もこの可能性を支持する. そこで最後に, HAT に, これまで知られていない HGF 前



駆体タンパク質の活性化機能が存在するかどうかの検証を *in vitro* で行った.

以上, HAI-1 の HAT プロテアーゼ活性に対する阻害作用, および HAT の活性化機構に対する作用の検証, さらに多くの HAI-1 標的プロテアーゼと同様 HAT も HGF 前駆体タンパク質を活性化するかの検証を実例として示し, *in vitro* ターゲットバリデーションの有用性と限界について考察する.

## 材料および方法

### 試薬

組換え HAT タンパク質 (2695-SE), 抗 HAT モノクローナル抗体 (MAB2695), および抗 HAI-1 ポリクローナル抗体 (AF1048)は R&D system (Minneapolis, MN, USA) から, HAT の合成基質である Boc-Ile-Gln-Gly-Arg-MCA (Boc-IQGR-MCA: 3094-v)はペプチド研(Osaka, Japan)から, 西洋わさびペルオキシダーゼ (Horseradish peroxidase; HRP) 標識された抗ヤギ IgG 抗体 (sc-2354) は Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) から, 抗 FLAG 抗体-HRP (A8592), 抗 FLAG M2 affinity resin (F2426)およびアプロチニン (A6106)は SIGMA (St. Louis, MO, USA)から, プロテイン G セファロース (17061801), 抗マウス IgG 抗体-HRP (NA-931)は GE Healthcare (Buckinghamshire, England) から購入した. 組換え HGF タンパク質は以前に調製されたものを使用した (Shimomura et al., 1992).

### 遺伝子構築

HAT 遺伝子の cDNA は, ヒト肺 cDNA ライブラリー (9506, TaKaRa: Kyoto, Japan)を鋳型として PCR により取得し, N 末端に 3x FLAG タグを付加したうえで pEF6-mycHisA (V96220, invitrogen: Carlsbad, CA, USA)にサブクローニングしたものを pEF6-N-FLAG-HAT とした. 全長 HAI-1 遺伝子, および膜貫通ドメインを有さない遊離性の可溶性 HAI-1 である NK1 および NK1LK2 (図 1-1A) の cDNA は以前に調製されたものを使用した (Denda et al., 2002). これらの cDNA は, pcDNA3.1-mycHis-A (V80020, invitrogen)にサブクローニングし, pcDNA3.1-HAI-1 と総称する. HAT cDNA への点変異の導入は, Site-Directed Mutagenesis kit (200518, Stratagene: La Jolla, CA, USA)を用い, 点変異置換されたオリゴ DNA を用いてキットに添付の説明書に従った. 全ての遺伝子配列は, DNA シークエンサー (ThermoFisher Scientific: Rockford, IL, USA)に

より確認した。

#### 細胞培養およびトランスフェクション

HEK293 細胞株を 1 型コラーゲンコート の 6 ウェルプレート (IWAKI: Chiba, Japan) に播種した。pEF6-N-FLAG-HAT と各種 pcDNA3.1-HAI-1 をプラスミド重量比 4:1 になるように Lipofectamine (18324012, invitrogen) および Plus reagent (11514015, invitrogen) を用いて、試薬に添付されている説明書に従いトランスフェクトし、3 時間後に等量の 2% FBS を含む培地を添加、24 時間後に細胞を回収した。

#### HAT 酵素アッセイ

組換え NK1 タンパク質および組換え NK1LK2 タンパク質を下記のように調製した。NK1 および NK1LK2 発現ベクター (pcDNA3.1-HAI-1) を Superfect transfection reagent (301305, QIAGEN: Hilden, Germany) を用いて CHO 細胞に導入した後に 37°C で一晩培養した。培地を Geneticin (10131035, ThermoFisher Scientific) を含む培地に交換し、出現した耐性クローンをローラーボトル中でさらに培養を行った。細胞がコンフルエント状態の時に血清を含まない培地に交換し、さらに 5 日間培養を行った。培養上清に Ni-NTA アガロース樹脂 (30210, Qiagen) を添加し目的タンパク質を結合させた後、洗浄し、溶出バッファー (50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 200 mM イミダゾール) を添加して遠心分離することにより目的タンパク質を回収した。次に透析によりイミダゾールを除去した後、さらに精製度を高める目的で抗 c-myc 抗体アガロース樹脂 (20169, Pierce) を加えて再度目的タンパク質を結合させた後洗浄し、20 mM 塩酸を用いてこれを溶出し、直ちに 1/10 量の 1 M Tris-HCl (pH 8.0) を加え中和し、精製 NK1 および NK1LK2 組換えタンパク質を取得した。

HAT の基質分解活性測定は下記のように行った。アッセイバッファー (50 mM Tris-

HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl and 0.05% Brij 35)中で、0.12 nM の HAT に種々濃度の阻害剤を加え室温で5分間保温した。その後、Boc-IQGR-MCA 基質を終濃度 100  $\mu$ M / 200  $\mu$ l になるように加えた。37°C, 30 分間インキュベートした後、基質の分解によって生じた蛍光を測定した (ARVO, Perkin Elmer Life Science: Boston, MA, USA)。阻害剤を添加していないサンプルの活性を 0%阻害、酵素なしのサンプルを 100%阻害とし、各阻害剤の阻害活性 ( $IC_{50}$ )を算出した。

### イムノブロット解析

細胞溶解物を用いたイムノブロットは下記のように行った。細胞はリン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.4, phosphate buffered saline: PBS)で洗浄したのち、Halt Protease inhibitor cocktail (78430, Thermofisher scientific)を含む 500  $\mu$ l の RIPA バッファー (0.1% SDS, 0.1% ノニデット P40, 0.5% デオキシコール酸ナトリウム/PBS (pH 7.4))で振とうしながら 4°C で一晩溶解した。15,000 rpm, 4°C, 10 分間遠心した上清 (細胞溶解物)を回収した。回収した細胞溶解物のタンパク質濃度は micro BCA protein assay reagent (23235, Thermofisher Scientific)を用いて測定した。細胞の培養上清は回収後、15,000 rpm, 4°C, 5 分間遠心したのち実験に用いた。細胞溶解物と培養上清は、5x サンプルバッファー (125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 4.3% SDS, 30% グリセロール, 10% 2-メルカプトエタノール, 0.01% ブロモフェノールブルー/PBS)を加え混和し、95°C, 5 分間加温し変性させた。

サンプルを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)に供し、PVDF 膜 (LC2002, invitrogen)に電氣的に転写した後、ブロッキング溶液 (5% スキムミルク/PBS)でブロッキングを行った。抗 HAT および HAI-1 抗体をブロッキング溶液中で反応させ、PBST (0.05% Tween-20 /PBS) で洗浄後、抗 HAT 抗体に対しては抗マウス IgG 抗体-HRP , 抗 HAT 抗体に対しては抗ヤギ IgG 抗体-HRP と反応させて洗浄し、ECL

chemiluminescence system (RPN2209, GE healthcare)を用いて可視化させ、LAS-3000 (Fujifilm Life Science: Stamford, CT, USA)を用いて化学発光の検出を行った。

### 免疫沈降

上記によって得られた細胞溶解物 100  $\mu$ l に 900  $\mu$ l の PBS を加え、2  $\mu$ g の抗 HAI-1 抗体または 30  $\mu$ l の抗 FLAG-M2 affinity resin を加えて、回転させながら 4°C で一晩反応させた。抗 HAI-1 抗体を添加したサンプルはさらにプロテイン G セファロースを加え、4°C でさらに 3 時間反応させた。反応後のサンプルは共に、PBST で 2 回、PBS で 1 回、150 mM NaCl で 1 回洗浄（すべて 4°C）後、20 mM HCl で溶出させ、1/10 量の 1 M Tris-HCl (pH 8.0)を加え中和した後、上述のイムノブロット実験に供した。

### HAT の HGF 前駆体タンパク質活性化アッセイ

4  $\mu$ g の HGF 前駆体タンパク質を種々濃度の HAT と、0.1% CHAPS を含む PBS 中で混和させて 37°C, 30 分間保温した。組換え NK1 タンパク質の阻害作用検討には、あらかじめ 10 ng の HAT と 100 ng の組換え NK1 タンパク質を 0.1% CHAPS/ PBS 中で混和させ、5 分間室温で保温した後に 4  $\mu$ g の HGF 前駆体タンパク質を加えて同様に 37 °C, 30 分間保温した。その後、サンプルを前述の方法で変性させ SDS-PAGE を行い、2.5% のクマシーブリリアントブルー溶液（水：メタノール：酢酸=6:3:1（重量比））でゲル中のタンパク質を染色した。

活性化 HGF タンパク質の生物活性確認は、HepG2 を用いた scattering assay により行った (Kondo et al., 2008)。HepG2 細胞に、上述のように処理した HGF タンパク質溶液を HGF 前駆体タンパク質の終濃度が 50 ng/ml になるように添加して、4 日間培養させた。細胞の形態を光学顕微鏡にて観察した。

## 結果

### 可溶型 HAI-1 組換えタンパク質による HAT プロテアーゼ活性阻害作用

HAT のプロテアーゼ活性に対する可溶型 HAI-1 タンパク質の阻害活性の検討を行った。HAI-1 は 66 kDa の膜タンパク質として発現され、細胞外ドメイン部分が切断されることにより 2 種類の主要な可溶型タンパク質として細胞外に遊離される。この可溶型 HAI-1 の分子量は約 40 kDa, 58 kDa であり、40 kDa HAI-1 は N 末端ドメイン (N), Kunitz ドメイン (K1)を含んでおり、HGFA に対して極めて強力な阻害活性を有している。一方、58 kDa HAI-1 は N 末端ドメイン (N), 2 つの Kunitz ドメイン (K1 および K2), さらに 2 つの Kunitz ドメインの間に LDL 受容体クラス A ドメイン (L)を含んでおり、HGFA に対する阻害活性は 40 kDa HAI-1 と比較して弱いことが知られている (Shimomura et al., 1999)。本研究では 40 kDa の可溶型 HAI-1 を NK1, 58 kDa の可溶型 HAI-1 を NK1LK2 (図 1-1A) と呼ぶことにし、これらを強制発現するベクターを構築し、CHO 細胞に発現させて精製組換えタンパク質を取得した。これらの組換えタンパク質と市販の組換え HAT タンパク質、および合成基質 (Boc-IQGR-MCA)を用いて阻害活性を測定したところ、NK1 が、既存の報告 (Yasuoka et al., 1997)で阻害活性が確認されているアプロチニン ( $IC_{50}=9.86$  nM)よりも強い阻害活性 ( $IC_{50}=0.86$  nM)を有していることが明らかとなった。一方、NK1LK2 は HAT に対してほとんど阻害活性を有していなかった (図 1-2)。

### HAT 活性化における自己活性の重要性

HAT は昆虫細胞に強制発現された場合、まず 48 kDa の膜型タンパク質として発現され、切断を受けることにより 27 kDa の活性型 HAT として細胞外に遊離される (Yamaoka et al., 1998)。しかしながら、哺乳類培養細胞における活性化機構についてはほとんど判明していない。そこで最初に、N 末端細胞内ドメインに 3x FLAG タグを付加

した全長 HAT 発現ベクターを構築 (図 1-1B) し, HEK293 細胞に一過性に発現させてその活性化状態の検証を行った. 細胞溶解物を SDS-PAGE に供し, 抗 FLAG 抗体を用いたイムノブロットを行ったところ, 52, 25, 15 kDa の 3 種類のバンドが確認された (図 1-3A). FLAG タグは N 末細胞質内ドメインに付加されていることから (図 1-1B), 52 kDa は全長の HAT タンパク質であると考えられ, 25, 15 kDa のバンドの出現は, 少なくとも HAT 分子内で 2 か所の切断を受けていることを示している. 培養上清サンプルを, プロテアーゼの触媒領域を認識する抗 HAT 抗体でイムノブロットしたところ, 約 27 kDa タンパク質の存在が明らかとなった (図 1-3B). 慢性呼吸器疾患患者の喀痰中で認められる活性型 HAT も 27 kDa の分子量を有することから (Yasuoka et al., 1997), この 27 kDa タンパク質は活性型 HAT であると考えられる.

前駆体である全長 HAT タンパク質は Arg186 と Ile187 の間で切断を受け, 活性型 HAT が生成されることが知られている (Yamaoka et al., 1998). そこで, 培地中に出現する 27 kDa タンパク質がこの切断を受けて生じるものであるかどうかを検証するため, Arg186 を Ala に置換した変異体を作製 (R186A) し, 同様に HEK293 への一過性発現で出現タンパク質の検証を行った. その結果, 細胞溶解物中の 25 kDa タンパク質は完全に消失し, 15 kDa タンパク質の減少が認められた (図 1-4A). また, 培養上清中では 27 kDa タンパク質が完全に消失したことより (図 1-4B), 培養上清中の 27 kDa タンパク質は Arg186 で切断を受けた C 末側の活性型 HAT であり, 細胞溶解物中の 25 kDa タンパク質は N 末側の残余断片であることが強く示唆された.

次に, HAT の活性化に自己のプロテアーゼ活性が必要とされるかどうかを検証するために, セリンプロテアーゼの活性発現に必須なアミノ酸の一つである Ser368 を Ala に置換した変異体を作製 (S368A) し, 同様に HEK293 細胞での出現タンパク質の検証を行った. その結果, S368A 導入細胞でも R186A 導入と同様に, 細胞溶解物中の 25 kDa タンパク質の消失と 15 kDa タンパク質の減少 (図 1-4A), 培養上清中の 27 kDa タ

ンパク質の消失（図 1-4B）が観察され、このことから HAT の活性化には自己のプロテアーゼ活性が必要であることが示唆された。

細胞溶解液中の 15 kDa タンパク質は、その分子量から SEA ドメイン内で切断を受けたものの N 末側断片と考えられる（図 1-4C）。この 15 kDa タンパク質は HAT-R168A, HAT-S368A においても検出されたが、その出現量は野生型 HAT と比較して少なかった。このことは、活性型 HAT の存在はこの部位の切断に必須ではないが、切断を間接的に促進させる可能性が考えられる。また、この切断を受けた C 末側の遊離断片は約 37 kDa 程度の大きさを有すると考えられるが、そのタンパク質断片は培養上清中では検出されなかった（図 1-4B）。このことは、37 kDa タンパク質は遊離後速やかに 27 kDa タンパク質へ変換されるため、または正しい構造を有することができないため等の理由により不安定であり培養上清中で検出されなかった可能性が考えられる。

#### HAI-1 共発現による HAT 活性化の阻害

HAI-1 が HAT の活性化を制御するかどうかを検証するために、HEK293 細胞に HAT と全長 HAI-1 あるいは NK1, NK1LK2 を共発現させて解析を行った。NK1 および NK1LK2 の共発現は培養上清中の HAT 27 kDa タンパク質の発現および細胞溶解物中の HAT 25 kDa タンパク質の発現を減少させなかった（図 1-5A）。しかし、HAT 単独の発現や NK1LK2 との共発現と比較して、NK1 の共発現は培養上清中の 27 kDa タンパク質量を増加させた（図 1-5B）。NK1 が HAT を強力に阻害する前述の結果と併せ考えると、培養上清中で HAT と NK1 が複合体を形成し、タンパク質の安定性を増加させた可能性が考えられる。一方、全長 HAI-1 と HAT を共発現させたサンプルでは、培養上清中の HAT 27 kDa タンパク質および細胞溶解液中の HAT 25 kDa タンパク質が消失していることが明らかとなった（図 1-5A, B）。細胞溶解液中の HAT 15 kDa タンパク質も減少しており、HAT の変異体 (S368A, R186A)と同様な出現パターンを示したことから



ら、全長 HAI-1 が共発現することで HAT の活性化が抑制された可能性が考えられた。

#### HAT および HAI-1 の相互作用

全長 HAI-1 が HAT の活性化を抑制する結果から、全長 HAI-1 と HAT の直接的相互作用が存在している可能性が考えられたため、免疫沈降法により相互作用の有無を検証した。HAT と全長 HAI-1 を HEK293 細胞に共発現させた細胞溶解物に対し、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降を行って溶出したタンパク質中には、抗 HAI-1 抗体で認識される全長 HAI-1 が共沈澱してくることが示された (図 1-6A)。また、抗 HAI-1 抗体を用いた免疫沈降を行って溶出したタンパク質中には、抗 FLAG 抗体で認識される全長の HAT タンパク質が存在することが示された (図 1-6B)。これらの結果より、HEK293 細胞で共発現させた全長 HAI-1 と HAT は相互作用して複合体を形成していることが示された。

#### HAT による HGF 前駆体タンパク質の活性化

HGF 前駆体タンパク質はセリンプロテアーゼによって限定消化を受けて成熟型 HGF へと変換・活性化される (Naka et al., 1992)。また、HGFA、マトリプターゼやヘプシンなど、HAI-1 が阻害するプロテアーゼの多くが HGF 前駆体タンパク質の活性化を生じさせることも知られている (Shimomura et al., 1997, Lin et al., 1999, Kirchhofer et al., 2005, Herter et al., 2005)。そこで、HAI-1 により阻害されることが明らかになった HAT も同様に HGF 前駆体タンパク質を活性化させる作用を有しているかどうかの検証を行った。

まず、種々濃度の組換え HAT タンパク質と組換え HGF 前駆体タンパク質を混和させ、SDS-PAGE で分離後にクマシーブリリアントブルー染色で HGF 前駆体タンパク質の分解の検討を行ったところ、HAT 濃度依存的に 54~65 kDa と 31 kDa のタンパク質生成の増加が認められた (図 1-7A)。これら分子量の HGF タンパク質は、HGFA など

活性化されることによって生じる HGF の重鎖と軽鎖の分子量に極めて近似している。また、組換え NK1 タンパク質を HAT と HGF 前駆体タンパク質に添加したところ、54~65 kDa と 31 kDa のタンパク質の生成は完全に阻害された (図 1-7B)。すなわち、NK1 は HAT による HGF 前駆体タンパク質の切断を阻害する活性を有することが明らかとなった。

最後に、HGF 前駆体タンパク質から HAT によって切断を受けたタンパク質が、生理的な HGF 活性を有しているかどうかを検証する目的で、HepG2 細胞株を用いた scattering assay を行った。活性化 HGF は凝集した形態の HepG2 の運動性を亢進させ、バラバラな形態を示すようにさせることが知られている。HGF 前駆体タンパク質と HAT を混和させた混合液を HepG2 に添加したところ、活性化 HGF を添加した時と同様なバラバラな形態を示し、HAT 単独で添加したときにはその表現型は認められなかった (図 1-7C)。このことより、HAT は HGF 前駆体タンパク質を生理学的に活性化させることが明らかとなった。

## 考察

今回の *in vitro* ターゲットバリデーションでは、最初に膜結合型および可溶型 HAI-1 が、HAT の阻害因子として機能し、創薬の対象となり得るかの検証をおこなった。その結果、Kunitz ドメインを 1 つだけ有する可溶型 HAI-1 である NK1 は、HAT のプロテアーゼ活性を、従来から知られる阻害剤であるアプロチニンよりも強力に阻害 ( $IC_{50}=0.86\text{ nM}$ ) した (図 1-2)。活性型 HAT は、主に気管支の繊毛上皮細胞に発現していることが知られている (Takahashi et al., 2001) が繊毛上皮細胞では HAI-1 も同様に発現しているため (Tanaka et al., 2009)、HAI-1 は気道組織における HAT の内在性阻害因子の一つであることが考えられる。事実、HEK293 細胞を用いた HAT と全長 HAI-1 の共発現実験により、HAI-1 により HAT の活性化が阻害されること (図 1-5)、および HAT と HAI-1 が複合体を形成すること (図 1-6) が明らかとなった。このことから膜結合型の全長 HAI-1 が膜上で HAT と相互作用し、HAT の活性を阻害することで活性化を抑制していることが示唆された。一方で、Kunitz ドメインを両方とも含む可溶型 HAI-1 である NK1LK2 は HAT に対してほとんど阻害作用を示さないことが示された (図 1-2)。このことから K2 ドメインの存在が K1 と HAT の結合を阻害しているものと考えられる。HAI-1 による阻害が従来から知られている HGFA やマトリプターゼにおいても、同様に K2 ドメインを有する HAI-1 の阻害活性が低いことが知られており (Denda et al., 2002, Kojima et al., 2008)、HAT の阻害様式もこれらと類似している。一方、膜結合型の全長 HAI-1 も Kunitz ドメインを両方とも保持しているが HAT と相互作用し、活性化を阻害する。その理由としては、膜結合型 HAI-1 の Kunitz2 ドメインは可溶型の NK1LK2 とは構造が異なっており Kunitz1 ドメインと干渉していないためと考えられる。同様の知見は、HGFA との相互作用においても認められる。HGFA は HAT 同様、NK1LK2 による阻害作用は弱いにもかかわらず、膜に発現する全長 HAI-1 には細胞膜上で強い結合を示すことが知られている (Kataoka et al., 2000)。このこと

は、膜上に存在する全長 HAI-1 の構造と可溶型 NK1LK2 の構造は異なり、HAI-1 の膜上での標的分子に対する阻害・結合活性には可溶型 HAI-1 と違いがあることを示唆している。

この様に、今回の *in vitro* ターゲットバリデーションにより遊離性の HAI-1 のうち Kunitz ドメインを 1 つだけ持つ可溶型 HAI-1 の NK1 が HAT の阻害因子として有効であることが示され、創薬の対象となる可能性を示すことができた。また膜結合型 HAI-1 の機能と、HAT の阻害効果を持たない可溶型 HAI-1 である NK1LK2 の構造についても考察を加えることができた。このようなドメインごとの機能を考慮した創薬標的因子の作用検証には、遺伝子組換え技術により得られたドメイン欠損変異体を用い、酵素活性測定などの生化学的検証、培養細胞を用いた遺伝子過剰発現等による標的分子の生理的機能検証や、相互作用分子の同定などが容易である *in vitro* ターゲットバリデーションが極めて大きな威力を発揮することを、実例をもって示すことが出来た。したがって創薬の妥当性検証のための *in vitro* ターゲットバリデーションは、その第一段階として極めて大きな可能性をもつことを実証できたと考えている。

インフルエンザの感染に関与している血液凝集素蛋白質の開裂には HAT だけでなく、TMPRSS2, TMPRSS4, KLK5, マトリプターゼ, TMPRSS13 の寄与が報告されている (Bottcher et al., 2006, Chaipan et al., 2009, Hamilton and Whittaker, 2013, Baron et al., 2013, Okumura et al., 2010)。インフルエンザウイルス由来のタンパク質に対する抗インフルエンザ薬は、ウイルスの変異による薬剤抵抗性の獲得が問題視されている (Deyde et al., 2007, Moscona, 2005, Sheu et al., 2011)。さらに、トリ・ブタインフルエンザウイルスなど、治療薬の開発が進められてこなかったウイルスのヒトへの感染報告なども近年なされており (Claas et al., 1998, Myers et al., 2007)、世界的な爆発感染を引き起こすものとして脅威とされている。HAI-1 は HAT だけでなく TMPRSS2, TMPRSS4, KLK5, マトリプターゼ, TMPRSS13 も阻害する作用があり (Shimomura et al., 2008, Cheng et al.,

2009, Mukai et al., 2008, Hashimoto et al., 2010, Lin et al., 1999), 感染に必要な機能を有する宿主側のプロテアーゼを阻害することで, ウィルス変異に対しても抵抗性のある治療薬になる可能性がある. 今後, HAI-1 に関する *in vitro/in vivo* ターゲットバリデーションを継続し, HAI-1 のインフルエンザ治療薬としての可能性を検討するための研究を継続する必要があると考える.

次に本実験では, これまで十分に明らかにされていない HAT の活性化機構と HAI-1 による制御の検証も行った. その結果, セリンプロテアーゼの活性に必須なアミノ酸 (S368) に変異を入れた実験で, HAT の活性化には HAT 自身の活性が重要な役割を果たしていることが明らかとなった. マトリプターゼも自己活性が活性化に重要であることが知られている. マトリプターゼの活性化は一分子内で生じるのではなく, 近傍に存在するマトリプターゼ分子によるトランス活性化である可能性が提唱されている (Oberst et al., 2003). その理由として, 活性化に必要な切断部位と, プロテアーゼ活性ドメインが物理構造的に一分子内で相互作用しえないと考えられているためである. マトリプターゼと HAT の分子構造, プロテアーゼの活性ドメインおよび活性化に必要な切断部位の位置関係は類似しており, HAT においても近傍の HAT 分子がトランス活性化に寄与している可能性が考えられる.

活性化サイト (R186A) の切断に加え, 細胞溶解液中に 15 kDa タンパク質を生成させる切断部位が存在する (図 1-4C). このタンパク質断片はセリンプロテアーゼ活性変異体 (S368A) および活性化部位変異体 (R186A) においても存在するが, その発現量は野生型 HAT と比較して少ない (図 1-4A). このことは, この部位の切断は HAT 自身のプロテアーゼ活性を必要としないが, 活性化が生じることによって間接的に切断が促進される可能性を示している. 15 kDa の分子量から, 切断は SEA ドメイン中で生じている可能性が考えられる (図 1-4C). SEA ドメインは多くの膜タンパク質で見られる構造であり, コンセンサス配列である Gly-Ser-Val-Val-Val において Gly の C 末側で

タンパク質切断を受けることが知られている (Wreschner et al., 2002). しかしながら HAT はこの配列を持たないため、15 kDa の切断サイトおよび切断メカニズムについては今後の解析が必要である.

この様に、今回の *in vitro* ターゲットバリデーションにより HAT の阻害因子のみならず、HAT 自身の活性化機構と HAT による新たな切断部位の可能性を示唆することができた. 本実験では対象となる分子への変異導入が解析の重要なカギを握っているが、作製された変異体を自在に発現させ解析するのは *in vitro* 実験の利点であり、*in vivo* 実験では時間、労力、費用の面から実現は難しい. このような自在な変異体の発現解析もまた *in vitro* ターゲットバリデーションの大きな可能性であろう.

ここまでの知見より、HAI-1 による HAT の活性化調節、活性調節メカニズム仮説を図 1-8 に示した. HEK293 細胞で共発現した HAT と全長 HAI-1 は相互作用をし、HAT の活性化を抑制している (図 1-8A). 何らかの刺激によって HAI-1 が切断を受け、NK1 を生じさせた場合、HAT は活性化して細胞外へ遊離するが NK1 により活性は抑制されると考えられる (図 1-8B). 一方、NK1LK2 が生じた場合も同様に HAT は活性化して細胞外に遊離するが、NK1LK2 による活性制御を受けずに HAT のプロテアーゼ活性を発揮すると考えられる. HAI-1 はマトリプターゼの活性化に必要であると報告されているが、HAT に関しては活性化には必要では無く、逆にこれを抑制していることが本研究によって示唆された. このように、HAI-1 は 2 型の膜結合型セリンプロテアーゼに対して、多様な調節作用を有していることが考えられる.

さらに本研究では HAT の内在性基質について、HAT が HGF 前駆体タンパク質を活性化させる可能性について検証した. その結果、HAT は HGF 前駆体タンパク質を活性化させ、NK1 はその活性化を抑制することが明らかとなった (図 1-7). HGF は多様な上皮細胞に対して、強力な増殖因子として作用する (Miyazawa et al., 1989, Rubin et al., 1991). したがって、傷害された組織に対する修復因子として作用することが考え

られている (Miyazawa et al., 1994). HGF は腎臓や肝臓などの障害に応答して増加するプロテアーゼの活性により活性化されることから (Miyazawa et al., 1994), 肺においても HAT 活性によって HGF の活性化と組織修復に何らかの関係がある可能性が考えられる。実際、慢性呼吸器疾患患者の喀痰中に HAT が存在することは、炎症や線維症形成に HAT が関与する一方で、組織修復にも HAT が関与している可能性が示唆される。今回の実験により HAT の阻害剤と活性化機構に加え、HAT の新たな基質と機能が示唆される結果となった。In vivo の実験であれば、たとえ HAT の活性化に伴い HGF 活性が上昇したとしても間接的な影響を排除することはできない。このような新たな HAT の基質と機能の証明は *in vitro* 実験であればこそ可能となるものであり、*in vitro* ターゲットバリデーションの持つ重要な可能性である。

最後に *in vitro* ターゲットバリデーションの課題について考察してみたい。

今回、HEK293 細胞に HAT を発現させた結果、15 kDa のタンパク質が多量に検出された。このタンパク質はその分子量から SEA ドメイン内で切断を受けたものの N 末側タンパク質断片と考えられるが、生体内においてこのような切断断片の存在は現在まで報告が無い。また、この切断を受けた C 末側の遊離断片は約 37 kDa 程度の大きさと考えられるが、そのタンパク質断片は培養上清中では検出されず極めて不安定と考えられた。しかし、本研究で用いた HEK293 細胞はヒト胎児腎臓由来細胞であり、HAI-1, HAT いずれも内在性に発現していない (図 1-3) ため、今回の結果は強制発現によって得られたものである。そのため、この 15 kDa 断片がどのような意味を持つものか、また、実際に生体内の肺気管支上皮細胞で生じているのかは現時点では不明である。この点は、本研究のような汎用細胞株を用いた *in vitro* ターゲットバリデーションの持つ大きな課題である。

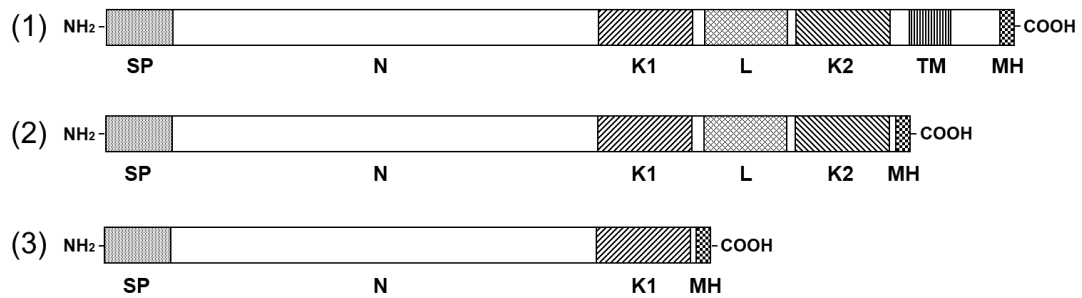
従って、より精度の高い *in vitro* ターゲットバリデーションを行うためには、本研究のような汎用細胞株の試験から、標的分子を内在性に発現するような細胞を用いた試

験を行っていく必要があると考えられ、本来のヒト気管支上皮細胞における HAI-1/HAT の挙動を検証するためにはヒト初代気管支上皮細胞、あるいはヒト気管支上皮細胞株を用いた過剰発現実験やノックダウン・ノックアウト実験が望ましい。しかしそれらは一般的に入手が困難であり、仮に入手しても遺伝子導入効率やノックダウン効率が限定的であるなどの問題点があることが多く、効率の良い遺伝子導入法、遺伝子ノックダウン・ノックアウト法の開発は *in vitro* ターゲットバリデーションの今後の課題である。

*In vitro* ターゲットバリデーションの次のステップとして、本章で事例とした呼吸器疾患の標的分子としての HAI-1 の *in vivo* ターゲットバリデーションを行う場合、種々の病態における HAI-1 の発現や役割などを、遺伝子改変動物（ノックアウト・ノックダウン・強制発現）を用いてさらに検討する必要がある。*In vivo* バリデーションにおいてノックアウトマウスは強力なツールであるが、HAI-1 のノックアウトマウスは胎生致死であるため (Fan et al., 2005, Tanaka et al., 2005), Cre-loxP システムなどを活用したコンディショナルノックアウト法など時間と労力を必要とする方法を取らざるを得ない。そこで、これに代わる手法としてノックダウン法が考えられる。そこで第 2 章においては、迅速・簡便な *in vivo* ターゲットバリデーション手法としての RNAi ノックダウン tg マウス作製法の開発を行うこととした。



## A Hepatocyte Growth Factor Activator Inhibitor Type-1 (HAI-1)



## B Human Airway Trypsin-like Protease (HAT)

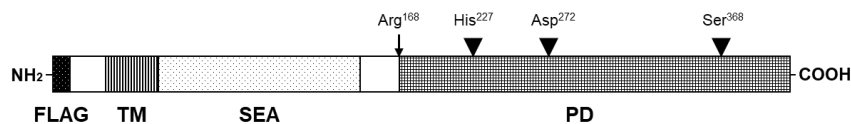


図 1-1 本研究に用いた HAI-1 および HAT 遺伝子の構造

(A) 膜結合型である全長 HAI-1 (1), 遊離性の可溶型 HAI-1 である NK1LK2 (2), および NK1 (3) の構造を示す。これらは全て C 末に myc-His タグを付加して用いた。SP, 分泌シグナルペプチド; N, N 末端領域ドメイン; K1, クニッツ (Kunitz)ドメイン 1; L, LDL 受容体クラス A ドメイン; K2, クニッツ (Kunitz)ドメイン 2; TM, 膜貫通領域; MH, mycHis タグ。

(B) HAT 遺伝子の構造を示す。本研究では N 末に 3xFLAG タグを付加して用いた。FLAG, 3xFLAG タグ; TM, 膜貫通領域; SEA, SEA ドメイン; PD, セリンプロテアーゼドメイン。活性化切断部位 (Arg 186)および触媒に必須な 3 アミノ酸 (His 227, Asp 272 and Ser 368)を矢印および矢頭で示す。

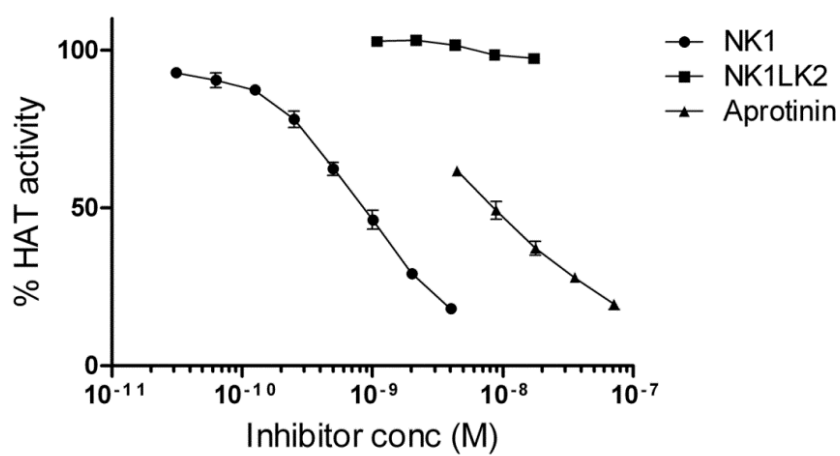
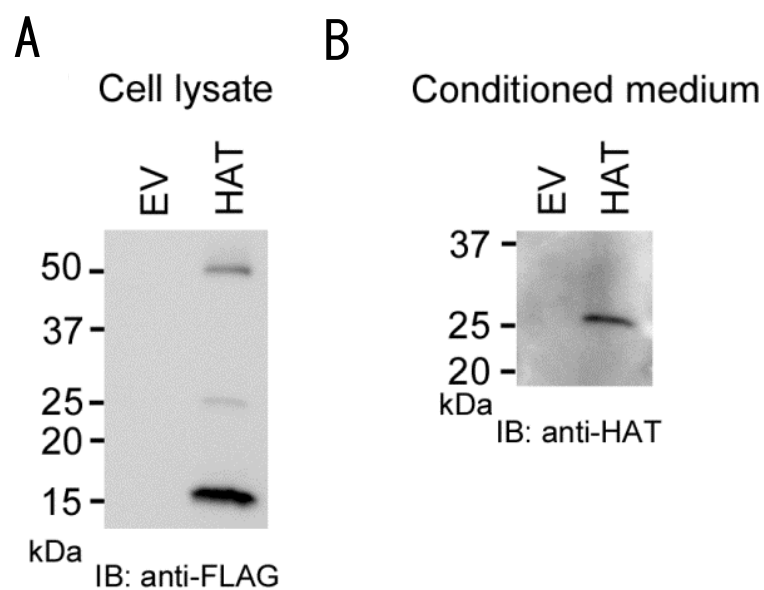


図 1-2 HAT プロテアーゼ活性に対する HAI-1 の阻害活性

組換え HAT を種々濃度の HAI-1 (NK1 (●), NK1LK2 (■))またはアプロチニン(▲)と混和させた後, Boc-IQGR-MCA を加えて生じた蛍光を測定し HAT のプロテアーゼ活性とした. 値は 3 回の独立した実験の平均値±標準偏差を示す.



**図 1-3. HEK293 細胞における HAT の活性化プロセッシング**

N 末端に FLAG タグを有する HAT 発現ベクター (HAT) または空ベクター (EV) を HEK293 細胞にトランスフェクトし、細胞溶解液 (A) および培養液 (B) をウェスタンブロット解析に供した。抗 FLAG 抗体によるブロット像 (A) および抗 HAT プロテアーゼドメイン抗体によるブロット像 (B) を示す。

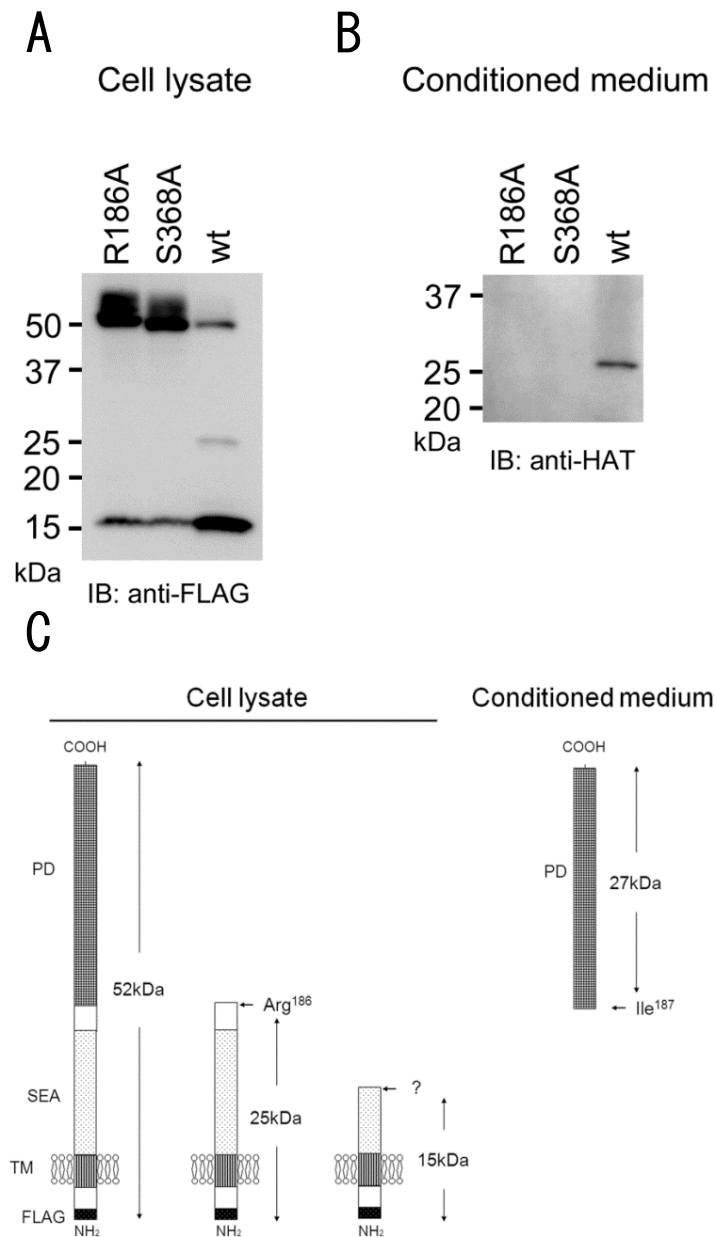


図 1-4. 変異導入による HAT 活性化の変化

野生型 HAT (wt), 活性化切断部位変異体 (HAT R168A), および触媒部位変異体 (HAT S368A) を HEK293 細胞株にトランスフェクトし, 細胞溶解液 (A) および培養液 (B) をそれぞれ抗 FLAG 抗体, 抗 HAT プロテアーゼドメイン抗体を用いたウェスタンブロット解析に供した. (C) HEK293 細胞で発現させた HAT の切断様式を模式化した図を示す. 図中の表記は図 1-1 参照.

