

令和元年6月12日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04688

研究課題名(和文) 中枢神経系・感覚器における部位および伝達物質特異的神経細胞除去法の開発

研究課題名(英文) Development of locus- and/or neurotransmitter-specific cell depletion method in CNS and/or sensory organs

研究代表者

米川 博通 (YONEKAWA, Hiromichi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術研究センター・特任研究員

研究者番号：30142110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：TRECK法は特定の細胞をマウス生体内から除去し、その細胞の個体での機能を解明するユニークな方法である。本研究では、これまで行なわれていなかった中枢神経系など外胚葉系の組織に対するTRECK法の開発を試みた。さらに今回は、脳内を部位特異的に蛍光蛋白で染め分ける方法も合わせて開発した。最初、中枢神経系の発生に重要な役割をしているNeuroDやNestinを用い、Tgマウスを作製したが、蛍光蛋白の発現が弱く実用化には至らなかった。そこで成体の脳に発現している遺伝子を用いたところ、実用化できる見通しが立った。現在、このマウスを用いて、脳の特定な細胞の除去による機能解明を企画している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はこれまで、内胚葉や中胚葉起源の細胞をマウス体内から特異的に除去する方法(TRECK法)を開発し、ヒト疾患モデルマウスの樹立や、その標的となる細胞の個体内での機能を明らかにしてきた。今回、我々は未着手の中枢神経系に対し、この方法の応用を試みた。また、この方法には脳内を部署ごとに蛍光蛋白で識別化が可能なようなDNA組換え体を考案した。様々な試行錯誤の結果、蛍光顕微鏡下で識別化が可能となるような有望なマウスを作出した。このマウスは脳の蛍光による識別化と、最終的には脳内から1種類の細胞を除去できることが期待される。従って、この研究成果が成就したときは、脳科学の方面に大きな貢献が期待できる。

研究成果の概要(英文)：TRECK enable us to deplete tissue-specifically any cells of interest in live mice and the depletion lead us to disclose in vivo function of the cell. We have succeeded in generate TRECK-Tg mice, the origin of the cells are endoderm or mesoderm. However, we did not succeed in generate TRECK-Tg mice for ectodermal cells. Therefore, we tried to develop CNS-, or neurotransmitter- specific TRECK method, with which we also combined color-differential display of brain by fluorescent proteins. At the first, although we used the genes which play an important roles in early development of CNS, the expression of fluorescent proteins was too weak to radicalize for conventional fluorescent microscopy. Next, we used the gene which strongly expresses in adult brain, and found that the fluorescent protein is strongly expressed enough to do the macro-scale observation in fluorescent microscopy. Now, we are investigating whether color display and specific cell depletion take place.

研究分野：実験動物学

キーワード：毒素受容体 ジフテリア毒素 組織特異的プロモーター トランスジェニックマウス 蛍光タンパク質 Cre/loxPシステム ヒト疾患モデルマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) TRECK 法 (Toxin Receptor Mediated Cell Knockout 法) について

私たちは平成 13 年(2001 年)に TRECK 法という画期的な方法を開発した (Saito, M. et al., 2001)。この TRECK 法は細菌等が産生する生物毒素(この場合はジフテリア毒素)に対する受容体を利用して、マウス体内の特定の細胞(群)を特異的に除去し、そのことによって、そのマウスの示す表現型の変化から、その細胞(群)の生体内での機能を明らかにする方法である。遺伝子と異なり生体内の全て細胞は、その細胞が果たす特有の機能を持っていると考えられる。従って、その細胞の機能が既知の場合、その細胞をマウス体内から除去することによってマウスは異常な表現型を示すようになる。これを利用して、そのマウスの異常な表現型がヒトの疾患の表現型に類似していた場合、ヒト疾患モデルマウスとしての利用も可能になる(例えば、膵島細胞除去による I 型糖尿病の発症など: 後述)。

