

新規人工染色体ベクターを用いた
DNA-PKcs遺伝子発現制御系の構築

鳥取大学医学部基盤病態医学講座器官病理学分野 (主任 井藤 久雄教授)

大槻 明 広

Establishment of a gene expression control system in a novel
Human Artificial Chromosome (HAC) vector.

Akihiro OHTSUKI

*Tottori University Graduate School of Medical Sciences, Department of Pathology
Division of Organ Pathology, Department of Microbiology and Pathology,
Faculty of Medicine, Tottori University*

ABSTRACT

A major obstacle in constructing a DNA-PKcs gene expression system using conventional vectors is the high expression levels of this gene which results in a decrease in cell proliferation and eventual cell death. One solution to this problem is the use of a Human Artificial Chromosome (HAC) vector. HACs have several advantages over conventional vectors such as: maintenance of a constant copy number in a host cell due to their stability, and the ability to accommodate multiple gene regulation elements or a huge genome, since there are no or less size limitations for the DNA to be introduced into them. Katoh et al. constructed a novel HAC called Δ qHAC, generated by deletion of a distal portion of the long arm of human chromosome 21 and insertion of a lox P sequence for gene cloning. In this present study, I attempted to construct a DNA-PKcs expression cassette housed in a Δ qHAC vector wherein DNA-PKcs expression levels can be artificially controlled by varying doses of tetracycline. The components of this novel DNA-PKcs expression system include: a tetracycline-binding transactivator protein, rtTA (Tet-On) or tTA (Tet-Off), a tetracycline-responsive element positioned next to a minimal human cytomegalovirus promoter, and the cDNA of human DNA-PKcs gene downstream of these two elements. RT-PCR analysis of selected clones derived from a DNA-PKcs-deficient CHO cell line harboring the DNA-PKcs/ Δ qHAC vector exhibited a proportional change in DNA-PKcs transcript levels in response to varying doses of doxycycline, a derivative of tetracycline. These results demonstrate that the combined use of Δ qHAC and the tetracycline gene regulation system is an efficient artificial regulation system for DNA-PKcs and will be useful for functional studies of this gene.

(Accepted on 22 September, 2003)

Key words : 1. Human artificial chromosome
2. Tet system
3. DNA-PKcs
4. V3 cell

はじめに

安定な遺伝子発現を得るため、既存のプラスミドあるいはウイルスベクターを用いて遺伝子を細胞に導入すると、導入遺伝子は宿主染色体に組み込まれ、その染色体上の位置や周囲のDNA配列やクロマチン構造の違いによって影響を受け、導入遺伝子の発現が活性化または不活性化を受ける¹⁾。このため宿主ゲノムの改変なく目的遺伝子を導入し、かつ細胞内で安定に導入遺伝子の発現を確立・維持させることは困難であった。近年、染色体工学の進展に伴って、新しいDNA導入法としてヒト人工染色体 (Human Artificial Chromosome: HAC) が開発され²⁻⁹⁾、培養細胞に大きなゲノムDNAを導入することができるようにな

った¹⁰⁻¹²⁾。しかし既存のHACベクターは詳細な構造が不明であったり、不要な遺伝子を含んでおり、遺伝子発現ベクターとして理想的とはいえなかった。

加藤らはこのような欠点を改良し、自律複製・分配、安定維持が可能であり、なおかつ余分な遺伝子の持ち込みがない最小単位のHACベクター (Δ qHAC) を作製した。まず、ニワトリpre-B細胞由来のDT40細胞中で、テロメア配列を人工的に挿入することにより切断を行なう染色体テロメアトランケーションによってヒト21番染色体長腕の大部分を排除し、全長16Mbまで短縮した。次に、DNAクローニングサイトとしてloxP配列¹³⁻¹⁵⁾を挿入している (図1)。 Δ qHAC上には、プラストサイジン耐性マーカー遺伝子が存在し、

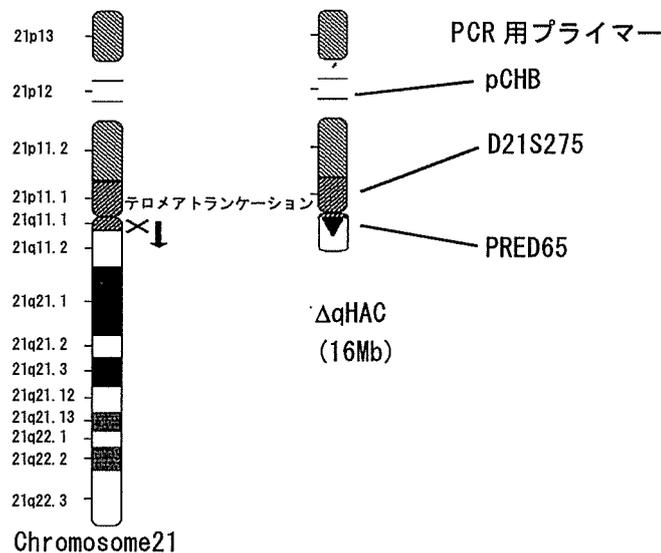


図1. ヒト21番染色体由来人工染色体 Δ qHACの構築

Δ qHACは、テロメア配列を人工的に挿入することによって切断を行う染色体テロメアトランケーションによってヒト21番染色体 (左) から長腕の大部分を削除し、DNAクローニングサイトとしてloxP配列 (黒三角) を挿入している (中央)。微小核融合法によって細胞に移入された Δ qHACに大きな欠失がないことを確認するために、ヒト21番染色体上のsequence tagged site (STS) および既知DNA配列にPCRプライマーを設定 (右) し、このプライマーによるPCRを行い、これらの部位に欠失のない Δ qHACを保持するクローンを選択した。

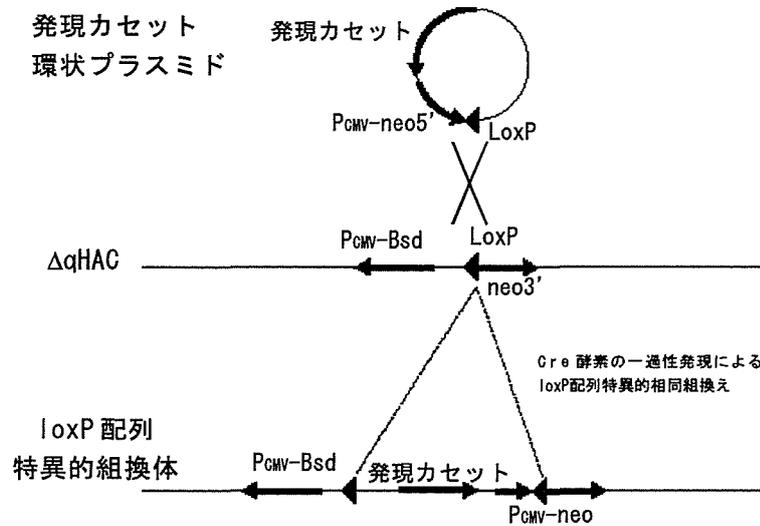


図2. Cre酵素によるloxP配列を介した発現カセットプラスミドの Δ qHACへの部位特異的挿入
 発現カセットプラスミド（上段）は環状で細胞内に導入されるため、線状化したプラスミドに比べランダムな染色体への挿入頻度が低い。同時に導入される環状Cre発現プラスミドからはCreが一過性に発現し、loxP配列をもつDNA間での組換えを促す結果、発現カセットは Δ qHAC（中段）に挿入される。この挿入反応は可逆的なもので逆反応として発現プラスミドが環状化した状態で欠失することもある。しかし、発現カセットプラスミドの5'側と Δ qHAC上の3'側neo耐性遺伝子は、発現カセットが部位特異的挿入されたときのみ全長neo耐性遺伝子を発現するので、G418薬剤耐性クローンを選択することで、loxP配列特異的組換え体（下段）を保持する細胞を得ることが出来る。また、 Δ qHAC長腕側にはブラストサイジン耐性遺伝子（P_{CMV}-Bsd）が存在する。

微小核細胞融合法を用いて、任意の哺乳動物細胞に移入が可能となっている。 Δ qHAC上で発現させたい遺伝子は、まずloxP配列とそれに隣接するneo耐性遺伝子5'側のみを含むプラスミド上にクローニングしておく。このプラスミドとCre発現ベクターを同時に Δ qHACを有する細胞に導入することにより、loxP配列を介した組換えを起こさせ目的遺伝子が Δ qHAC上に挿入される。 Δ qHACはloxP配列に隣接して3'側neo耐性遺伝子を含んでいるため、loxP配列特異的組換え体を持った細胞クローンは、neo耐性遺伝子全長を含みG418薬剤耐性となる（図2）。このHACベクターを用いることにより、宿主細胞のゲノム配列を変えることなく、単一コピーを安定で保持し、またHACベクター上の一定部位への挿入により目的遺伝子が保持されることから、隣接する遺伝子や発現エレメント、クロマチン状態などの影響が一定しており、常に均一の条件で外来遺伝子を

挿入することが可能となった。

DNA二重鎖切断（DNA double-strand breaks, DSBs¹⁶⁾）は、正常細胞分裂時や電離放射線照射（ionising radiation, IR）によって発生し、この損傷は細胞にとって致命的である。脊椎動物においてDSBsの修復機構には、相同組換え修復（homologous DNA recombination, HR）と相同組換えによらない末端結合（nonhomologous DNA end joining, NHEJ）の2つの機序がある。HRは相同染色体または姉妹染色分体のDNA相同配列を利用し、NHEJは大きな相同配列を利用することなく切断末端を直接結合することによってDSBsを修復する。このうちNHEJにはDNA-dependent Protein Kinase (DNA-PK)¹⁶⁾、XRCC4¹⁷⁾、およびligaseIV¹⁸⁻²⁰⁾が関わっており、免疫系の発達に重要な抗体の多様性を規定しているV(D)J recombinationの過程においても利用されている。

DNA-dependent Protein Kinase (DNA-PK) は470kDaの酵素活性サブユニット (DNA-PKcs) とKu70 (70kDa) とKu80 (86kDa) のヘテロ2量体からなる制御サブユニットから構成されているセリン/スレオニンタンパク質キナーゼである^{16, 21)}. DNA-PKcs欠損マウスはジーンターゲットングの手法を用いてつくられ, 自然発生のSCIDマウスと同一の重症複合免疫不全を示し, 放射線感受性の上昇やV(D)J recombinationの障害といった表現型をもつ²²⁾. また, 重症複合免疫不全マウスでは, 発癌率の上昇が見られるが, これが成熟B, T細胞が減少したためであるのか, または直接DNA修復機構の破綻が原因であるのかは不明である. したがって, DNA-PKcsと発癌リスクを評価するためには, 生後成熟リンパ球数が上昇するまでDNA-PKcsを発現し, その後ノックアウトされるような発現制御システムが望まれた.

DNA-PKcs遺伝子に変異をもつCHO細胞株のV3細胞では放射線感受性が高いが²³⁾, V3細胞内でのDNA-PKcsの大量発現は細胞毒性あるいは細胞増殖の抑制を引き起こすと考えられる. 相補性の確認のためのDNA-PKcs発現系の構築は従来のベクター系では非常に困難であり²¹⁾, この点でも新たに人工的に発現を制御するシステムが必要と考えられた.

さらにHRとNHEJは相互に補完しあい多数の経路によってDNA修復機構を構成すると考えられ²⁴⁾, 詳細な反応機序を検討するために二重欠損モデルの作製が有効であると考えられる. 二重欠損モデルでは致死率が非常に高いので, 単遺伝子欠損モデルを作製したのち人工的な遺伝子発現制御システムによって二重欠損とすることで, モデルの作製が期待できる.

本研究ではHACベクター上に, テトラサイクリン (Tc) による誘導系 (Tet system) を利用して巨大なDNA修復遺伝子であるDNA-PKcsの人工的な発現制御を可能とするベクターを作製した. Tet-systemには, Tet-Off²⁵⁾とTet-On²⁶⁾があり, Tet-Off systemでは, Tcまたはその誘導体であるドキシサイクリン (Dox) が存在すると遺伝子発現がオフになる. 一方, Tet-On systemでは, TcまたはDoxにより遺伝子が発現する. Tet-Off systemにおいては, 大腸菌のテトラサイクリン耐性オペロン遺伝子を負に調節するTet

リプレッサータンパク質 (TetR) と単純ヘルペスウイルスVP16活性化ドメイン (AD) 融合体であるテトラサイクリン制御トランス活性化因子 (tTA) が組み込まれる. このタンパク質はTcの非存在下で, tetオペレーター配列 (tetO) の7回反復配列からなる応答エレメント (TRE) に結合し, 隣接するエンハンサー部を含まない最小CMVプロモーター (PminCMV) からのmRNAの転写を活性化するが, Tcと結合したtTAはTREに結合できずmRNAの転写は行われぬ. Tet-On systemでは, tTAの4つのアミノ酸残基を変化させることによって応答が逆転したreverse tTA (rtTA) が組み込まれる. 従来のベクター系では, DNA-PKcs遺伝子とTet systemを別々に細胞内に導入していたが, ΔqHACを用いることによって, 一度に導入することが可能となる. 実際の発現カセットは, ΔqHAC上に, (r) tTA発現カセットとTRE-PminCMVによって転写制御されるヒトDNA-PKcs遺伝子cDNAからなるDNA-PKcs発現カセットを構築した (図3). このHACベクターを導入した細胞はDNA-PKcs遺伝子発現をDox投与により制御することが可能になると考えられた.

材料および方法

発現カセットの作製

1. 第1世代

pBluescriptIISK (+) (ストラタジーン) ベクターの制限酵素切断部位a) NotI-HindIII, b) HindIII-ClaI, c) XhoIに, それぞれa) XhoIをNotIに改変したpTet-On (またはpTet-Off) (クロンテック) の(r)tTA領域を含むNotI-HindIII領域, b) SmaIをClaIに改変したpBS226 (ライフテック) のHindIII-ClaI断片, c) pTRE-2 (クロンテック) のXhoI-SalI断片を挿入した. このプラスミドの2つのNotI切断部位では含まれるTRE-PminCMVおよびloxP-neo5'領域を, pKDP-J1²¹⁾のNotI部位に挿入し目的のDNA-PKcs発現カセット (pTNTneoDP, pTFTneoDP) を得た (図3, 第1世代).

2. 第2世代

第1世代のベクターから, neo耐性遺伝子のCMVプロモーターを削除して, TREの両側にPminCMVを挿入することによって, neo耐性遺伝子のCMVプロモーターによるDNA-PKcs遺伝

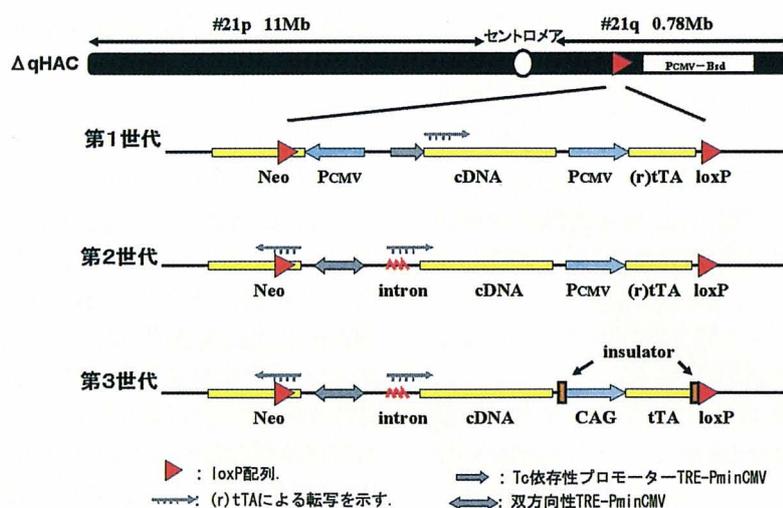


図3. DNA-PKcs発現カセットプラスミドの構築と Δ qHACへの挿入

Δ qHACの基本構造を示す(最上段)。 Δ qHAC長腕側にはプラスタサイジン耐性遺伝子(P_{CMV} -Bsd)が存在する。赤い三角で示したloxP配列に下3段の第1から3世代のテトラサイクリン誘導システムとDNA-PKcsの発現カセットが挿入される。第1, 2世代は本研究に用いられたのもで, 第3世代は検討中のものである。

子の発現抑制の可能性を取り除いた。また, β グロブリンイントロン配列を挿入することによって, タンパク質合成効率の改善を期待した。

pCAGGS²⁷⁾をBssHIIとEcoRIで処理して β グロブリンイントロンを切り出し平滑末端化後, pBluescriptIISK (+)のSmaI部分に挿入した。これをPstIで処理して, pBI (ストラタジーン)のPstI部分に挿入した(pBI-beta)。また, pTNTneoよりプライマーTN1: 5'-CCGAC-TGCAGAGGATCTGGAGGCCACCATG, TN2: 5'-CTAGAACTAGTGGATCCCCCGGを用いて, CMVプロモーターの下流neo耐性遺伝子の開始コドン上流からloxP配列を含む部分をPCRで増幅し, neo耐性遺伝子の上流のXbaIをPstIに改変したPCR産物を得た。XhoIをNotIに改変したpTet-On (またはpTet-Off)のNotIから(r)tTA領域下流のHindIIIおよび, PCR産物のHindIII-PstI部分をpBluescriptIISK (+)のNotI-PstI領域に挿入し, このプラスミドのEcoRV-XhoI領域にpBI-betaのEcoRV-SalI領域を挿入した。得られたプラスミドの2つのNotI切断部位ではさまれる調節領域をpKDP-J1のNotI切断部位に挿入し目的のDNA-PKcs発現カセット(pBITNDP, pBITFDP)を得た(図3,

第2世代)。

微小核融合法による人工染色体の移入

ドナー細胞を25 cm²遠心用フラスコ(コースター)中で細胞密度が約70%飽和程度まで培養し, コルセミド(0.10 μ g/ml, デメコルシン, 和光純薬)を含む培養液(20%牛血清(以下BS), イーグルF12培地(以下F12))中で60から72時間培養して微小核を誘導した。培地を除去し, 予め37°Cに保温しておいたサイトカラシンB(10 μ g/ml DMEM中)溶液を遠心用フラスコに満たし, アクリル性遠心容器に遠心用フラスコを挿入し, 34°C, 8000rpm, 1時間の遠心を行った。微小核を無血清DMEMに懸濁して回収し, フィルターで濾過して精製した。レシピエント細胞を80%飽和の状態まで培養した60 mm細胞培養ディッシュ(ファルコン)に, 精製した微小核(12フラスコ分)を加えPEG溶液で融合した。48時間後にトリプシン処理により細胞を分散し, 8 μ g/mlのプラスタサイジン(Blasticidin S Hydrochloride, フナコシ)を含む選択培地(10%BS, F12)で培養した。約2週間の培養の後, 出現した薬剤耐性コロニーを単離した。得られた耐性クローンは, ヒト21番染色体短腕上のSTS

マーカー-D21S275と短腕上プライマー-pCHB (F: 5'-CGAGGTGACTCTCGGTTTGC, R: 5'-TTTCGCAAGCAGGCATTTG) および長腕上のプライマー-PRED65 (F: 5'-GCCTGGCATC-TTCCTCAATA, R: 5'-TTGCATGCCTGTGG-TACTGT) でPCRを行い (図1), Δ qHACに大きな欠失がないことを確認した. さらに染色体解析ならびにFISHにて移入された Δ qHACを確認した.

発現カセットプラスミドのトランスフェクションおよびG418耐性クローンの単離

発現カセットプラスミドのHACベクターを保有するCHO細胞への導入は電ポレーション, またはリポフェクション法を用いた.

1. エレクトロポレーション

ヒト21番由来人工染色体を保持するCHO細胞 (CHO (#21) bsd-79-1またはV3) をトリプシン処理し, 約 5×10^6 細胞を0.8 mlのリン酸バッファー (PBS) に懸濁した. 10 μ gの発現カセットプラスミドとCre酵素発現ベクター-pBS185 (ライフテック) 20 μ g存在下でジーンパルサー (バイオラッド) を用いて電ポレーションを行った. 容量25 μ Fのコンデンサに750 Vで電荷し電極間距離4 mmのエレクトロポレーションセルを用いて放電した. エレクトロポレーションした細胞を, 100 mm細胞培養ディッシュ (ファルコン) 10枚に播種し培地 (F12, 10%BS) を加えた. 48時間後に800 μ g/mlのG418 (GENETICIN, シグマ) と8 μ g/mlのブラストサイジンを含む培地と置き換えた. 約2週間後に薬剤耐性コロニーを単離した.

2. リポフェクション

ヒト21番由来人工染色体を保持するCHO細胞 (CHO (#21) bsd-79-1またはV3) を60 mm細胞培養ディッシュ中に細胞密度が約80%飽和程度まで培養したのち, 10%BS含む無抗生物質F12培地に培地を交換した. 導入するプラスミドは, 2 μ gの発現カセットと4 μ gのpBS185 (ライフテック) を無血清DMEM250 ml中に混和し, lipofectamine2000 (インビトロジェン) 5 μ lをDMEMで250 μ lに希釈し5分間室温に置いた溶液に加え, さらに20分間室温に置いた. このプラスミドを無抗生物質培地に加え37°C, 5% CO₂で4時間培養後, 培地を交換した. プラスミドを加えて24時間後に100 mm細胞培養ディッシュ3枚に播種し,

800 μ g/mlのG418と8 μ g/mlのブラストサイジンを含む培地 (F12, 10%BS) を加えた. 約2週間後にコロニーを単離した.

発現カセットの導入の確認

発現カセットを導入しG418耐性となったクローンは, HAC上のloxP配列を介した組換えが起こっていると考えられた. さらに目的の発現カセットが導入されていることを確認するためにDNA-PKcs遺伝子のcDNA配列をもちいたプライマーオリゴヌクレオチドDP-28: 5'-CACTC-CGGGCCTTCCGCTGAGAC, DP-29: 5'-GTTCTTGGGCACGAATGTTGTGAを用いてPCR増幅を行った. 反応条件は, 変性94°C 20秒, アニーリング62°C 20秒, 伸長72°C 1分を35サイクル行った.

RT-PCRによるDNA-PKcs遺伝子発現の確認

目的の細胞クローンを100 mm細胞培養シャーレに播種し, 800 μ g/mlのG418, 8 μ g/mlのブラストサイジン, 100 ng/mlのDox (Doxycycline hydrochloride, シグマ) を含むF12で3日間培養した後, 細胞質RNAをRNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した. 2 μ gの抽出したRNAよりスーパースク립ト・ファーストストランドシンセシスシステム (SuperScript First Strand Synthesis System for RT-PCR, GIBCO) を用いて, cDNA合成を行った.

得られたcDNAよりDNA-PKcsの発現を確認するために, ヒトDNA-PKcsのmRNAに対するプライマーオリゴヌクレオチドDP-28, DP-29を用いてPCR増幅を行った. 反応条件は, 変性94°C 20秒, アニーリング62°C 20秒, 伸長72°C 1分を30サイクル行った.

ルシフェラーゼアッセイ

60 mm細胞培養ディッシュに60%飽和程度の細胞にリポフェクトアミンおよびブラス試薬 (インビトロジェン) を用いてpBI-GL (クロンテック) 1 μ g, pRL-SV40 0.2 μ g (プロメガ) を導入した. ルシフェラーゼ活性はデュアルルシフェラーゼ定量システム (プロメガ) を用いて計測した. つまり, 24時間培養した後, 細胞をPassive Lysis Bufferを用いて回収しホタルおよびウミシイタケルシフェラーゼについて, それぞれの発光

試薬を加えた10秒後から30秒間の発光強度をルミノメーターで計測した。

蛍光色素標識法 (Fluorescence in situ hybridization) FISH

約80%飽和程度になった培養細胞に最終濃度0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のホルセミドを添加し37°Cで2時間培養した後、細胞を回収し0.075 M, KClにより低張処理しカルノア液 (メタノール:酢酸=3:1)により固定した。この固定標本をパスツールピペットで少量スライドガラスに落としガスバーナーで乾燥させた。ヒト染色体特異的プローブDNA (Cot-1) をニックトランスレーションキット (Roche) を用いてジゴキシゲニン標識しホルムアミドによって変性させた。作製した染色体標本は、70°C, 70%ホルムアミド/2 \times SSC溶液にて変性した。ハイブリダイゼーション溶液 (4 \times SCC, 20% Dextran sulfate, 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA) と変性済みプローブDNA溶液を等量ずつ混合した。スライドあたり20 μl の混合溶液を標本に滴下し、37°Cで一晩ハイブリダイゼーションを行い、洗浄緩衝液 (50%ホルムアミド, 2 \times SSC) で洗浄した。ジゴキシゲニン標識したプローブを抗ジゴキシゲニン-ローダミンで検出した。

結 果

プラスミド上で構築した2つの遺伝子ユニットからなる第1世代のテトラサイクリン依存性DNA-PKcs発現カセットを次のように作製した。4つの構成要素、1) サイトメガロウイルスプロモーター (P_{cmv}) の制御下でテトラサイクリンによる誘導に必要なrtTA, 2) rtTA とDoxで制御されるTRE-PminCMVの下流に置かれたヒトDNA-PKcs遺伝子cDNA, 3) 選択マーカー用の5'領域のみを有するneo遺伝子、ならびに4) ΔqHAC 組み込み用のloxP配列からなるプラスミドを構築した (pTNTneoDP, TetOn) (図3 第1世代)。このDNA-PKcs発現用カセットを、テロメアトランケーションにより長腕遠位を削除し、長腕近位にloxP配列を導入したヒト21番由来人工染色体 ΔqHAC を保持するハムスター細胞株 (CHO (#21) bsd-79-1) に導入を行った。その際同時に、Cre組み換え酵素遺伝子を一過性に発現させることで、loxP配列間の部位特異的組み換え反応により、目的とするカセットを人工染色体に挿入し

た。目的の組み換え体はG418選択培地で10日間培養後に耐性クローンとして得られた。これらのクローンでDNA-PKcs遺伝子が実際に細胞内に導入されていることを確認するためにPCRを行った。各細胞クローンのゲノムDNAから、ヒトDNA-PKcsのcDNA特異的プライマーを用いてその配列を検出したところ、7クローン中6クローンでcDNAの存在が確認された (細胞名DPN, 発現頻度6/7=86% 以下同じ)。

この6クローンにおいてDox存在下でのDNA-PKcs発現をRT-PCR法により確認した (図4-A)。しかし、Tet-On systemを組み込んでいるため、Doxの非存在下では発現が抑制されるはずであるが、実際にはかなりの量の発現が認められ、かつその発現が逆に上昇しているものもあり、Doxによるコントロールが十分でなかった (図4-B)。この現象が、宿主細胞に依存しているかどうかを検討するため、このうち特に発現の多かったDPN-B2のDNA-PKcs発現カセットを含む ΔqHAC を微小核融合法によりV3細胞に移入した。G418とBS存在下で薬剤耐性株を6クローン得た。ゲノムDNAのPCRでは6クローンすべてがDNA-PKcsのcDNAを保持していた。ところが、DNA-PKcsの遺伝子発現をRT-PCRで確認したところ、遺伝子の発現は確認されなかった (VHDPN, 0/6=0%)。さらにrtTAの発現が十分得られていることを確認するために、ルシフェラーゼアッセイによって外来に導入したテトラサイクリン依存性ルシフェラーゼ遺伝子発現のDoxによる制御を確認したところ (図5, VHDPN1-6), Doxを加えない状態でもルシフェラーゼの活性があるため、Doxの有無でルシフェラーゼ活性の変化は最大で2倍未満であり、良好な発現制御が得られていなかった。

