

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15412

研究課題名(和文)毛髪特異的なCreマウスの作製

研究課題名(英文)Generation of hair shaft-specific Cre mice

研究代表者

下村 裕 (SHIMOMURA, Yutaka)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70397107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、毛髪に特異的に発現する毛ケラチン35(Krt35)遺伝子のプロモーターの調節下にCreリコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウス(Krt35-Cre)を作製することを目的とする。Krt35-Creの塩基配列を有するトランスジェニックマウスを作製し、B6.129X1-Gt(ROSA)26Sortm1マウスと交配させることにより、Krt35-Cre(+)/EYFP(+)のマウスの作製に成功した。しかしながら、毛髪特異的なEYFPの発現は認められなかったことから、本研究計画は目的を達成することができなかったと結論付けた。

研究成果の概要(英文)：In this project, we aimed to generate transgenic mice that specifically express Cre recombinase under the control by the promoter of a hair shaft-specific hair keratin Krt35 (Krt35-Cre). We initially made transgenic mice carrying the nucleotide sequences of Krt35-Cre. Subsequently, we backcrossed these mice with B6.129X1-Gt(ROSA)26Sortm1 mice and successfully generated Krt35-Cre(+)/EYFP(+) mice. However, these mice did not specifically expressed EYFP in the hair shaft. Therefore we concluded that we could not achieve our objectives.

研究分野：皮膚科学分野

キーワード：毛髪特異的 Creマウス Krt35

1. 研究開始当初の背景

毛包の発生は、胎生期に上皮と間葉の密接な相互作用によって開始され、生後は一生にわたり、退行期 休止期 成長期からなる毛周期を営む。成長期毛包の中央では毛髪が形成され、その周囲を内毛根鞘・コンパニオン層・外毛根鞘が取り囲み、毛髪を支持している。毛髪は、内側から毛髄・毛皮質・毛小皮の3層から構成されており、非常に強固に角化することが特徴である。毛髪には数多くの遺伝子が発現していることが知られているが、それらの遺伝子がコードする蛋白は、毛ケラチン、細胞接着分子、シグナル伝達関連分子、転写因子など多岐にわたる。しかしながら、各遺伝子の毛髪の分化過程における機能や遺伝子間の関連性等については未知の部分が多いのが現状である。それらの謎を明らかにするために、標的遺伝子のノックアウトマウスを作製して解析するという手法が挙げられるが、例えば、beta-catenin (*Ctnnb1*) や E-cadherin (*Cdh1*) などは他臓器でも重要であることから、これらの targeted ノックアウトマウスは胎児致死に陥ってしまったり生後すぐに死んでしまうという欠点がある。また、皮膚特異的なモデルマウスを作製するためのプロモーターとして、ケラチン 5 (K5)、ケラチン 14 (K14)、ケラチン 15 (K15) などが知られている。しかしながら、これらの遺伝子は毛髪には発現しておらず、さらに K5, K14 は表皮にも広く発現しているため、毛髪における標的遺伝子の機能解析には適さない。本研究開始前に、毛髪特異的な Cre マウスは存在していなかった。

2. 研究の目的

本研究では、毛髪に特異的に発現する毛ケラチン 35 (*Krt35*) 遺伝子のプロモーターの調節下に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウス (K35-Cre) を作製することを目的とする。K35-Cre マウスの作製に成功した場合、既に存在している標的遺伝子の conditional allele を持つマウスと交配させることにより、様々な遺伝子を毛髪のみでノックアウトさせることができる。これらのマウスは致死性ではなく、生後長くにわたって毛髪の動態を観察できるため、毛髪の分化機構の更なる解明につながる新知見が得られると予想される。また、*Krt35* プロモーターを利用することにより、将来的には毛髪特異的に標的遺伝子を過剰発現させるトランスジェニックマウスなどの作製も可能になる。さらに、これまでに存在している皮膚特異的なプロモーター (K5, K14, K15, *Involucrin* など) と並び、今後、世界の研究者に広く使用されるようになる発展性があると期待できる。

