

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月29日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791388

研究課題名（和文） 尾部退行症候群を示す *Sd* 変異マウスの分子メカニズムの解析研究課題名（英文） Elucidation for molecular etiology of *Danforth's short tail (Sd)* mutant, a caudal regression model mouse.

研究代表者

仙波 圭 (SEMBA KEI)

熊本大学・生命資源研究支援センター・特定事業研究員

研究者番号：00398190

研究成果の概要（和文）：自然発症で得られた *Sd* 変異マウスは、脊椎欠損、鎖肛 (Suda H, Lee KJ, Semba K. et al. *Pediatr Surg Int.* 27:269-273. 2011)、腎臓欠損を呈し、ヒトの尾部退行症候群のモデル (Ando T., Semba K. et al. *Mech Dev.* 128:129-40. 2011.) であるが、*Sd* 変異マウスの原因遺伝子は、1930年の初回報告より80年以上経過しているにもかかわらず発見されなかった。しかし、我々の研究グループが同定、報告した *Skt* 遺伝子 (Semba K. et al. *Genetics.* 172:445-456. 2006.) をもとに、1. *Sd* 変異マウスに対するポジショナルクローニングと原因遺伝子座領域に対する詳細なスクリーニング、ショットガンシーケンス、ゲノムアッセムブリー解析、2. 発見した挿入変異の本体であるレトロウイルス配列 (Early Transposon: ETn) の人工的な挿入変異の再現とそのマウスの作出実験、3. *Sd* マウスより樹立した変異 ES 細胞を使用した候補遺伝子領域 (*Ptf1a*/アンチセンス RNA) の破壊実験とその遺伝子破壊マウスの作出実験、4. 破壊した2つの候補遺伝子である *Ptf1a* とアンチセンス RNA (non-coding RNA) をそれぞれノックインすることによる *Sd* 表現型のレスキュー実験、5. *Sd* 変異胚より得られた RNA と DNA アレイを使用した遺伝子発現プロファイリング解析によって得られた情報をもとに、*Ptf1a* 強制発現による *Cdx2* シグナルパスウェイに対する影響の検討を行った。以上の解析結果より、*Sd* 変異の病因は脊椎欠損に先行する脊索の変性であり、正常発生では膀胱と神経細胞の前駆細胞にしか発現を認めない膀胱発生、神経発生に必須である転写因子 *Ptf1a* の発現制御領域への ETn の挿入が、*Sd* 変異胚の脊索、cloaca、後腸、中腎管で *Ptf1a* を異所性発現させていることを示した。加えて、我々のグループが行ったこの一連の研究で、胚生期の脊索、cloaca、後腸、中腎管に異所性発現した *Ptf1a* が *Cdx2*, *T*, *Wnt3a*, *Cyp26a1* を抑制し尾部退行を引き起こすという原因メカニズムの端緒を得ることができた (Semba K. et al. *PLoS Genet.* 9:e1003204. 2013.).

研究成果の概要（英文）：Caudal regression syndrome (CRS) is a congenital heterogeneous constellation of caudal anomalies that includes varying degrees of agenesis of the spinal column, anorectal malformations, and genitourinary anomalies (Ando T., Semba K. et al. *Mech Dev.* 128:129-40. 2011.). Its pathogenesis is unclear. However, it could be the result of excessive physiologic regression of the embryonic caudal region based on analyses of the various mouse mutants carrying caudal agenesis. Among the mouse mutants, the *Danforth's short tail (Sd)* mouse is considered a best model for human CRS. *Sd* is a semidominant mutation, characterized by spinal defects, urogenital defects, and anorectal malformations, thus showing phenotypic similarity to human CRS. Although *Sd* is known to map to mouse chromosome 2, little is known about the molecular nature of *Sd*. Here, we demonstrate an insertion of one type of retrotransposon near the *Ptf1a* gene. This resulted in ectopic expression of *Ptf1a* gene in the caudal region of the embryo and downregulation of *Cdx2* and its downstream targets, leading to characteristic phenotypes in *Sd* mouse. Thus, *Sd* mutant mice will provide insight into the development of the spinal column, anus and kidney (Semba K. et al. *PLoS Genet.* 9:e1003204. 2013.).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：Danforth's short tail、Sd変異マウス、transposon、Ptfla、脊索、
遺伝子破壊、変異ES細胞、脊椎欠損

1. 研究開始当初の背景

Danforth's short tail (Sd) マウスは短く曲がった尾椎、泌尿生殖器異常、肛門直腸奇形を持つ自然発生の半優性変異体である (Dunn et al., 1940; Favre et al., 1999; Gruneberg, 1958)。これまでの研究により Sd 変異がマウス 2 番染色体近位に mapping されているにもかかわらず、責任遺伝子はまだ同定されていない (Alfred et al., 1997; Lane and Birkenmeier, 1993; Maatman et al., 1997)。Sd ホモ接合体胚において脊索はいったん形成されるものの E9.5-11.0 の間に消失してしまうことが報告されている (Dietrich et al., 1993; Gruneberg, 1958)。Sd ホモ接合体後期胚は腎臓の欠損、鎖肛、腰仙部での脊柱の途絶が表現型として報告されており、また、脊椎欠損の程度は遺伝的背景に影響されることも明らかになっている (Dietrich et al., 1993; Dunn et al., 1940; Theiler, 1988)。Dietrich らは、Sd ホモ接合体後期胚で尾側の椎体や神経管底板が欠失し、頭側では問題なく形成されていることも示した。我々の組織学的解析により椎間板髄核組織が全脊椎で完全欠損することを示した。

現在、報告されている数多くの脊椎異常を示す変異マウスの中でも、頭骨・四肢骨に異常を示さず最も重篤な脊椎欠損を示す変異マウスは、この Sd 変異マウスである (図 1)。また、Sd 変異マウスは脊椎欠損、鎖肛、腎臓欠損を呈す尾部退行症候群のモデルマウスでもある (図 2)。Sd 変異マウスは、ホモ接合体胚は、胚性期 9.0 (embryonic day 9.0: E9.0) までに脊索が消失し、ヘテロ接合体胚は、E12.5 までに胚の尾部を残してほぼ全長の脊索が消失するが、Sd 変異マウスは、脊索発生の程度に相関して形成される脊椎数が決まることを我々の先行実験で確認した (Ando T., Semba K. et al. *Mech Dev.* 128:129-40, 2011.)。Sd 変異マウスの原因ゲノム変異、

遺伝子は、初回報告より 80 年近く経過しているにもかかわらず、まだ発見されていない。しかし、申請者らが発見したマウス第 2 番染色体上の Sickel tail (Skt) 遺伝子を同定するに至った遺伝子トラップマウスライン (Skt^{Gt}) を使用したポジショナルクローニングによって Skt 遺伝子の上流 0.6cM、物理的距離にして約 1200kb あたりに原因遺伝子があることを交配実験及びゲノム解析の結果見出した (Semba K. et al. *Genetics.* 172:445-456, 2006.)。この Skt^{Gt} の解析によって得られた情報が、極めて興味深い脊椎、椎間板の表現型を示す Sd 変異マウスの責任遺伝子を同定する糸口になりえると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、

- (1). 「Sd 原因ゲノム変異の同定」
Sd ゲノム領域のスクリーニング→コンテイングの作製→候補領域へのショッガンシークエンス→ゲノムアッセムブリ解析→発見したゲノム変異を人工的に再現した変異マウスを作成して Sd 表現型の有無を検討する。
- (2). 「Sd 原因遺伝子の確定」
候補遺伝子の破壊実験→レスキュー実験によって Sd 表現型を消失/再現を調べる。
- (3). 「Sd 原因遺伝子の機能解析のための発現パターンの解析」
同定した原因遺伝子にマーカー遺伝子を挿入し胚発生時期の発現モニタリングを行う。
- (4). 「Sd 原因遺伝子の機能解析のため、既知のシグナル分子の異常の発見」
発現プロファイリングで候補分子パスウェイの同定を行い in vivo、in vitro 強制発現系を使用し、その関連性の有無を検討する。上記目的のための各項目の解析実験を行うことで、Sd 変異マウスが示す尾部退行症候群の病因を明らかにする。

3. 研究の方法

熊本大学・動物資源開発研究部門(CARD)で、ヘテロ接合体 *Sd* 変異マウスを wild-type マウスと交配させ飼育、繁殖させる [Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) より入手]。また、ヘテロ接合体 *Sd* 変異マウス同士を交配させ、ホモ接合体 *Sd* 変異胚を採取する。

(1). 「*Sd* 原因ゲノム変異の同定」のために、*Sd* ホモ接合体ゲノム DNA より構築したコスミドライブラリー (Bam HI による partially digestion されたホモ接合体 *Sd* DNA と SuperCos1 Cosmid Vector Kit と Gigapack® III gold packaging extract にて構築) を用いた候補ゲノム領域に対して 32 種類のプローブを作製してスクリーニングを行い *Sd* 候補ゲノム領域のコスミドコンティグを作製する。その中の候補コスミドクローンを超音波にて 1.5kb~6.0kb の DNA 断片にして pBluescriptII SK(-) にサブクローニング後、T3, T7 プライマーと dye terminator を使用したショットガンシーケンシング [capillary-based autosequencer (ABI 3700; PE Applied Biosystems, Foster City, CA)]、ゲノムアセンブリー解析 (PolyPhred software) を行い、ゲノム配列の精査を行う。この実験で発見した候補ゲノム変異を人工的に再現する遺伝子改変マウスを作成し、*Sd* 表現型が再現するかを検討することで発見したゲノム変異が *Sd* 変異の本体であることを証明する。

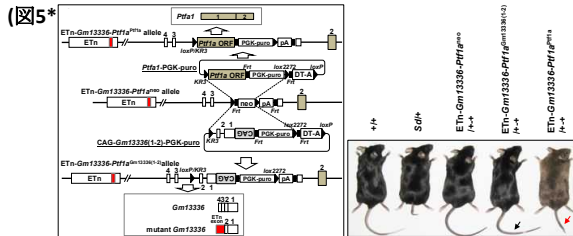
(2). 「*Sd* 原因遺伝子の確定」のために、既に樹立している *Sd* ES 細胞 [1 × nonessential amino acids (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY), 0.1 mM β-mercaptoethanol, 1 mM sodium pyruvate, 1% fetal bovine serum (HyClone; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA), 14% Knockout™ Serum Replacement (Gibco Invitrogen), 1100 U/ml leukemia inhibitory factor (ESGRO; Chemicon, Temecula, CA) にて培養] を用いて、トランスポゾンと融合する *Sd* 候補遺伝子領域の第 1, 2 エクソンをターゲティングし破壊することで、RNA の発現を消失させる。これにより、*Sd* 変異マウスの表現型が消失するかどうか調べる。既に完成、準備済みである *Sd* 原因遺伝子の第 1, 2 エクソンのターゲティングベクター [5' arm: 4109bp-PGK-neoR-3' arm: 5,931bp-MC1-DTA ベクターに Cre/lox と FRT/flp システム (Araki K. et al. *Nucleic Acids Res.* 30: e103. 2002.; Araki K. et al. *BMC Biotechnol.* 10, 29. 2010.) の両者を組み込んでおり、PGK-neoR 配列は任意の遺伝子

配列と置換可能である] を、*Sd* ES 細胞に対して電気穿孔法にて導入する。次に、全クローンに対しサザンブロット法にてスクリーニングを行う。そして、homologous recombination 法にて適正に *Sd* 候補遺伝子領域をノックアウトできたクローンを選別する。このノックアウトされた ES クローンを使用して、アグリゲーション法によりキメラマウスを作製する。続いて、ヘテロ接合体マウスを作成して、トランスポゾンの変異が残っているにもかかわらず、*Sd* 変異マウスの表現型が消失するかどうか検討する。加えて、破壊した領域より重複して転写されている 2 つの候補遺伝子: *Ptf1a* とそのアンチセンス RNA (non-coding RNA) をそれぞれノックインすることによる *Sd* 表現型のレスキュー実験を行い *Sd* 変異マウスの表現型の責任転写産物を明確にする。その際、*Ptf1a*-ノックインベクター (pKR3-FRT-del. pA-puro-2272 with the cloned *Ptf1a* ORF) とアンチセンス RNA ノックインベクター (pKR3-FRT-del. pA-puro-2272 with the cloned *Gm13336* (1-2)) を使用する。

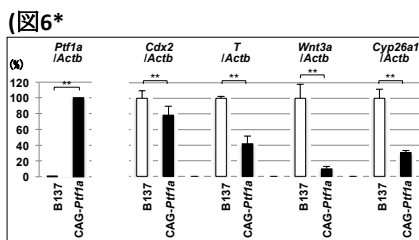
(3). 「その遺伝子の機能解析のための発現パターン解析」のために、*Sd* 候補遺伝子領域を適性にノックアウトできたクローンに対して、*lacZ* ノックインベクター (pKR3-FRT-del. pA-puro-2272, cloned *lacZ*) と *Cre/lox* システムを利用して *Sd* 候補遺伝子領域に *lacZ* をノックインしたマウスを作成して、胚、成体の各臓器において、wild-allele と *Sd*-allele のそれぞれから *Sd* 候補遺伝子を発現する細胞を正確に特定する。

(4). 「機能解析のため、既知のシグナル分子の異常の発見」のために、野生型、*Sd* ホモ接合体の E10.0 胚より RNA を抽出し、Microarray analysis [Whole Mouse Genome Array system ver. 2.0 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)] を利用した遺伝子発現プロファイリング [Feature Extraction software ver. 10.5 (Agilent Technologies)] を行うことで、*Sd* 原因遺伝子が関係するシグナルパスウェイの特徴を検討する。定量 RT-PCR 法で使用した TaqMan プローブ、PCR 条件は以下: *Ptf1a* (Mm 00479622), *Cdx2* (Mm 01212280), *T* (Mm 01318252), *Wnt3a* (Mm 00437337), *Cyp26a1* (Mm 00514486), *Actb* (Mm 00607939); Applied Biosystems. Reaction condition: 2 min at 50° C → 10 min at 95° C; 15 s at 95° C → 1 min at 60° C. 40 サイクル。

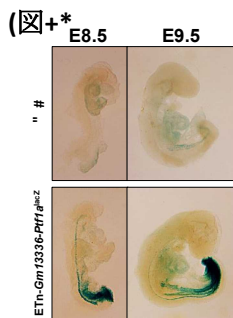
あり、正常発生では膀胱と神経細胞の前駆細胞にしか発現を認めない *Ptf1a* 制御領域への ETn 挿入が *Ptf1a* の胚生期の脊索、cloaca、後腸、中腎管での異所性発現を起させ、同部組織での *Cdx2* 関連シグナル pathway を抑制していることを強く示唆した(図 7)。



・#/存在下の%&破壊マウスに対する、%&と%&アンチセンス遺伝子の置換挿入!
%&ノックインによるレスキュー実験により尻尾の!&表現型が回復している(赤矢印)



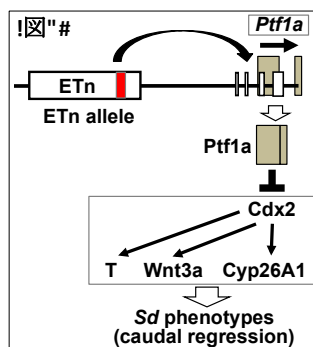
野生型、2細胞における%&強制発現!
による(!)*関連遺伝子の発現抑制



!&胚では、%&遺伝子が!
脊索・%&・後腸・中腎管で
発現していることを発見した。

(7)「尾部退行の発症メカニズム」

in vivo, in vitro で示した本実験結果は、異所性発現した *Ptf1a* が *Cdx2*, *T*, *Wnt3a*, *Cyp26a1* を抑制し尾部退行の原因メカニズムとなっていることを強く示唆した(図 8)。



%&挿入変異による!&#の異所性!
発現による尾部退行の発症メカニズム

(8)「考察と今後の展望」

① *Ptf1a* は膀胱と神経発生・分化の運命決定を担う重要な転写因子であることが知られている (*Nat Genet.* 32: 128-134. 2002.; *Neuron.* 47: 201-213. 2005.) が、膀胱・神経の発生・分化の転写因子としての *Ptf1a* の役割と、本研究で判明した脊椎欠損、鎖肛、腎欠損の原因となる *Ptf1a* の役割との間で、*Ptf1a* が関与する臓器と発現組織が大きく違うため、*Sd* 変異における *Ptf1a* の役割と関与する分子パスウェイを推測するのは難しい。

② 過去の文献的知見では *Ptf1a* が関与する脊椎、肛門、腎臓発生の見解は皆無であり、*Ptf1a* と蛋白複合体を形成する分子として *Tcf4*, *Tcf12*, *RBPJ* が報告されているのみである。加えて、これらの分子が *Sd* 変異で認める脊椎欠損、鎖肛、腎臓欠損に関与する知見もない状況であった。上記背景より、本研究により得られた情報は、世界で初めて報告されることになった内在性ウイルス (ETn) の挿入変異による gain-of-function タイプの疾患発症のメカニズムであるため、まだ詳細な制御機構まで明示できていないが、独自性が極めて高い成果となったと考えている。

③ この *Sd* ヘテロ接合体、ホモ接合体の両方で認める脊椎・肛門・腎臓の各臓器の極めて重篤な症状は、原因となるゲノム・分子メカニズムが全くわかっていないヒト先天性疾患の尾部退行症候群 (*Birth Defects Res A1.* 76:205-209. 2006.)、Currarino syndrome (*Am J Hum Genet.* 66:312-319. 2000.)、軸椎欠損、仙骨欠損、椎間板変性、鎖肛、泌尿生殖器疾患と多岐に渡り相似しているため、*Sd* 変異の病因を明らかにした本研究の知見のもとに、関連ヒト疾患のゲノム制御・分子制御メカニズムを明示できれば、斬新な疾患発症の知見が得られる可能性があり、該当疾患の発症の基盤的知見になりえると考えている。

④ 今後、発展すべき研究方針として、*Sd* 変異の発症メカニズムの知見が in vivo, in vitro の双方でお互いに関連することで深まるように計画し、また、同時進行でヒト先天性疾患の解析も遂行すべきである。将来、この自然発症で得られた脊椎欠損と尾部退行を示す *Sd* 変異による表現型発症の病理に対するゲノムレベル、蛋白レベルにおける分子メカニズムが明らかになることによって、脊椎・肛門・腎臓疾患の新規の病理知見が得られるだけでなく、細胞分化に重要な役割を果たす bHLH 型転写因子であり強力な細胞運命決定因子である *Ptf1a* 機能の応用により将来の関連臨床疾患の治療の開発に貢献し患者の QOL を向上させる礎になるかもしれない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

①Semba K, et al. (他17名, 1番目), Ectopic expression of *Ptfla* induces spinal defects, urogenital defects, and anorectal malformations in *Danforth's short tail* mice. *PLoS Genetics*, e1003204. doi: 10.1371/journal.pgen.1003204. 2013、査読有