このような結果は微小核融合法の過程でHACの損傷があった可能性を考えたため、先にV3細胞に発現カセットを保持しない ΔqHAC を移入した後、発現カセットを導入することにした。V3細胞に ΔqHAC を導入しプラスミド存在下で薬剤耐性クローンを6クローン得た。これをヒト21番染色体上の既知DNA配列に対するPCRプライマー (D21S275, PCHB, PRED65) (図1) でPCRを行い大きな欠失のないと考えられる ΔqHAC を保持するV3H3クローンを得た。また、FISH解析を行い、V3H3細胞は ΔqHAC を1つだ

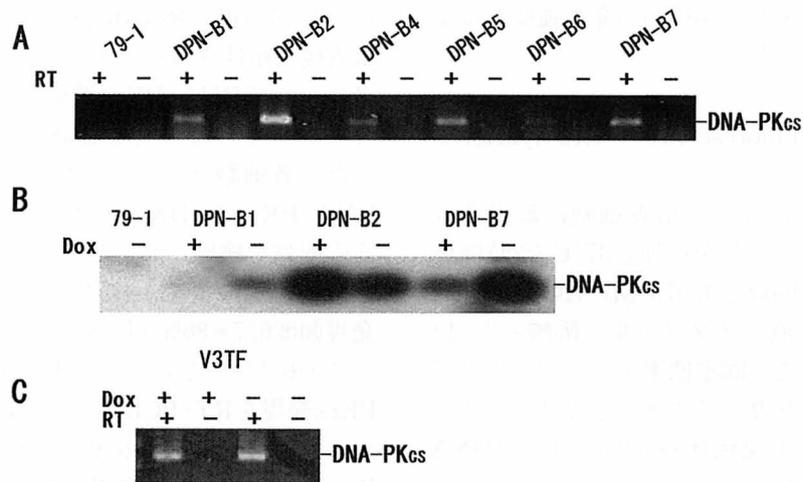


図4. RT-PCRによるDNA-PKcsのmRNAの発現-1

- A: DPN-B1からB7の7クローンでDNA-PKcsのmRNAの発現が確認された。(79-1は発現カセットを含まないΔqHACを保持するCHO細胞)
- B: Dox(100ng/ml)を加えたときのDPNにおけるDNA-PKcsのmRNA発現の変化をNorthern Blotによって示す。B2ではDoxを加えることで発現量が増えるが、逆にB1, B7では減少している。また、Doxを加えなくてもDNA-PKcsのmRNA発現が確認できた。
- C: V3TFも1クローンでmRNAの発現が確認された。Dox(100ng/ml)を加えた場合でもDNA-PKcsのmRNA発現が確認できた。

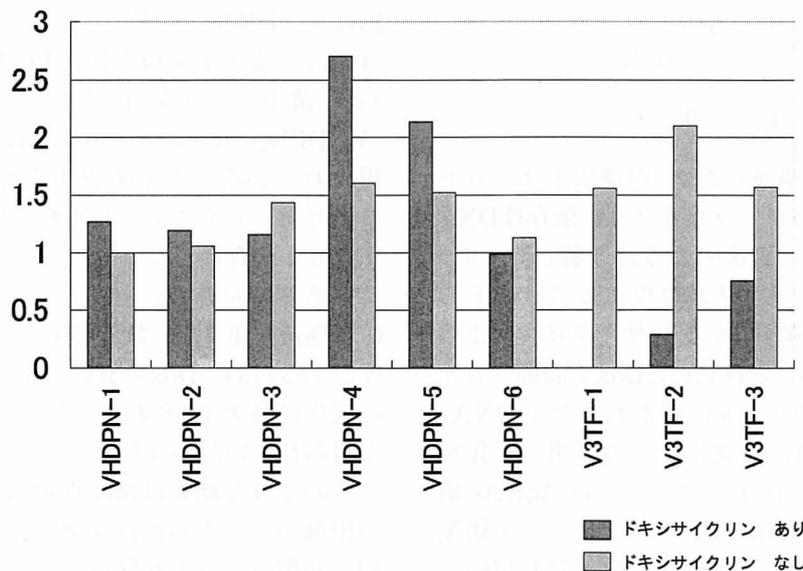


図5. ルシフェラーゼアッセイによる(r)tTAの転写活性

pBI-GLプラスミドからホタルルシフェラーゼが、(r)tTAによって発現される。対照として同時に導入するpRL-SV40プラスミドからは、ウミシイタケルシフェラーゼが(r)tTA非依存的に発現する。ホタルとウミシイタケルシフェラーゼの比を示すことで、(r)tTAの転写活性を比較した。(r)tTAの転写が全くない場合、グラフ上0となる。VHDPNは、rtTA (Tet-on)を発現しており、Doxを加えた場合転写活性が上昇すると考えられた。VHDPN4, 5では、Doxを加えた場合活性が上昇したが、Doxを加えない場合でも、他のクローンと同程度の活性が見られた。一方、V3TFはtTA (Tet-off)を発現しているため、Doxを加えた場合、転写活性が低下すると考えられたが、クローン1, 2, 3のすべてで、Doxを加えることによって転写活性の低下が確認された。また、V3TF1では、Doxを加えることによって転写活性が完全に検出されなくなった。

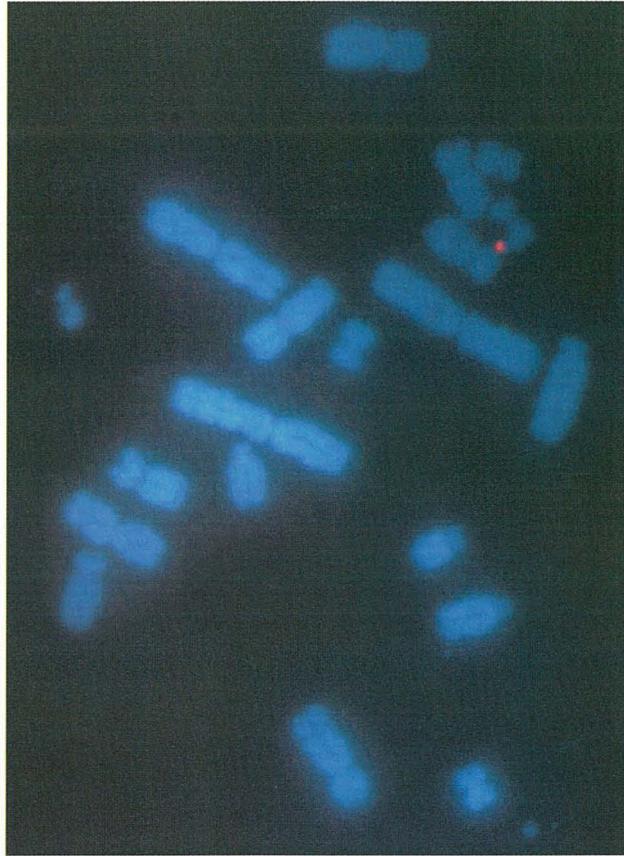


図6. FISHによる Δ qHACを保持するV3H3細胞の染色体像

V3H3細胞で、CHO細胞由来の20本の染色体(青)と、 Δ qHAC(ヒト染色体特異的プローブcot-1によって赤く標識される)が他の染色体に挿入されることなく保持されていた。

け保持することを確認した(図6)。

このV3H3細胞に発現カセットpTNTneoDP(Tet-On)(図1 第1世代)の導入を行ったところ、薬剤耐性クローンを17クローン得て、うち6クローンがゲノムPCRでDNA-PKcsのcDNAを保持することが示された。しかしながら、そのDNA-PKcsの発現はいずれもRT-PCRで発現を確認できなかった(V3TN, 0/6=0%)。同様にpTFTneoDP(Tet-Off)(図1 第1世代)発現カセットをV3H3細胞に導入し薬剤耐性クローンを30クローン得たが、うちゲノムPCRでcDNAを確認できたのは2クローンであった。さらにPR-PCRにて1クローン(V3TF, 1/2=50%)のみ発現を確認したが、ドキシサイクリンによる発現の変化は認められなかった(図4-C)。

このことはpTNTneoDP(第1世代, Tet-Off)で検討すると、CHOで高率に発現が得られたHACベクター上の遺伝子発現が、染色体移入で別の

CHO系列の細胞V3に移したところ、あるいはあらたにV3細胞にHACベクター上に目的遺伝子を構築した場合どちらにおいても、V3細胞内での発現が極端に抑制されていた。これは、 Δ qHAC上の遺伝子発現が宿主細胞依存性にコントロールされていることを強く示唆している。そして、これら発現が得られた細胞において、Doxにて発現制御がうまく行われない理由として、この発現カセットでは近傍にある、neo遺伝子の発現をつかさどる P_{CMV} 内に存在するエンハンサーエレメントが、neo遺伝子のみでなく、すぐ近傍に存在するTRE-PminCMVにおいても影響を与えている可能性が考えられた。

第1世代のベクターから、neo耐性遺伝子の P_{CMV} を削除して、TREの両側にPminCMVを挿入することによって、neo耐性遺伝子上流の P_{CMV} 内に存在するエンハンサーエレメントが、DNA-PKcs遺伝子の発現に影響を与える可能性を取り

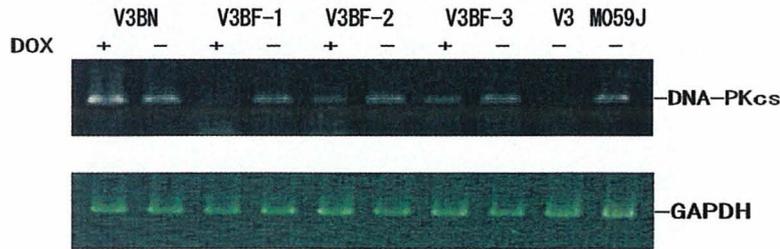


図7. RT-PCRによるDNA-PKcsのmRNAの発現-2

V3BNとV3BF1-3でDoxを添加によるDNA-PKcsのmRNAの発現の変化を検討した。V3BNはrtTA (Tet-on) を発現しており、Doxを加えることでmRNAの発現量が上昇した。しかし、Doxを加えない場合でもmRNAの発現が確認された。一方、V3BFはtTA (Tet-off) を発現しており、Doxを加えることによって、mRNAの発現量は減少した。特にV3BF1では、Doxを加えることによってmRNAの発現が消失した。

除いた。また、 β グロビンイントロン配列を挿入することによって、タンパク質合成効率の改善を期待した。この第2世代発現コンストラクトpBITNDP (Tet-On) およびpBITFDP (Tet-Off) (図3 第2世代) をV3H3細胞に導入したところ、前者では薬剤耐性16クローン中4クローンがゲノムPCRでcDNAを保持しており、1クローンのみでmRNAの発現が認められた (V3BN, 1/4=25%)。Doxを含まない培地では、RNAは明らかに低下していたが依然かなりの発現が確認できた。一方、後者では薬剤耐性6クローン中3クローンでゲノムPCR陽性で、その3クローンはすべてmRNAの発現が認められた (V3BF, 3/3=100%)。さらに3つのmRNA発現クローンすべてにおいて、Doxを加えたとき発現量の低下が認められた。特にV3BF1では、Doxを加えることによって発現量が検出できない程度まで低下していた (図7)。ルシフェラーゼアッセイによって外来に導入したテトラサイクリン依存性ルシフェラーゼ遺伝子発現のDoxによる制御を確認したところ (図5, V3BF1-3), Doxを加えることでルシフェラーゼ活性が低下した。これはRT-PCRの結果と相関しており、特にV3BF1ではルシフェラーゼ活性が検出されない程度まで低下していた (図5 V3TF1-3)。

考 察

Δ qHACは、ヒト染色体でもっとも小さい21番染色体 (48Mb) をいわゆるトップダウンアプローチにより染色体テロメアトランケーションを行って長腕上の既知遺伝子を削除し16Mbに短縮

されたものである。さらに外来遺伝子挿入のためのloxP配列が挿入されている。このHACベクターはヒト培養細胞内で安定に維持分配されることが確認されている。さらに移入細胞の染色体に挿入されることなく単独で存在するため、他の遺伝子と相互作用することなく複数の、または遺伝子ゲノムのような巨大なDNA配列も挿入可能であると期待されている。したがって、遺伝子治療、及び再生医療における幹細胞の遺伝子操作用ベクターとしての可能性も大きい。今回、 Δ qHAC上で複数遺伝子が期待されるように発現することを証明するため、さらに、遺伝子発現を人工的に制御するシステムを構築するために、プラスミド上で2つの遺伝子ユニットからなる発現カセットを Δ qHACに挿入しこの発現解析を行った。

第1世代発現カセットでは、79-1細胞内でmRNAの発現がみられるもののDoxによる発現制御が不可能であった。これは、neo耐性遺伝子のCMV発現制御領域と(r)tTA依存性発現制御領域が非常に近接しているために、neo耐性遺伝子のCMVエンハンサーエレメントに結合した転写調節因子が(r)tTA依存性プロモーターに作用してその転写を活性化、あるいは抑制し、これらの相互作用によって、(r)tTAの量や状態に関りなくDNA-PKcs遺伝子の転写が行われていると考えられた。あるいはごく近接した領域に2つのプロモーター配列が存在する際に、転写因子が競合的に結合したり、その部位のDNA構造が変化することで周囲の発現制御領域に影響をあたえ、転写の相互干渉 (transcriptional interference), プ

ロモーター抑制 (promoter suppression) と呼ばれる現象が起き、転写が活性化されたり抑制されたりすることが知られている²⁸⁻²⁹⁾。その際、(r)tTA依存性プロモーターTRE-PminCMVはP_{CMV}からエンハンサーエレメントを除いた転写開始点付近を含む最小プロモーターPminCMVとTetオペレータDNA配列を7回反復したテトラサイクリン応答因子 (TRE) を付加した構造であるため、近傍のCMVプロモーターによって特に影響を受けやすいことが推定された。さらにルシフェラーゼアッセイの結果からDoxの有無によるルシフェラーゼ活性の変化が見られないことから、rtTATタンパク質自体も発現量が少なく、rtTAT遺伝子のCMVプロモーターも相互作用が及んでいる可能性が示唆された。

このような結果から、まず、neo耐性遺伝子発現用のCMVプロモーターP_{CMV}とTRE-PminCMVの相互作用を避けるためにP_{CMV}を削除して、TREの両側にPminCMVを配置し双方向性に転写活性をもつTRE-PminCMVに変更した。また、DNA-PKcsタンパク質の発現量を高めるためにcDNA配列の上流にβグロブリンイントロンを挿入した。この第2世代発現カセットを用いたところ、DNA-PKcsのmRNAを発現するV3細胞株が得られるようになった。したがって、neo耐性遺伝子のCMVプロモーターP_{CMV}と(r)tTA依存性プロモーターTRE-PminCMVの相互作用による影響がmRNAの発現に大きく影響していることが示唆された。また、V3TF細胞クローンのルシフェラーゼアッセイによる検討では、RT-PCRの結果と相関して、Doxの投与によってルシフェラーゼ活性の低下が示され、特にV3TF1では、Dox投与によって活性が消失した。このことから、(r)tTATタンパク質の発現が十分あり、Tet-Off systemが機能していることが示唆された。

今後、さらにウェスタンブロットを行いDNA-PKcsの発現をタンパク質レベルで検討すると共に、さらに、DNA-PKcsの発現量を増加させながら、厳密な遺伝子発現制御を維持できるように発現カセットを改良したいと考えている。(r)tTA自体のCMVプロモーターや、ΔqHACの薬剤選択マーカーであるBsd遺伝子のCMVプロモーターもDNA-PKcsおよび(r)tTAの発現に影響する可能性があるため、2箇所にchicken β globinのイン

スレーター配列²⁹⁾を挿入し、tTAの発現量を上昇させるためプロモーターをCAGプロモーター²⁷⁾に変更している (図3 第3世代)。Chicken β globinのインスレーター配列は、CTCF結合部位を含みエンハンサープロモーター相互作用を抑制すると考えられている。これを挿入することによって、(r)tTA依存性プロモーター、(r)tTA自体のプロモーターおよびBsdのプロモーターをそれぞれの遺伝子発現コンパートメントとして分割することが可能であると考えられる。

同じCHO細胞由来であるにもかかわらず、79-1細胞ではmRNAの発現がみられたが、このHAC発現ベクターをV3細胞に導入しても発現クローンが得られなかった。当初は微小核融合法の過程で人工染色体の欠失などの変化が影響している可能性が考えられた。しかしながら、欠失のないΔqHACを保持するV3H3細胞に直接発現カセットを導入しても同様に発現クローンが得られなかったこと、また第2世代発現カセットでは、mRNAの発現を確認できたことから、全く同じDNA配列をもつ発現ベクターを保持していても、79-1細胞ではDNA-PKcsの発現が見られるが、V3細胞では見られない結果であった。これは、DNA-PKcs欠損株であるV3細胞では、ある種の転写因子に変化が起こっており、転写活性が低下しているか、あるいはDNA-PKcs遺伝子が発現すると細胞の生存・増殖に不利となり、エピジェネティックに抑制されているクローンが優位に得られる可能性が考えられ、HACベクター上の遺伝子発現も、宿主細胞に影響されると考えられた。

本研究で用いたHACベクターはΔqHACを保持する細胞にDNA-PKcs発現カセットを導入する際に、Cre発現ベクターと共に導入してloxP配列特異的組換え体を得る。この組換えによってneo耐性遺伝子が再構成される。したがって、G418薬剤耐性クローンはすべて目的の発現カセットをΔqHACにもっていると考えられたが、多くのクローンで、特にV3細胞への導入時に薬剤耐性であるにもかかわらず、DNA-PKcsのcDNAを含まないクローンが多数得られた。この原因にはいくつか考えられるが、一つには一度Cre特異的組換えがあり、neo耐性遺伝子が再構成された後、再びCreによるloxP組換えが起こり、loxPには含まれた領域が欠失してしまう反応が関与している

可能性がある。あるいは、loxP類似配列が、ゲノム中に存在し、そこで組み換えが起こり、その近傍にあるプロモーター配列によりneo遺伝子が部分的に活性化されたため、耐性クローンが出現したと考えられる。また、DNA-PKcs遺伝子が欠失した方が細胞の生存・増殖に優位になるため非特異的にDNA-PKcs発現に關与する領域が欠失したクローンが多く得られた可能性も考えられる。

本研究ではDNA-PKcs遺伝子発現をmRNAレベルで検討したが、機能的に発現を証明するために、今後細胞形質の変化にて相補テストを行う予定である。DNA-PKcsは、DNA損傷修復にかかわっており、この遺伝子に変異のあるV3細胞では放射線感受性が高いことが知られている²³⁾。DNA-PKcs遺伝子を導入し、Doxにて遺伝子発現を誘導することで、V3細胞の放射線感受性が改善すると考えられる。放射線感受性は、放射線照射後のコロニー形成能を用いて検討する予定である。

すでに、マウスES細胞に染色体を移入して作製されたヒト染色体移入マウスの実験から、ヒト21番染色体セントロメア領域がマウス個体内で安定に保持されると報告されており³⁰⁾、今回作製したDNA-PKcs発現HACベクターを用いて、遺伝子治療モデルへの応用を試みる予定である。実際にはDNA-PKcs遺伝子の発現を検証したHAC発現ベクターをDNA-PKcs欠損ES細胞 (DNA-PKcs^{-/-}) に導入し、DNA-PKcsの欠損が補正されたES細胞 (DNA-PKcs⁺ + HAC) を作製する。このES細胞 (DNA-PKcs⁺ + HAC) をLIF非存在下にメチルセルロースを用いて半固定状態で培養する方法により、造血系幹細胞を分化誘導する。この細胞をDNA-PKcs欠損マウスの成体に戻すことにより、成熟したTおよびB細胞が回復しSCIDマウスの重症複合免疫不全が治療されることが期待される。

結 語

ヒト21番染色体由来のHACベクターを利用して、テトラサイクリンによる誘導系と、巨大なDNA修復遺伝子であるDNA-PKcsのcDNAを導入することによって、人工的な発現を制御可能とするベクターを作製した。このDNA-PKcs発現HACベクターをV3細胞に導入し、DNA-PKcs遺

伝子mRNAの発現がドキシサイクリン投与により人工的に制御可能となった。

稿を終えるにあたり、終始懇切なる御指導、御校閲を賜りました鳥取大学大学院機能再生医科学専攻生体機能医工学講座押村光雄教授、また御校閲を賜りました鳥取大学医学部基盤病態医学講座器官病理学井藤久雄教授、同器官制御外科学講座麻酔・集中治療医学石部裕一教授に深謝いたします。また、本研究遂行にあたり直接ご指導いただきました同大学院機能再生医科学専攻遺伝子再生医療学講座栗政明弘助教授に深謝いたします。また、英文添削をしていただいたCandice G. T. Tahimicさんをはじめ研究に助力していただきました同機能再生医科学専攻、同細胞工学教室、ゲノム医工学教室各位に厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Green, E. D., Riethman, H. C., Dutchik, J. E., Olson, M. V. (1991) Detection and characterization of chimeric yeast artificial-chromosome clones. *Genomics* 11, 658-669.
- 2) Harrington, J. J., Bokkelen, G. V., Mays, R. W., Gustashaw, K., Willard, H. F. (1997) Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial chromosomes. *Nat. Genet.* 15, 345-355.
- 3) Shen, M.H., Yang, J., Loupart, M. L., Smith, A., Brown, W. (1997) Human mini-chromosomes in mouse embryonal stem cells. *Hum. Mol. Genet.* 6, 1375-1382.
- 4) Ikeno, M., Grimes, B., Okazaki, T., Nakano, M., Saitoh, K., Hoshino, H., McGill, N. I., Cooke, H., Masumoto, H. (1998) Construction of YAC-based mammalian artificial chromosomes. *Nat. Biotechnol.* 16, 431-439.
- 5) Telenius, H., Szeles, A., Kereso, J., Csonka, E., Praznovszky, T., Imreh, S., Maxwell, A., Perez, C. F., Drayer, J. I. Hadlaczky, G. et al. (1999) Stability of a functional murine satellite DNA-based artificial chromosome across mammalian species. *Chromosome Res.* 7, 3-7.
- 6) Grimes, B. and Cooke, H. (1998) Engineering mammalian chromosomes. *Hum. Mol.*

- Genet. 7, 1635-1640.
- 7) Kelleher, Z. T., Fu, H., Livanos, E., Wendelburg, B., Gulino, S., Vos, J. M. (1998) Epstein-Barr-based episomal chromosomes shuttle 100 kb of self-replicating circular human DNA in mouse cells. *Nat. Biotechnol.* 16, 762-768.
 - 8) Zoia, L. and Jose, E. M. (2002) Advances in human artificial chromosome technology. *TRENDS in Genetics* 18, 313-319.
 - 9) Tomizuka, K., Yoshida, H., Kugoh, H., Sato, K., Ohguma, A., Hayasaka, M., Hanaoka, K., Oshimura, M., Ishida, I. (1997) Functional expression and germline transmission of a human chromosome fragment in chimaeric mice. *Nat. Genet.* 16, 133-143.
 - 10) Mejia, J. E., Willmott, A., Levy, E., Earnshaw, W. C., Larin, Z. (2001) Functional complementation of a genetic deficiency with human artificial chromosomes. *Am. J. Hum. Genet.* 69, 315-326.
 - 11) Grimes, B. R., Schindelbauer, D., McGill, N. I., Ross, A., Ebersole, T. A., Cooke, H. J. (2001) Stable gene expression from a mammalian artificial chromosome. *EMBO Rep.* 2, 910-914.
 - 12) Choo, K. H. A. (2001) Engineering human chromosomes for gene therapy studies. *Trends Mol. Med.* 7, 235-237.
 - 13) Smith, A. J., De Sousa, M. A., Kwabi-addo, B., Heppell-Parton, A., Impy, H., Rabbitts, P. (1995) A site-directed chromosomal translocation induced in embryonic stem cells by Cre-loxP recombination. *Nat. Genet.* 9, 376-384.
 - 14) Abuin, A., Bradley, A. (1996) Recycling selectable markers in mouse embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 16, 1851-1856.
 - 15) Van Deursen, J. et al. (1995) Cre-mediated site-specific translocation between non-homologous mouse chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 7376-7380.
 - 16) Smith, G. C. M. and Jackson, S. P. (1999) DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev.* 13, 916-934.
 - 17) Li, Z., Otevrel, T., Gao, Y., Cheng, H. L., Seed, B., Stamato, T. D., Taccioli, G. E. and Alt, F. W. (1995) The XRCC4 gene encodes a novel protein involved in DNA double-strand break repair and V(D)J recombination. *Cell* 83, 1079-1089.
 - 18) Critchlow, S. E., Boater, R. P. and Jackson, S. P. (1997) Mammalian DNA double-strand break repair protein XRCC4 interacts with DNA ligaseIV. *Curr. Biol.* 7, 588-598.
 - 19) Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesaza, P., Wilson, T. E., Mann, M., Lieber, M. R. (1997) Activity of DNA ligaseIV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* 388, 492-495.
 - 20) Wilson, T. E., Grawunder, U., Lieber, M. R. (1997) Yeast DNA ligaseIV mediates non-homologous DNA end joining. *Nature*. 388, 495-498.
 - 21) Kurimasa, A., Kumano, S., Boubnov, N. V., Story, M. D., Tung, C. S., Peterson, S. R., Chen, D. J. (1999) Requirement for the kinase activity of human DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in DNA strand break rejoining. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3877-3884.
 - 22) Gao, Y., Chaudhuri, J., Zhu, C., Davidson, L., Weaver, D. T., Alt, F. W. (1998) A targeted DNA-PKcs-null mutation reveals DNA-PK-independent functions for KU in V(D)J recombination. *Immunity*. 9, 367-376.
 - 23) Whitmore, G. F., Varghese, A. J., Gulyas, S. (1989) Cell cycle responses of two X-ray sensitive mutants defective in DNA repair. *Int. J. Radiat. Biol.* 56, 657-665.
 - 24) Stephen, P. J. (2002) Sensing and repairing DNA double-strand breaks. *Carcinogenesis*. 23, 687-696.
 - 25) Gossen, M., Bujard, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 89, 5547-5551.
 - 26) Kistner, A., Gossen, M., Zimmermann, F., Jerecic, J., Ullmer, C., Lubbert, H., Bujard,

- H. (1996) Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**, 10933-10938.
- 27) Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J. (1991) Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* **108**, 193-199.
- 28) Bell, A. C., West, A. G., Felsenfeld, G. (2001) Insulators and boundaries: Versatile regulatory elements in the eukaryotic genome. *Science.* **291**, 447-450.
- 29) Hasegawa, K., Nakatsuji, N. (2002) Insulators prevent transcriptional interference between two promoters in a double gene construct for transgenesis. *FEBS lett.* **520**, 47-52.
- 30) Kazuki, Y., Shinohara, T., Tomizuka, K., Katoh, M., Ohguma, A., Ishida, I., Oshimura, M. (2001) Germline transmission of a transferred human chromosome 21 fragment in transchromosomal mice. *J. Hum. Genet.* **46**, 600-603.

米子医学雑誌 第54巻 第6号

平成15年10月25日 印刷

平成15年11月5日 発行

発行者：能 勢 隆 之

編集者：井 藤 久 雄

印刷者：中 野 四 郎

印刷所：鳥取県米子市富益町米川西 8

今井印刷株式会社

発行所：米子医学会

鳥取県米子市西町88-2

鳥取大学医学部同窓会館内

郵便番号683-0826 電話 (0859) 31-5116

編集委員：井上貴央, 河合康明, 前田迪郎

昭和42年2月28日 学術刊行物指定

THE JOURNAL OF THE YONAGO MEDICAL ASSOCIATION

Published by Yonago Medical Association
Yonago 683-0826, Japan

Editorial Board

Chief Editor : Hisao ITO, M. D., Ph. D.

Associate Editor : Takao INOUÉ, M. D., Ph. D.

Yasuaki KAWAI, M. D., Ph. D.

Michio MAETA, M. D., Ph. D.

Editorial Office :

Faculty of Medicine, Tottori University

Yonago 683-8503, Japan

米子医学雑誌

THE JOURNAL
OF THE
YONAGO MEDICAL ASSOCIATION

第 54 卷

平成 15 年 2 0 0 3

米 子 医 学 会

米子市 鳥取大学医学部内

発行日付

第 1 号	平成14年12月25日
第 2 号	平成15年 3 月 5 日
第 3 号	〃 5 月 5 日
第 4 号	〃 7 月 5 日
第 5 号	〃 9 月 5 日
第 6 号	〃 11 月 5 日

第 1 号

- 看護組織における副師長の動機づけ (motivation) に関する研究 永見 瑠美子... 1
- 鳥取県西部地区における介護保険制度認知調査
..... 細田 武伸, 黒沢 洋一, 森田 曜, 谷垣 静子, 能勢 隆之... 9
- Niemann-Pick 病C 型での JAK/STAT シグナル伝達系の恒常的活性化
..... 上野 誠...17
- Isoproterenolによる一過性内向き電流誘発不整脈モデルを用いた医薬品の催不整脈作用の検討
..... 丸本 明彬...33
- 気道上皮細胞株における酸化ストレスによる核DNA損傷の評価
..... 藤井 義寛, 富田 桂公, 櫃田 豊...48

第 2 号

- 結節性硬化症の原因遺伝子産物hamartinと結合する蛋白質の同定: yeast two-hybrid法による検索
..... 安井 斉希子...61
- 振動障害による白ろう指の長期の経過と寒冷負荷試験との関連
..... 森田 曜, 黒沢 洋一, 細田 武伸...74
- ヒト腹部大動脈瘤におけるMMPsとTIMPsの発現 玉井 伸幸...84

第 3 号

- 婦人科悪性腫瘍術後患者が抱える生活上の問題と心身状態の関連性
..... 鈴木 康江, 佐々木 くみ子, 片山 理恵, 前田 隆子, 遠藤 有里, 稲田 信子, 紀川 純三...97
- 血清と尿ビリルビンの解離に関する検討
..... 太田 健一, 汐田 晋也, 妹尾 徳子, 田中 久美子, 長尾 幸典, 中村 裕美, 中村 真一
西山里 香, 藤田 宏美, 吉牟田 あゆみ, 若槻 有香, 足立 良行, 野上 智
野津 美真子, 深田 美香, 南前 恵子, 山田 貞子, 周防 武昭...104
- 舌アミロイドーシスの症状を呈した多発性骨髄腫の2例
..... 柴田 昌美, 音田 貢, 片岡 聡, 阪本 博文, 小谷 勇
土井 理恵子, 木山 陽介, 領家 和男...112

第 4 号

症例報告；肺炎症性偽腫瘍の1例-----庄盛浩平，橋本 潔，荒木邦夫，井藤久雄---121

粟粒結核を併発した乳癌術後患者の一部検例

-----本城総一郎，入川千恵，尾崎充彦，山下英樹
塚本和充，安達博信，井藤久雄---125

急性出血性壊死性膵炎を併発した肝細胞癌症例：剖検所見を中心として

-----山下英樹，塚本和充，入川千恵，庄盛浩平
本城総一郎，安達博信，井藤久雄---131

第 5 号

鳥取県内における医学生と看護学生の移植医療についての認識：アンケート調査の結果解析

-----平松喜美子・大谷昭子・松尾ミヨ子・井藤久雄---137

ヒト膵管癌細胞株における抗Fas抗体誘導アポトーシスとFasおよびFas関連因子の発現

-----武田安未，尾崎充彦，安達啓子，本城総一郎，井藤久雄---145

肉腫像を伴う肺癌の一例：その組織分類を中心に

-----荒木邦夫，山下英樹，橋本 潔，庄盛浩平，安達博信，井藤久雄---155

第 6 号

平成14年度に行った鳥取大学医学部での学生による授業評価

-----井上 仁，中野俊也，河合康明---161

極低出生体重児の養育上の問題と家族の支援に関する検討

-----鈴木康江，佐々木くみ子，片山理恵，前田隆子，北川かほる，笠置綱清
村田千恵，稲田信子，長田郁夫，岡 明，山本照恵---179

介護者のストレス認知に影響を与える介護の規範意識

-----平松喜美子，長澤順子，寺田伊都子，松尾ミヨ子---185

*Candida albicans*の鑑別のための新しい厚膜胞子形成培地（Canary培地）の検討-----中本幸子---192

新規人工染色体ベクターを用いたDNA-PKcs遺伝子発現制御系の構築 ----- 大槻明広---202

DIF

とは

DPD Inhibitory Fluoropyrimidines

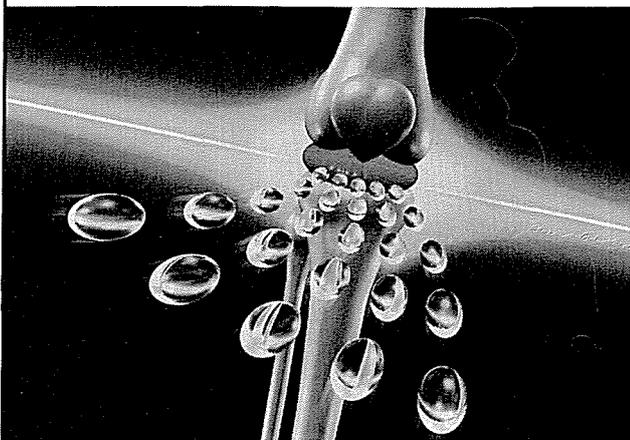
DPD阻害作用をもつ
フッ化ピリミジンの新分類です



大鵬薬品工業株式会社
〒101-8444 東京都千代田区神田錦町1-27

「慢性関節リウマチにおける膝関節痛」*に適應をもつ 初めてのヒアルロン酸Na製剤。

3つの関節疾患に適應を有する平均分子量約190万のヒアルロン酸Naが、関節治療への新しい道を拓きます。



慢性関節リウマチにおける膝関節痛*

変形性膝関節症

肩関節周囲炎

*以下の基準を全て満たす場合に限る。
(1)抗リウマチ薬等による治療で全身の病勢がコントロールできていても膝関節痛のある場合
(2)全身の炎症症状がCRP値として10mg/dL以下の場合
(3)膝関節の症状が軽症から中等症の場合
(4)膝関節のLarsenX線分類がGrade IからGrade IIIの場合

●5つの製品特性●

- 1 ヒアルロン酸ナトリウム製剤として、初めて慢性関節リウマチにおける膝関節痛*に対する効能・効果が認められました。
- 2 正常関節液中に存在するヒアルロン酸に近い粘弾性特性を有する高分子量ヒアルロン酸ナトリウムです (in vitro)。
- 3 軟骨変性(ウサギ, in vitro)、炎症性滑膜増殖(サル)および疼痛(イヌ, in vitro)に対し抑制効果が認められます。
- 4 関節液の潤滑(液体膜潤滑、境界潤滑)を改善します (in vitro)。
- 5 副作用は1,376例中42例(3.05%)にみられました。主なものは、局所疼痛12件(0.87%)等でした。(効能追加時)



関節機能改善剤

指定医薬品

スベニール®

ヒアルロン酸ナトリウム関節内注射液

薬価基準収載

ディスポ
バイアル

【禁忌(次の患者には投与しないこと)】

本剤の成分に対し過敏症の既往歴のある患者

【効能・効果】

- 変形性膝関節症、肩関節周囲炎
- 慢性関節リウマチにおける膝関節痛(下記(1)~(4)の基準を全て満たす場合に限り)
 - (1)抗リウマチ薬等による治療で全身の病勢がコントロールできていても膝関節痛のある場合
 - (2)全身の炎症症状がCRP値として10mg/dL以下の場合
 - (3)膝関節の症状が軽症から中等症の場合
 - (4)膝関節のLarsenX線分類がGrade IからGrade IIIの場合

【用法・用量】

- 変形性膝関節症
通常、成人1回2.5mLを1週間毎に連続5回膝関節腔内に投与する。その後、症状の維持を目的とする場合は、2~4週間隔で投与する。
- 肩関節周囲炎
通常、成人1回2.5mLを1週間毎に連続5回肩関節(肩関節腔、肩峰下滑液包又は上腕二頭筋長頭腱鞘)内に投与する。
- 慢性関節リウマチにおける膝関節痛
通常、成人1回2.5mLを1週間毎に連続5回膝関節腔内に投与する。