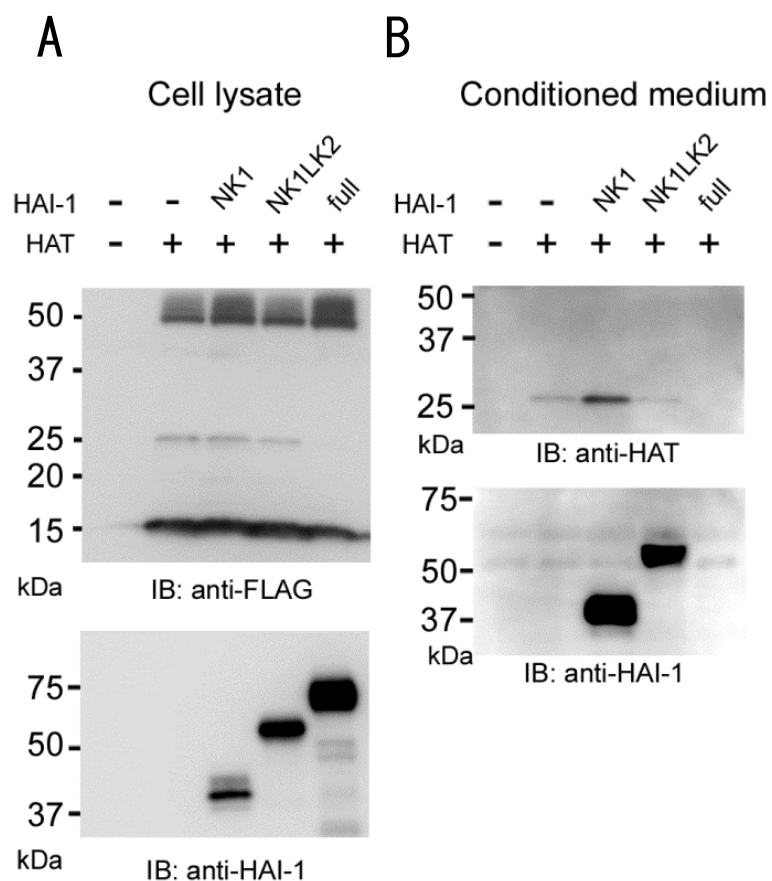
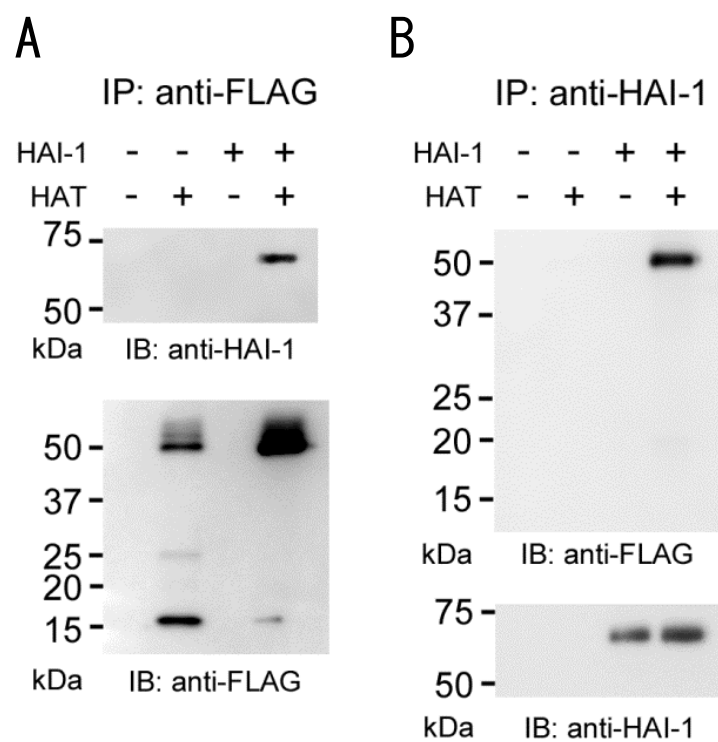


図 1-5. HAI-1 共発現による HAT 活性化の影響

HAT 発現ベクターと NK1, NK1LK2, または全長 HAI-1 (full)の発現ベクターを HEK293 細胞株に共導入した. 細胞溶解液を抗 FLAG 抗体 (A 上段)および抗 HAI-1 抗体 (A 下段)を用いたウェスタンブロット解析に, 培養液を抗 HAT プロテアーゼドメイン抗体 (B 上段)と抗 HAI-1 抗体 (B 下段)を用いたウェスタンブロット解析に供した.



**図 1-6. HAT と HAI-1 の相互作用**

HAT 発現ベクターおよび全長 HAI-1 発現ベクターを HEK293 細胞に共導入した。細胞溶解液を抗 FLAG 抗体 (A), または抗 HAI-1 抗体 (B) による免疫沈降に供し, 得られたタンパク質を抗 HAI-1 抗体 (A 上段, B 下段), および抗 FLAG 抗体 (A 下段, B 上段) によるウェスタンブロット解析に供した。

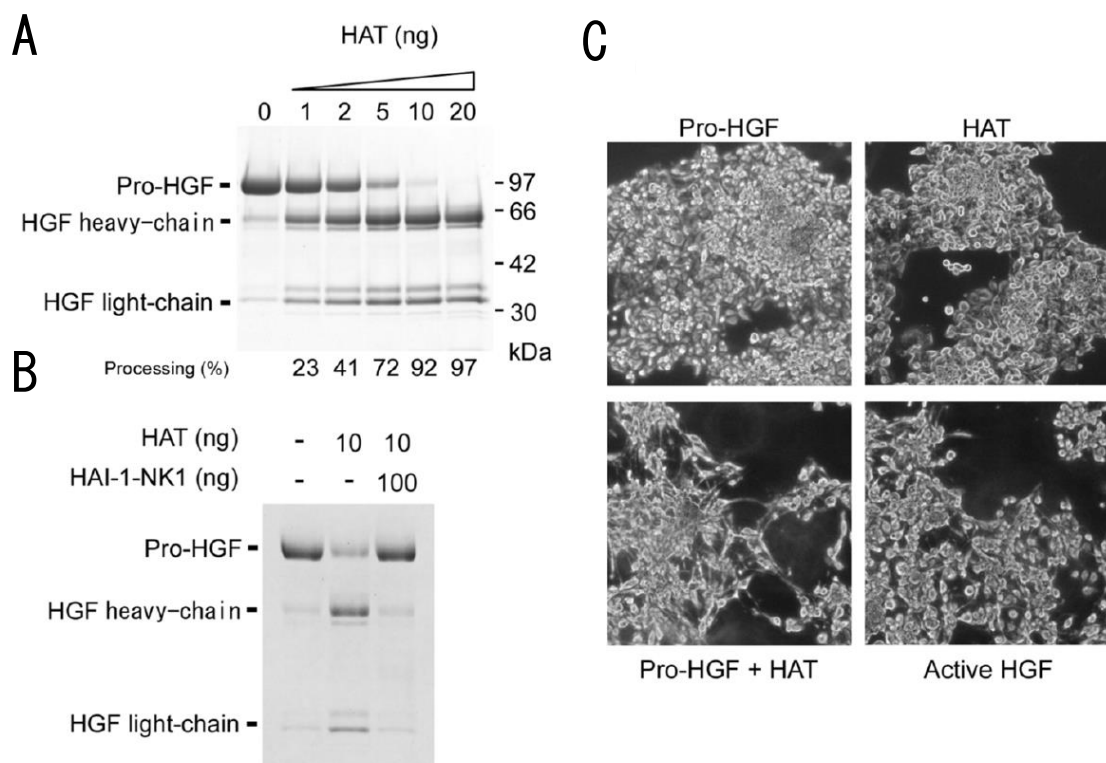


図 1-7. HAT による HGF 前駆体の活性化作用

(A) 種々濃度の HAT と 4  $\mu$ g の HGF 前駆体タンパク質 (Pro-HGF)をインキュベートした後、サンプルを還元条件下で SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 に供した。ゲル中タンパク質をクマシーブリリアントブルー染色し切断断片を検出した。HGF 前駆体タンパク質の減少率 (processing (%))を図の下部に示す。(B) HAI-1 による HAT の HGF 前駆体タンパク質切断阻害。10 ng の HAT と 100 ng の HAI-1-NK1 をインキュベートした後、4  $\mu$ g の HGF 前駆体タンパク質を加えさらにインキュベートした。(C)HepG2 細胞株を用いた HGF 生理活性評価。50 ng/mL の HGF 前駆体タンパク質,20 ng/mL の HAT, またはその両者を HepG2細胞株に作用させた。ポジティブコントロールとして 50 ng/mL の活性型 HGF (Active HGF)を作用させた。細胞は 4 日間培養し、顕微鏡下で形態を観察した。

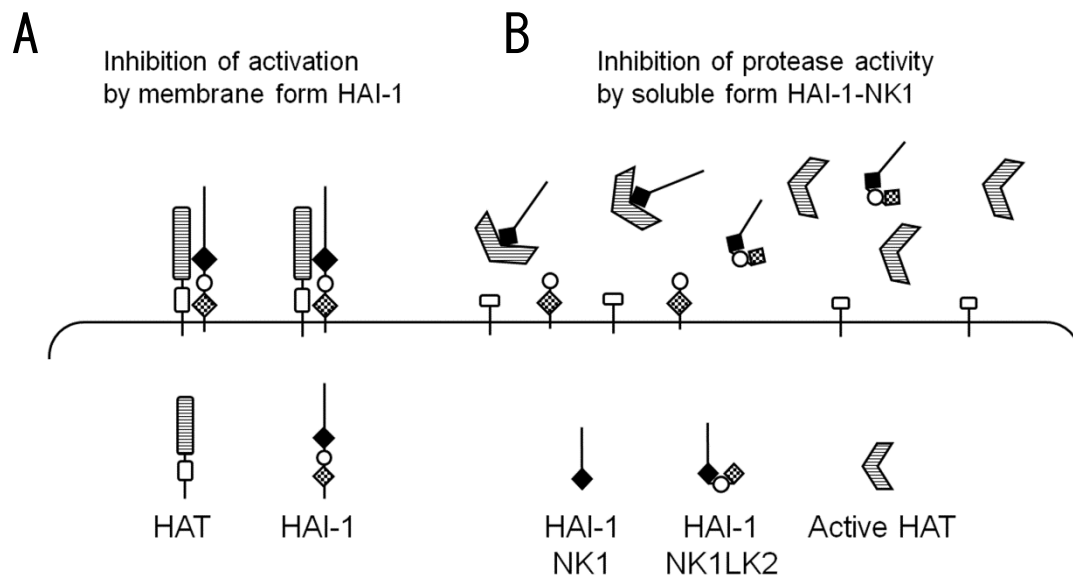


図 1-8. HAI-1 による HAT の活性化制御，および活性制御の模式図

共発現状況下では，膜結合型の全長 HAI-1 は HAT と膜上で相互作用し，活性化を抑制していると考えられる (A). HAI-1 は細胞膜外での切断によって 2 種類の可溶型 HAI-1 である NK1, NK1LK2 が生じる．遊離された HAI-1 に HAT 活性化抑制作用はないため，HAT は自己活性により活性化され細胞外へ遊離する．細胞外において，NK1 は HAT に対して強いプロテアーゼ活性阻害作用を有しており，HAT の活性を抑制するが，NK1LK2 の阻害活性は極めて弱いいため，HAT の活性は抑制されない (B).



## 第二章

*In vitro* および *in vivo* ターゲットバリデーションに有用な  
mir-187 前駆体配列を用いた siRNA 発現遺伝子の開発研究

## 要約

創薬標的分子の個体組織におけるターゲットバリデーションでは、*in vivo* での標的遺伝子ノックアウトや発現抑制による機能喪失実験が極めて有効である。本章では、RNA 干渉 (RNAi)法を応用し、ヒトマイクロ RNA の一つである mir-187 前駆体配列を利用した small interfering RNA (siRNA)発現カセットを用いた *in vitro* および *in vivo* で有効な遺伝子発現抑制手法の開発を試みた。標的遺伝子として、摂食および代謝に関連するマウス 4 型メラノコルチン受容体 (*mMc4r*) 遺伝子を選定し、その配列に対する siRNA を mir-187 配列と置換させた siRNA 発現遺伝子カセット(miR-mMC4R)を構築し、ヒト培養細胞に *mMc4r* を過剰発現させる遺伝子と共導入したところ、約 80%の特異的な遺伝子発現抑制効果を示した。この遺伝子構築を用い、トランスジェニック (tg)マウスラインを確立したところ、脳各部位において内在性 *mMc4r* mRNA の 20～30%の有意な発現抑制を認めた。また、ノザンブロット解析により導入した遺伝子由来 *mMc4r* siRNA の発現を確認した。さらに tg マウスは 9%の有意な摂餌量亢進と 30%の体重増加の表現型を有しており、高インスリン血症・膵機能変化・脂肪肝の発症・内臓脂肪の蓄積など、*mMc4r* ノックアウトマウスと同様の表現型が認められた。本ベクターは従来報告されている方法と比較し、制限酵素サイトにより合成されたヘアピンオリゴ DNA を直接的に導入出来る、他のプロモーターベクターへの移植が容易である、tg 動物を迅速に選別できる、といった利点を持つよう改良されている。また、RNAi 発現ベクターを用いた tg 法では、発現量が異なる複数の tg ラインを解析することにより、遺伝子発現量と表現型の相関を検討し得る可能性が示され、ノックアウト技術には無い本方法の利点が示唆された。これらの結果より、mir-187 前駆体配列を利用した siRNA 発現遺伝子カセットの *in vitro* および *in vivo* における遺伝子ノックダウン法が有効である事が証明され、迅速・効率的なターゲットバリデーションに有用であることが示唆された。

## 緒言

本章では創薬標的分子の *in vivo* ターゲットバリデーションを行うためにノックダウン動物を作製する手法として、RNAi ノックダウントランスジェニックマウスを作製するための迅速・効率的なベクター構築を検討し、さらにこれによって作製したノックダウンマウスの有効性について考察した。

RNAi は線虫で初めて発見された後 (Fire et al., 1998), 哺乳動物を含む広範な生物種で保存されていることが明らかとなった (McManus and Sharp, 2002), 内在性の遺伝子発現抑制機構である。哺乳動物では、細胞内に small interfering RNA (siRNA) と呼ばれる約 21 塩基長の二本鎖 RNA が存在し、これが RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれるタンパク質複合体に取り込まれ、片側の RNA 鎖と相補的な mRNA を特異的に分解することにより標的遺伝子の発現抑制、いわゆるノックダウンが起こることが知られている。したがって、標的遺伝子に対する siRNA を人為的に発現させることができれば、その遺伝子のノックダウンが可能となる。現在では siRNA の発現方法として miRNA の発現機構を利用した short hairpin RNA (shRNA) を発現させるのが一般的である。

すなわち、動物細胞においては、microRNA (miRNA) と呼ばれる 22 塩基以下の内在性低分子 RNA が存在しており (Kim, 2005), mRNA の分解、および mRNA の 3' 非翻訳領域に部分的に結合した場合には翻訳抑制を生じさせることが知られている (Zeng et al., 2003, Yekta et al., 2004). 内在性の miRNA は、長鎖の primary-miRNA (pri-miRNA) として、RNA ポリメラーゼ II (RNA pol II) 依存性プロモーターから転写された後 (Lee et al., 2004, Cai et al., 2004) 70~80 塩基のヘアピン型前駆体 (pre-miRNA) が切り出され (Han et al., 2006), エクスポーチン 5 と Ran-GTP ヘテロダイマーにより細胞質へと搬出される (Yi et al., 2003, Lund et al., 2004). 細胞質で pre-miRNA は、Dicer によって、約 22 塩基の miRNA へと切断を受け (Hutvagner et al., 2001, Ketting et al., 2001), 遺伝子発

現制御作用を発揮する (Khvorova et al., 2003, Scgwarz et al., 2003). 従ってこの機構を利用し, miRNA 配列の部分を標的遺伝子に対する siRNA に置換すれば, shRNA 発現システムを構築することが可能である.

RNAi は培養細胞系 (Harborth et al., 2001)から哺乳類の個体 (Podolska and Svoboda., 2011)においてまで, いくつもの実験系において機能的に遺伝子発現を抑制する手法として活用されてきている. RNAi を用いた遺伝子制御技術は, 以下にあげるいくつかの点において有用であると考えられる. 第一に, RNAi による発現抑制は一般的に部分的であり, 相同組換え技術 (Hermann et al., 2003)やゲノム編集技術 (Yang et al., 2014)によるノックアウトと異なり完全な機能不全を引き起こさない. このことは, 第 1 章にて論じた HAI-1 のように (Fan et al., 2005, Tanaka et al., 2005), 完全な機能不全が胎生致死を生じさせる遺伝子などの機能解析や, 低形質遺伝子機能を有する病態モデル動物作製に有用であり, ノックアウト技術を補完するといえる. 第二に, miRNA は組織特異的な発現を可能とする多種多様の RNA pol II 依存のプロモーター (Zhou et al., 2005)の制御下に置くことで, 時間特異的, 組織特異的な遺伝子発現制御を可能とする (Montes-Cobos et al., 2015). したがって, RNA pol II を用いた RNAi 効果発現戦略は, 従来の遺伝子ノックアウト技術とは別の有用性を提供することができると考えられる.

miR-187 は神経に多く含まれる miRNA であり, 腫瘍マーカーとしての報告があり有用なバイオマーカーとして注目されている (He et al., 2012). 我々は, miR-187 の前駆体配列内に, 制限酵素である *Dra*III と *Psh*AI の切断サイトが含まれていることに注目した. この制限酵素サイトを利用することで, siRNA 配列を容易に変換できる利点があると考えられる.

本実験では, 生体内での遺伝子発現抑制効果を評価するために, 標的遺伝子としてマウス 4 型メラノコルチン受容体 (*mMc4r*) 遺伝子を選択した. *mMc4r* 遺伝子は, 7 回

膜貫通型の G タンパク質共役型受容体であり、脳の中では視床下部に主要な発現が認められ、摂餌や体重調節などに関与していることが示されている (Balthasar et al., 2005). この遺伝子を標的とした理由は、*mMc4r* のホモノックアウトマウスでは摂餌量の亢進と肥満の表現系を示すことが知られている一方で、*mMc4r* ヘテロノックアウトマウスにおいては野生型マウスとホモノックアウトマウスの中間的な表現型を示すことより、表現型は遺伝子発現量に依存적であることが示されているからである (Huszar et al., 1997). さらに、*mMc4r* ノックダウンの *in vivo* 評価は体重測定を行うことで簡便に評価できることが期待され、ノックダウン効果を有するトランスジェニック個体を非侵襲的に解析することができ、モデル遺伝子として適切であると考えられる.

なお、*mir-187* 前駆体配列を利用した shRNA 発現コンストラクトの有用性を評価することを第一目的とする今回の実験においては、時間特異的、組織特異的な遺伝子発現制御は考慮しないこととし、プロモーターとして、非特異的に過剰発現させることが可能な CAG プロモーターを使用することとした (Niwa et al., 1991).

## 材料及び方法

### ヒト mir-187 遺伝子のクローニング

HeLa 細胞のゲノム DNA を鋳型として、下記プライマーを用いて 5'および 3'隣接領域およびループ配列を含むヒト mir-187 遺伝子をクローニングした。

5'-CGCGGATCCATCGGGATGCACAGCAAGT-3'

5'-GCTCTAGACCCACCAGAGCCTGGACTTTC-3'

ヒト mir-187 遺伝子は *Dra*III と *Psh*AI サイトを有しており、このサイトを利用して任意のヘアピンオリゴ DNA を導入することが可能である。ヒト mir-187 遺伝子に任意のヘアピンオリゴ配列を導入したものを図 2-1 A に示す。このヘアピンオリゴ配列には 21 塩基対の siRNA 配列 (N で示す) と、17 塩基対の mir-30 のループ配列 (Fellmann et al., 2013) が挿入されている。ヘアピンオリゴ配列は *Dra*III サイトから *Psh*AI サイトまでの約 90 塩基対の相補的な 2 本のオリゴヌクレオチド鎖を *in vitro* 合成し、アニーリングさせ作製した。

### *In vitro* ノックダウン検証用ベクターの構築

ヒト mir-187 をベースとした shRNA のノックダウン効果を検証する目的で、*Bam*HI と *Xba*I で切り出される mir-187 カセット (図 2-1A) を pCAG ベクターのプロモーター下流に導入したベクターを構築した (pCAG-miR-187 : 図 2-1 B)。本実験では siRNA 配列として m*Mc4r* 遺伝子に対する下記の配列を含むヘアピンオリゴ DNA (miR-mMC4R) を合成し、pCAG-miR-187 の *Dra*III/*Psh*AI サイトに導入したベクターを構築した (pCAG-miR-mMC4R)。

mMC4R: 5'-GGATGCTATGAGCAACTTTTT-3'

また、コントロール shRNA 配列として、下記に示すホタルルシフェラーゼ遺伝子に対する siRNA 配列を含むヘアピンオリゴ DNA を合成し、同様に pCAG-miR-187 の *Dra*III/*Psh*AI サイトに導入したベクターを構築した (pCAG-miR-Luc)。

ホタルルシフェラーゼ: 5'-GATTTCGAGTCGTCTTAATGT-3'

siRNA 配列の設計はいずれもデザインアルゴリズム (Ui-Tei et al., 2004, Naito et al., 2004)を用いて行った.

上記の *mMc4r* 遺伝子発現に対する検証用ベクターのノックダウン効率の検証は、トランスフェクション効率による影響を最小限とするために、内在的に *mMc4r* 遺伝子を発現していないヒト細胞株であるヒト胎児腎臓由来 293 (HEK293)細胞に、*mMc4r* 遺伝子発現ベクターと本ノックダウン検証用ベクターの共導入によって行った. そのため、*mMc4r* 遺伝子を過剰発現するベクターを構築した. *mMc4r* (NM\_016977)のタンパク質コード領域を下記プライマーを用いた PCR によりクローニングし、pcDNA3.1-mycHis-A (invitrogen)に導入した (pcDNA3.1-mMC4R).

*mMc4r*-FW: 5'-ACCATGAACTCCACCCACCACCATG-3'

*mMc4r*-RV: 5'-TTAATACCTGCTAGACAACTCACAG-3'

#### *In vivo/in vitro* ノックダウン用ベクターの構築

*In vitro* および *in vivo* において導入・発現細胞を EGFP 蛍光で可視化・同定すること、また *in vitro* で blasticidin を用いた薬剤選択により安定発現細胞を取得することを目的とし、pEF1-alpha (631991, Takara)に EGFP 遺伝子を導入したプラスミドから EF1-alpha/EGFP 発現カセットを、pRS shRNA vector (TR20003, Origene: Rockville, MD, USA)から、SV40/blasticidin 発現カセットをそれぞれ PCR で増幅させた遺伝子断片を pCAG-miR-187 ベクター (図 2-1B) に連結し、pGKD-miR-187 ベクターとした (図 2-1 C). 本ベクターの *DraIII/PshAI* サイトに、上述のヘアピンオリゴ DNA (miR-mMC4R)を挿入したベクターを tg 作製ベクター (pGKD-miR-mMC4R)とした.

### In vitro ノックダウン検証

HEK293 細胞を用いたノックダウン検証は以下の通り行った。トランスフェクション前日に HEK293 細胞株をコラーゲン type I コートの 6 ウェルプレート (IWAKI)に、約 70%コンフルエントになるよう播種し、10% FBS を加えた DMEM (Thermo Scientific; Logan, UT)培地を用いて培養した。pcDNA3.1- mMC4R と共に pCAG-miR-mMC4R、またはコントロールベクターである pCAG-miR-Luc または miR-187 カセットを含まない pCAG 空ベクターをプラスミド重量比 5:1 になるように Lipofectamine (18324012, invitrogen)および Plus 試薬 (11514015, invitrogen)を用いて、試薬に添付されているプロトコルに従いトランスフェクトした。共導入後 1 日目に細胞から抽出した全 RNA を鋳型として、後述する RT-qPCR 法により *mMc4r* 遺伝子発現の定量を行った。

### Tg 動物の作製・同定

Tg マウスの作製は、Hogan ら (1994)の定法に従って、pGKD-miR-mMC4R を *SalI* により直鎖状にした後に精製した遺伝子 (GKD-miR-mMC4R)を、C57BL/6J の受精卵前核へ顕微注入することにより行った。なお、本章の tg 作製は旧三菱化学生命科学研究所・生殖工学開発室に依頼した。Tg マウスの同定は切断された尾断片 (~5 mm)からプロテアーゼ K 処理およびフェノール/クロロホルム抽出後にエタノール沈殿して精製したゲノム DNA を用いたサザンブロット解析法により行った。サザンブロット解析は、ゲノム DNA を *NcoI* で制限酵素処理し、図 2-1C に示す EGFP 遺伝子断片を <sup>32</sup>P で標識したプローブを用い常法の通り行った。Tg マウスと判定された動物は、C57BL/6J と交配させることで F1 マウスを得た。全ての実験動物を用いる操作は、NIH のガイドラインに準拠した三菱化学生命科学研究所の動物倫理委員会の承認のもとに行った。



## RNA 抽出および RT-qPCR

Tg マウスの細胞および各組織からの全 RNA 抽出と低分子量 RNA 抽出は、それぞれ TRIzol (15596026, Invitrogen) と mirVana miRNA Isolation kit (AM1560, Ambion; Austin, TX, USA) を用いてキットに添付のプロトコルに従って行った。cDNA は SSII superscript reverse transcriptase (18064014, Invitrogen) とオリゴ dT プライマーを用いて試薬に添付のプロトコルに従って逆転写することにより取得した。各サンプルにおける *mMc4r* および内部標準として  $\beta$ -actin の qPCR は SYBR premix ExTaqII reagent (RR820Q, TaKaRa; Kyoto, Japan) を用い、下記に示すプライマーを用いて行った。PCR 増幅産物を精製し希釈した検量線から相対的発現量を算出した。

MC4R-F, 5'-CGCCAGGGTACCAACATGAAG-3'

MC4R-R, 5'-ACATGAAGCACACGCAGTATGG-3'

$\beta$ -actin-F, 5'-GGCCAACCGTGAAAAGATGA-3'

$\beta$ -actin-R, 5'-CACAGCCTGGATGGCTACGTA-3'

*In vitro* ノックダウン検証のために HEK293 細胞から抽出した RNA の定量にはヒト *GAPDH* 遺伝子を内部標準として使用し、プライマーセットはタカラバイオから購入した。

## miR-miMC4R の発現解析

miR-miMC4R の発現は、Dicer によって siRNA にプロセスされる前の mir-187 前駆体配列を含む RNA の半定量 RT-PCR 法による解析、および Dicer によってプロセスされた siRNA のノザンプロット解析により行った。

半定量 RT-PCR では組織から抽出された全 RNA を SSIII superscript reverse transcriptase (18080044, Invitrogen) とオリゴ dT プライマーを用いて逆転写し得られた cDNA を用

い, miR-miMC4R 前駆体と内部標準としてマウス *Gapdh* 遺伝子の PCR を, 下記プライマーを用いて行った.

miR-miMC4R 前駆体

3-MC4R-FW, 5'-TGTGAAGCCACAGATGGAAAAAG-3'

3-miR187-RV2, 5'-TCTGATAGGCAGCCTGCACC-3'

マウス *Gapdh*

mGAPDH-FW, 5'-CAAATTCAACGGCACAGTCAAG-3'

mGAPDH-RV, 5'-CCTCACCCCATTTGATGTTAGTG-3'

PCR は下記条件で行った.

94°C 5 min

(94°C 30 sec - 60°C 30 sec- 72°C 30 sec) x 28~32 cycles (miR-mMC4R),または x 15~19

cycles (GAPDH)

PCR 産物は 2% アガロースゲルを用いて電気泳動し, エチジウムブロマイドで染色した後, UV トランスイルミネーターで可視化した. ノザンブロット解析には RT-qPCR の項目に記した方法で取得した低分子量 RNA を 15%尿素-TBE ポリアクリルアミドゲルにより変性条件下で電気泳動し, キャピラリー法によって Hybond N+ (RPN2020B, GE healthcare; Uppsala, Sweden)に転写した. メンブレンを 70,000  $\mu\text{J}/\text{cm}^2$  でクロスリンクし, siRNA の検出には Digoxigenin (DIG) system (12039672910, Roche; Indianapolis, IN)を用いた. プローブは下記に示すオリゴ DNA を鋳型に, mirVana miRNA probe construction kit (AM1550, Ambion)を用いて DIG 標識した RNA を用いた.

miR-mMC4R sense probe (siRNA guide strand 検出用):

5'-AAAAAGTTGCTCATAGCATCCCCTGTCTC-3'

DIG-easy Hyb (11603558001, Roche) を用いたハイブリダイゼーション (室温, O/N) を行った後, 0.1x SSC, 0.1% SDS, 37°C で 15 分間, 2 回洗浄し, DIG Luminescent

Detection Kit (11363514910, Roche)を用い、付属するプロトコルに従い、抗 DIG-AP 抗体を用いた検出を行った。mMc4r の siRNA 検出後、脱プローブを行い、内部標準として、キットに付属する miR-16 probe template を用いて作製した DIG ラベル RNA プローブを用いて同様にノザンブロット解析を行った。脱プローブは、0.1% SDS , 68°C で振とうしながら 30 分間インキュベートすることにより行い、2x SSC で洗浄後、再度メンブレンを miR-16 プローブを用いたハイブリダイゼーションに使用した。

### Tg 動物の表現型解析

#### <体重・摂餌量測定>

F2 世代以降の動物は原則 2 匹/ケージにて飼育し、闘争による脱毛などのストレスが認められた場合、個別飼育とした。体重は毎週 1 回測定した。摂餌量測定は 8~9 ヶ月齢の動物を対象とし、個別飼育にして 1 週間馴化させ、9 日間の給餌器重量の減少を測定することによって実施した。給餌器外に持ち出された飼料も測定し、(day0 における給餌器総重量) - (day9 における給餌器総重量) + (給餌器外飼料重量) を 9 日間の摂餌量とした。

#### <経口ブドウ糖負荷テスト (OGTT)>

動物を一晩絶食させた後、1 mg/kg でグルコースを腹腔内投与した。血液サンプルは尾より 0, 30, 60, 90, および 120 分後に採取し、血漿中のグルコース濃度をグルコース CII-テストワコー (432-90913, Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)を用い測定した。

#### <各種血清パラメーターおよび臓器重量の測定>

動物は採材の 4 時間前に絶食させ、全血および種々臓器を摘出、臓器重量は精密天秤を用いて測定した。また血清中の生化学的パラメーターは下記試薬を用い、キットに添付のプロトコルに従い測定した。

血中グルコース：グルコース CII-テストワコー (432-90913, Wako)

インスリン：マウスインスリン測定キット (MS303, Morinaga Institute of Biologic Science, Yokohama, Japan)

トリグリセライド：トリグリセライド E-テストワコー (432-40201, Wako)

遊離脂肪酸：NEFA C-テストワコー (279-75401, Wako)

レプチン：マウス/ラットレプチン測定キット (MS333, Morinaga Institute of Biologic Science)

#### 統計解析

統計解析は、対応のない両側 Student's t 検定により行った。

## 結果

### mir-187 前駆体配列を用いた siRNA 発現遺伝子の *in vitro* における遺伝子ノックダウン効率検討

まず、pCAG-miR-mMC4R 遺伝子の *in vitro* 遺伝子ノックダウン効率を、HEK293 細胞株を用いて検討した。その結果、pCAG 空ベクターを導入したコントロールに比べ、pCAG-miR-mMC4R 遺伝子ベクターを共導入した場合、一過性の *mMc4r* RNA 発現を約 80%抑制することが明らかとなった。一方、pCAG-miR-Luc 発現ベクターの共導入では pCAG 空ベクターを導入したコントロールと発現量が等しく遺伝子発現抑制効果はまったく認められなかった (図 2-2)。これらの結果より pCAG-miR-187 発現カセットは、*in vitro* において特異的で効果的な RNAi を誘導させることが明らかとなった。

### GKD-miR-mMC4R tg マウスの作製

次に、*SaII* を用いて直鎖状にした GKD-miR-mMC4R 遺伝子を C57BL/6J の受精卵前核に顕微注入することで 4 匹の tg マウスを作製した (図 2-3A)。

これら F0 マウスの中で、雄 tg マウスの 10L において著明な体重増加の表現型が認められた (図 2-3B)。また、4 匹の tg マウスの視床下部から抽出された RNA を用いて miR-mMC4R 前駆体および *Gapdh* の RNA 発現を半定量 RT-PCR で解析したところ、10L において最も高い miR-mMC4R 前駆体の発現が認められた (図 2-4)。これらの結果より、10L で観察された体重増加の表現型は、miR-mMC4R の高い発現によって生じている可能性が示唆された。

また、10L を繁殖して得られた tg および野生型雄マウスの体重を 6 週齢から 31 週齢の間で測定したところ、11 週目から有意な体重増加が認められ、31 週の時点では野生型マウスと比較して 30%の体重増加が認められた (図 2-5)。

#### GKD-miR-mMC4R tg マウスにおける RNA 発現解析

次に、10L を繁殖して得られた tg マウスの視床下部・線条体・海馬・前頭前野から全 RNA と低分子量 RNA を取得し、低分子量 RNA ノザンブロット解析および RT-qPCR 解析を実施した。m*Mc4r* 遺伝子に対する siRNA のガイド鎖 RNA を検出するセンス鎖 RNA プローブを用いたところ、tg マウスにおいてこれら全ての部位でガイド鎖 RNA の発現が認められた (図 2-6A)。また、全 RNA を鋳型として用いた RT-qPCR では、tg マウスのすべての部位において 20~30% の有意な m*Mc4r* RNA の発現抑制が認められた (図 2-6B)。従って、GKD-miR-MC4R tg マウスの脳内において発現した siRNA が、内在性 m*Mc4r* RNA の発現を部分的に抑制していることが示唆された。

#### GKD-miR-mMC4R tg F2 マウスの摂餌量および肥満関連表現型の解析

さらに tg マウスにおける過剰摂食行動について上記で取得した tg および野生型マウスを用いて検討を行った。37 週齢~41 週齢マウスの 9 日間の摂餌量を測定したところ、tg マウスにおいて 9% の有意な摂餌量増加が認められた (表 2-1)。

次に、体重増加の表現型をさらに検証する目的で、肥満・糖尿病に関する解析を実施した。絶食時における血液生化学パラメーターを測定した結果、血中インスリン量は約 6 倍、レプチン量は 2.5 倍の有意な増加を認めた。肝重量は 1.6 倍、肝 TG 値は 1.4 倍の有意な増加を認めた。膵インスリン量は 3.5 倍、膵重量は 1.1 倍の有意な増加を認めた。さらに腸間膜脂肪重量は 1.7 倍の有意な増加を認めた。一方、血中グルコース・トリグリセライド・遊離脂肪酸・コレステロール値に有意な変化は認められなかった (表 2-1)。

さらに tg マウスにおける耐糖能変化を検討するために OGTT 試験を実施したところ、AUC<sub>0-2h</sub> では有意差が認められなかったが耐糖能の低下傾向が認められた (図 2-7)。

以上の結果より，GKD-miR-mMC4R tg マウスでは，摂餌量の亢進，および，高インスリン血症，血中レプチン値の亢進，膵機能異常，腸間膜脂肪の蓄積と脂肪肝を伴う肥満症を発症していることが明らかとなった．

## 考察

本章では mir-187 前駆体配列を用いた RNAi 発現ベクターの有効性を *in vitro* および *in vivo* において証明すると共に、*in vivo* ターゲットバリデーションにおけるノックダウンマウスの有効性について検討した。最初に、本方法が miRNA 配列を利用したノックダウンベクター開発に関する過去の報告 (Yue et al., 2010, Chung et al., 2006) と比較した優位点について考察したい。mir-187 は、前駆体配列内に *PshAI* と *DraIII* の制限酵素サイトを有しているため、合成されたヘアピンオリゴを直接的に導入出来るという利点を有する。Yue ら (2010) の方法では、mir-21 配列を活用した約 100 bp のオリゴヌクレオチドを鋳型に、制限酵素配列を付加した約 50 bp のプライマーを用いた PCR で shRNA 配列を増幅後、PCR 産物を精製した後に制限酵素処理してクローニングしているため本方法と比較して 3 段階の追加操作が必要となる。また、Chung ら (2006) の方法では、non-coding RNA である BIC に含まれる mir-155 前駆体配列を活用し、約 64 塩基対の合成オリゴヌクレオチドを直接的にクローニングする点で本方法と類似している。しかしながら現在までに *in vivo* で有効性を示した報告はなされていない。これらと比較し、操作段階が少なく *in vivo* での有効性が確認された本章の方法は、ハイスループットな siRNA 発現ライブラリー構築を可能とし、*in vitro* では迅速・効率的なターゲット遺伝子スクリーニングやターゲットバリデーションに、*in vivo* では迅速・効率的なノックダウン動物の作製に多大な寄与があるものと考えられる。さらに、本方法により作製された mir-187 前駆体カセットは、*XbaI/BamHI* を用いることで容易に切り出すことができ、他のプロモーターベクターへの移植も容易である。この利点も、miRNA 配列を利用した過去の報告 (Yue et al., 2010, Chung et al., 2006) と異なる点であり、本方法が柔軟性においてより優れていると考えられる。

過去の報告において、*mMc4r* のヘテロノックアウトマウスで約 25%、ホモノックアウトマウスでは 50% の体重増加が 15 週齢で認められている (Huszar et al., 1997)。一



方、本実験において約 20~30%の *mMc4r* RNA 発現抑制が認められた *miR-mMC4R* tg マウスでは、15 週齢で約 15%の体重増加が認められた (図 2-5)。さらに、*mMc4r* ホモノックアウトにおける摂餌量亢進は、野生型マウスに比べて約 40%であったのに対し (Huszar et al., 1997), *miR-mMC4R* tg マウスでは約 9%の摂餌量増加であった (表 2-1)。このことから *mMc4r* の遺伝子発現低下量と、体重増加および摂餌量亢進はよく相関しており、*in vivo* ターゲットバリデーションにおけるノックダウンマウスの有用性を表しているものと考えられる。すなわち、従来の低分子医療に加え抗体医薬や核酸医薬などの新たな高分子医薬と呼ばれる医薬品においても、そのターゲットを完全に抑制するのではなく、部分的に抑制するのが現実的であり、どの程度抑制すればどの程度の効果が発揮されるのかといった相関を得ることもターゲットバリデーションの重要なポイントとなる。今回の RNAi 発現ベクターを用いた tg 法は、同じ遺伝子構築を用いて tg マウスを作製した場合でも、導入された遺伝子のコピー数や位置により tg ラインによって発現が異なるため (図 2-4)、複数の tg ラインを解析することにより遺伝子発現量と表現型の相関を検討することが可能となる。このことはワイルド・ヘテロ・ホモの 3 表現型しか得られないノックアウト技術と異なる点であり、RNAi 法と tg 法を組み合わせることで応用した本方法の利点と考えられる。一方で、tg ラインによって発現が異なる点では有用な tg の選抜という労力が必要となる場合もある。その欠点を補うためには、今後 Crispr/Cas9 システムなどの遺伝子編集技術と併用し、*Rosa26* など周辺領域による発現調節を受けにくいゲノム領域に特定数の RNAi 発現ベクターをノックイン導入し、組織特異性・発現量など導入遺伝子プロモーターの本来の発現特性が発揮されるように工夫することでより有用な技術となりうる事が考えられる。

*miR-mMC4R* 発現遺伝子は、哺乳類細胞培養系においては約 80%の遺伝子発現抑制効果を有するのに対し (図 2-2)、本 tg マウスにおける遺伝子発現抑制効果は約 20~30%と、限定される結果であった (図 2-6B)。この *in vitro* と *in vivo* で認められる

遺伝子発現抑制効果の乖離に関しては従来から指摘されている点であり、siRNA 発現量がトランスジェニックマウス脳内において十分な発現抑制効果を発揮するには足りなかったためと考えられる。ノザンブロット解析において、線条体では 6  $\mu$ g の低分子量 RNA 中に約 1 ng の siRNA が検出されている (図 2-6A)。6  $\mu$ g の低分子量 RNA は約 80 mg の組織から抽出された (data not shown)。すなわち、1 ng siRNA が 80 mg の組織中に存在する計算となり、モル濃度に換算すると siRNA の濃度は 1 nM 以下となり、十分な遺伝子発現抑制効果を発揮するためには濃度が低すぎたことが裏付けられる。この原因の一つとして、CAG プロモーターから発現される大量の shRNA が、核内から pre-miRNA を搬出する律速因子であるエクスポートイン 5 を飽和させた可能性が考えられる (Grimm et al., 2006)。高発現の shRNA は内在性の miRNA 機能を阻害し、正常な胚発生を阻害することが報告されている (Wang et al., 2007)。そのため、miR-mMC4R の発現が低い tg マウスのみが生き残って出生した可能性も考えられる。この問題を克服するためには、誘導型発現プロモーターや、組織・時期特異的発現プロモーターのような RNA pol II プロモーターを用いることによって致死性を回避することが有用な手段になると考えられる。

miR-mMC4R tg マウスでは、m*Mc4r* ノックアウトマウスと同様、高インスリン血症 (Albarado et al., 2004)・脂肪肝 (Sutton et al., 2004)を伴う肥満症と摂餌量の増加が認められた (表 2-1) が、血糖値は野生型マウスと比較して変化が認められなかった。過去の報告において、m*Mc4r* ホモノックアウトマウスは血中グルコースおよび血中インスリン値に変化が認められない時期において既にヘテロノックアウトマウスおよび野生型マウスと比べて体重が増加していることが知られている (Albarado et al., 2004)。しかし最終的には高血糖症および高インスリン血症を発症しており (Huszar et al., 1997), miR-mMC4R tg マウスの結果はこれとは異なっていた。最近、m*Mc4r* ノックアウトマウスの視床下部外側部 (LHA)に m*Mc4r* 遺伝子を発現させた報告では、グルコース代

謝の改善が認められる一方、体重増加や血中インスリン濃度には影響を及ぼさないことが示された (Morgan et al., 2015). このことは肥満・インスリン代謝調節作用と、グルコース代謝調節作用は MC4R によって領域別に調節されており、20%~30%の部分的な発現抑制では MC4R の LHA 経路に影響を及ぼさないため miR-mMC4R tg マウスではグルコース代謝に顕著な変化を認めなかった可能性が考えられる. このことは部分的なノックダウンが *in vivo* において、遺伝子発現レベルと特異的な表現型との関連を評価する非常に強力なツールであることを示唆しており、今回の RNAi 発現ベクターを用いた tg 法の利点の一つと捉えることができる.

以上、本章において、筆者は mir-187 前駆体配列を用いた新しい siRNA 発現カセットを開発した. この発現カセットを用いた部分的な遺伝子発現抑制によって、ノックアウト技術では得られない貴重な情報が得られることが期待できる. 従って、本研究は、*in vitro*, *in vivo* における創薬標的分子のバリデーション研究や遺伝子機能不全をもたらされた動物モデルの作製研究に大きな貢献をもたらすものと考えられる. 第 1 章で論じた HAI-1 に関して本方法を応用し、肺上皮細胞特異的なプロモーター下流にマウス *Hai-1* siRNA を発現するカセットを連結して tg マウスを作製することで、*in vivo* ターゲットバリデーションを行うことが可能であると考えられる.

なお、本研究では、体重調節に関連する *mMc4r* 遺伝子を標的としたことで、F0 マウスにおいてノックダウン動物を効率よく同定することが可能であった. しかしながら、一般的に *in vivo* ターゲットバリデーションを必要とする遺伝子は、*in vivo* における機能がよくわかっていない遺伝子であり、その機能変化による表現型も不明であることが多い. Tg 動物を用いた多くの遺伝子の *in vivo* ターゲットバリデーションを効率的に行うためには、有用な tg 動物を迅速・簡便に同定し、ライン化して詳細な機能解析を行うことが必要である. よって第 3 章において、tg 胚の迅速・簡便な同定法を開発し、tg 動物を用いた *in vivo* ターゲットバリデーションの効率化を試みた.

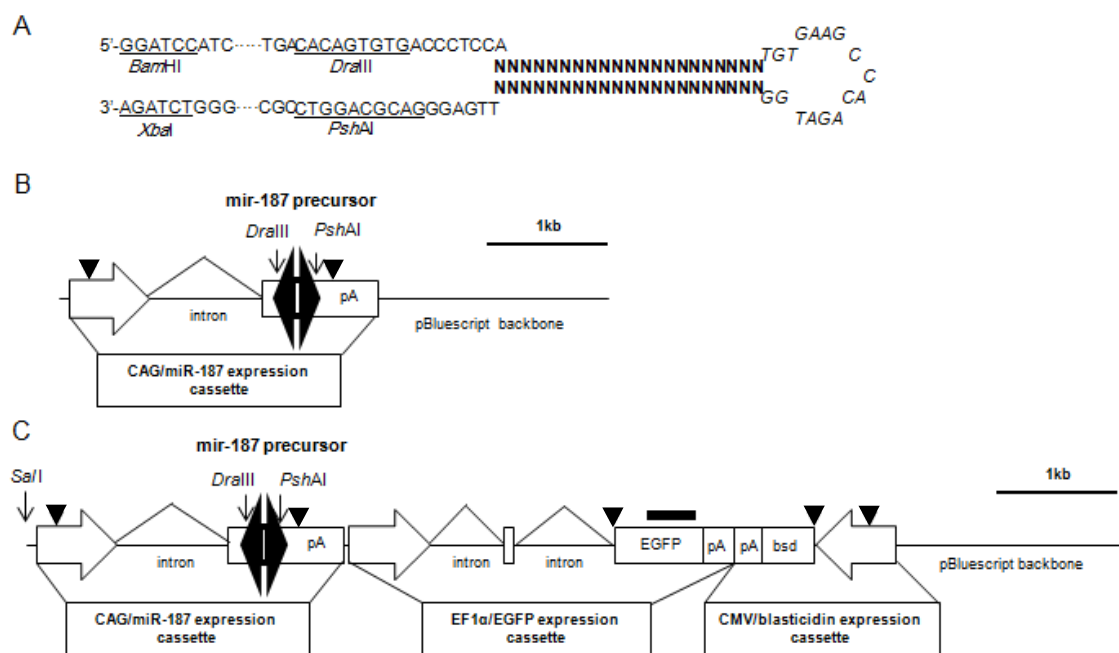
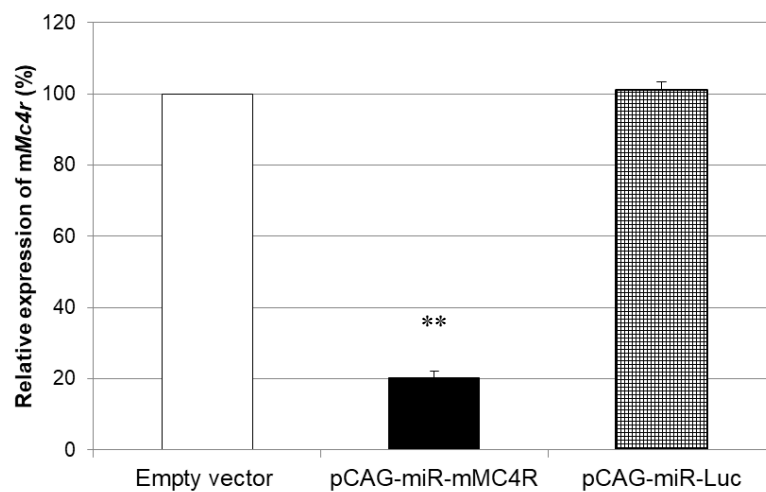


図 2-1. siRNA 発現遺伝子の模式図

A: mir-187 前駆体を基とする siRNA 発現カセット。イタリック：mir-30 由来ループ配列，太字：siRNA 配列

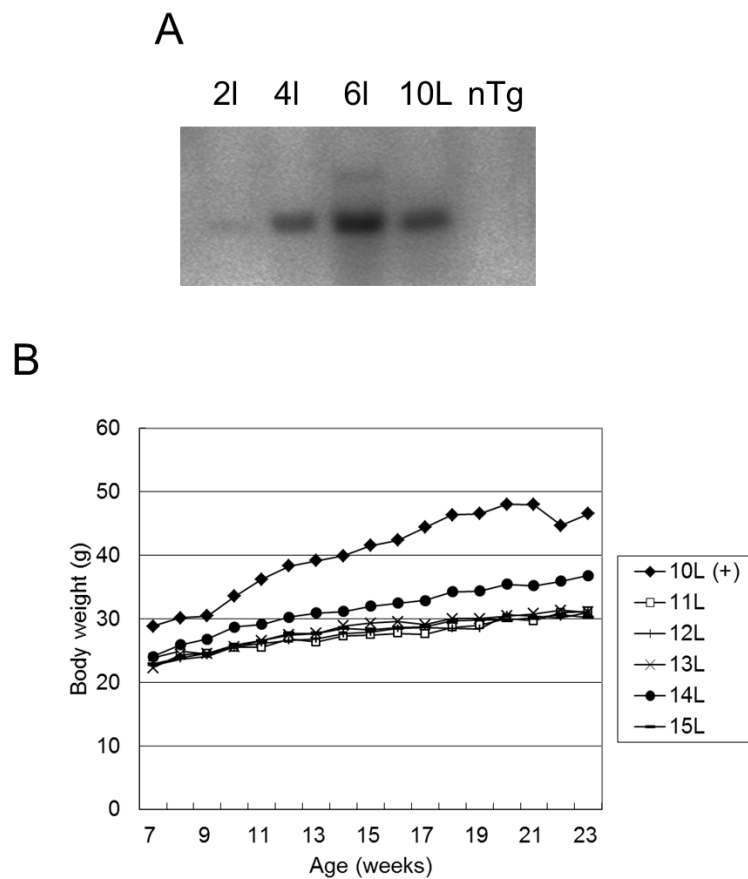
B: pCAG-miR-187 遺伝子構築。矢印：shRNA クローニングサイト (*Dra*III, *Psh*AI 認識配列)，矢頭：*Nco*I 認識配列 (サザンブロット解析で使用)

C: pGKD-miR-187 遺伝子構築。矢頭：*Nco*I 認識配列，太線：tg マウス同定に用いたプローブ



**図 2-2. マウス MC4R 遺伝子を過剰発現させた HEK293 細胞における pCAG-miR-mMC4R 遺伝子のノックダウン効率**

HEK293 細胞に、pcDNA3.1-mMC4R および siRNA 配列を含まない pCAG-miR187 empty vector, pCAG-miR-mMC4R, または pCAG-miR-Luc を共導入し、1 日後に全 RNA を回収、RT-qPCR により *mMc4r* とヒト *GAPDH* 遺伝子の発現を解析した。値は 3 回の独立した実験の平均値+標準誤差を示す。\*\*:  $p < 0.01$  (t-test)

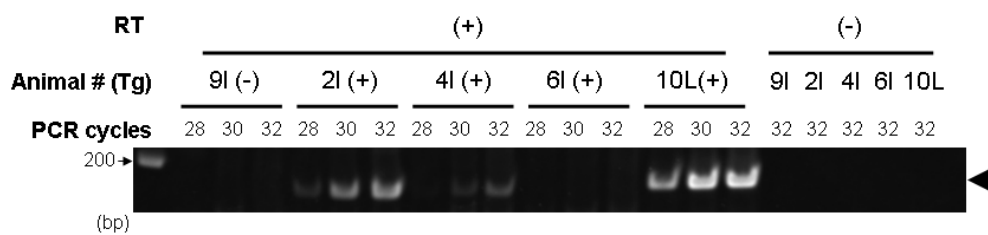


**図 2-3. GKD-miR-mMC4R ファウンダーtg マウスの同定**

A: GKD-miR-mMC4R ファウンダーtg マウスのサザンブロット解析. 雌 9 匹中 3 匹 (2l, 4l, 6l), 雄 6 匹中 1 匹(10L)が tg マウスとして同定された. nTg: 野生型マウス

B: 雄ファウンダーマウスの体重推移. 10L: tg マウス, 11L-15L: 野生型マウス

### A : miR-MC4R precursor



### B : GAPDH

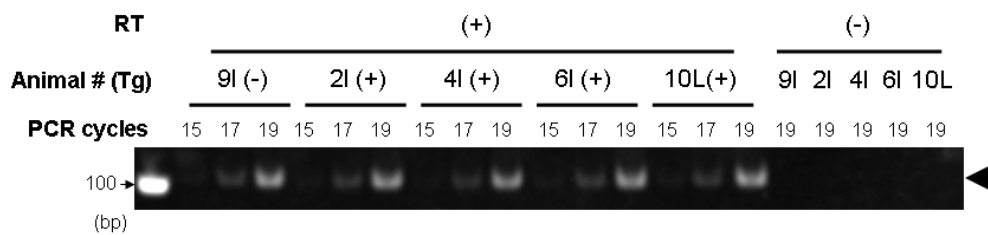


図 2-4. GKD-miR-mMC4R ファウンダーマウスにおける miR-MC4R 前駆体 RNA 発現

GKD-miR-mMC4R ファウンダー-tg マウスにおける，半定量 PCR 法を用いた miR-mMC4R 前駆体 RNA(A)およびマウス *Gapdh* RNA(B)の発現解析

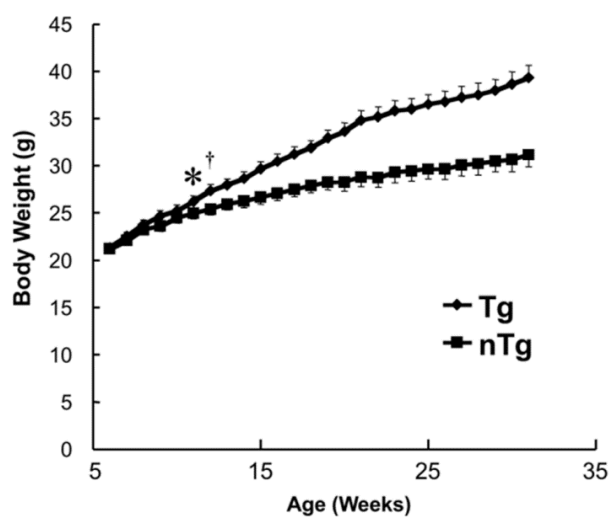


図 2-5. GKD-miR-mMC4R tg マウスライン(10L)における体重推移

Tg マウス(n=9)および野生型マウス(nTg: n=15)間で統計的に有意な体重差が生じた最初の週を \* ( $p<0.05$ )および † ( $p<0.01$ )で示す.

エラーバーは標準誤差を示す.



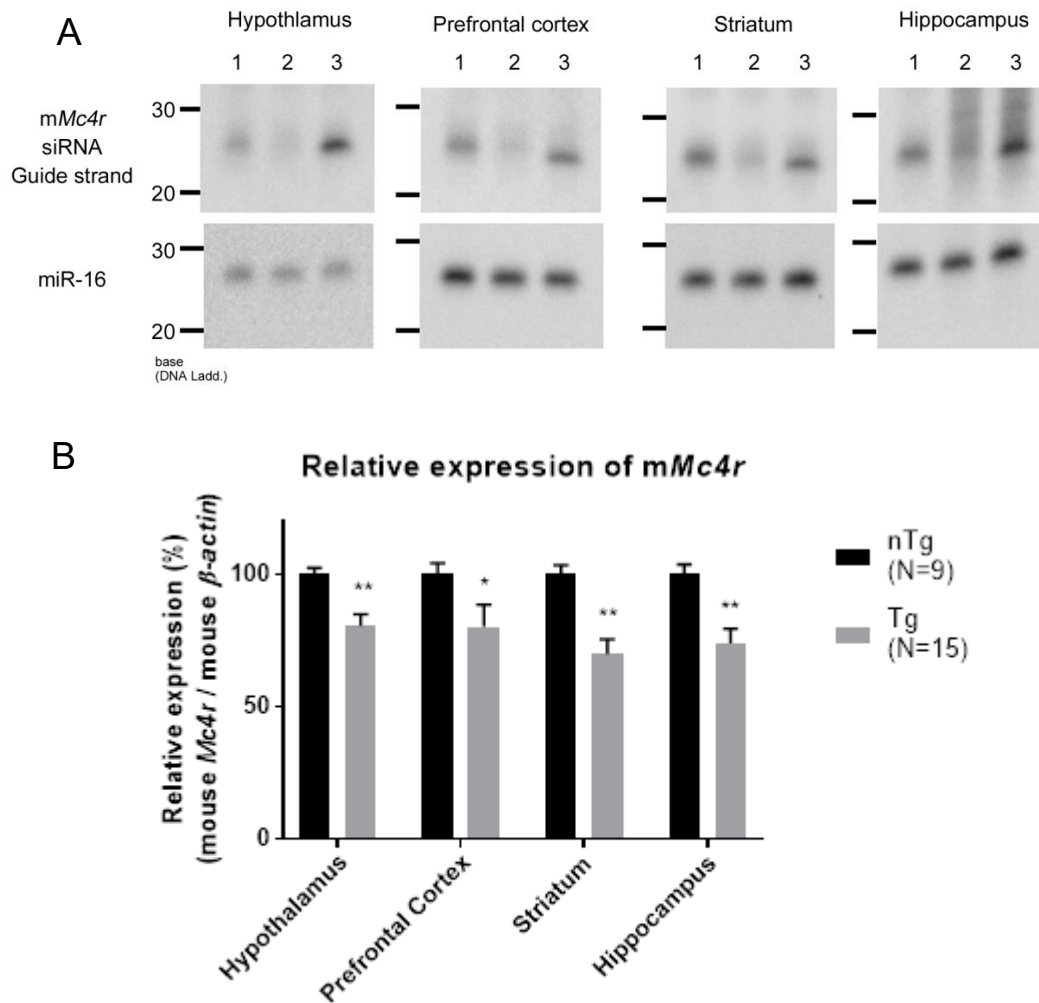


図 2-6. GKD-miR-mMC4R マウスにおける RNA 発現解析

miR-mMC4R tg マウスの種々脳領域（視床下部：Hypothalamus, 前頭前野：Prefrontal cortex, 線条体：Striatum, 海馬：Hippocampus）における, mMc4r siRNA のガイド鎖 RNA (A), および mMc4r 遺伝子 (B) の発現を解析した.

A; 前頭前野, 線条体, 海馬は 6  $\mu$ g, 視床下部は 2  $\mu$ g の低分子 RNA を用いノザンブロット解析に供した. 内部標準として miR-16 の発現を用いた. 1: miR-mMC4R tg マウス, 2: 野生型マウス, 3: 野生型マウス低分子 RNA + 1 ng 合成 siRNA(mMc4r)

B; 種々脳領域から抽出した全 RNA を用いて, mMc4r および内部標準として  $\beta$ -actin 遺伝子の発現を定量 PCR により解析した. \*,  $p < 0.05$ , \*\*,  $p < 0.01$  (t-test)

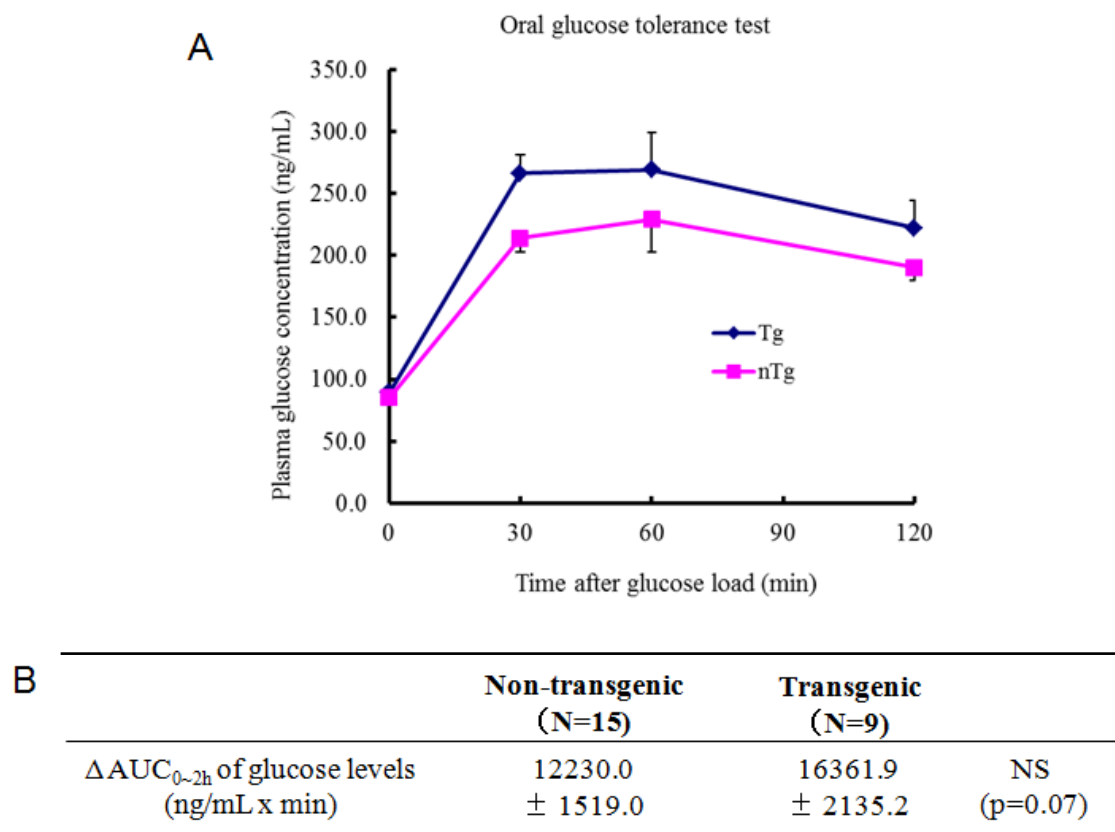


図 2-7. 経口ブドウ糖負荷テスト

A; 前日から絶食させたマウスに対し、ブドウ糖を経口投与 (1 g/kg 体重)し、血中グルコース濃度を経時的 (0, 30, 60, 120 分後)に測定した。血中グルコース濃度の測定はグルコース CII-テストワコー (Wako)を用いて行った。

B; 血中グルコースの推移グラフ (A)から  $\Delta AUC_{0\sim 2\text{ hr}}$  を算出した結果を示す。平均値 $\pm$ 標準偏差, NS; not-significant (t-test)

表 2-1. GKD-miR-mMC4Rtg マウスライン (10L)における摂餌量, 組織重および血清  
中・組織中生化学パラメーター

	non-tg (n=9)	Tg (n=15)	
<b>Food consumption</b>			
Total food intake for 9 days (g)	35.6±3.4	38.4 ± 3.3	*
<b>Serum</b>			
Glucose (mg/dl)	85.12 ± 3.20	89.12 ± 3.76	NS
Triglyceride (mg/dl)	71.8 ± 1.8	73.6 ± 3.6	NS
Insulin (ng/ml)	3.2±0.3	20.0 ± 6.7	*
Free fatty acid (uEq/l)	1369.3 ± 44.4	1483.4 ± 98.0	NS
Total cholesterol (mg/dl)	181.9 ± 10.8	199.4 ± 11.6	NS
Leptin (ng/ml)	19.8 ± 2.9	50.8 ± 15.7	*
<b>Pancreas</b>			
Insulin (ng/ml/g tissue)	58387.2 ± 3246.2	203192.5 ± 28998.7	**
Tissue weight (g)	0.372 ± 0.013	0.399 ± 0.016	*
<b>Liver</b>			
Triglyceride (mg/g tissue)	28.3 ± 1.3	38.1 ± 2.0	**
Tissue weight (g)	1.387 ± 0.060	2.258 ± 0.174	**
<b>Mesenteric Fat</b>			
Tissue weight (g)	0.990 ± 0.067	1.653 ± 0.070	**

Mean ± SD, \*: p<0.05, \*\*: p<0.01 (t-test)

## 第三章

*In vivo* ターゲットバリデーションに有用な  
トランスジェニック動物の作出効率改善のための基礎研究

## 要約

標的候補分子の *in vivo* ターゲットバリデーション研究において、遺伝子改変動物は極めて強力なツールである。中でもトランスジェニック (tg) 技術は、げっ歯類だけでなく大動物や霊長類においても作製実績があり、遺伝子機能解析や疾患モデル動物の開発研究において極めて重要な技術である。しかしながら、その作出効率は限定的であり研究効率の観点で課題とされている。したがって tg 動物の作製過程において、目的とする動物の作出効率向上は有用な *in vivo* ターゲットバリデーション手法としての価値を高めるものである。本章では、緑色蛍光タンパク質 (EGFP) をマーカーとした、着床前の遺伝子改変胚の選別方法を確立した。

CAG プロモーター下流に EGFP を連結させた遺伝子を受精卵前核に顕微注入し、桑実胚から胚盤胞になるまで培養を行った。胚を蛍光顕微鏡で観察し、一部の胚は制限酵素である *Dpn* I と *Bal* 31 によって外来性遺伝子を消化してから PCR を行うことで、ゲノムに組み込まれた遺伝子のみを検出し tg 胚の同定を行った。その結果、全体に蛍光が認められた胚は全てが tg 胚と判定されたが、モザイク様に蛍光が認められた胚の半分は non-tg 胚と判定された。この胚を移植して出生させた個体においては、全体に蛍光が認められた胚を移植して出生させた個体では全体の 77% が tg マウスであり、モザイク様に蛍光が認められた胚を移植して出生させた個体では 21.4% が tg マウスであった。これらの結果より、EGFP をマーカーとした tg 胚選別法の有用性が確認され、特に蛍光様式を適切に判別することで著しい作出効率の改善が認められることが明らかとなった。Tg 動物を用いた *in vivo* ターゲットバリデーションに本方法を応用することで、従来必要であった tg 動物の選抜作業を効率化することが可能となり、*in vivo* ターゲットバリデーションの迅速化に寄与できることが示唆された。

