

論文の内容の要旨

論文題目 Long SAGE 法を用いたラット肝臓における LPS 刺激応答遺伝子の包括的解析

指導教官 松島綱治教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

社会医学専攻

氏名 長畑智之

背景

エンドトキシン（内毒素）はグラム陰性桿菌の外膜に存在し、その本体はリポ多糖類（lipopolysaccharide:LPS）であり強力なサイトカイン誘導物質である。血中に放出された LPS は血清蛋白である LPS binding protein(LBP)と結合し、マクロファージ細胞膜上の特異的受容体(CD14)に結合する。また血清中にはマクロファージなどから遊離した可溶性 CD14(sCD14)が存在しており、血管内皮細胞や線維芽細胞などの CD14 を発現していない細胞は、この sCD14 と結合した LPS-LBP 複合体を認識し MD2 と TLR4 の複合体を介し、細胞内にシグナルが伝達される。これにより IL-1、TNF、IL-6、IL-8 などの炎症性サイトカインが放出され、その結果、好中球が組織に集積して様々なメディエーターを放出する。エンドトキシンが血液中に放出された状態がエンドトキシン血症である。敗血症は菌血症（bacteremia）に重篤な全身性感染症所見を伴う状態と定義され、細菌やその毒素が局所に留まらず全身に波及し、重篤な全身性の生体反応を引き起こされた病態として捉えられる。重症化するとショック、DIC による出血傾向を引き起こし、多臓器不全へと進展する。このことによる肝不全は血漿交換などの治療が成されているが死亡率も高く重要な疾患であると考えられている。

LPS 投与したヒト肝細胞、マウス、ラットの肝臓においてこれまで炎症、代謝、毒性などの際に重要な働きをしている IL-1 β 、IL-8、IL-6、TNF- α など種々のサイトカイン、

UDP-glucuronosyltransferase、dihydropyrimidine dehydrogenase、phosphoenolpyruvate carboxykinase など薬物代謝酵素の発現変化、またラットにおいて albumin、transferrin、haptoglobin、lipopolysaccharide binding protein、alpha-1-glycoprotein、angiotensinogen、alpha-2-macroglobulin、metallothionein、heme oxygenase などの個々における遺伝子発現の変化、また CLP (cecal ligation puncture) を用いた敗血症モデルを用いた cDNA microarray 解析、マウスによる DNA microarray 解析は成されているが、LPS 投与したラットの肝臓における応答遺伝子発現の包括的解析は成されていない。一方、ラットは代謝系、毒性試験などにおいて実験動物として使用されているがヒトとの比較において発現遺伝子の詳細な解析は成されておらず検討することは非常に意義がある。

そこで今回行った正常ラットの肝臓の結果と以前私達の研究室で行った正常マウス、ヒトの肝臓との結果から遺伝子発現を調べたところ、ラットはヒトの代謝酵素などをマウスと比べ鋭敏に発現している傾向が認められ、ヒトと非常に近いことが観察された。そのため毒性を評価する上でラットでの評価は意義があると思われた。そこで、多くの毒物がある中、今回、我々は LPS 投与によりラット肝臓で発現変動する遺伝子を系統的に調べるために Long SAGE 法を用いて解析を行った。cDNA microarray では既存の搭載遺伝子の発現解析に限定されるのに対し、Long SAGE 法は細胞、臓器における遺伝子発現の迅速なスクリーニング技術であり、数万個の 21bp からなる cDNA 断片の塩基配列を決定し SAGE データベースを検索することにより各細胞、臓器における未知、既知を問わず各遺伝子発現状況を定量することが出来る利点がある。

方法

8 週令、雄、SD ラットに LPS (E-coli o55:B5, 2mg/kg BW) を i.p. し 6 時間後の肝臓から Total RNA を抽出し、mRNA を精製、Long SAGE library を作製し、解析を行った。

各々のサンプル(コントロール群、LPS 投与群)から RNA-Bee により Total RNA を精製し、poly(A) + mRNA を μ MACS mRNA isolation kit を用いて単離した。200ng の poly(A) mRNA を SuperScript Choice System for cDNA Synthesis により、5' 末端をビオチン化したオリゴ d(T)18 をプライマーとして cDNA を合成した。cDNA を 50U の制限酵素 NlaII で一晩消化した後、cDNA の 3' 側のフラグメントを 1mg の Dynabeads M-280 Streptavidin と結合させた。これを 2 つに分け、それぞれに異なるリンカーを 10U の T4DNA リガーゼを用いてライゲーションした。

リンカーの配列は、

1A:5' -TTTGGATTTGCTGGTGCAGTACAACCTAGGCTTAATATCCGACATG-3'

1B:5' -TCGGATATTAAGCCTAGTTGTACTGCACCAGCAAATCC AminoModifiedC7-3'

2A:5' -TTTCTGCTCGAATTCAGCTTCTAACGATGTACGTCGACATG-3'

2B:5' -TCGGACGTACATCGTTAGAAGCTTGAATTCGAGCAG AminoModifiedC7-3'

であり、1Aと1B、2Aと2Bを等量混合し、95℃で2分、65℃で10分、37℃で10分、室温で20分と徐々に冷やしながらアニーリングさせたものを用いた。このリンカーには制限酵素 MmeI の認識部位が含まれており、ライゲーション後 40U の MmeI を 10mM HEPES, pH8.0、2.5mM KOAc、5mM MgOAc、2mM DTT、40uM S-adenosylmethionine 存在下、37℃、2.5時間反応させて beads から cDNA を切り離した後、2群に分けた cDNA をお互いにライゲーションさせた。その後、それぞれのリンカーに含まれる配列をプライマーとして、PCR によりライゲーション産物を増幅した。プライマーの配列は、1: 5' -GTGCTCGTGGGATTTGCTGGTGCAGTACA-3'

2: 5' -GAGCTCGTGTGCTCGAATTCAAGCTTCT-3'

であり、95℃で30秒、55℃で1分、70℃で1分を28サイクル行った。12%のPAGE(160V、2時間)にて泳動及び精製後、これを再び NlaIII で消化し、1つの cDNA 由来の tag が2つ繋がった ditag を得た。5U の T4 リガーゼで 16℃、2時間反応させ、ditag がいくつも繋がった concatemer を作製し、8%のPAGE(160V、2.5時間)で泳動し、600bp 以上のバンドを抽出、精製してベクター pZero-1 の SphI 部位にサブクローニングした。このベクターには抗生物質 Zeocin の耐性遺伝子の他に、マルチクローニングサイトを含んだ自殺遺伝子が組み込まれている。従って、セルフライゲーションを起こした場合、プラスミドは大腸菌内で複製出来ずコロニーを形成出来ないため、サブクローニング出来たものだけがコロニー形成することになる。コンピテントセル (ElectroMax、Invitrogen Co.) にエレクトロポレーション法(400Ω、25μF、1.8kV)にてトランスフォーメーションし、コロニーPCR法により concatemer を増幅した。効率良くシーケンスを行うため、600bp 以上の concatemer を選択し、これをテンプレートとして BigDye Terminator kit でシーケンス反応を行い、ABI3730 自動シーケンサーを用いて tag の配列を決定した。シーケンスファイルは SAGE プログラム (Johns Hopkins 大学の Kinzler 博士らにより供与) により解析した。シーケンスエラーを除き、全部で 63,324 tags (うち正常ラット肝臓より 30,916 tags、LPS 投与ラット肝臓から 32,408 tags) を解析した。遺伝子の同定は NCBI のホームページ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SAGE/>) で行った。

結果ならびに考察

今回、我々は正常ラット肝臓、LPS 投与ラット肝臓ライブラリーから得た 30,916 tag、32,408 tag をシーケンスし 16,000 種類以上の遺伝子 tags を得た。

そのうち、正常ラット肝臓に対し発現が上昇、減少している上位 100 の遺伝子を同定した。LPS 投与によりラット肝臓から発現した遺伝子の上位のものとして mig、guanylate binding protein2 (Gbp2)、CD14 などの発現が上昇し、発現が減少したものとして sulfotransferase hydroxysteroid gene 2、LAR receptor-linked tyrosine phosphatase、UDP-glucuronosyl transferase、肝薬物代謝酵素 (cytochrome P450 3A2、2C6、1A2、3A18、2D18、2C39)、トラン

スプーター (solute carrier family 3 member 1、solute carrier family 27 member 32、FXFD-domain-containing ion transport regulator 2、organic anion transporter、kidney specific organic anion transporter、solute carrier family 26 member 1) などの取り込み型、排出型のトランスポーターの発現変動が観察された。LPS による肝傷害により薬物代謝系酵素、トランスポーター遺伝子変動が引き金となりバランスが崩れ代謝物のうっ滞による毒性が生じていると考えられる。マウス、ヒトの正常な肝臓で遺伝子発現解析されたプロファイルと比較すると、ラットのプロファイルはヒトで発現している薬物代謝酵素、トランスポーターをマウスよりも顕著に発現していることが認められた。また、ヒトと比較してもラットのライブラリーの方がより上位に薬物代謝酵素などを発現している傾向が強いことも観察出来た。これらの結果からもラットはマウスに比べ、よりヒトと代謝系などが似た傾向であることが示唆され、薬物の毒性評価などにおいてもマウスよりもラットの方が有用なモデル動物となりうるものと考えられた。

ヒトゲノム配列解読完了が宣言された今、生命現象の分子レベルでの解明、様々な疾患に対する新規治療法の開発、併用薬の酵素誘導に起因する二次疾患の阻止、テーラーメイド医療、疾患の診断、予防、薬効、副作用の予測、環境化学物質による毒性等においてこれらのデータが広く有効活用されることが期待される。また、今後、これらの肝薬物代謝酵素、トランスポーターを含んだデータは新たな薬物毒性スクリーニングシステム、cDNA 環境毒性チップなどの評価に有用であると考えられる。