〈用法・用量に関連する使用上の注意〉

本剤は、関節内に投与するので、厳重な無菌的操作のもとに行うこと。

【使用上の注意】—抜粋—

1. 慎重投与(次の患者には慎重に投与すること)
 - (1)他の薬剤に対して過敏症の既往歴のある患者
 - (2)肝障害又はその既往歴のある患者
 - (3)対象関節部に皮膚疾患又は感染症のある患者
2. 重要な基本的注意
 - (1)本剤の投与により、ときに局所痛があらわれることがあるので、投与後の局所安静を指示するなどの措置を講じること。
 - (2)注入部位以外に漏れると疼痛を起こすおそれがあるので、確実に投与すること。
 - (3)変形性膝関節症、慢性関節リウマチにおける膝関節痛については、投与関節の炎症又は関節液貯留が著しい場合、本剤の投与により当該部位の炎症症状の悪化を招くことがあるので、炎症症状を抑えてから本剤を投与することが望ましい。

(4)慢性関節リウマチにおける膝関節痛については以下の点に注意すること。

- 1)本剤による治療は原因療法ではなく局所に対する対症療法であるので抗リウマチ薬等と併用すること。本剤は漫然と運用する薬剤ではない。
- 2)抗リウマチ薬等の治療により全身の病勢がコントロールできていても膝関節痛のある場合、当該膝関節腔内に投与すること。
- 3)膝関節以外の使用経験はなく、他の関節については有効性・安全性が確立していないため本剤を投与しないこと。
- 4)慢性関節リウマチでは膝関節の器質の変化が高度なものは有効性・安全性が確立していないため本剤を投与しないこと。
- 5)慢性関節リウマチでは、連続5回投与後、症状の維持を目的として、原則2~3週間隔で最高10回(合計15回)までの使用経験はあるが、それ以上の安全性は確立されていない。

3. 副作用

安全性評価対象症例1,376例中、42例(3.05%)54件に副作用(臨床検査値異常を含む)が認められた。

主な副作用は、投与関節での局所疼痛12件(0.87%)、ALT(GPT)上昇7件(0.51%)、AST(GOT)上昇5件(0.36%)、Al-P上昇4件(0.29%)、LDH上昇3件(0.22%)、局所熱感2件(0.15%)、発熱2件(0.15%)、発疹2件(0.15%)、倦怠感2件(0.15%)等であった。(効能追加時)

以下のような副作用が認められた場合には、減量・休薬など適切な処置を行うこと。

		0.1~5%未満	0.1%未満
過敏症 ^{注1)}	発熱、発疹		痒痒感
肝臓	AST(GOT)上昇、ALT(GPT)上昇、Al-P上昇、LDH上昇		
血液			好酸球増多、ヘマトクリット低下、白血球増多
投与関節	疼痛(主に投与後の一過性の疼痛)、熱感		腫脹、関節周囲のしびれ感、関節液貯留
その他	倦怠感、蛋白尿、尿沈渣異常		動悸、ほてり、総蛋白低下、BUN上昇

注1) 副作用があらわれた場合には投与を中止すること。

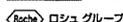
※その他の「使用上の注意」等については製品添付文書をご参照ください。「使用上の注意」の改訂には十分ご留意ください。

製造発売元



中外製薬株式会社

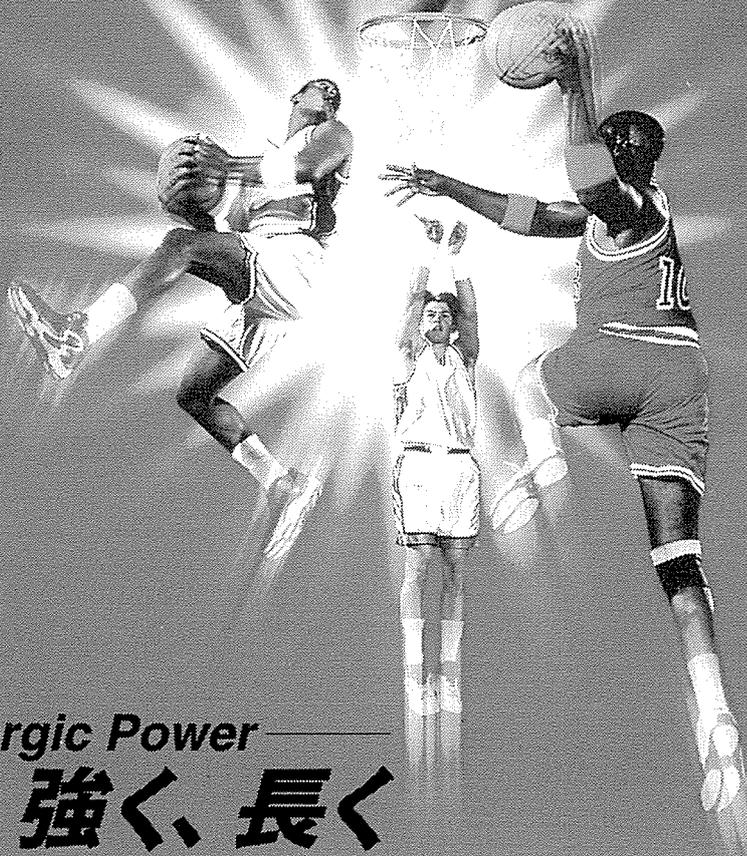
〒104-8301 東京都中央区京橋2-1-9



ロシュグループ

CSU-0246 2003.6

Once
a
day



Anti Allergic Power 速く、強く、長く

ジルテック®の特性

1. 速く、強く、長く、選択的なヒスタミンH₁受容体拮抗作用を示します(海外データ、*in vitro*を含む)。
2. アレルギー反応の遅発相における好酸球遊走を臨床用量で抑制します(海外データを含む)。
3. アレルギー性鼻炎、蕁麻疹、湿疹・皮膚炎、痒疹、皮膚掻痒症に効能・効果を有します。
4. 1日1回の投与で十分な効果を発揮します。
5. 副作用又は臨床検査値の異常変動は1,396例中13.5% (189例)に認められ、副作用は10%で主に眠気(6.0%)でした(承認時までの調査)。重大な副作用としてショック、痙攣、肝機能障害、黄疸が報告されています。

■禁忌(次の患者には投与しないこと)
本剤の成分又はヒドロキシジンに対し過敏症の既往歴のある患者

指定医薬品/要指示医薬品^{注)}

薬価基準収載

持続性選択H₁受容体拮抗・アレルギー性疾患治療剤

ジルテック®錠5・10

Zyrtec® Tablet 5・10 塩酸セチリジン錠

^{注)} 注意—医師等の処方せん・指示により使用すること

発売元(資料請求先)
住友製薬株式会社
大阪市中央区道修町2丁目2番8号

製造元
ユーシービー・ジャパン株式会社
東京都千代田区神田駿河台2丁目2番地

■効能・効果

アレルギー性鼻炎
蕁麻疹、湿疹・皮膚炎、痒疹、皮膚掻痒症

■用法・用量

通常、成人には塩酸セチリジンとして1回10mgを1日1回、就寝前に経口投与する。

なお、年齢、症状により適宜増減するが、最高投与量は1日20mgとする。

■使用上の注意

1. 慎重投与(次の患者には慎重に投与すること)

- (1) 腎障害のある患者(高い血中濃度が持続するおそれがある。)
- (2) 肝障害のある患者(高い血中濃度が持続するおそれがある。)
- (3) 高齢者(高い血中濃度が持続するおそれがある。)

2. 重要な基本的注意

- (1) 眠気を催すことがあるので、本剤投与中の患者には自動車の運転等危険を伴う機械の操作には従事させないよう十分注意すること。
- (2) 本剤を季節性の患者に投与する場合は、好発季節を考慮して、その直前から投与を開始し、好発季節終了時まで続けることが望ましい。

3. 副作用

承認時までの調査1,396例中13.5% (189例)に副作用又は臨床検査値の異常変動が認められた。副作用は1,396例中10.0% (140例)にみられ、主なものは眠気6.0% (84例)、倦怠感0.9% (12例)、口渇0.6% (9例)、嘔気0.5% (7例)であった。また、主な臨床検査値の異常変動はAST(GOT)上昇1.4% (17/1,182例)、ALT(GPT)上昇1.5% (18/1,181例)、好酸球増多0.8% (9/1,114例)、総ビリルビン上昇0.5% (6/1,133例)であった。

(1) ショック(0.1%未満)

観察を十分に行い、呼吸困難、血圧低下、蕁麻疹等の症状があらわれた場合には、投与を中止し、適切な処置を行うこと。

(2) 痙攣(0.1%未満)

異常が認められた場合には、投与を中止し、適切な処置を行うこと。

(3) 肝機能障害、黄疸(頻度不明)

AST(GOT)、ALT(GPT)、γ-GTP、LDH、Al-Pの上昇等の肝機能障害(初期症状:全身倦怠感、食欲不振、発熱、嘔気等)、黄疸があらわれることがあるので、観察を十分に行い、異常が認められた場合には投与を中止し、適切な処置を行うこと。

●その他の詳細につきましては製品添付文書をご覧ください。

昭和四十二年二月二十八日
学術刊行物指定

発行所 米子医学会
(郵便番号六八三〇八二八)米子市西町八八一二
鳥取大学医学部同窓会館内(電話 米子 ③五二一六)