3. 研究の方法

(1) Mouse *Krt35* promoter (約 3 Kb; exon 1 の start codon より上流の配列も含む)・

-globin intron・Cre recombinase・ -globin 3'-UTR のシークエンスを、pBluescript-SK ベクターに順次クローニングする。*mKrt35* promoter のシークエンスは、BAC clone を鋳型として PCR で増幅する。また、pCAGGS ベクターおよび pCMV-Cre マウスの DNA も本クローニングの鋳型として用いる。作製したベクターを *KpnI*, *NotI* sites で直鎖化後、マウス受精卵前核にマイクロインジェクションする。作製した F0 マウスについて、尾から DNA を抽出後に PCR 法で genotyping を行い、トランスジェンが導入されているマウスを同定する。それらを野生型マウス (C57BL/6) と交配させて F1 マウスを作製し、トランスジェン陽性の系を複数樹立する。

(2) 上記で作製したマウスの系それぞれについて、皮膚(背部、手掌)および他臓器(脳、眼、心臓、肺、肝臓、腎臓など)から total RNA を抽出し、RT-PCR により Cre-mRNA が(毛包を含む)背部皮膚でのみ発現している founder を選択する。Cre の発現が背部皮膚でのみ検出されたマウスを、Rosa26-loxP-stop-loxP-EYFP マウス (B6.129X1-Gt(ROSA)26Sortm1(EYFP) Cos/J) と交配させて、得られたマウスの皮膚およびその他臓器の組織の凍結切片を蛍光顕微鏡で観察し、EYFP が毛髪に特異的に発現するかどうかを解析することにより、毛髪特異的な Cre マウスの系 (K35-Cre) を確立する。

(3) 作製した K35-Cre マウスを、beta-catenin (*Ctnnb1*) 遺伝子の conditional allele を持つマウス (B6.129-Ctnnb1^{tm2Kem/KnwJ}; 以下 *Ctnnb1*flox/flox と略す; 本研究室で既に保有) と交配させる。これにより得られたマウスを K35-Cre・*Ctnnb1*flox/wt と呼ぶことにする。K35-Cre・*Ctnnb1*flox/wt マウスを、再度 *Ctnnb1*flox/flox と交配させることにより、*Ctnnb1* 遺伝子が毛髪特異的にホモでノックアウトされるマウスが得られる (K35-Cre・*Ctnnb1*flox/flox)。皮膚および他の臓器の切片を作成し、抗 beta-catenin 抗体を用いた免疫染色で、beta-catenin の発現が目的通りに毛髪のみで消失しているかどうかを確認する。その後、作製した conditional ノックアウトマウスの皮膚を採取する(胎生 15.5 日~生後 42 日目まで)。まず、それぞれの HE 染色標本を作成し、毛包の発生分化にどのような形態学的異常が出ているかを解析する。また、皮膚組織から total RNA を抽出し、毛包に発現する様々な遺伝子の発現量の変化を real time PCR で測定する。特に、Wnt シグナル、Shh シグナル、Bmp シグナルに関連した遺伝子群や、ケラチン・カドヘリンなどの構造蛋白遺伝子の発現量に注目する。さらに、上記の皮膚切片で、各種毛ケラチンに対する抗体や E-cadherin などの細胞接着分子に対する抗体を用いて免疫染色(蛍光抗体法および免疫組織化学染色法)を行う。

4. 研究成果

(1) 平成 27 年度は、mouse *Krt35* promoter・SV40 intron・Cre リコンビナーゼ・SV40-3'UTR のシーケンスを、pBluescript-SK ベクター

