

令和元年5月26日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19918

研究課題名(和文)劣性遺伝形式を示す自然発生多血症及び発毛異常モデルマウス『pocy』の解析

研究課題名(英文) Analysis of spontaneous polycythemia model mouse "pocy" showing recessive inheritance.

研究代表者

荒木 正健 (Araki, Masatake)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・准教授

研究者番号：80271609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：pocyの生後3週から18週における詳細な血液学検査を行い、多血症が一過性であることを確認した。pocyでは野生型マウスと比べて3週齢から8週齢で赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値が有意に増加し、血小板数は減少した。エクソーム解析を行い、pocy特異的な変異を持つ候補遺伝子を18個検出した。pocy2及びES細胞のDNA解析により、2個の遺伝子が候補として残った。文献情報も考慮し、責任遺伝子を1つに絞り込むことができた。この遺伝子の変異(m)がpocyの表現型の原因であることを確認するために、ゲノム編集技術を用いてC57BL/6Nマウスに変異(m)を導入することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

通常、自然発生突然変異マウスは顕性(優性)遺伝であることが多く、潜性(劣性)遺伝は稀である。本研究により、潜性遺伝形式を示す、これまでに知られていなかった多血症の存在が示唆された。多血症は無症状のこともあるが、各血球が増え血液が濃くなり、血液粘度が上昇して流れにくくなるため、中枢神経系の血液循環が障害されることで、頭痛、めまい、ほてり、のぼせ、耳鳴りの症状が起きることが多い。高血圧も一つの特徴である。pocyの解析により、これまで原因不明とされていた患者が『多血症』と診断されるようになるかもしれない。重篤な病気ではないが、特効薬が開発されれば、市場規模としては大きい可能性もある。

研究成果の概要(英文)：We found a spontaneous mutant mouse line showing red color with recessive inheritance. As a result of the blood test, it was confirmed that this recessive mutant mouse was a model mouse of polycythemia, hence it was named pocy (Familial Polycythemia). Pocy showed temporary polycythemia. Compared to C57BL/6N mice, pocy showed high level of RBC (the number of Red Blood Cells), HGB (Hemoglobin concentration) and HCT (Hematocrit value) during three to eight weeks after birth,

Exome analysis was performed to detect 18 candidate genes having a pocy specific mutation. DNA analysis of pocy2 and ES cells left two genes as candidates. Taking account of the literature information, I was able to narrow down the responsible gene to one. In order to confirm that mutation (m) of this gene is the cause of the pocy phenotype, we successfully introduced mutation (m) into C57BL / 6N mice using genome editing technology.

研究分野：生命科学

キーワード：多血症 自然発生突然変異マウス pocy 潜性(劣性)遺伝

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

1. 研究開始当初の背景

我々は可変型遺伝子トラップクローンデータベース(EGTC)を開発し、全世界に公開している。その中の Ayu21-W267 というトラップマウスにおいて、F4 世代のヘテロ接合体 とヘテロ接合体の交配を行ったところ、産仔の一部に赤い色をしたマウスが出現した。ただし、トラップベクターを指標としたジェノタイピングにおいて、赤いマウスはホモ接合体ではなく、ヘテロ接合体であった。そこでトラップした遺伝子の影響による表現型ではなく、自然発生の突然変異が原因であると推測した。次に、赤いマウス(突然変異に関してホモ接合体と予想)と B6 マウスを交配し、得られた産仔(突然変異に関してヘテロ接合体と予想)は全て赤くないことを確認した。この産仔の中のトラップベクターを持たない とを交配したところ、得られた産仔の中に赤いマウスが出現した。この後、赤い と赤い を交配し、生まれた産仔が全て赤いマウスであることを確認した。その後、ホモ接合体同士の交配で維持している。体が赤いのは血液中の赤血球が異常に増えているためであった。この突然変異を起こした遺伝子座を pocy (Familial Polycythemia)と名付けて、Center for Animal Resources and Development (CARD)への寄託も行った (CARD ID:2239, B6;CB-pocy/Card)。また、pocy は発毛異常モデルマウスでもある。

2. 研究の目的

通常、自然発生突然変異マウスは顕性(優性)遺伝であることが多く、潜性(劣性)遺伝は稀であり、劣性遺伝形式を示す多血症モデルマウスの報告はこれまでに無い。本研究の目的は、pocy の表現型を詳細に解析すると並行して、劣性遺伝様式を示す pocy の責任遺伝子を探索し、新たな多血症及び発毛異常の病因・病態解明への糸口を見つけることである。

3. 研究の方法

(1) pocy ホモ接合体マウスを C57BL/6N マウスと交配し、得られたヘテロ接合体マウス同士の交配を行って、新たに pocy ホモ接合体マウス(pocy2)を作製する。

(2) pocy2 及び C57BL/6N マウスに関して、生後3~18週における詳細な血液学検査を行う。

(3) 次世代シーケンサを用いて、野生型、ヘテロ接合体、ホモ接合体2匹ずつのエクソーム解析を行い、pocy 特異的な遺伝子変異を18個検出している。そこで今回は、pocy2 を用いて、責任遺伝子の絞り込みを行う。

(4) pocy 候補遺伝子を同定することができたら、ゲノム編集技術を用いた検証実験を行う。

4. 研究成果

(1) pocy ホモ接合体マウスを C57BL/6N マウスと交配し、得られたヘテロ接合体マウス同士の交配を行って、新たに pocy ホモ接合体マウス(pocy2)を作製した(図1)。pocy2 についても、CARD への寄託を行った(CARD ID:2749, B6;CB-pocy2/Card)。

(2) pocy2 及び C57BL/6N マウス各5~7匹を単位とする各8グループを構成し、それぞれ生後3、5、8、10、12、14、16、18週に採血後、解剖して脾臓の重量を測定した。血球成分については、総合血液学検査装置[ADVIA2120i]を用いて、詳細な解析を行った。

(** : P<0.01, * : P<0.05, Unpaired-Student's-t-test, two-tail)

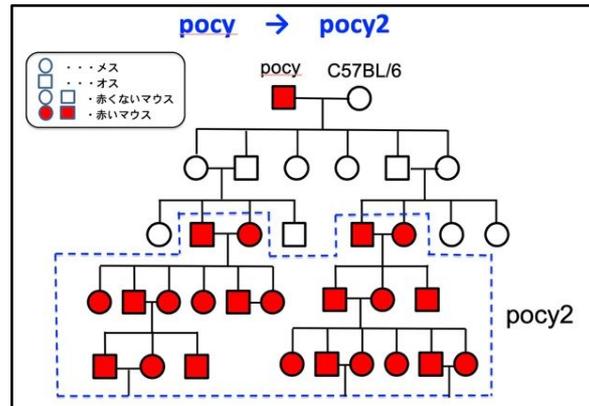


図1 . pocy2 の樹立

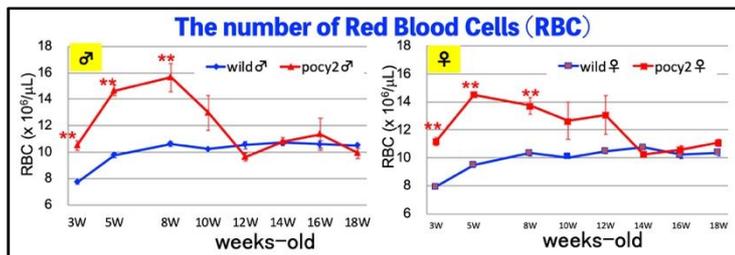


図2 . 赤血球数の継時変化

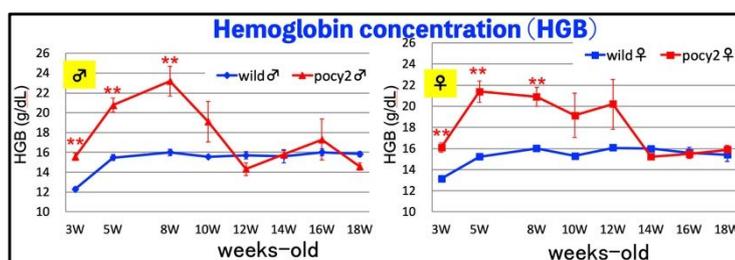


図3 . ヘモグロビン濃度の継時変化

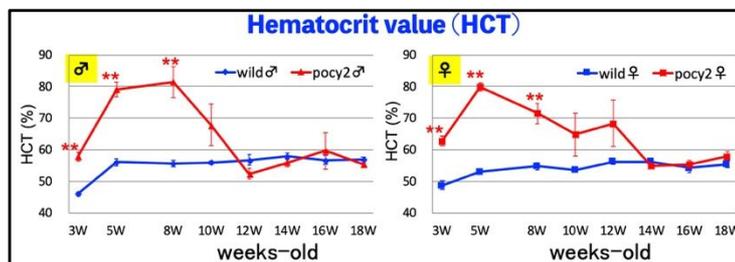


図4 . ヘマトクリット値の継時変化

その結果、pocy の多血症は一過性であることを確認した。赤血球数(図2)、ヘモグロビン濃度(図3)及びヘマトクリット値(図4)は生後3~8週で有意に増加し、一時的な多血症を発症するが、その後は正常であった。また生後3~8週では血小板数(図5)が有意に減少した。逆に白血球数(図6)は生後8週以降有意に増加した。

脾臓の重量は生後3~8週で有意に増加していた(図7)。

(3) pocy の表現型の原因遺伝子を同定するために、次世代シーケンサーを用いてエクソーム解析を行った。ホモ接合体(pocy)ヘテロ接合体及び野生型(C57BL/6N)マウスのオス及びメス各1匹からDNAを抽出し、Agilent SureSelect Mouse All Exon Kitを用いて解析した。その結果、pocy 特異的な変異を持つ候補遺伝子を18個検出した(図8)。

次に、この18個の遺伝子に関して、pocy2でもホモ接合体状態を維持しているものを選ぶことで、7個に絞り込むことができた。

pocy は、もともと Ayu21-W267 というトラップクローンからスタートしている。データベース EGTC には 1278 クローンの ES 細胞株を登録しているが、その中の 508 クローンに関しては、ES 細胞からキメラマウスを複製し、マウスラインを樹立して CARD に寄託している。しかしながら、pocy のような表現型はこれまで観察されなかった。従って、Ayu21-W267 の親株である ES 細胞:KTPU8 ES 細胞株においては、pocy の責任遺伝子は野生型であったと推定される。そこで7個の候補遺伝子について、KTPU8 ES 細胞におけるシーケンスを確認したところ、5個はヘテロ接合体状態で、2個が野生型であることが分かった。すなわち、この2個のうちのどちらかが pocy の責任遺伝子であると考えられる。

さらに文献情報も考慮し、責任遺伝子の候補を一つに絞り込むことができた。

(4)一つに絞り込んだ遺伝子の変異(m)が pocy の表現型の原因であることを確認するために、ゲノム編集技術を用いて C57BL/6N マウスに変異(m)を導入することに成功した。これから表現型の確認を行う予定である。

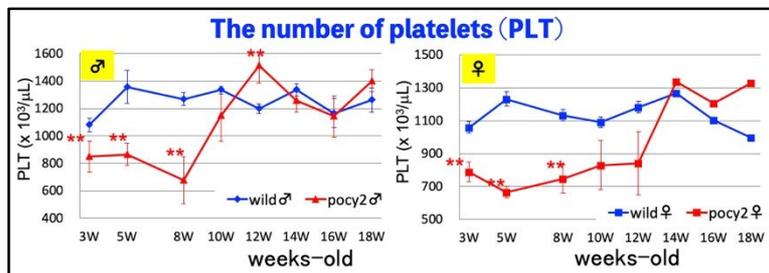


図5. 血小板数の経時変化

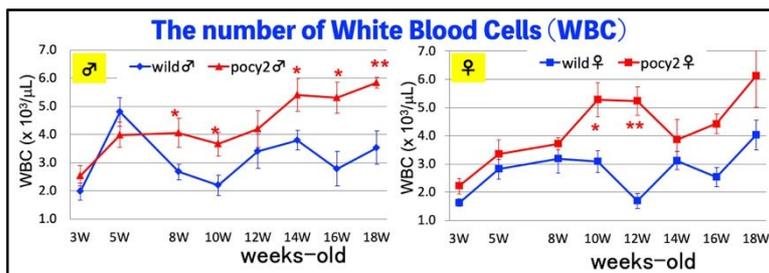


図6. 白血球数の経時変化

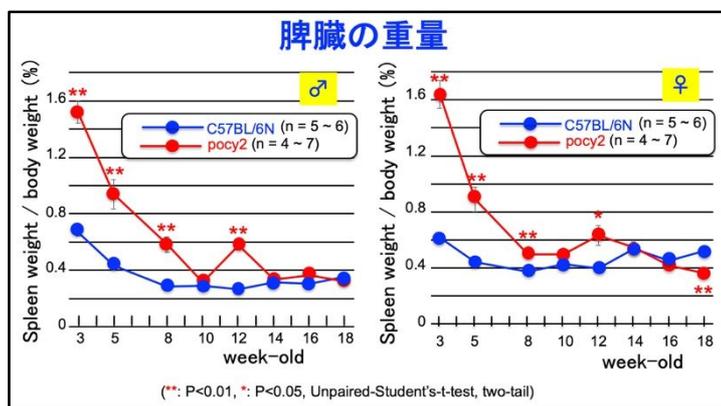


図7. 脾臓重量の経時変化

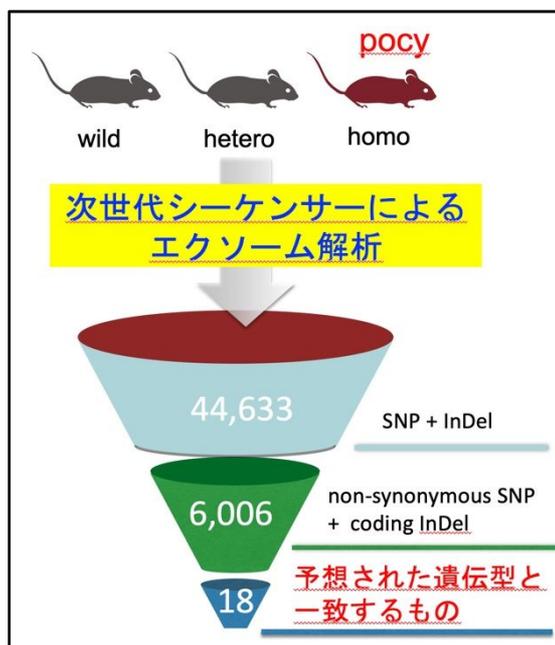


図8. エクソーム解析による責任遺伝子の探索

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Tanaka, K., Kim, S. E., Yano, H., Matsumoto, G., Ohuchida, R., Ishikura, Y., Araki, M., Araki, K., Park, S., Komatsu, T., Hayashi, H., Ikematsu, K.,

Tanaka, K., Hirano, A., Martin, P., Shimokawa, I., Mori, R., MiR-142 is required for Staphylococcus aureus clearance at skin wound sites via small GTPase-mediated regulation of the neutrophil actin cytoskeleton. *J. Invest. Dermatol.*, 137(4), 931-940 (2017).

Kurogi, S., Sekimoto, T., Funamoto, T., Ota, T., Nakamura, S., Nagai, T., Nakahara, M., Yoshinobu, K., Araki, K., Araki M. and Chosa, E., Development of an efficient screening system to identify novel bone metabolism-related genes using the exchangeable gene trap mutagenesis mouse models. *Sci. Rep.*, 7, 40692 (2017).

Goswami, D., Marz, S., Li, Y. T., Artz, A., Schafer, K., Seelige, R., Pacheco-Blanco, M., Jing, D., Bixel, M. G., Araki, M., Araki, K., Yamamura, K., Vestweber, D., Endothelial CD99 supports arrest of mouse neutrophils in venules and binds to neutrophil PILRs. *Blood*, 129(13),1811-1822 (2017).

Kim, YJ., Osborn, D., Lee, JY., Araki, M., Araki, K., Mohun, T., Käsäkoski, J., Brandstack, N., Kim, HT., Miralles, F., Kim, CH., Brown, N., Kim, HG., Martinez Barbera, JP., Ataliotis, P., Raivio, T., Layman, L., Kim, SH., WDR11-mediated Hedgehog signalling defects underlie a new ciliopathy related to Kallmann syndrome. *EMBO reports*, 19, 269-289 (2018).

Tsukahara, R., Yamamoto, S., Yoshikawa, K., Gotoh, M., Tsukahara, T., Neyama, H., Ishii, S., Akahoshi, N., Yanagida, K., Sumida, H., Araki, M., Araki, K., Yamamura, K. I., Murakami-Murofushi, K., Ueda, H., LPA5 signaling is involved in multiple sclerosis-mediated neuropathic pain in the cuprizone mouse model. *J. Pharmacol.Sci.*, 136, 93-96 (2018).

[学会発表](計17件)

荒木 正健、「染色体特異的にクラスターを形成しているトラップ領域 (CSCT) の解析」第64回日本実験動物学会総会、2017年。

古畑 理樹、「生体内における LincRNA-p21 の発現および機能解析」第30回モロシヌス研究会、2017年。

中原 舞、「内在性遺伝子座で過剰に発現した LincRNA-p21 が糖尿病を引き起こす機序の解明」第30回モロシヌス研究会、2017年。

吉住友希、「LincRNA トラップクローンのゲノム編集による修正と機能解析」第30回モロシヌス研究会、2017年。

荒木 正健、「染色体特異的にクラスターを形成しているトラップ領域：CSCT13は、マウス初期発生過程において重要な役割を演じていることが示唆された」日本遺伝学会第89回大会、2017年。

Masatake Araki, "Chromosome specific clustered trap region: CSCT13 might be related with the early embryogenesis of mouse." 2017年度生命科学系学会合同年次大会・第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会、2017年。

古畑 理樹、「生体内における LincRNA-p21 の発現解析」2017年度生命科学系学会合同年次大会・第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会、2017年。

吉信 公美子、「可変型遺伝子トラップ法による新規 LincRNA の生体内機能解析」2017年度生命科学系学会合同年次大会・第40回日本分子生物学会年会・第90回日本生化学会大会、2017年。

古閑 成美、「劣性(潜性)遺伝形式を示す自然発生多血症モデルマウス『pocy』の解析」平成29年度文部科学省新学術領域研究 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム 成果発表会、2018年。

荒木正健、「潜性(劣性)遺伝形式を示す自然発生多血症モデルマウス『pocy』の解析」第65回日本実験動物学会総会、2018年。

北元優梨、「潜性遺伝形式を示す自然発生突然変異多血症モデルマウス『pocy』の解析」第31回モロシヌス研究会、2018年。

古畑理樹、「生体内における LincRNA-p21 の機能解析」先端モデル動物支援プラットフォーム 若手支援技術講習会、2018年。

吉信公美子、「コンディショナルノックアウトを効率よく行うためのタモキシフェン投与方法の検討」日本遺伝学会第90回大会、2018年。

荒木正健、「潜性(劣性)遺伝形式で多血症の症状を示す自然発生突然変異マウス『pocy』の解析」日本遺伝学会第90回大会、2018年。

北元優梨、「潜性(劣性)遺伝形式を示す自然発生多血症モデルマウス『pocy』の解析」第41回日本分子生物学会年会、2018年。

齋藤桂花、「マウスゲノムにおける遺伝子および転写産物の存在しない領域に集積するトランプクローンの探索」第41回日本分子生物学会年会、2018年。

荒木 正健、「劣性（潜性）遺伝形式で多血症の症状を示す自然発生突然変異マウス『pocy』の解析」、平成30年度文部科学省新学術領域研究 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム 成果発表会、2018年。

〔その他〕

ホームページ等

データベース EGTC [<http://egtc.jp>]

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：荒木 喜美

ローマ字氏名：ARAKI KIMI

所属研究機関名：熊本大学

部局名：生命資源研究・支援センター

職名：教授

研究者番号（8桁）：90211705

研究分担者氏名：吉信 公美子

ローマ字氏名：YOSHINOBU KUMIKO

所属研究機関名：熊本大学

部局名：生命資源研究・支援センター

職名：助教

研究者番号（8桁）：20274730

研究分担者氏名：要 匡

ローマ字氏名：KANAME TADASHI

所属研究機関名：国立成育医療研究センター研究所

部局名：ゲノム医療研究部

職名：部長

研究者番号（8桁）：40264288

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：林田 隆成

ローマ字氏名：HAYASIDA RYUUSEI

研究協力者氏名：北元 優梨

ローマ字氏名：KITAMOTO YUURI

研究協力者氏名：鳥越 大輔

ローマ字氏名：TORIGOE DAISUKE

研究協力者氏名：中村 直子

ローマ字氏名：NAKAMURA NAOKO

研究協力者氏名：中潟 直己

ローマ字氏名：NAKAGATA NAOMI

研究協力者氏名：高岡 裕

ローマ字氏名：TAKAOKA YUTAKA

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。