一方、機能未知の場合は、その細胞を除去することによってマウスに新しい表現型異常が生じる。その場合は、その表現型異常がその排除された細胞によるものであるということが簡単に証明できる(例えば、腎臓の足細胞除去による糸状体硬化症の発症から、足細胞が糸状体の維持に重要な働きをしているなど: B. L. Wharram et al., 2005)。

(2) TRECK 法の原理

この TRECK 法は、ジフテリア毒素 (DT) に対するヒトとマウスの間の感受性の差を利用して、マウス体内の標的細胞のみを特異的に除去する方法である。ヒトの細胞はマウスのそれに比べ、DT に対する感受性が 1,000 から 10,000 倍高い。その感受性は、細胞表面に発現するジフテリア毒素受容体 (DTR) の DT に対する結合の強さに依存している。従って、マウスのある特定の細胞表面にヒト由来の DTR を発現させると、その細胞はヒトの細胞と同等の感受性を持つようになる。

(3) TRECK 法の実際

ヒト由来のジフテリア毒素受容体 (hDTR) の cDNA を標的となる細胞に特異的に発現する組織特異的プロモーターの下流に置き、そのプロモーターによって制御された hDTR を標的細胞の上に発現するようなベクター (TRECK ベクター) を構築する。

その TRECK ベクターを用い、マウスの前核期卵へのマイクロインジェクションを行ない、TRECK トランスジェニックマウス (TRECK-Tg マウス) を作製する。

得られた TRECK-Tg マウスを飼育し、任意の時期にジフテリア毒素 (DT) を腹腔内に投与することにより、マウス生体内の hDTR を発現している標的細胞を破壊する。

DT によって標的細胞が破壊されたことを組織学的、あるいは免疫組織化学的に確認すると同時に、DT 投与後のマウスの表現型変化を観察し、破壊された標的細胞の *in vivo* 機能を確認する。

この 4 段階を踏むことによって、標的細胞の *in vivo* 機能が解明できる。

2001 年の論文では、肝実質細胞に特異的に発現するタンパク質アルブミンのプロモーターを用いて TRECK-Tg マウスを作製した。この TRECK-Tg マウスに DT を腹腔内に投与すると、投与後 2 日にその Tg マウスは急性の肝炎を発症した。肝臓での組織学的検索の結果、DT 処理によって肝実質細胞が特異的に破壊されていることが観察された。また、肝実質細胞の破壊の程度、すなわち肝炎の重篤度は、DT の投与量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) に概ね比例することも確認された。

この成功を基にして、私たちは平成 27 年度(2015 年度)までに、2 種類の糖尿病発症モデルマウスを樹立した。その 1 つはヒト細胞の移植を可能とする重度免疫不全マウス (SCID マウス) を遺伝的背景としたモデルマウス、もう 1 つは組織特異的発現を確実にするための大腸菌人工染色体 (Bacterial Artificial Chromosome: BAC) を基本とした TRECK ベクターを C57BL/6J に導入した Tg マウスである (Matsuoka, K. et al., BBRC 2013)。

その他に、アトピー性皮膚炎の治療薬の開発のために有用と思われる無毛 NC/Nga マウス (Takada, T. et al., Transgenic Res. 2008)、尿細管の機能不全に基づく急性腎不全マウス (Sekine, M. et al., Transgenic Res., 2012)、好塩基球、抗酸球を欠損する免疫不全マウス (Matsuoka, K. et al. PLoS One, 2013) など、6 種類の疾患に対する 7 系統の TRECK-Tg マウスを樹立し、その大部分を国際誌に公表してきた。

(4) 残された課題

しかし、近年の脳科学の発展と共に、

神経疾患、特に神経変性疾患のマウスモデルが必要となったこと、

私たちが TRECK 法で未だ神経変性疾患のモデルマウス作製に挑戦したことがないこと、など 2 つの理由により、その様な神経変性疾患のモデルマウスを作製し、実際に中枢神経系のどの部分が脳機能のどの様な所に係わるのかを明らかにする目的で、本研究を計画した。

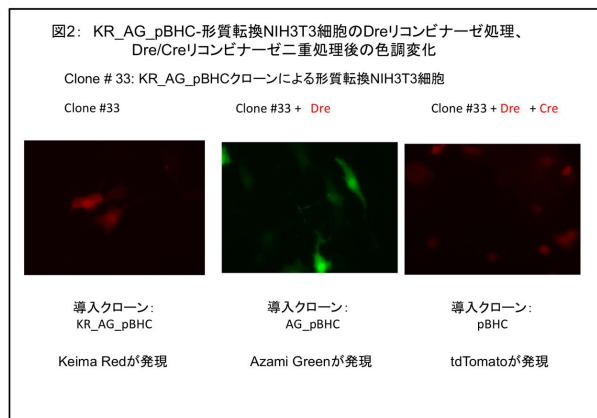
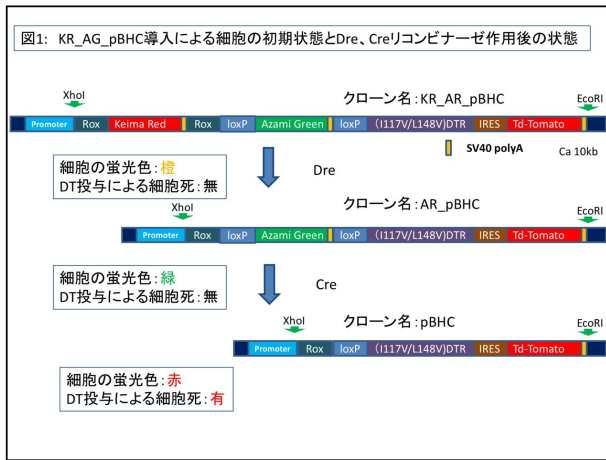
さらに、

組織特異性のあまり高くないプロモーターの利用と

中枢神経系細胞と標的細胞とを 2 種類の蛍光タンパク質で標識し、非侵襲的に hDTR の発現を観察できること、

を目的として、これまで成功している 2 種類のプロモーターによる TRECK 法 (Double Promoter Driven TRECK 法: DPD-TRECK 法) をさらに発展させた TRECK 法の開発を目指した。

そこで、Tg マウスで発現させる DNA 組換え体 (KR_AG_pBHC) を考案し、構築した。



この KR_AG_pBHC の 5'-先端にある制限酵素 XhoI の切断部位を利用し、中枢神経系で発現する遺伝子のプロモーターに連結する。次に、そのプロモーターに連結した KR_AG_pBHC をマウスに導入し、Tg マウスを作製する。もし、トランスジーンが上手く作動すれば、マウスの中枢神経系は Keima Red の蛍光を発するはずである (図 1)。この DNA 組換え体でマウス培養細胞 NIH3T3 を形質転換し、Dre リコンビナーゼ、Cre リコンビナーゼで処理したところ、いずれも図 1 に示す予想通りの色調変換が生じた (図 2)。

実際にこの過程をマウスで行なうには、KR_AG_pBHC に中枢神経系で特異的に発現する適当なプロモーターを連結した DNA 組換え体をマウスに導入して Tg マウスを作製し、Keima Red の発現を確かめる。その後、同様に中枢神経系で Dre リコンビナーゼを発現する Dre ドライバーマウスと交配することによって、Keima Red を除去し Azami Green の発現を確認する。最後に、同様に中枢神経系で Cre リコンビナーゼを発現する Cre ドライバーマウスと交配することによって、Azami Green を除去し、DTR を発現させる。DTR の発現は DTR の 3'-末端に IRES で連結した td-Tomato の蛍光で確認できる。

この時、Dre ドライバーマウス、Cre ドライバーマウスをそれぞれ異なった

組織特異的なものを利用すれば、その組織特異性に従って蛍光色素が発現し、組織の染め分けができると思った。

そこで、上記の DNA 組換え体 (KR_AG_pBHC) を中枢神経系の初期発生過程で重要な役割を果たしている NeuroD のプロモーターに結合し、Tg マウスを作製した。しかし、残念ながら、中枢神経系での Keima Red の発現は見られなかった。

そこで、実験系をより単純にするため、上記の DNA 組換え体 (KR_AG_pBHC) から KR(Keima Red)を除いた DNA 組換え体を再度 NeuroD のプロモーターに結合し、Tg マウスを作製した。

NeuroD 遺伝子を選んだ理由は、この蛋白質が神経組織と共に膵臓の細胞にも発現していることから、第 2 のプロモーターに神経特異的なプロモーターを持つ Cre ドライバー Tg マウスとの交配によって中枢神経系が tdTomato で赤色に標識され、一方の膵臓細胞には Azami Green の緑色蛍光のまま残ると予想されたからである。

しかしながら、中枢神経系での Azami Green の発現はほとんど認められず、以後の研究には使用できなかった。そこで、中枢神経系で蛍光タンパク質をより強く発現するプロモーターの探索を開始した。

2. 研究の目的

中枢神経系での蛍光蛋白の発現を蛍光顕微鏡で簡単に確認できるモデルマウスの開発を行なう。そのため、それに適したプロモーターの検索を行なう。そのモデルマウスが獲得できたら、培養細胞で得られたような蛍光蛋白による中枢神経系部位の識別、特異的細胞除去を行なう。

3. 研究の方法

NeuroD プロモーターによる中枢神経系での蛍光蛋白の発現は見られなかった。そのため、他の遺伝子のプロモーターを利用することにした。まず、最初に選んだのは中枢神経系の発生初期に働き、Flox 型の KO 遺伝子の中枢神経系特異的発現によく利用される Nestin 遺伝子を利用することにした。しかし、Nestin 遺伝子のプロモーターによる Tg マウスの作製を試みようとしたが、Nestin 遺伝子を中枢神経系に正確に発現させるためには、Nestin 遺伝子の第 1 イントロンの存在が欠かせないことが判明した。しかし、Nestin 遺伝子のプロモーターと第 1 イントロンを同時に有する Tg マウスの作製には、操作がかなり煩雑、かつ時間がかかるため、ノックインマウス作製法でモデルマウスを作製することにした。

また、Nestin 遺伝子で効果が得られないことを想定して、中枢神経系で働く他の遺伝子も利

用することにした。この場合にも、Tg マウス作製法ではなく、ノックインマウス作製法を採用することにした。

4. 研究成果

(1) Nestin 遺伝子のプロモーターの選択とモデルマウスの作製

Flox 型のノックアウト (KO) マウスを用いた中枢神経特異的 KO マウスの作製には、Nestin 遺伝子のプロモーターがよく利用されるので、試みることにした。Nestin 遺伝子のプロモーターによる Tg マウスの作製を試みようとしたが、Nestin 遺伝子を中枢神経系に正確に発現させるためには、Nestin 遺伝子の第 1 イントロンの存在が欠かせないことが判明した。しかし、Nestin 遺伝子のプロモーターと第 1 イントロンを同時に有する Tg マウスの作製には、操作がかなり煩雑、かつ時間がかかるため、ノックインマウス作製法でモデルマウスを作製することにした。図 1 に示した DNA 組換え体 KR_AG_pBHC から KR を除いた DNA 組換え体を C57BL/6N 由来の ES 細胞 RENKA のゲノムにノックインし AG_pBHC ノックイン系統を作製し、それと同時に作製した AG_pBHC 系統にさらに rox 配列で挟んだ Keima Red 遺伝子を再度ノックインして、KR_AG_pBHC ノックイン系統を作製した。これら両系統が生殖系列移行を行なうことを確認し、個体数も十分確保できたので、中枢神経系に Azami Green、Keima Red の発現があるか否かを確認した。しかし、残念ながらこれら蛍光蛋白の発現は非常に弱く、この系統も実用化にはほど遠かった。

(2) Rosa26 座位への AG_pBHC のノックイン

Nestin プロモーターによる蛍光蛋白の発現の弱さは、Nestin 蛋白の発現が胎仔後期の時期によるからと考え、成体でも常時発現をしている Rosa26 座位への AG_pBHC のノックインを試みた。このノックインマウスも生殖系列移行は比較的簡単にクリアし、繁殖もかなり良いので、Azami Green の発現を調べた。その結果、Azami Green の発現が見られた。現在、実用化が可能かどうかの検定を行なっている。

(3) Thy-1 プロモーターを利用した AG_pBHC のノックイン

中枢神経系において、Thy-1 遺伝子はマウス成体で比較的高い発現活性を有している。また、Rainbow Mouse においてもこの Thy-1 遺伝子のプロモーターが利用されている (Livet J. et al., 2007)。そこで、Rosa26 座位に Thy-1 遺伝子のプロモーターを組み込んだノックインマウスを作製した。現在、生殖系列移行を終えたマウス個体が獲得されており、C57BL/6N との交配で個体数を増やしている。

(4) 本研究計画の総括

以下の表が本研究計画で作製した遺伝子改変マウス、およびその性質等の総括である。本研究計画を実施した当初は、汎用性を重視したため、中枢神経系の初期段階で働く遺伝子(プロモーター)を重点に遺伝子改変マウスの作製を行なった。しかし、これらの遺伝子の発現は生体内では極めて弱く、それに伴い蛍光蛋白の発現も見られなかった。このことを理解するため研究期間のほぼ全般を使ってしまい、計画が大幅に遅れた。この点は TRECK 法でマウスを作製するときに十分考慮しなければならない。

この反省にたつて、本研究計画の後半期間は成体の中枢神経系で常時発現をしている遺伝子に切り替え、遺伝子改変マウスを作製した。これらのマウスについてはそう遠くない将来に実用化できるよう現在も研究を続けている。

系統名	DNA組換え体の導入法	利用した遺伝子/ プロモーター	蛍光タンパク質			発現	系統化	実用化
			Keima Red	Azami Green	td-Tomato			
Tg31	Transgenesis	NeuroD	×			×		×
Tg81	Transgenesis	NeuroD	×			×	×	×
MP1-11	Knockin	Nestin	×			×		×
MP2-9	Knockin	Nestin	×			×		×
MP2-10	Knockin	Nestin	×			×		×
MP1-3E2	Knockin	Nestin				×		×
MP2-4B5	Knockin	Nestin				×		×
SA-AG-DTR	Knockin	Rosa26	×					検討中
Rosa-Thy-1/ -AG-DTR	Knockin	Rosa26/Thy-1(pro)	×			検討中		検討中

<引用文献>

- Saito, M. et al, Nature Biotechnol. 19: 746-750, 2001
 B. L. Wharram et al., J Am Soc Nephrol 16: 2941-2952, 2005.
 Matsuoka, K. et al., BBRC 436: 400-405, 2013
 Takada, T. et al., Transgenic Res. 17: 1155-1162, 2008
 Sekine, M. et al., Transgenic Res., 21: 51-62, 2012

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11 件)

K. Matsuoka, K. Wada, Y. Miyasaka, S. P. Yasuda, Y. Seki, Y. Nishito, H. Yonekawa, C. Taya, H. Shitara, Y. Kikkawa; OHC-TRECK: A Novel System Using a Mouse Model for Investigation of the Molecular Mechanisms Associated with Outer Hair Cell Death in the Inner Ear. Scientific Rep. 査読有 9: 5285, 2019.

<https://www.nature.com/articles/s41598-019-41711-2>

H. Sano, K. Namekata, A. Kimura, H. Shitara, X. Guo, C. Harada, Y. Mitamura, T. Harada; Differential effects of N-acetylcysteine on retinal degeneration in two mouse models of normal tension glaucoma. Cell Death & Disease 査読有 10: 75, 2019.

<https://www.nature.com/articles/s41419-019-1365-z>

H. Tani, S. Ohnishi, H. Shitara, T. Mito, M. Yamaguchi, H. Yonekawa, O. Hashizume, K. Ishikawa, K. Nakada, J.-I. Hayashi; Mice deficient in the Shmt2 gene have mitochondrial respiration defects and are embryonic lethal. Scientific Rep. 査読有 8: 425, 2018. <https://www.nature.com/articles/s41598-017-18828-3>

K. Wada, J. Saito, M. Yamaguchi, Y. Seki, M. Furugori, G. Takahashi, Y. Nishito, H. Matsuda, H. Shitara, Y. Kikkawa; Pde6b^{rd1} mutation modifies cataractogenesis in Foxe3^{rcr} mice. Biochem. Biophys. Res. Commun. 査読有 496: 231-237, 2018.

<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.01.031>

H. Shitara, L. Cao, M. Yamaguchi, H. Yonekawa, C. Taya; Establishment of a heteroplasmic mouse strain with interspecific mitochondrial DNA haplotypes and improvement of a PCR-RFLP-based measurement system for estimation of mitochondrial DNA heteroplasmy. Transgenic Res. 査読有 26: 559–565, 2017.

doi: 10.1007/s11248-017-0009-2

K. Okumura, M. Saito, Y. Yoshizawa, H. Munakata, E. Isogai, I. Miura, S. Wakana, M. Yamaguchi, H. Shitara, C. Taya, A. C. Karaplis, R. Kominami, Y. Wakabayashi; The parathyroid hormone regulates skin tumour susceptibility in mice. Scientific Rep. 査読有 7: 11208, 2017. <https://www.nature.com/articles/s41598-017-11561-x>

S. P. Yasuda, Y. Miyasaka, Y. Kikkawa; Effects of Genetic Background on Susceptibility and the Acceleration of Hearing Loss in Mice. In: An Excursus into Hearing Loss. 査読有 2017. DOI: 10.5772/intechopen.72469

S. R. Yoshii, A. Kuma, T. Akashi, T. Hara, A. Yamamoto, Y. Kurikawa, E. Itakura, S. Tsukamoto, H. Shitara, Y. Eishi, N. Mizushima; Systemic Analysis of Atg5-Null Mice Rescued from Neonatal Lethality by Transgenic ATG5 Expression in Neurons. Develop. Cell 査読有 39: 116-130, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2016.09.001>

- ⑨ Y. Kikkawa, Y. Miyasaka; Genetic Modifiers of Hearing Loss in Mice: The Case of Phenotypic Modification in Homozygous Cdh23^{ahl} Age-Related Hearing Loss. In: Genetics of Deafness. Vona B, Haaf T (eds), 査読有 Monogr Hum Genet. Basel, Karger, 20: 97-109, 2016.

<https://doi.org/10.1159/000444568>

- ⑩ Y. Miyasaka, H. Shitara, S. Suzuki, S. Yoshimoto, Y. Seki, Y. Ohshiba, K. Okumura, C. Taya, H. Tokano, K. Kitamura, T. Takada, H. Hibino, T. Shiroishi, R. Kominami, H. Yonekawa, Y. Kikkawa; Heterozygous mutation of *Ush1g/Sans* in mice causes early-onset progressive hearing loss, which is recovered by reconstituting the strain-specific mutation in *Cdh23*. Hum. Mol. Genet., 査読有 25: 2045 -2059, 2016.

<https://doi.org/10.1093/hmg/ddw078>

T. Nishimura, O. Kaminuma, M. Saeki, N. Kitamura, K. Matsuoka, H. Yonekawa, A. Mori, T. Hiroi; Essential Contribution of CD4+ T Cells to Antigen-Induced Nasal Hyperresponsiveness in Experimental Allergic Rhinitis. PLoS ONE 査読有 11: e0146686, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146686>

[その他]

ホームページ等

米川博通・設楽浩志:

http://www.igakuken.or.jp/center/basic/a:nimal_research.html

吉川欣亮:

<http://www.igakuken.or.jp/project/detail/mammal.html>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

吉川欣亮 (KIKKAWA, yoshiaki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・プロジェクトリーダー
研究者番号： 20280787

設楽浩志 (SHITARA, hirosi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術研究センター・主席基盤技術研究職員
研究者番号： 90321885