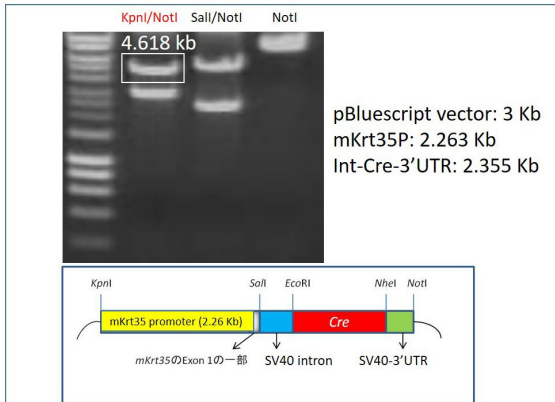


図1. *mKRT35*-Creベクターの作製と制限酵素処理による確認

に順次クローニングした(図1)。*mKRT35* promoter に関しては、当初の予定の 3 kb の産物が PCR で増幅されなかったため、約 2.26 kb の領域を使用した。また、intron と 3' -UTR についても、 β -globin 由来のものとの組み換え作業が予定通りに進まなかったため、最終的に SV40 を用いた。クローニング後、BigDye Terminator を用いて Sanger sequencing を行い、すべての塩基配列が正しいかどうかを確認した。

作製したベクターを制限酵素 *KpnI* と *NotI* で直鎖化後、4.618 Kb の塩基配列(図1)をマウス受精卵前核にマイクロインジェクションした。生まれてきたマウスの耳からゲノム DNA を抽出して PCR 法でジェノタイピングを試行した結果、トランスジーン陽性の F0 マウスが 2 匹得られた(図2)。

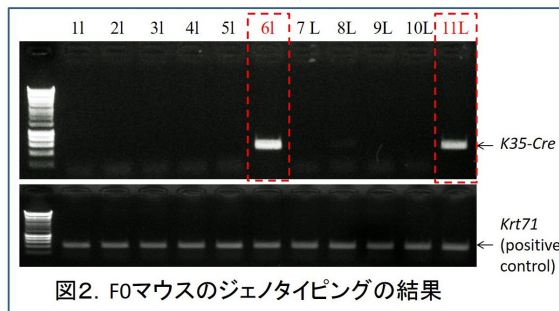


図2. F0マウスのジェノタイピングの結果

(2) 平成 28 年度には、F0 マウスを野生型マウスと交配させることにより、トランスジーンをヘテロで有する F1 マウスを 1 匹得た。その後、トランスジーン陽性の F1 マウスをさらに野生型マウスと交配させることにより、トランスジーン陽性の F2 マウスを計 8 匹得た。それらの F2 マウスを Rosa26-loxP-stop-loxP-EYFP マウス (B6.129X1-Gt(ROSA)26Sortm1) と交配させ、ジェノタイピングにより *Krt35*(+)/*EYFP*(+)、*Krt35*(-)/*EYFP*(+)、*Krt35*(+)/*EYFP*(-) または *Krt35*(-)/*EYFP*(-) の F2 マウスを抽出し、そ

れぞれの皮膚および内臓を採取して OCT コンパウンド内に封入して凍結保存した。

(3) 平成 29 年度は、まず上記のマウスの皮膚の新鮮凍結切片を作製して蛍光顕微鏡で観察したが、すべてのマウスで毛髪に緑色の蛍光の発色が観察された。つまり、この発色は非特異的なバックグラウンドと考えられた。そこで、抗 EYFP 抗体を用いて免疫染色を行い、2 次抗体に Alexa594 を使用することによって赤色の蛍光を発する陽性シグナルの検出を目指した。しかしながら、*Krt35*(+)/*EYFP*(+) でも陽性シグナルが毛髪に認められなかった。また、*Krt35*(+)/*EYFP*(+) の皮膚から total RNA を抽出して RT-PCR を施行した結果、*Cre* の発現はごくわずかしかなかった。以上の結果から、本研究で作製した *Krt35*-*Cre* マウスでは、目的通りに効率よく *Cre* リコンビナーゼを強発現しておらず、そのために EYFP の陽性シグナルが得られなかったと結論付けた。そのため、当初計画していた *Ctnnb1* の conditional ノックアウトマウスの作製に進むことができなかった。本研究が失敗した要因としては、使用した *mKrt35* 遺伝子の promoter の長さが不足していた可能性や、トランスジーンが組み込まれたマウスの染色体の領域が遺伝子発現に適していなかった可能性などが考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

下村 裕 (SHIMOMURA, Yutaka)
山口大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70397107

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし