

新しい機能性遺伝子同定技術の創出と成人病性血管障害関連遺伝子探索への応用

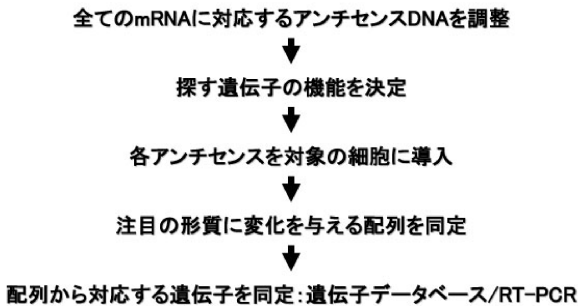
●米倉 秀人 ◆山本 博 ◆渡辺 琢夫 ◆山本 靖彦

金沢大学大学院医学系研究科

〈研究の目的と進め方〉

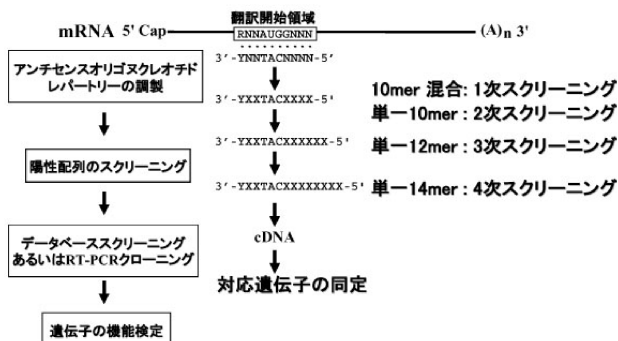
我々は、注目する表現形質を担う遺伝子を機能面から系統的かつ簡便に同定する技術としてアンチセンスディスプレイ (Antisense Display) 法 (Yonekura, H. et al., Nucleic Acids Res. 27, 2591-2600, 1999; Ann. N.Y. Acad. Sci. 947, 382-386, 2001) を独自に考案した。その原理は、概ね全てのmRNA分子種をカバーしうるアンチセンスオリゴヌクレオチド (アンチセンスDNA) のレパートリーの中から注目する細胞形質変化を引き起こす配列を同定し、その配列をもとに当該形質を担う遺伝子を分離することである。

アンチセンスディスプレイ法の原理:機能から遺伝子を見つける



本研究の目的は、本法を新しい機能性遺伝子スクリーニング技術として確立するとともに、医学・生物学上重要な形質を担う遺伝子の分離に適用することである。予定計画期間内に達成を目指す具体的目標は、成人病性血管障害関連遺伝子、特に新規血管新生関連遺伝子を分離することである。さらに、多くの成人病の発症に重要な血管の障害を引き起こす遺伝子の同定とその機構の解明を行う。

アンチセンスディスプレイ法の流れ



〈研究開始時の研究計画〉

- (1) アンチセンスディスプレイ法の検出感度、特異性を向上させるための改良を行ない、ゲノム資源活用のための新規生命技術として当該技術を確認する。
- (2) 多くの成人病の進展に重要な血管新生をモデル系として内皮細胞にアンチセンスディスプレイ法を適用し、血管新生の制御に関わる新規遺伝子を分離する。
- (3) 分離された遺伝子の構造・機能を明らかにして関連する疾患の分子病態の解析を行なうとともに、これらを利用あるいは標的とした成人病性血管障害の新しい予防・治療原理開発の可能性を検討する。
- (4) アンチセンス法を利用して、多くの成人病の発症に重要な血管の障害を引き起こす遺伝子の同定とその機構解明を行う。

〈研究期間の成果〉

- (1) アンチセンスディスプレイ法の検出感度、特異性を向上させるための改良を行ない、ゲノム資源活用のための新規生命技術として当該技術を確認する。
 - (i) 種々のホスホロチオエート型アンチセンスDNAプールを調製して、ヒト初代培養微小血管内皮細胞の培養培地に添加し細胞増殖変化を指標にスクリーニング条件の検討を行なった結果、16種の配列を含む鎖長10塩基のアンチセンスDNAプールが最も良好に作用したことから、このレパートリーをスクリーニングに用いることに決定した。
 - (ii) 1プールあたり16種のアンチセンスDNAからなる計512のプールを各3mmolスケールで合成・精製し、スクリーニング用の新規アンチセンスレパートリーの調製を完了した。
(成果リスト: 4,11,16-18)

- (2) 多くの成人病の進展に重要な血管新生をモデル系として内皮細胞にアンチセンスディスプレイ法を適用し、血管新生の制御に関わる新規遺伝子を分離する。
 - (i) 改良アンチセンスディスプレイ法を初代培養ヒト微小血管内皮細胞に適用し、内皮細胞の増殖促進を指標に血管新生抑制性遺伝子のスクリーニングを行ない、1プールあたり16種のASからなる計512のプールすべてのスクリーニングを完了した。その結果、a) 増殖を促進するプール、b) 低酸素による増殖誘導を阻害するプール、c) 増殖を阻害するプールがそれぞれ複数プール見出された。上記陽性プールのうち、a) は血管新生抑制性遺伝子が、b) は低酸素応答に関与する遺伝子が、c) は増殖等に関わる遺伝子が、プール中のアンチセンス配列により抑制されたと考えられる。
 - (ii) 数回の確認の後、上記3種のカテゴリーより、血管新生抑制性遺伝子の探索に焦点を絞り、a) のカテゴリーより最も顕著な変化を与えたプールをえらび、二次スクリーニングを行った。具体的には、それぞれのプールに含まれていた16種のアンチセンス配列を単独で調製して、内皮細胞の増殖促進を指標にスクリーニングを行ない、

上記の形質変化を引き起した10塩基の単一配列を同定した。

(iii) 同定した10塩基の配列を12塩基に延長して三次スクリーニングを行い、形質変化を引き起す12塩基の単一配列を同定した。

(iv) 同定した12塩基の配列を14塩基に延長して四次スクリーニングを行い、形質変化を引き起す14塩基の単一配列を同定した。

(v) 以上のスクリーニングで同定された、血管内皮細胞の増殖促進を示す単一の14塩基アンチセンス配列を用いて、cDNA/ESTデータベースを検索し、対応する配列を有する候補配列を5種得た。

(vi) ヒト血管内皮細胞での5種の候補配列の発現をRT-PCR法とノーザン法で検討した結果、うち1種 (pICln) の発現が確認され、アンチセンスDNAの標的がpICln遺伝子であることが明らかとなった。

(成果リスト: 11,18)

(3) 分離された遺伝子の構造・機能を明らかにして関連する疾患の分子病態の解析を行なうとともに、これらを利用あるいは標的とした成人病性血管障害の新しい予防・治療原理開発の可能性を検討する。

(i) pICln mRNAの別領域に対するアンチセンスDNAの添加で、血管内皮細胞の増殖促進が再現され、さらに血管内皮細胞の管腔形成が促進された。

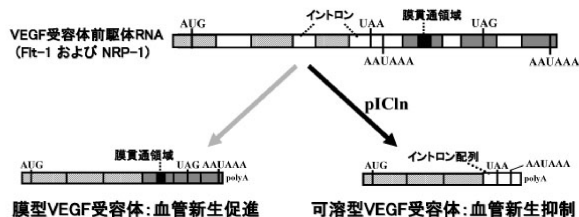
(ii) アンチセンスDNA処理細胞での各種血管新生関連遺伝子の発現を調べたところ、選択的スプライシングによって生じる2種の血管新生抑制性可溶性VEGF受容体 (soluble Flt-1, soluble neuropilin-1) mRNAの発現が特異的に抑制されていることが示された。

(iii) 逆にpIClnを過剰発現させたヒト血管内皮細胞では、soluble Flt-1, soluble neuropilin-1 mRNAの発現が亢進し細胞増殖が抑制されることが示された。

(iv) 以上、今回同定された遺伝子は、選択的スプライシングを制御し血管新生制御に関与するというこれまで知られていなかった新しいタイプの血管新生抑制遺伝子であることが示された。

(成果リスト: 11,20)

pIClnによる血管新生抑制のメカニズム: 選択的RNAスプライシングの制御



(4) アンチセンス法を利用して、多くの成人病の発症に重要な血管の障害を引き起こす遺伝子の同定とその機構解明を行う。

アンチセンスDNAを用いた我々の研究により、糖尿病性血管障害は高血糖状態でグルコースと蛋白質の非酵素的な反応により生成される糖化蛋白advanced glycation endproducts (AGE) が血管細胞上の受容体RAGE (receptor for AGE) と結合することによって引き起こされることが示唆された。そこで、RAGE遺伝子の血管障害における役割について解析を行った。

(i) 血管細胞でRAGEを過剰発現するトランスジェニッ

クマウスを作製して糖尿病を誘発し、血管合併症を解析した。その結果、RAGEの過剰発現は腎症を顕著に増悪した。

(ii) RAGE遺伝子ノックアウトマウスを作製して糖尿病血管合併症を解析した結果、RAGE過剰発現マウスとは逆に、腎症の発症が顕著に抑制された。

(iii) 我々は、ヒトの血管内皮細胞が、それまでまったく知られていなかった、分泌型のRAGEを発現していることを発見した。これは、RAGE遺伝子から選択的スプライシングにより生成されるもので、イントロン9の一部が残り、膜貫通領域をコードするエクソン10が抜けることで、分泌性の可溶性RAGEをコードする。我々はこれをendogenous secretory RAGE (esRAGE) と命名した。

(iv) 我々が発見した可溶性RAGE (esRAGE) は、血管保護作用を持つことが示された。すなわち、可溶性RAGE (esRAGE) は、AGEによる内皮細胞障害の指標であるERKリン酸化亢進とVEGF発現亢進を顕著に抑制した。

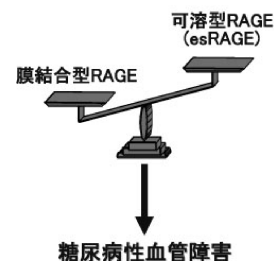
(v) さらに我々は、ヒトの血液中に可溶性RAGE (esRAGE) が実際に存在していることを見出した。可溶性RAGE (esRAGE) 測定用ELISAシステムを開発し、血中可溶性RAGE濃度と糖尿病合併症との関連を解析した結果、合併症をもつ患者は有意に血中の可溶性RAGEの濃度が低いこと示された。これは、可溶性RAGE (esRAGE) が糖尿病血管合併症罹患リスクの予知因子となりうることを示している。可溶性RAGE (esRAGE) については、国内、米国、ヨーロッパで特許を出願した。

(vi) さらに、血中の可溶性RAGE濃度が低いと、動脈硬化にもなりやすいということを示す結果を得た。すなわち、動脈壁肥厚と血中可溶性RAGE濃度は逆相関を示した。

(vii) 以上、RAGEが合併症発症に関与していることが個体レベルで証明された。さらに、膜結合型RAGEが優勢になれば、合併症の危険性が増し、可溶性RAGE (esRAGE) が優勢であれば危険性が下がるということが示され、可溶性RAGE (esRAGE) が糖尿病血管合併症罹患リスクの予知因子となりうるということが考えられた。

(成果リスト: 1-3,5-11,12-15)

選択的スプライシングによって生じる膜型と可溶性RAGEのバランスが糖尿病血管合併症の罹患感受性に影響する



〈国内外での成果の位置づけ〉

我々のアンチセンスディスプレイ法は、機能抑制法による大規模遺伝子スクリーニングの世界的に最初のものとなった。最近では、数年前に動物細胞でもRNAiが機能することが明らかになったことから、抑制効率のよさなどの理由により、RNAiを用いた遺伝子スクリーニングが行われ始めている。我々のアンチセンスディスプレイ法は、こういった機能抑制法による大規模遺伝子スクリーニングの原理的基盤を提供し、先駆となった画期的な試みであったと評価されている。近年、機能面からの哺乳

動物遺伝子同定に、国内外でマウスでの大規模変異導入など行われている。このアプローチは有望であるが、非常に大きな労力を要する、個体レベルでの形質解析が難しい等の困難が存在する。我々が有効性を示した細胞レベルでの機能抑制法による大規模遺伝子スクリーニングは、個体レベルのアプローチの弱点を補いながら、遺伝子機能解析に貢献できるものと期待される。また、我々の研究により、RAGE遺伝子が糖尿病性血管障害に関わることが個体レベルで初めて証明された。さらに、我々が発見した、選択的スプライシングによって生成される内在性の可溶性RAGE蛋白 (esRAGE) は、各種血管障害における防御的働きとこれを用いたリスク予知に関して、大きな注目を集めている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

- (1) 陽性プールの中には、高次スクリーニングで、形質変化を引き起す単一配列を同定できなかったものがある。一次スクリーニングでは効果の低い複数の配列による総量効果が表れていた可能性が考えられた。また、2次構造上アンチセンスDNAのアクセスが困難な、あるいは存在量・半減期などからアンチセンス効果が低いmRNA分子種が存在することが想定される。
- (2) 今回遺伝子同定に用いた14塩基では、データベーススクリーニングで複数の候補が現れた。遺伝子同定の特異性をあげるために、より長い配列が必要と思われる。
- (3) 今回同定した新しい血管新生抑制遺伝子pIClnの作用機序については解明されたが、これを利用あるいは標的とした成人病性血管障害の新しい予防・治療原理開発には至らなかった。

〈今後の課題〉

- (1) アンチセンスディスプレイ法と同じ原理で働き、標的特異性および抑制効果が格段に高いRNAi法を利用した機能性遺伝子スクリーニング法の開発につき検討する
- (2) 2次構造上アンチセンスDNAのアクセスが困難なため、アンチセンス効果が低いmRNA分子種をも対象とするため、2次構造を破壊しながらmRNAに結合できるモルフォリノ誘導体型アンチセンスを利用したアンチセンスディスプレイ法の新バリエーションにつき検討する
- (3) 可溶性VEGF受容体mRNAの選択的スプライシング制御におけるpIClnの詳細な作用機序とこれを標的とした血管新生制御法開発の可能性を検討する。
- (3) RAGE/esRAGEを標的とした血管障害のリスク予知法の開発につき検討する。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文/プロシーディング

1. 0111141846

Tanaka, N., Yonekura, H., Yamagishi, S., Fujimori, H., Yamamoto, Y., and Yamamoto, H.: The receptor for advanced glycation end products is induced by the glycation products themselves and tumor necrosis factor- α through nuclear factor- κ B, and by 17 β -estradiol through Sp-1 in human vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 275 (33), 25781-25790 (2000)

2. 0111141849

Yamamoto, Y., Kato, I., Doi, T., Yonekura, H., Ohashi, S., Takeuchi, M., Watanabe, T., Yamagishi, S., Sakurai, S., Takasawa, S., Okamoto, H., and Yamamoto, H.: Development and prevention of advanced diabetic nephropathy in RAGE-overexpressing mice. *J. Clin. Invest.*

108 (2), 261-268 (2001)

3. 0111141855

Wu, P., Yonekura, H., Li, H., Nozaki, I., Tomono, Y., Naito, I., Ninomiya, Y and Yamamoto, H.: Hypoxia down-regulates endostatin production by human microvascular endothelial cells and pericytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288 (5), 1149-1154 (2001)

4. 0202141637

Yonekura, H., Yasui, K., Sakurai, S., Li, H., Yamamoto, Y., and Yamamoto, H.: Antisense display - A new method for functional gene screen and its application to angiogenesis-related gene isolation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 947 (Atherosclerosis VI), pp.382-386 (2001)

5. 0303191547

Petrova, G., Yamamoto, Y., Muraki, K., Yonekura, H., Sakurai, S., Watanabe, T., Li, H., Takeuchi, M., Makita, Z., Kato, I., Takasawa, S., Okamoto, H., Imaizumi, Y., and Yamamoto, H.: Advanced glycation endproduct-induced calcium handling impairment in mouse cardiac myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 34 (10):1425-1431 (2002)

6. 0303191555

Yonekura, H., Yamamoto, Y., Sakurai, S., Petrova, R. G., Abedin, Md. J., Li, H., Yasui, K., Takeuchi, M., Makita, Z., Takasawa, S., Okamoto, H., Watanabe, T., and Yamamoto, H.: Novel splice variants of the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) expressed in human vascular endothelial cells and pericytes, and their putative roles in diabetes-induced vascular injury. *Biochem. J.* 370 (3), 1097-1109 (2003)

7. 0308081440

Unoki H., Furukawa K., Yonekura H., Ueda Y., Katsuda S., Mori, M., Nakagawara K., Mabuchi H., and Yamamoto, H.: Up-regulation of *cyr61* in vascular smooth muscle cells of spontaneously hypertensive rats. *Lab. Invest.* 83 (7), 973-982 (2003)

8. 0404062140

Sakurai, S., Yonekura, H., Yamamoto, Y., Watanabe, T., Tanaka, N., Li, H., Rahman, A.K.M.A., Myint, K.-M., Kim, C.-H., and Yamamoto, H.: The AGE-RAGE system and diabetic nephropathy. *J. Am. Soc. Nephrol.* 14 (Suppl 3), S259-S263 (2003)

9. 0404062145

Yonemura, Y., Sakurai, S., Yamamoto, H., Endou, Y., Kawamura, T., Bandou, E., Elnemr A., Sasaki, T., Akiyama, T., Takasawa, S., Okamoto, H.: REG gene expression is associated with the infiltrating growth of gastric carcinoma. *Cancer* 98 (7), 1394-1400 (2003)

10. 0404062152

Miura J, Uchigata Y, Yamamoto Y, Takeuchi M, Sakurai S, Watanabe T, Yonekura H, Yamagishi S, Makita Z, Sato A, Omori Y, Yamamoto H, Iwamoto Y.: AGE down-regulation of monocyte RAGE expression and its association with diabetic complications in type 1 diabetes. *J. Diabetes Complications* 18 (1), 53-59 (2004)

11. 0601311825

Li, H., Yonekura, H., Kim, C-H., Sakurai, S., Yamamoto, Y., Takiya T., S., Futo, Watanabe, T., Yamamoto, H.: Possible participation of pICln in the regulation of angiogenesis

through alternative splicing of VEGF receptor mRNAs
Endothelium 11 (5-6) , 293-300 (2004)

12. 0601311833

Yonekura, H., Yamamoto, Y., Sakurai, S., Watanabe, T. and Yamamoto, H.: Roles of the receptor for advanced glycation endproducts in diabetes-induced vascular injury. J. Pharmacol. Sci. 97 (3) , 305-311 (2005)

13.

Sakurai, S., Yamamoto, Y., Tamei, H., Matsuki, H., Obata, K., Li, H., Miura, J., Osawa, M., Uchigata, Y., Iwamoto, Y., Watanabe, T., Yonekura, H., Yamamoto, H.: Development of an ELISA system for a circulating decoy receptor for AGE and its application to type I diabetic patients. Diabetes Res. Clin. Pract. in press (2006)

2) データベース/ソフトウェア

なし

3) 特許など

14. 発明の名称: 可溶性RAGEタンパク質

発明者: 山本 博, 米倉秀人, 山本靖彦, 櫻井 繁, 渡邊 琢夫

出願人: 金沢大学長

出願番号 特願2002-48182号・U2001P85PCT

出願年月日:平成14年2月25日 (2002)

公開年月日:平成15年5月7日 (2003) :特開2003-125786

WO 02/074805 A1 (国際出願日2002.3.19;国際公開日2002.9.26) ; US 2005/0033017 A1; EP 1 380 593 A1

15. 発明の名称: 生活習慣病予知因子

発明者: 山本 博, 米倉秀人, 渡邊琢夫, 山本靖彦, 他

出願者: 金沢大学TLO

出願番号 特願2004-158837号

出願年月日:平成16年5月28日 (2004)

4) その他顕著なもの、

16. 米倉秀人: 血管新生のオートクリン制御. 生化学 (ミニレビュー) 73巻 (1号) , p.27-31 (2001)

17. 米倉秀人: 新しい機能性遺伝子スクリーニング法-アンチセンスディスプレイ法-の開発と新規遺伝子探索への適用. バイオサイエンスとインダストリー ((財) バイオインダストリー協会) , Vol.60 (No.7) , 36-37 (2002)

18. 米倉秀人, 李 慧, 山本 博: アンチセンスDNAを用いた機能的遺伝子同定法-アンチセンスディスプレイ法の原理と適用-. RNAi法とアンチセンス法ミRNAの科学と応用 (関根光雄, 多比良和誠 編) , 講談社サイエンティフィック社, pp.189-199 (2005)