## 緒言

トランスジェニック (tg)法による創薬標的の *in vivo* ターゲットバリデーションは、プロモーターの選択による組織特異的な発現が可能、過剰発現だけでなく、第二章で示したように RNAi によるノックダウンが可能、ES 細胞が樹立されていない動物種でも適用が可能、迅速・安価に作製が可能、といった点で極めて有用である。しかしながら、課題として作出効率が低いことが挙げられる。特に、大動物や霊長類となると移植できる胚の数に制限が生じてしまうため、移植までに tg 胚を同定することは研究効率を格段に改善し、非常に有用な技術となると考えられる。過去、 $\beta$  ガラクトシダーゼ (Ueno et al., 1987, Bonnerot et al., 1991, Kubisch et al., 1995) やクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) (Majumder et al., 1993) をレポーター遺伝子として使用した例が報告されている。しかしながら、これらのレポーターを使用した場合は胚を生かしたままで発現を検証できないため、実用化は困難である。ホタルルシフェラーゼ遺伝子をレポーターとして使用する報告もあるが (Thompson et al., 1995, Nakamura et al., 1998), この場合においても、判定するために外来性の基質の添加が必要であり、胚への影響が無視できない。

緑色蛍光タンパク質 (GFP) はオワンクラゲから同定された有用な蛍光マーカー遺伝子である (Prasher et al., 1992)。GFP そのものの毒性は極めて低く、青色光 (488 nm) を照射して緑色光を発し、外来性の基質や補因子を必要としない。よって、tg 胚を選別するために極めて有用であることが考えられる。Takada ら (1997) は変異型 GFP である S65T を用いた tg マウス胚の選別法を報告した。この報告では、GFP 陽性胚と陰性胚を選別して移植し、得られた個体を解析しており、GFP 陽性胚を移植して出生させた個体の 1/4 はモザイク tg 個体と考えられる結果であった。モザイク tg 個体は生殖系細胞への導入効率が悪く、ラインを確立するために多くの産仔を得る必要があるため多大な労力を必要とする。胚選抜の時点でモザイク tg 胚を判定し排除する方法が確立

されれば、迅速なライン確立を行うことが可能となり *in vivo* ターゲットバリデーションの効率化に寄与する。Enhanced GFP (EGFP)は、野生型 GFP と比較して 35 倍の蛍光強度を有しており(Cormak et al., 1996), tg 胚を選別するための指標として優れた特性をもっていると考えられる。そこで本章では、EGFP と強力な発現ベクターである CAG プロモーター (Okabe et al., 1997)を用い、有用かつ効果的な胚選別法の開発に取り組んだ。

なお、本実験では選別した tg 胚と non-tg 胚の検証に、改変 PCR 法を用いた胚からの導入遺伝子検出法 (Soe et al., 1997)を用いた。この方法は、一般的に遺伝子導入に用いる DNA は、Dam メチル化酵素を有している大腸菌から精製されており、GATC 配列の A がメチル化されているのに対し、ゲノムに導入された配列は複製過程でメチル化が消失することを利用した検出法である。すなわち、顕微注入後に染色体外に存在する非導入 DNA はメチル化を保持しており、A メチル化 GATC 配列を特異的に消化する制限酵素の *DpnI* 処理により消化され切断を受けるのに対し、ゲノム DNA は *DpnI* による消化を受けていないため PCR によって検出可能となる。この方法に加え、より確実な検証として、実際に選別胚を子宮または卵管采へ移植し、出生した仔マウスが EGFP 遺伝子を持つか否かの直接的な確認も行った。

## 材料および方法

### 動物

ICR マウスおよび BDF<sub>1</sub> マウスは三共ラボ (Tokyo, Japan)から購入した。マウスは 22~25°C で湿度 40~60%に制御された環境下で、14 時間の照明、10 時間消灯の明暗サイクル下で、餌および水は十分に与えて飼育した。動物実験は、東京大学農学部の実験動物使用に関するガイドラインに従って行った。

### 遺伝子構築

EGFP 発現ベクターは下記のように構築した。サイトメガロウイルス (CMV) エンハンサー、ニワトリ  $\beta$ -actin プロモーターの制御下にウサギ  $\beta$ -globin のイントロン、エクソンとポリ A シグナル配列を連結し、EGFP の cDNA はウサギ  $\beta$ -globin のエクソン内に連結した。SalI と BamHI でプラスミドを切断し、1% のアガロースゲルで電気泳動して発現カセットを切り出して分離した後に塩化セシウム密度勾配遠心法 (Hogan et al., 1994)によって受精卵への顕微注入に使用する DNA を精製した。精製 DNA はインジェクションバッファー (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.25 mM EDTA (pH 7.4))に溶解した。

### DNA 顕微注入と胚培養

DNA の受精卵前核への顕微注入は Hogan らの方法 (1994)に従って行った。過排卵を誘発した雌性 BDF<sub>1</sub> と雄性 BDF<sub>1</sub> を交配させ、卵管から受精卵を回収した。精製 DNA 断片を約 1,500 コピー程度、顕微注入により前核に注入し、M16 培地 (M7292, SIGMA) 中、37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% 空気、湿度 100%で培養した。

### EGFP 蛍光観察



桑実胚期，または胚盤胞期の胚を，M2 培地 (M7167, SIGMA)に移し，蛍光実体顕微鏡 (MZ FL III, Leica: Dearfield, IL, USA)下，FITC 用のフィルターを用いて観察を行った．胚の蛍光像は，胚細胞全体が均一に蛍光陽性であるもの（均一発現胚），胚細胞の一部が蛍光陽性であるもの（モザイク様発現胚），および蛍光陰性のもの（蛍光陰性胚）として判定し，選別した．

#### Tg 胚の改変 PCR 法による解析

選別した胚の一部は，改変 PCR 法 (Soe et al., 1997)による導入 DNA の解析を行った．胚は一つずつ PBS で 2 回洗浄した後，1x PCR buffer (pH 8.4, 20 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>)で 2 回洗浄した．その後，PCR チューブに移し，0.05 mg/ml プロテイナーゼ K (124568, Merk), 1.7 μM 硫酸ドデシルナトリウム (SDS), 20 mM dithiothreitol (DTT) を含む 2 μl の 1x PCR buffer を加え，37°C, 1 時間インキュベートした．次に，プロテイナーゼ K を失活させるために 95°C で 5 分間インキュベートした．

上記により得られたゲノム DNA は，200 mU の *Dpn* I (IVGN010-6, Gibco), 20 mM Tris-HCl(pH 7.4), 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl 中で 37°C, 1 時間消化し，65°C, 10 分間処理して酵素を失活させた．引き続き，250 μl の *Bal*31 (M213, Biolab Co. Ltd.)溶液 (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 600 mM NaCl, 12 mM CaCl<sub>2</sub>, 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA)を加え，37°C, 1 時間処理した後，70°C, 10 分間処理して失活させた．DNA は GeneClean II kit (111001400, MP Biomedical)を用いて回収し，滅菌水で溶出した後に PCR 増幅を行い，PCR 産物に対してサザンブロット解析を行った．

PCR に使用した EGFP 遺伝子増幅のためのプライマーは下記の通り．

5' primer: 5'-ACGGCAAGCTGACCCTGAA-3'

3' primer: 5'-GGGTGCTCAGGTAGTGGTT-3'

内部標準に使用したマウス *β-actin* に対するプライマーは市販品 (Funakoshi) を使用した。

PCR の条件は 94°C 5 min の後, (95 °C 1 min - 60 °C (EGFP), 62°C (β-actin) 1 min - 72 °C 1 min) x 45 cycles とした。

PCR 産物は 2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い, エチジウムブロマイドで染色した後に UV トランスイルミネーターで可視化した。その後, 必要に応じてサザンブロット解析に供した。

#### 胚移植および tg マウススクリーニング

選別した胚の一部は, 偽妊娠 ICR マウスに移植した。胚盤胞は子宮へ, 桑実胚は卵管采へ移植を行った。出生した個体の尾, または肝臓からゲノム DNA を抽出し, PCR およびサザンブロット解析による tg マウスの同定を行った。PCR は 1.5 unit の rTaq DNA polymerase (R001A, TaKaRa) と 1x PCR buffer, 250 μM dNTP, 10% DMSO と 0.1 μM の上記プライマーを用い,

94°C 5 min, (95 °C 1 min - 59 °C 1 min - 72 °C 1 min) x 30 cycles の条件で行った。

サザンブロット解析には, 10 μg のゲノム DNA を *EcoRI* で処理したものをを用い, CAG-EGFP 遺伝子が組み込まれたプラスミドを *EcoRI* で処理することで得られる EGFP 遺伝子断片 (図 3-1) をニックトランスレーション法 (Rigby et al., 1977) を用い <sup>32</sup>P-dCTP で標識した DNA プローブを用いた。

## 結果

### 胚における EGFP 蛍光と Tg 率

CAG-EGFP 遺伝子（図 3-1）を注入した胚における EGFP の蛍光は、種々発生ステージにおいて観察された。いくつかの胚では 2 細胞期から蛍光が認められ、発生ステージが進むにつれて蛍光陽性率は高くなり、桑実胚期、胚盤胞期では約 40%の胚が蛍光陽性であった（図 3-2）。これらの EGFP 陽性胚のうち、胚細胞の全体が均一に蛍光陽性である胚（均一発現胚，図 3-2C）の割合は 38%（全体の約 13%）であり，一方で 62%（全体の 24%）の胚はモザイク様蛍光を有する胚（モザイク様発現胚，図 3-2D）であった。

まず，均一発現胚／モザイク様発現胚を分けずに全ての EGFP 蛍光陽性胚を偽妊娠雌マウスに移植して得られた産仔の解析を行ったところ，PCR 解析によって 19 匹中 8 匹 (42.1%)が tg であることが判明した（表 3-1）。この結果より，全ての蛍光陽性胚の中には一過性発現によって蛍光陽性となっている non-tg 胚が半分以上含まれていることが明らかとなった。

### EGFP 蛍光の発現様式と Tg 率の関係

一細胞期にゲノムに組み込まれた遺伝子は発生における細胞分裂に伴い胚全体に分配され，均一に発現をするのに対し，ゲノム外で一過性発現をする遺伝子や 2 細胞期以降でゲノムに組み込まれた遺伝子は，胚発生の過程でモザイク様に分配され，EGFP 蛍光もモザイク様に認められる可能性を考え，均一発現胚とモザイク様発現胚を選別し，別々に解析・移植することを行った。

均一発現胚に対し，改変 PCR 法により導入遺伝子の検出を行ったところ，解析した 6 個の胚全てが tg 胚であると判定された。一方，モザイク様発現胚では 4 個の胚のうち 2 個が non-tg 胚であると判定された（図 3-3）。

選別した胚を偽妊娠雌マウスに移植して、産仔を取得し解析を行った。均一発現胚を移植して出生した個体 13 匹のうち、サザンブロット解析で tg マウスと判定された個体は 10 匹 (76.9%)であり、モザイク様発現胚を移植して出生した個体のうち、サザンブロット解析で tg マウスと判定された個体は 14 匹中 3 匹 (21.4%)であった (表 3-1)。また、移植時に EGFP 蛍光が認められなかった蛍光陰性胚を移植して出生した個体 32 匹では 2 匹 (6.3%)が tg マウスであった。

これらの結果から、EGFP をマーカー遺伝子として tg 胚を選別する方法において、均一発現胚を選別して移植することの有用性が示された。

## 考察

本章では、EGFP をマーカー遺伝子として使用し、tg 胚を確実に選別するための新たな方法の開発に取り組んだ。EGFP は野生型 GFP と比べて 35 倍の蛍光強度を有するため (Cormak et al., 1996)、蛍光顕微鏡下で容易に観察することが可能である。今回の実験で、EGFP 蛍光は 2 細胞期以降から観察することができた。過去の報告でも、SV40/*lacZ* を用いた検討では 1 細胞期から (Takada and Toyoda, 1991)、HSP70.1/*luciferase* を用いた検討では 4 細胞期から (Thompson et al., 1995) レポーター遺伝子の発現が観察されている。今回観察された時期については、今回用いた CAG ベクターに使用されているアクチンプロモーターおよびサイトメガロウィルスエンハンサーの組み合わせによる特性と考えられる。

蛍光陽性胚の割合は発生に従い増加し、桑実胚期に約 40% に達した。このように高率なレポーター遺伝子陽性率は SV40/*lacZ* を用いた報告でも観察されている (Takada and Toyoda, 1991)。マウス乳清酸性タンパク質遺伝子をゲノムに導入されないような構造で 1 細胞期に導入した過去の検討では、胚盤胞期まで遺伝子の発現がモザイク様に見られたという報告がある (Burdon and Wall, 1992)。この知見は、本実験で観察した約 40% の蛍光陽性胚の中には、ゲノムに導入されなかった遺伝子が染色体外で発現している non-tg 胚を多く含んでいる可能性を示唆するものである。すなわち、EGFP 蛍光陽性胚の中から真の tg 胚をさらに選別する必要がある。

今回、真の tg 胚を選別するための方法として、胚の細胞全体が均一な蛍光陽性である均一発現胚か、あるいは一部が蛍光陰性であるモザイク様発現胚かを指標とした選別を行った。その理由として、導入遺伝子が注入時にゲノム DNA に取り込まれた場合、胚全体に導入遺伝子が分配され胚全体が蛍光を有することが想定できること、また上述の通り、遺伝子をゲノムに導入されないような構造で 1 細胞期に導入した場合、遺伝子の発現がモザイク様に見られたという報告 (Burdon and Wall, 1992) がある

ためである。

改変 PCR 法を用いた胚からの導入遺伝子検出法 (Soe et al., 1997)によって、均一発現胚と判定された 6 個の胚は全て tg 胚と判定された。一方、モザイク様発現胚と判定された胚 4 個のうち 2 個は non-tg 胚と判定され (図 3-3)、上述の仮説を支持する結果を得た。さらに均一発現胚を移植して出生させた個体では 76.9%が tg 個体であり、蛍光様式による選別を行わずに全ての蛍光胚を移植した場合の 42.1%に比べ格段に tg 率が高まることが示された (表 3-1)。また、モザイク様発現胚を移植した場合の tg 率が 21.4%と、選別を行わずに蛍光胚を移植した場合よりも有意に低いことは (表 3-1)、ゲノムに組み込まれていない non-tg 胚ではモザイク様発現をすと考えた今回の仮説を裏付けるものである。今回、均一発現胚で得られた 76.9%という tg 率は、胚選別を行わなかった場合の一般的な tg 作出効率である 10~20% (Auerbach et al., 2003, 2004)と比較して格段に高い。さらに、Takada ら (1997)が GFP を用いて胚選別を行った方法では、92%が PCR によって tg マウスと判定された一方で、PCR 陽性個体の 27%はサザンブロット解析では non-tg マウスと判定されている。これらの個体はモザイク個体と考察されており、本方法に従いモザイク様の蛍光を有する胚を選別して排除することでより確実な胚選抜法を確立することができたと考えられる。これまで家畜などの大動物胚では、顕微注入法による tg 率は 1%以下とされており (Wall et al., 1992)、現実的に tg 家畜を顕微注入法で作出することは極めて困難であると考えられている。動物個体へ遺伝子を導入する他の方法としてレトロウイルスを用いた方法も挙げられ、その場合は 10~50%の胚に遺伝子が導入されると言われている (Smith, 2002)。本方法はウイルスを用いた遺伝子導入法と組み合わせて用いることも可能であり、今回の結果を踏まえると 70%以上の確立で tg 胚を選別できると考えられ、この場合、100 個程度の胚への遺伝子導入により 10~50 個の胚を選抜することができ、その中で真の tg 胚が 7~35 個含まれることが期待できることを考えると、移植後の出生率を併せ考えても tg

個体を得る可能性が飛躍的に高くなると考えられる。また、移植胚数が限られる大動物での tg 作出において、移植動物調達の負担を軽減させることができるため、研究効率を著しく高めることが可能となる。以上より、今回の選別法は確実な tg 胚を選別する極めて有益な方法であり、*in vivo* ターゲットバリデーションを行うにあたり、その迅速性・効率性を高めることに極めて有効であると考えられる。

今回、均一発現胚を移植して出生させた個体全てが tg であるとは判定されなかった。この理由として、EGFP は可溶性タンパク質であるため、一過性に大量発現した EGFP が細胞分裂の際に全ての細胞に分配されて全体に蛍光を有した可能性がある。EGFP は半減期が 26 時間と長く、極めて安定なタンパク質であり (Corish et al., 1999), タンパク質不安定化シグナルであるオルニチンデカルボキシラーゼの PEST ドメインを付加し半減期を 2 時間程度に短縮させた d2EGFP のようなマーカー遺伝子を用いることで一過性発現タンパク質の分配による偽陽性胚の選別ができる可能性が考えられる。また、蛍光観察の際、胚の全細胞に対して 3 次元的に評価することは困難なため、一部細胞が蛍光陰性である胚を選抜してしまった可能性もある。今後、判定の際には胚を回転するなどの注意も必要であろう。予備実験により、EGFP の励起光 (490 nm) を 30 分程度照射しても、胚の発生に対しての影響は認められなかった (data not shown)。実際の判別に必要な時間は数分であり、たとえ胚を回転する処置を加えたとしても発生への影響はほとんど無いと考えられる。したがって、EGFP タンパク質を用いた本方法は非侵襲的に胚選抜を可能とする有効な方法であると考えられる。

以上より、本方法は tg 動物、とりわけ tg 大動物の作出効率の向上に有用であり、迅速かつ効率的な *in vivo* ターゲットバリデーション手法としての遺伝子改変動物作製技術の価値を著しく高めるものである。

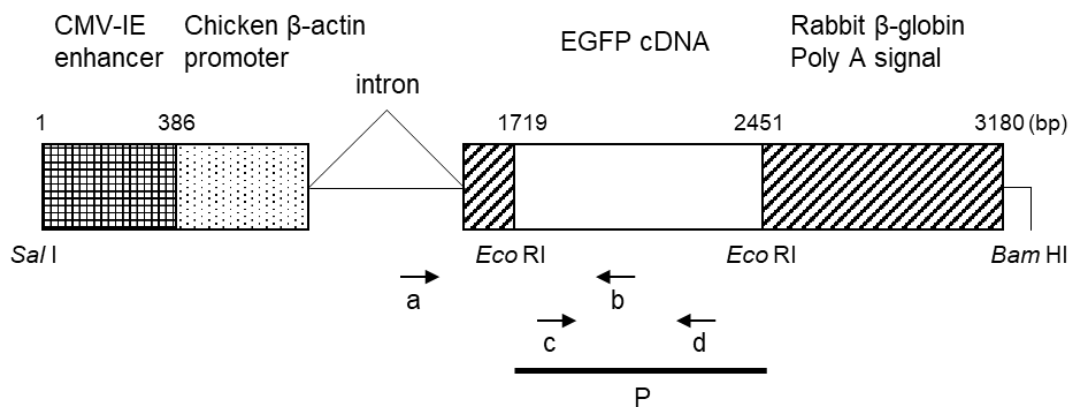
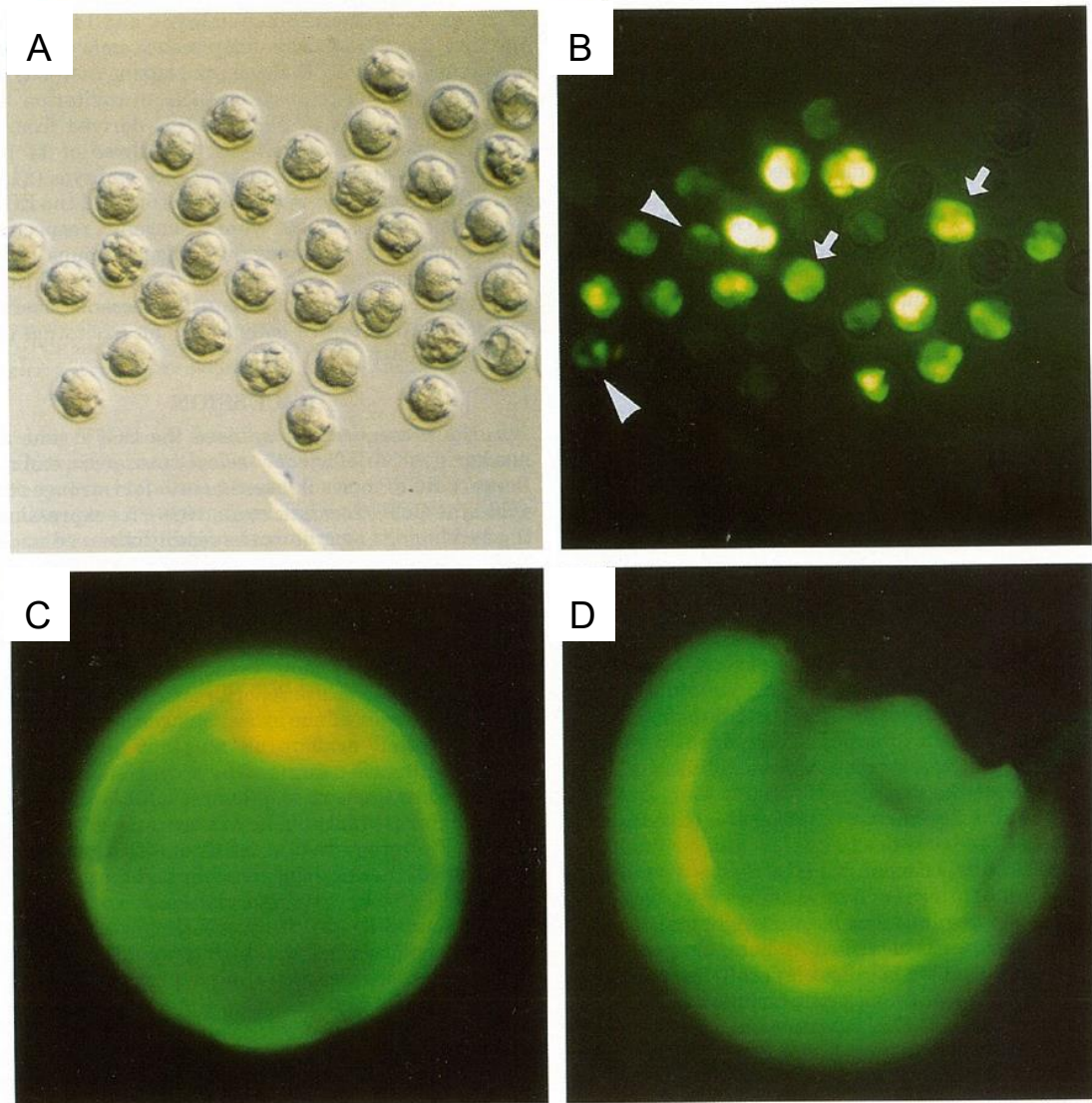


図 3-1 CAG-EGFP 遺伝子の模式図.

Tg マウスの PCR 判別に用いたプライマーの位置を矢印 (a, b)で示す. *DpnI* と *Bal31* を用いた改変 PCR (Soe et al., 1997)による胚選別に用いたプライマーの位置を矢印 (c, d)で示す. サザンブロット解析でプローブに用いた EGFP 遺伝子断片 (P)は, *EcoRI* 切断によって得られた.





**図 3-2. CAG-EGFP 遺伝子導入後の胚観察像**

CAG-EGFP 遺伝子を顕微注入後，胚を M16 培地中で 3～4 日間培養し，実体蛍光顕微鏡下で観察した。

A: 桑実胚期の明視野観察像，

B: 桑実胚期の蛍光観察像．均一発現胚を矢印，モザイク様発現胚を矢頭で示す．

C: 均一な発現を示す胚盤胞期胚の蛍光観察像．

D: モザイク様発現を示す胚盤胞期胚の蛍光観察像

表 3-1. 蛍光様式に基づいた胚選抜の有無による tg マウス作出効率

	Fluorescent pattern in the embryos transferred	No. of pups analyzed	No. of transgenic (%) <sup>*</sup>
Non-classified embryos	Positive	19 <sup>a</sup>	9 (42.1) <sup>1, 3</sup>
	Negative	32 <sup>a</sup>	2 (6.5) <sup>2, 4</sup>
Classified embryos	Uniform-fluorescence	13 <sup>b</sup>	10 (76.9) <sup>3</sup>
	Mosaic-fluorescence	14 <sup>b</sup>	3 (21.4) <sup>1, 4</sup>

<sup>\*</sup> Values with different superscript numbers are significantly different ( $P<0.02$ ).

<sup>a</sup> Genomic DNAs of pups were analyzed by PCR.

<sup>b</sup> Genomic DNAs of pups were analyzed by Southern blotting and identified by observation of fluorescence on the surface of body under the EGFP excitation light.

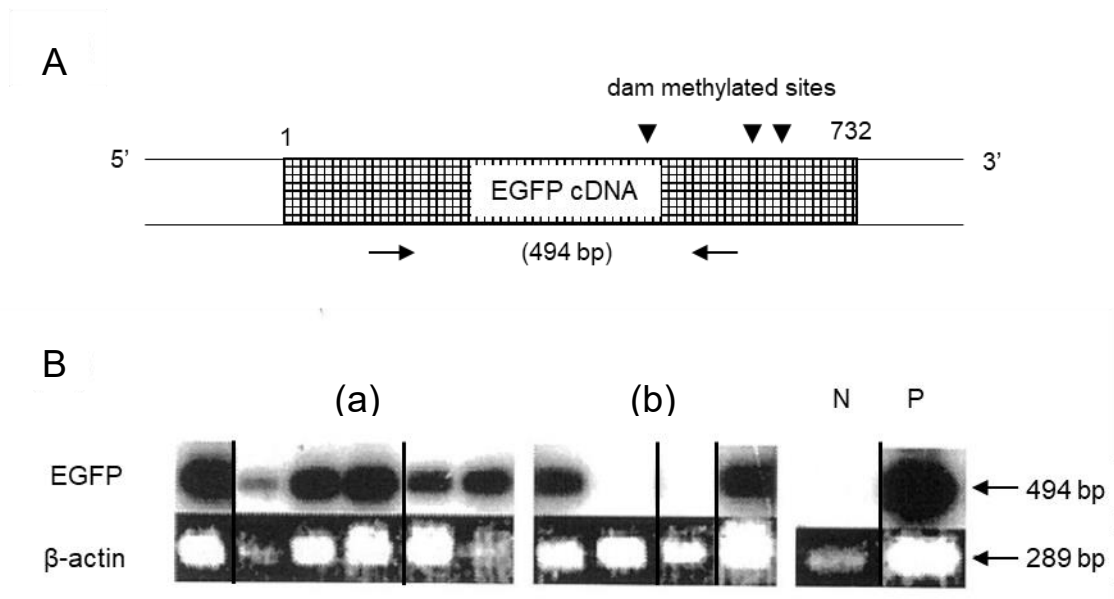


図 3-3. 改変 PCR 法による胚盤胞期胚の導入遺伝子検出

A: EGFP cDNA 配列内における改変 PCR 法に用いたプライマーの位置 (矢印: 図 3-1. c,d) および Dam メチラーゼによるメチル化部位 (矢頭)

B: 単一胚からの改変 PCR による増幅産物像. EGFP 遺伝子の増幅産物は, 改変 PCR の後サザンブロット解析を行った. マウス  $\beta$ -actin 遺伝子は PCR によって検出を行った. (a) 均一蛍光発現胚を用いた解析. (b) モザイク様発現胚を用いた解析. N: 陰性対象 (顕微注入非実施). P: 陽性対照 (CAG-EGFP tg マウスゲノム DNA)

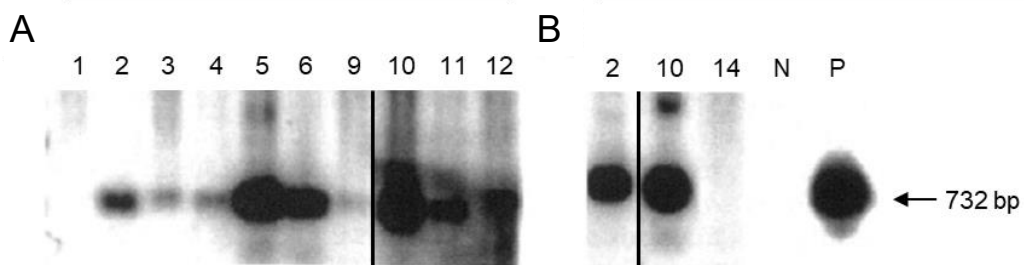


図 3-4. 蛍光様式で判別した胚を移植した産仔のゲノム DNA を用いたサザンブロット解析

ゲノム DNA を *Eco*RI で制限消化した後,  $^{32}\text{P}$  標識した EGFP 遺伝子断片 (図 3-1, P) を用いてサザンブロット解析を行った.

A: 均一発現胚を移植して得られた産仔のゲノム DNA を用いた解析.

B: モザイク様発現胚を移植して得られた産仔のゲノム DNA を用いた解析. N: 野生型マウスのゲノム DNA. P: CAG-EGFP tg マウスゲノム DNA

## 総合考察

現在の医療・創薬分野において求められる最重要項目は、多くの機能未知評価候補分子に対する迅速かつ効率的なターゲットバリデーションである。本研究では、非臨床創薬研究における *in vitro* および *in vivo* ターゲットバリデーションの実例および迅速化・効率化の方策を示した。

第1章では、遺伝子組換えタンパク質および遺伝子導入した哺乳類細胞を用いて、呼吸器疾患の標的として注目されているヒト気道トリプシン様プロテアーゼ (HAT), およびプロテアーゼ阻害因子である肝細胞増殖因子 (HGF)活性化因子 1 型阻害因子 (HAI-1)に対する *in vitro* ターゲットバリデーションを行った。ヒト培養細胞における遺伝子組換え HAI-1 および HAT タンパク質の強制発現実験によって、HAT の活性および活性化は、HAI-1 との共発現状態、HAI-1 の分泌様式によって精密に調節されている可能性を示し、HAI-1 が呼吸器疾患に対する治療薬となりうる可能性を示すことができた。

本研究においては、遺伝子組換え技術による変異体の作製が機能解析に大きな役割を果たした。すなわち、HAT のセリンプロテアーゼ活性変異体 (S368A), 活性化部位変異体 (R186A), さらに膜結合部位を除いた2種類の遊離型 HAI-1 である。これらを用いることで Kunitz ドメインを1つだけ持つ HAI-1 が HAT 抑制効果をもつこと、HAT と HAI-1 が複合体を形成すること、HAT の活性化に HAT 自身の活性が必要であることなどを示唆することができた。*In vitro* ターゲットバリデーションの特徴は、対象とする遺伝子の生理作用を単純な系で検出・解析できる点であり、様々な組換え変異体作製や、変異体遺伝子の強制発現等の実験は、標的遺伝子の迅速な機能解析に役立つ。本実験ではこのことを実例を持って明確に示すことができたと考えている。

一方、課題としては、遺伝子の過剰発現実験などで汎用される細胞株は、そのトランスフェクション効率や細胞増殖性などの取り扱いやすさから選ばれることが多く、本研究で用いられた HEK293 細胞もヒト胎児腎臓由来細胞であり、HAI-1, HAT いずれも内

在性に発現していない点が挙げられる。本研究で、活性型 HAT は主に培養上清中で検出され、細胞溶解物中ではほとんど検出がされなかったが、これが本来発現する組織と使用する細胞株の由来組織の違いにより、本来の発現環境と異なるなどの理由から、過剰発現させた外来遺伝子が示す挙動が本来のものではなかった可能性を否定することができない。また、無限増殖を特徴とする細胞株は、増殖能を阻害する遺伝子群が染色体ごと欠損していることも多く、本来必要とする補因子などが欠損した状態で評価してしまうことで結果を見誤る可能性も否定できない。これらの課題を解決するためには、一次の細胞株を用いたアッセイののち、標的遺伝子が内在性に発現しうる初代細胞を用いたアッセイを行うことが有効であると考えられる。近年の技術の進歩により、より微弱な応答検出、初代細胞への遺伝子改変や、シングルセルアッセイなども可能となっており、今後の *in vitro* ターゲットバリデーションはこれらの最新技術を駆使することでより効率的に行える可能性が考えられる。

第2章では、迅速な *in vivo* ターゲットバリデーション手法としての RNAi tg マウス作製法の開発を行った。ヒト mir-187 前駆体配列を活用した RNAi 用ベクターは、*in vitro* で 80%程度のノックダウン効果を発揮し、*in vivo* において限定的ではあるが有意なノックダウン作用をもたらした。すなわち *in vitro*, *in vivo* 双方のターゲットバリデーションに使用可能で、迅速、簡便な操作が行える RNAi 用ベクターを構築することができた。

RNAi tg マウスの特徴の一つとして、配列や系統によって異なるノックダウン効率による様々な発現量を有する動物を用いた解析ができるため、期待する表現型と遺伝子発現量との相関性を検証することが可能となる点を挙げられる。今回、相関性を検証するには至らなかったが、少なくとも表現型の現れている個体では発現抑制を確認することができた。また、RNAi tg マウスでは 100%のノックアウトに至らないことが多く、胎生致死遺伝子の成体における機能解析を可能とする。さらに、プロモーターの選択による簡便な組織・細胞特異的ノックダウンをすることで、*in vivo* ターゲットバリデーション

ンの可能性をさらに拡げることができる可能性が考えられる。今後は表現型と遺伝子発現量との相関性の検証、組織・細胞特異的プロモーターの有効性も含めてさらに検討していく必要がある。

本研究において得られた tg マウスのノックダウン効率が限定的であった理由に関しては第 2 章の考察でも述べたが、今後初期胚での発現が少なく、組織特異性の高いプロモーターの使用によって胚発生に及ぼす影響を回避すると同時に組織特異的ノックダウンを達成できれば、本 RNAi tg 法の利点を最大限に活かすことができるものと考えられる。

一方、siRNA 配列に類似した配列を有する遺伝子発現抑制効果、すなわちオフターゲット効果については留意する必要があると考えられるが、*in silico* での配列選択、*in vitro* でのオフターゲット検証、また、今回開発したベクターの利点を活かし、複数配列を用いた RNAi tg マウス作製などの手段を用いて検証を進めることでより質の高い *in vivo* ターゲットバリデーションが可能と考えられる。

第 3 章では、遺伝子改変動物作出研究全般において大きなボトルネックとなる作出効率の改善に取り組んだ。本研究では非侵襲的に遺伝子導入の有無を確認することが可能な蛍光マーカータンパクを用いた胚選別法に関し、発現様式を見極めることでより効率的な胚選別が可能であることを明らかにした。本方法によって選抜を行うことで、個体作出、ジェノタイピングなどの労力を抑え、効率的な研究が行えるようになることが期待される。

創薬研究においては、ターゲットバリデーションとともにヒトにおける薬効予測性が大きな課題となっている。すなわち、げっ歯類で認められた薬効や毒性などが種差などの要因によってヒトとは異なることで、臨床試験が進まないことが多い。したがって臨床試験までにヒトへの外挿性を検証し、成功確度を高めることが重要視されている。ヒトへの薬効に関する外挿性予測を行う場合、非げっ歯類動物における疾患モデルの有無

が重要であるが、一部疾患を除き、非げっ歯類では疾患モデル動物が確立されていない点が課題である。遺伝子改変技術による非げっ歯類疾患モデル動物作出はこの課題を克服するために期待されるが、非げっ歯類では遺伝子改変効率が著しく低いため現在までほとんど取り組まれてこなかった。したがって本方法を非げっ歯類での遺伝子改変動物作製に適用することで *in vivo* ターゲットバリデーションだけでなく、ヒトへの外挿性が高い薬効予測モデル構築可能性が拡がり、創薬研究の効率化に大きく貢献することが期待できる。

以上述べたとおり、創薬研究における機能未知遺伝子の *in vitro* および *in vivo* ターゲットバリデーションにおいて、迅速化・効率化は極めて重用であり、本研究成果は *in vitro*, *in vivo* の両者に対し寄与するものと考えられる。これらは必ずしも *in vitro* の次に *in vivo* というのではなく、*in vivo* の複雑な系で認められた現象を、*in vitro* の単純な系で検証することで因果関係を明らかにすることができるため、疾患モデル動物等で認められた発現変動などが、病因的な変動であるのか結果として生じた変動であるかを見分けることにも *in vitro* の系が役立つ。こうして、*in vitro* バリデーションから *in vivo* バリデーションへ、また、*in vivo* バリデーションから *in vitro* バリデーションへと検証を繰り返していくことでより精度の高いターゲットバリデーションが可能となり、派生した現象を検出することで新規標的分子の探索にも繋がることを期待できる。今後、新たな創薬標的分子のターゲットバリデーションを *in vitro* および *in vivo* で実践するとともに、さらなる技術開発を進めていくことでターゲットバリデーションの効率化を進めていく予定である。



## 引用文献

Albarado D.C., McClaine J., Stephens J.M., et al. (2004) Impaired coordination of nutrient intake and substrate oxidation in melanocortin-4 receptor knockout mice. *Endocrinology* **145**, 243-252.

Auerbach A.B. (2004) Production of functional transgenic mice by DNA pronuclear microinjection. *Acta Biochim. Pol.* **51**, 9031

Auerbach A.B., Norinsky R., Ho W., Losos K., Guo Q., Chatterjee S. and Joyner A.L. (2003) Strain-dependent differences in the efficiency of transgenic mouse production. *Transgenic Res.* **12**, 59-69

Balthasar N., Dalgaard L.T., Lee C.E., et al. (2005) Divergence of melanocotin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell* **123**, 493-505.

Baron J., Tarnow C., Mayoli-Nussle D., Schilling E., Meyer D., Hammami M., Schwalm F., Sterinmetzer T., Guan Y., Garten W., Klenk H.D. and Bottcher-Friebertshauser E. (2013) Matriptase, HAT, and TMPRSS2 activate the hemagglutinin of H9N2 influenza A viruses. *J. Virol.* **87**, 1811-1820.

Beaufort N., Leduc D., Eguchi H., Mengele K., Hellmann D., Masegi T., Kamimura T., Yasuoka S., Fend F., Chignard M. and Pidard D. (2007) The human airway trypsin-like protease modulates the urokinase receptor (uPAR, CD87) structure and functions. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **292**, L1263-L1272

Bertram S., Clowacka I., Muller M.A., Lavender H., Gnirss K., Nehlmeier I., Niemeyer D., He Y., Simmons G., Drosten C., Soilleux E.J., Jahn O., Steffen I., and Pohlmann S. (2011) Cleavage and activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by human

airway trypsin-like protease. *J. Virol.* **85**, 13363-13372.

Bonnerot C., Vernet M., Grimber G., Briand P. and Nicolas J.F. (1991) Transcriptional selectivity in early mouse embryos: a qualitative study. *Nucleic Acids Res.* **19**, 7251-7257

Bottcher E., Matrosovich T., Beyerle M., Klenk H.-D., Garten W. and Matrosovich M. (2006) Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *J. Virol.* **80**, 9896-9898

Burdon T.G. and Wall R.J. (1992) Fate of microinjected genes in preimplantation mouse embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **33**, 436-442

Cai X., Hagedorn C.H. and Cullen B.R. 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* **10**, 1957-1966.

Capecchi M.R. (1989) Altering the genome by homologous recombination. *Science* **244**, 1288-1292.

Chaipan C., Kobasa D., Bertram S., Glowacka I., Steffen I., Tsegaye T.S., Takeda M., Bugge T.H., Kim S., Park Y., Marzi A., and Pohlmann S. (2009) Proteolytic activation of the 1918 influenza virus hemagglutinin. *J. Virol.* **83**, 3200-3211.

Cheng H., Fukushima T., Takahashi N., Tanaka H., and Kataoka H. (2009) Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 regulates epithelial to mesenchymal transition through membrane-bound serine proteinases. *Cancer Res.* **69**, 1828-1835.

Chokki M., Eguchi H., Hamamura I., Mitsuhashi H. and Kamimura T. (2005) Human airway trypsin-like protease induces amphiregulin release through a mechanism involving protease-

activated receptor-2-mediated ERK activation and TNF  $\alpha$ -converting enzyme activity in airway epithelial cells. *FEBS J.* **272**, 6387-6399

Chokki M., Yamamura S., Eguchi H., Masegi T., Horiuchi H., Tanabe H., Kamimura T. and Yasuoka S. (2003) Human airway trypsin-like protease increases mucin gene expression in airway epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **30**, 470-478

Chung K.H., Hart C.C., Al-Bassam S., Avery A., Taylor J., Patel P.D., Vojtek A.B. and Turner D.L. (2006) Polycistronic RNA polymerase II expression vectors for RNA interference based on BIC/miR-155. *Nucleic Acids Res.* **34**, e53

Claas E.C.J., Osterhaus A.D.M.E., Van Beek R., De Jong J.C., Rimmelzwaan G.F., Senne D.A., Krauss S., Shortridge K.F., and Webster R.G. (1998) Human influenza A H5N1 virus related to a highly pathogenic human influenza virus. *Lancet*, **351**, 472-477.

Clark A.J., Cowper A., Wallace R., Wright G. and Simons J.P. 1992. Rescuing transgene expression by co-integration. *Nat. Biotech.* **10**, 1450-1454.

Corish P. and Tyler-Smith C. (1999) Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells. *Protein Eng.* **12**, 1035-1040

Cormack B.P., Valdivia R.H. and Falkow S. (1996) FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**, 33-38.

Coumoul X., Shukla V., Li C., Wang R.-H. and Deng C.-X. (2005) Conditional knockdown of *Fgfr2* in mice using Cre-loxP induced RNA interference. *Nucl. Acids Res.* **33**, e102.

Denda K., Shimomura T., Kawaguchi T., Miyazawa K. and Kitamura N. (2002) Functional

characterization of Kunitz domains in hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1. *J. Biol. Chem.* **277**, 14053-14059

Deyde V.M., Xu X.Y., Bright R.A., Shaw M., Smith C.B., Zhang A., et al. (2007) Surveillance of resistance to adamantanes among influenza A (H3N2) and A (H1N1) viruses isolated worldwide. *J. Infect. Dis.* **196**, 249–257.

Fan B., Brennan J., Grant D., Peale F., Rangell L. and Kirchhofer D. (2007) Hepatocyte growth factor activator inhibitor-1 (HAI-1) is essential for the integrity of basement membranes in the developing placental labyrinth. *Dev. Biol.* **303**, 222-230

Fan B., Wu T.D., Li W. and Kirchhofer D. (2005) Identification of hepatocyte growth factor activator inhibitor-1B as a potential physiological inhibitor of prostaticin. *J. Biol. Chem.* **280**, 34513-34520

Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E. and Mello C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **392**, 806-811.

Godiksen S., Selzer-Plon J., Pedersen E.D.K., Abell K., Rasmussen H.B., Szabo R., Bugge T.H. and Vogel L.K. (2008) Hepatocyte growth factor activator inhibitor-1 has a complex subcellular itinerary. *Biochem. J.* **413**, 251-259

Grimm D., Streetz K.L., Jopling C.L., et al. (2006) Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature* **44**, 537-541.

Hamilton B.S., and Whittaker G.R. (2013) Cleavage activation of human-adapted influenza virus subtypes by kallikrein-related peptidases 5 and 12. *J. Biol. Chem.* **288**, 17399-17407.

Han J., Lee Y., Yeom K.H., Nam J.W., Heo I., Rhee J.K., Sohn S.Y., Cho Y., Zhang B.T. and Kim V.N. (2006) Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* **125**, 887-901.

Harborth J., Elbashir S.M., Bechert K., et al. (2001) Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J. Cell Sci.* **114**, 4557-4565.

Hashimoto T., Kato M., Shimomura T. and Kitamura N. (2010) TMPRSS13, a type II transmembrane serine protease, is inhibited by hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 and activates pro-hepatocyte growth factor. *FEBS J.* **277**, 4888-4900.

He M., Liu Y., Wang X., et al. (2012) Cell-type based analysis of microRNA profiles in the mouse brain. *Neuron* **73**, 35-48.

Hemann M.T., Fridman J.S., Zilfou J.T., et al. (2003) An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes in vivo. *Nat. Genet.* **33**, 396-400.

Herter S., Piper D.E., Aaron W., Gabriele T., Cuter G., Cao P., Bhatt A.S., Choe Y., Craik C.S., Walker N., Meininger D., Hoey T. and Austin R.J. (2005) Hepatocyte growth factor is a preferred in vitro substrate for human hepsin, a membrane-anchored serine protease implicated in prostate and ovarian cancers. *Biochem. J.* **390**, 125-136

Hofmann A., Kessler B., Ewerling S., Weppert M., Vogg B., Ludwig H., Stojkovic M., Boelhaue M., Brem G., Wolf E. and Pfeifer A. (2003) Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO Rep.* **4**, 1054-1060.

Hofmann A., Zakhartchenko V., Weppert M., Sebald H., Wenigerkind H., Brem G., Wolf E. and Pfeifer A. (2004) Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. *Biol.*

*Reprod.* **71**, 405-409.

Hogan B., Constantini F. and Lacy E. (1994) Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual.

Hopkins A.L. and Groom C.R. (2002) The druggable genome. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 727-730

Houdebine L.M. (2007) Transgenic animal models in biomedical research. *Target discovery and validation reviews and protocols.* **360**, 163-202.

Huszar D., Lynch C.A., Fairchild-Huntress V., et al. (1997) Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* **88**, 131-141.

Hutvagner G., McLachlan J., Pasquinelli A.E., et al. (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* **293**, 834-838.

Jiang W., Zhou L., Breyer B., Feng T., Cheng H., Haydon R., Ishikawa A. and He T.C. (2001) Tetracycline-regulated gene expression mediated by a novel chimeric repressor that recruits histone deacetylases in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 168-174.

Kataoka H., Shimomura T., Kawaguchi T., Hamasuna R., Itoh H., Kitamura N., Miyazawa K. and Koono M. (2000) Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 is a specific cell surface binding protein of hepatocyte growth factor activator (HGFA) and regulates HGFA activity in pericellular microenvironment. *J. Biol. Chem.* **275**, 40453-40462

Kataoka H., Suganuma T., Shimomura T., Itoh H., Kitamura N., Nabeshima K. and Koono M. (1999) Distribution of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) in human

tissues: cellular surface localization of HAI-1 in simple columnar epithelium and its modulated expression in injured and regenerative tissues. *J. Histochem. Cytochem.* **47**, 673-682

Kato M., Yamanouchi K., Ikawa M., et al. 1999. Efficient selection of transgenic mouse embryos using EGFP as a marker gene. *Mol. Reprod. Dev.* **54**, 43-48.

Ketting R.F., Fisher S.E., Bernstein E., et al. (2001) Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* **15**, 2654-2659.

Khvorova A., Reynolds A. and Jayasena S.D. (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* **115**, 209-216.

Kim V.N. (2005) MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 376-385

Kirchhofer D., Peek M., Lipari T., Billeci K., Fan B. and Moran P. (2005) Hepsin activates pro-hepatocyte growth factor and is inhibited by hepatocyte growth factor activator inhibitor-1B (HAI-1B) and HAI-2. *FEBS Lett.* **579**, 1945-1950

Kojima K., Tsuzukim S., Fushikim T. and Inouye K. (2008) Roles of functional and structural domains of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 in the inhibition of matriptase. *J. Biol. Chem.* **283**, 2478-2487

Kondo A., Hirayama N., Sugito Y., Shono M., Tanaka T. and Kitamura N. (2008) Coupling of Grb2 to Gab1 mediates hepatocyte growth factor-induced high intensity ERK signal required for inhibition of HepG2 hepatoma cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **283**, 1428-1436

- Kubisch H.M., Hernandez-Ledezma J.J., Larson M.A., Sikes J.D. and Roberts R.M. (1995) Expression of two transgenes in vitro matured and fertilized bovine zygotes after DNA microinjection. *J. Reprod. Fertil.* **104**, 133-139.
- Lee Y., Kim M., Han J., Yeom K.H., Lee S., Baek S.H. and Kim V.N. (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* **23**, 371-380.
- Lewandski M. (2001) Conditional control of gene expression in the mouse. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 743-755.
- Lin C.Y., Anders, J., Johnson, M. and Dickson, R.B. (1999) Purification and characterization of a complex containing matriptase and a Kunitz-type serine protease inhibitor from human milk. *J. Biol. Chem.* **274**, 18237-18242
- Lois C., Hong, E.J., Pease S., Brown E.J. and Baltimore D. (2004) Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* **295**, 868-872.
- Lund E., Guttinger S., Calad A., Dahlberg J.E. and Kutay U. (2004) Nuclear export of microRNA precursors. *Science* **303**, 95-98.
- Majumder S., Miranda M. and DePamphilis M.L. (1993) Analysis of gene expression in mouse preimplantation embryos demonstrates that the primary role of enhancers is to relieve repression of promoters. *EMBO J.* **12**, 1131-1140.
- Matsushima R., Takahashi A., Nakaya Y., Maezawa H., Miki M., Nakamura Y., Ohgushi F. and Yasuoka S. (2006) Human airway trypsin-like protease stimulates human bronchial fibroblast proliferation in a protease-activated receptor-2-dependent pathway. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* **290**, L385-L395



McGrew M. J., Sherman A., Ellard F.M., et al. (2004) Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep.* **5**, 728-733.

McManus M.T. and Sharp P.A. (2002) Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 737-747.

Miyazawa K., Shimomura T., Naka D. and Kitamura N. (1994) Proteolytic activation of hepatocyte growth factor in response to tissue injury. *J. Biol. Chem.* **269**, 8966-8970

Miyazawa K., Tsubouchi H., Naka D., Takahashi K., Okigaki M., Arakaki N., Nakayama H., Hirono S., Sakiyama O., Takahashi K., Gohda E., Daikuhara Y. and Kitamura N. (1989) Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for human hepatocyte growth factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163**, 967-973

Montes-Cobos E., Li X., Fischer H.J., et al. (2015) Inducible knock-down of the mineralocorticoid receptor in mice disturbs regulation of the Renin-Angiotensin-Aldosterone system and attenuates heart failure induced by pressure overload. *PLoS ONE* **10**, e0143954.

Morgan E.A., McDaniel L.N., Yin T., et al., (2015) Regulation of glucose tolerance and sympathetic activity by MC4R signaling in the lateral hypothalamus. *Diabetes* **64**, 1976-1987.

Moscona A. (2005) Oseltamivir resistance-disabling our influenza defenses. *N. Engl. J. Med.* **353**, 2633–2636.

Mukai S., Fukushima T., Naka D., Tanaka H., Osada Y. and Kataoka H. (2008) Activation of hepatocyte growth factor activator zymogen (pro-HGFA) by human kallikrein 1 related peptidases. *FEBS J.* **275**, 1003-1017.

Myers K.P., Olsen C.W., and Gray G.C. (2007) Cases of swine influenza in humans: A review of the literature. *Clin. Infect. Dis.* **44**, 1084-1088.

Nagaike K., Kawaguchi M., Takeda N., Fukushima T., Sawaguchi A., Kohama K., Setoyama M. and Kataoka H. (2008) Defect of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1/serine protease inhibitor, Kunitz type 1 (Hai-1/spint1) leads to ichthyosis-like condition and abnormal hair development in mice. *Am. J. Pathol.* **173**, 1464-1475

Naito Y., Yamada T., Ui-Tei K., et al. (2004) siDirect, highly effective, target-specific siRNA design software for mammalian RNA interference. *Nucleic Acids Res.* **32**, W124-W129

Naka D., Ishii T., Yoshiyama Y., Miyazawa K., Hara H., Hishida T. and Kitamura N. (1992) Activation of hepatocyte growth factor by proteolytic conversion of a single-chain form to a heterodimer. *J. Biol. Chem.* **267**, 20114-20119

Nakamura A., Okumura J. and Muramatsu T. (1998) Quantitative analysis of luciferase activity of viral and hybrid promoters in bovine preimplantation embryos. *Mol. Reprod. Dev.* **49**, 368-373.

Niwa H., Yamamura K. and Miyazaki J. (1991) Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**, 193-199.

Oberst M.D., Chen L.-Y.L., Kiyomiya K., Williams C.A., Lee M.-S., Johnson M.D., Dickson R.B. and Lin C. (2005) HAI-1 regulates activation and expression of matriptase, a membrane-bound serine protease. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **289**, C462-C470

Oberst M.D., Williams C.A., Dickson R.B., Johnson M.D. and Lin C.-Y. (2003) The activation of matriptase requires its noncatalytic domains, serine protease domain, and its cognate inhibitor. *J. Biol. Chem.* **278**, 26773-26779

Okabe M., Ikawa M., Kominami K., Nakanishi T. and Nishimune Y. (1997) “Green mice” as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* **407**, 313-319.

Okumura Y., Takahashi E., Yano M., Ohuchi M., Daidoji T., Nakaya T., Böttcher E., Garten W., Klenk H.D. and Kido H. (2010) Novel type II transmembrane serine proteases, MSPL and TMPRSS13, proteolytically activate membrane fusion activity of the hemagglutinin of highly pathogenic avian influenza viruses and induce their multicycle replication. *J. Virol.* **84**, 5089-5096.

Overington J.P., Al-Lazikani B. and Hopkins A.L. (2006) How many drug targets are there? *Nat. Rev. Drug Discov.* **5**, 993-996.

Pinkert C.A. (2002) Transgenic Animal Technology. Academic, Orlando, FL.

Podolska K. and Svoboda P. (2011) Targeting genes in living mammals by RNA interference. *Briefings in Functional Genomics* **10**, 238-247.

Pracher D.C., Eckenrode V.K., Ward W.W., Prendergast F.G. and Cormier M.J. (1992) Primary structure of the Aequorea Victoria green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229-233.

Rigby P.W., Dieckmann M., Rhodes C. and Berg P. (1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J. Mol. Biol.* **113**, 237-251

Rubin J.S., Chan A.M.-L., Bottaro D.P., Burgess W.H., Taylor W.G., Cech A.C., Hirschfield D.W., Wong J., Miki T., Finch P.W. and Aaronson S.A. (1991) A broad-spectrum human lung fibroblast-derived mitogen is a variant of hepatocyte growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 415-419

Sasaki E., Suemizu H., Shimada A., Hanazawa K., Oiwa R., Kamioka M., Tomioka I., Sotomaru Y., Hirakawa R., Eto T., Shiozawa S., Maeda T., Ito M., Ito R., Kito C., Yagihashi C., Kawai K.,

- Miyoshi H., Tanioka Y., Tamaoki N., Habu S., Okano H., and Nomura T. (2009) Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature* **459**, 523-528.
- Scannel J.W., Blanckley A., Boldon H. and Warrington B. (2012) Diagnosing the decline in pharmaceutical R&D efficiency. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11**, 191-200
- Segwarz D.S., Hutvagner G., Du T., et al. (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**, 199-208.
- Sheu T.G., Fry A.M., Garten R.J., Deyde V.M., Shwe T., Bullion L. Peebles P.J., Li Y., Klimov A.I. and Gubareva L.V. (2011) Dual resistance to adamantanes and oseltamivir among seasonal influenza A(H1N1) viruses: 2008-2010. *J. Infect. Dis.* **203**, 13-17.
- Shi Y. (2003) Mammalian RNAi for the masses. *Trends Genet.* **19**, 9-12.
- Shimomura T. and Kato M. (2008) New influenza therapeutic agent and/or prophylactic. patent, JP2008308438.
- Shimomura T., Denda K., Kawaguchi T., Matsumoto K., Miyazawa K. and Kitamura N. (1999) Multiple sites of proteolytic cleavage to release soluble forms of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 from a transmembrane form. *J. Biochem.* **126**, 821-828
- Shimomura T., Denda K., Kitamura A., Kawaguchi T., Kito M., Kondo J., Kagaya S., Qin L., Takata H., Miyazawa K. and Kitamura N. (1997) Hepatocyte growth factor activator inhibitor, a novel Kunitz-type serine protease inhibitor. *J. Biol. Chem.* **272**, 6370-6376
- Shimomura T., Ochiai M., Kondo J. and Morimoto Y. (1992) A novel protease obtained from FBS-containing culture supernatant, that processes single-chain form hepatocyte growth factor to

two chain form in serum-free culture. *Cytotechnology* **8**, 219-229

Shinagawa T. and Ishii S. (2003) Generation of Ski-knockdown mice by expressing a long double-strand RNA from an RNA polymerase II promoter. *Genes Dev.* **17**, 1340-1345.

Smith K.R. (2002) Gene transfer in higher animals: theoretical considerations and key concepts. *J. Biotechnol.* **99**, 1-22.

Soe B.B., Kim C.H., Tojo H., Tanaka S., Yamanouchi K., Takahashi M., Sawasaki T. and Tachi C. (1997) Efficient selection of preimplantation transgenic embryos by an improved procedure using DpnI-Bal31 digestion and the polymerase chain reaction. *Reprod. Fertil. Dev.* **9**, 263-269.

Sutton G.M., Trevaskis J.L., Hulver M.W., et al. (2006) Diet-genotype interactions in the development of the obese, insulin-resistant phenotype of C57BL/6J mice lacking melanocortin-3 or -4 receptors. *Endocrinology* **147**, 2183-2196.

Suzuki M., Kasai K. and Saeki Y. 2006. Plasmid DNA sequences present in conventional Herpes Simplex virus amplicon vectors cause rapid transgene silencing by forming inactive chromatin. *J. Virol.* **80**, 3293-3300.

Szabo R., Molinolo A., List K. and Bugge T.H. (2007) Matriptase inhibition by hepatocyte growth factor activator inhibitor-1 is essential for placental development. *Oncogene* **26**, 1546-1556

Szabo R., Wu Q., Dickson R.B., Netzel-Arnett S., Antalis T.M. and Bugge T.H. (2003) Type II transmembrane serine proteases. *Thromb. Haemost.* **90**, 185-193

Takada T., Iida K., Awaji T., Itoh K., Takahashi R., Shibui A., Yoshida K., Sugano S. and Tsujimoto G. (1997) Selective production of transgenic mice using green fluorescent protein as a

marker. *Nature Biotech.* **15**, 468-461.

Takahashi M., Sano T., Yamaoka K., Kamimura T., Umemoto N., Nishitani H. and Yasuoka S. (2001) Localization of human airway trypsin-like protease in the airway: an immunohistochemical study. *Histochem. Cell Biol.* **115**, 181-187

Takeda S. and Toyoda Y. (1991) Expression of SV40-lacZ gene in mouse preimplantation embryos after pronuclear microinjection. *Mol. Reprod. Dev.* **30**, 90-94.

Tanaka H., Fukushima T., Yorita K., Kawaguchi M. and Kataoka H. (2009) Tissue injury alters the site of expression of hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 in bronchial epithelial cells. *Hum. Cell* **22**, 11-17

Tanaka H., Nagaike K., Takeda N., Itoh H., Kohama K., Fukushima T., Miyata S., Uchiyama S., Uchinokura S., Shimomura T., Miyazawa K., Kitamura N., Yamada G. and Kataoka H. (2005) Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 (HAI-1) is required for branching morphogenesis in the chorioallantoic placenta. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 5687-5698

Tarran R., Trout L., Donaldson S.H. and Boucher R.C. (2006) Soluble mediators, not cilia, determine airway surface liquid volume in normal and cystic fibrosis superficial airway epithelia. *J. Gen. Physiol.* **127**, 591-604

Thompson E.M., Adenot P., Tsuji F.I. and Renard J.P. (1995) Real time imaging of transcriptional activity in live mouse preimplantation embryos using a secreted luciferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 1317-1321.

Ueno K., Hiramoto Y., Hayashi S. and Kondoh H. (1987) Introduction and expression of recombinant  $\beta$ -galactosidase genes in cleavage stage mouse embryos. *Dev. Growth Differ.* **30**, 61-

73.

Ui-Tei K., Naito Y., Takahashi F., et al. (2004) Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res.* **32**, 936-948.

Venter J.C., Adams M.D., Myers E.W., et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-1351.

Wall R.J., Hawk H.W. and Nel N. (1992) Making transgenic livestock: Genetic engineering on a large scale. *J. Cell. Biochem.* **49**, 113-120.

Wang Y., Medvid R., Melton C., et al. (2007) DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat. Genet.* **39**: 380-385.

Whitelaw C.B.A. (2004) Transgenic livestock made easy. *Trends Biotechnol.* **22**, 157-159.

Wreschner D.H., McGuckin M.A., Williams S.J., Baruch A., Yoeli M., Ziv R., Okun L., Zaretsky J., Smorodinsky N., Keydar I., Neophytou P., Stacey M., Lin H.-H. and Gordon S. (2002) Generation of ligand-receptor alliances by “SEA” module-mediated cleavage of membrane-associated mucin proteins. *Protein Sci.* **11**, 698-706

Yamaoka K., Masuda K., Ogawa H., Takagi K., Umemoto N. and Yasuoka S. (1998) Cloning and characterization of the cDNA for human airway trypsin-like protease. *J. Biol. Chem.* **273**, 11895-11901

Yang H., Wang H. and Jaenisch R. (2014) Generating genetically modified mice using CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Nat. Protoc.* **9**, 1956-1968.

Yasuoka S., Ohnishi T., Kawano S., Tsuchihashi S., Ogawara M., Masuda K., Yamaoka K.,

Takahashi M. and Sano T. (1997) Purification, characterization, and localization of a novel trypsin-like protease found in the human airway. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **16**, 300-308

Yekta S., Shih I.H. and Bartel D.P. (2004) MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science* **304**, 594-496.

Yi R., Qin Y., Macara I.G. and Cullen B.R. (2003) Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* **17**, 3011-3016.

Yue J., Sheng Y., Ren A. and Penmatsa S. (2010) A miR-21 hairpin structure-based gene knockdown vector. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **394**, 667-672

Zeng Y., Yi R. and Cullen B.R. (2003) MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 9779-9784.

Zhou H., Xia X.G. and Xu Z. (2005) An RNA polymerase II construct synthesizes short-hairpin RNA with a quantitative indicator and mediates highly efficient RNAi. *Nucl. Acids Res.* **33**, e62.

製薬協 DATA BOOK 2002, 2007, 2012

特許庁 (2015) 平成 26 年度 特許出願技術動向調査報告書 (概要) : 抗体医薬



## 謝辞

本論文をまとめるにあたり，終始懇切丁寧で的確なご指導を頂いた東京大学大学院農学生命科学研究科教授 内藤 邦彦先生に心より感謝いたします。

また，本研究の機会を賜り，大学院在学中にご指導いただいた東條 英昭先生に深く感謝をいたします。

第二章の研究は，金沢大学理工研究域教授 程 肇先生の惜しみないご協力により完成することができました。ここに心からの感謝を申し上げます。

創薬研究の面白さと難しさを教えていただき，常に有意義なご助言を頂いた，田辺三菱製薬株式会社 下村 猛博士に深く感謝を申し上げます。

本論文は，家族の支援なしには完成させることができませんでした。支えてくれた妻のゆう子に感謝いたします。

最後に，長い学生生活を何も言わずに支援してくれた両親に，最大限の感謝を申し上げます。