②Abe K, Araki K, Tanigawa M, Semba K, et al. (他6名, 4番目), A Cre knock-in mouse line on the *Sickle tail* locus induces recombination in the notochord and intervertebral disks. *Genesis*, 50: 758-65. doi: 10.1002/dvg.22035. 2012、査読有

③Ando T, Semba K, et al. (他9名, 2番目), The floor plate is sufficient for development of the sclerotome and spine without the notochord. *Mech Dev*, 128:129-40. 2011.、査読有

④Suda H, Lee KJ, Semba K, et al. (他6名, 3番目), The *Skt* gene, required for anorectal development, is a candidate for a molecular marker of the cloacal plate. *Pediatr Surg Int*, 27:269-73. 2011.、査読有

[学会発表] (計9件)

①仙波圭, Caudal regression in *Danforth's short tail* is caused by the ectopic expression of *Ptfla*. 第60回日本実験動物学会総会、2013. 5. 15、つくば国際会議場 (つくば市)

②山村研一、脊椎形成の分子メカニズムの解析—マウスからヒトへ—、第26回日本軟骨代謝学会(招待講演)、2013. 3. 1、千里ライフサイエンスセンター (豊中市)

③仙波圭, *Danforth's short tail (Sd)* マウスのゲノム変異と原因遺伝子領域の決定、第35回日本分子生物学会年会、2012. 12. 13、福岡国際会議場 (福岡市)

④荒木喜美、*Danforth's short tail (Sd)* 変異の原因は *Ptfla* の異所性発現である、第35回日本分子生物学会年会、2012. 12. 13、福岡国際会議場 (福岡市)

⑤山村研一、古典的なミュータント *Danforth's short tail (Sd)* に学ぶ、発生工学・疾患モデル研究会(招待講演)、2012. 10. 23、東京ガーデンパレス (文京区)

⑥山村研一、尾部退行症候群と関連する *Sickle tail (Skt)* 遺伝子および

Danforth's short tail (Sd) 遺伝子、第103回BRCセミナー(招待講演)、2012. 4. 10、筑波研究所 (つくば市)

⑦仙波圭、仙椎形成異常の発生メカニズムに関する解析、第26回日本整形外科学会基礎学術集会、2011. 10. 21、ベイシア文化ホール (前橋市)

⑧ 仙波圭、尾部退行症候群を示す *Danforth's short tail (Sd)* 変異マウスの解析、第2回DBELSワークショップ in 雲仙・普賢岳、2011. 9. 2、雲仙観光ホテル(雲仙市)

⑨仙波圭、加齢、変性椎間板における *Pax1* 発現の検討、第25回日本整形外科学会基礎学術集会、2010. 10. 14、国立京都国際会館(京都市)

[図書] (計2件)

①仙波圭, 他、中外医学社、脊椎・脊髄—up to date, 「脊椎と脊髄の発生」、2012、*Clinical Neuroscience*. Vol. 30. 10: pp1094-1097

②仙波圭, 他、中山書店、論文ができてしまう! 疾患モデルマウス表現型解析指南, 「脊椎」、2011、pp233-239

[その他]

(ホームページ)

熊本大学生命資源研究・支援センター・疾患モデル分野・Sd and Skt グループ
<http://irda-genetics.kuma-u.jp/research/r06.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仙波 圭 (SEMBA KEI)

熊本大学・生命資源研究支援センター・特定事業研究員

研究者番号: 00398190

(2) 研究協力者

山村 研一 (YAMAMURA KEN-ICHI)

熊本大学・生命資源研究支援センター・教授

研究者番号: 90115197

(3) 研究協力者

荒木 喜美 (ARAKI KIMI)

熊本大学・生命資源研究支援センター・准教授

研究者番号: 90211705