

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和2年6月16日現在

機関番号：13601
研究種目：奨励研究
研究期間：2019
課題番号：19H00327
研究課題名：薬剤投与誘導型 *Chst14* 遺伝子欠損マウスの樹立と効率的な遺伝子欠損誘導方法の確立
研究代表者
嶋田 新 (SHIMADA, Shin)
信州大学基盤研究支援センター動物実験支援部門・技術職員

交付決定額（研究期間全体）（直接経費）：540,000 円

研究成果の概要：本研究では、*Chst14* flox マウスと Cre-ERT2 マウスを交配することで、薬剤（タモキシフェン）投与誘導型 *Chst14* 遺伝子欠損マウスの樹立に成功した。樹立したマウスを用いて *Chst14* 遺伝子の欠損誘導方法を検討した結果、効果的な欠損誘導には、コーンオイルに溶解したタモキシフェン (Tamox) を 25mg/kg の用量で 5 日間連続腹腔内投与する方法が適していることが示唆された。また、Tamox 混合飼料を 5 日間自由摂取させることでも欠損誘導は可能であった。今後は、本研究で得られたデータを基に、さらに効率的な欠損誘導方法の検討を行う予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

薬剤投与誘導型 *Chst14* 遺伝子欠損マウス (DI-*Chst14* KO マウス) を樹立し、欠損誘導方法を検討したことにより、DI-*Chst14* KO マウスの効率的な遺伝子欠損誘導方法（タモキシフェンの最適投与方法と投与量および解析時期）を確立するためのデータが得られた。得られたデータを基に、さらに効率的な遺伝子欠損誘導方法を検討することが可能になった。将来的に、DI-*Chst14* KO マウスは筋拘縮型エーラスダンロス症候群 (mcEDS) の疾患モデル動物として、mcEDS の病態メカニズム解明研究に寄与することが期待される。

研究分野：実験動物学

キーワード：筋拘縮型エーラスダンロス症候群 (mcEDS)、DI-*Chst14* KO マウス、遺伝子欠損誘導、タモキシフェン (Tamox)、腹腔内投与、経口投与

1. 研究の目的

筋拘縮型エーラスダンロス症候群 (mcEDS) は、信州大学医学部から報告された新規疾患で、*CHST14* 遺伝子の変異を原因とする¹⁾。mcEDS 患者では、巨大皮下血腫等の生命に関わる重篤な皮膚症状を呈するが、病態メカニズムの解明や治療法開発には至っていない。将来的な治療法開発のためには、疾患モデル動物を用いた病態メカニズム研究が重要であるが、*Chst14* 遺伝子ホモ欠損マウスの殆どが胎生致死となる²⁾ため、出生率の改善が必要と考えた。以前の研究で離乳率の高い系統である BALB/c への戻し交配を行ったところ、出生率を従来の 1.9% から 8.1% まで改善することに成功したが、メンデルの法則と比べると出生率は低いものであった。そこで、胎生致死の問題を完全に回避するために、CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子編集を行い、本研究に先行して *Chst14* flox マウスの樹立に成功していた。

本研究では、(1) 先行して樹立した *Chst14* flox マウスと、タモキシフェン (Tamox) 投与依存的に flox 配列を切除する Cre-ERT2 マウスを交配し、Tamox 投与依存型 *Chst14* 遺伝子欠損マウス (DI-*Chst14* KO マウス) を樹立すること、および (2) 樹立した DI-*Chst14* KO マウスを用いた病態解析を行うための効率的な遺伝子欠損誘導方法 (Tamox の最適投与方法と投与量および解析時期) を確立することにより、将来的な mcEDS の病態メカニズム解明研究に役立てることを目的とした。

2. 研究成果

(1) *Chst14* flox マウスと Cre-ERT2 マウスを交配し、出生したマウスから *Chst14* flox

hetero, Cre-ERT2 hetero マウスを選定して同腹仔の雌雄同士を交配することで *Chst14* flox homo, Cre-ERT2 homo (DI-*Chst14* KO) マウスの樹立に成功した。

(2) 10 週齢まで飼育した DI-*Chst14* KO マウスに腹腔内投与または経口投与により Tamox を投与し、*Chst14* 遺伝子の欠損率を解析した。腹腔内投与では、Tamox をコーンオイルに溶かして 0 (コーンオイルのみ)、10、25、50、100 mg/kg の投与量で 5 群に分けて 5 日間連続で投与した。経口投与では、Tamox 混合粉末飼料(Tamox 含有量 0.2[mg/g]) を 5 日間連続で与えた。投与後 2 日間のインターバルを置き、0、7、14、28 日目で経時的に皮膚生検を行い、採取した皮膚からゲノム DNA を抽出して、リアルタイム PCR により *Chst14* 遺伝子の欠損率を測定した。0mg/kg 腹腔内投与群では欠損誘導は起こらないことを確認した。10mg/kg 腹腔内投与群の欠損率±標準誤差は、0、7、14、28 日目でそれぞれ $1.6 \pm 5.5\%$ 、 $1.8 \pm 5.9\%$ 、 $3.2 \pm 2.7\%$ 、 $0.3 \pm 3.7\%$ であり低い欠損率であった (図 1)。25mg/kg 腹腔内投与群では、 $31.4 \pm 13.6\%$ 、 $40.6 \pm 12.6\%$ 、 $39.6 \pm 9.0\%$ 、 $49.1 \pm 5.8\%$ であり、投与後 7 日後以降の欠損率は、10mg/kg 腹腔内投与群と比較して高い値を示した (Tukey 検定により有意差あり) (図 1)。50mg/kg 腹腔内投与群では、 $31.6 \pm 9.1\%$ 、 $41.2 \pm 7.0\%$ 、 $37.1 \pm 7.2\%$ 、 $59.1 \pm 2.2\%$ 、100mg/kg 腹腔内投与群では、 $31.3 \pm 5.2\%$ 、 $33.4 \pm 4.2\%$ 、 $41.6 \pm 5.2\%$ 、 $67.7 \pm 4.4\%$ であり、25mg/kg 腹腔内投与群と比較して有意差はなかった (図 1)。Tamox 混合粉末飼料を与えた群は、 $37.9 \pm 4.2\%$ 、 $21.7 \pm 12.1\%$ 、 $38.9 \pm 4.8\%$ 、 $35.3 \pm 6.8\%$ であり、25mg/kg 腹腔内投与群と比較して有意差はなかった (図 1)。投与群ごとに時間経過による欠損率の変化を比較解析した結果、0、7、14、28 日目の欠損率に有意差は認められなかった。

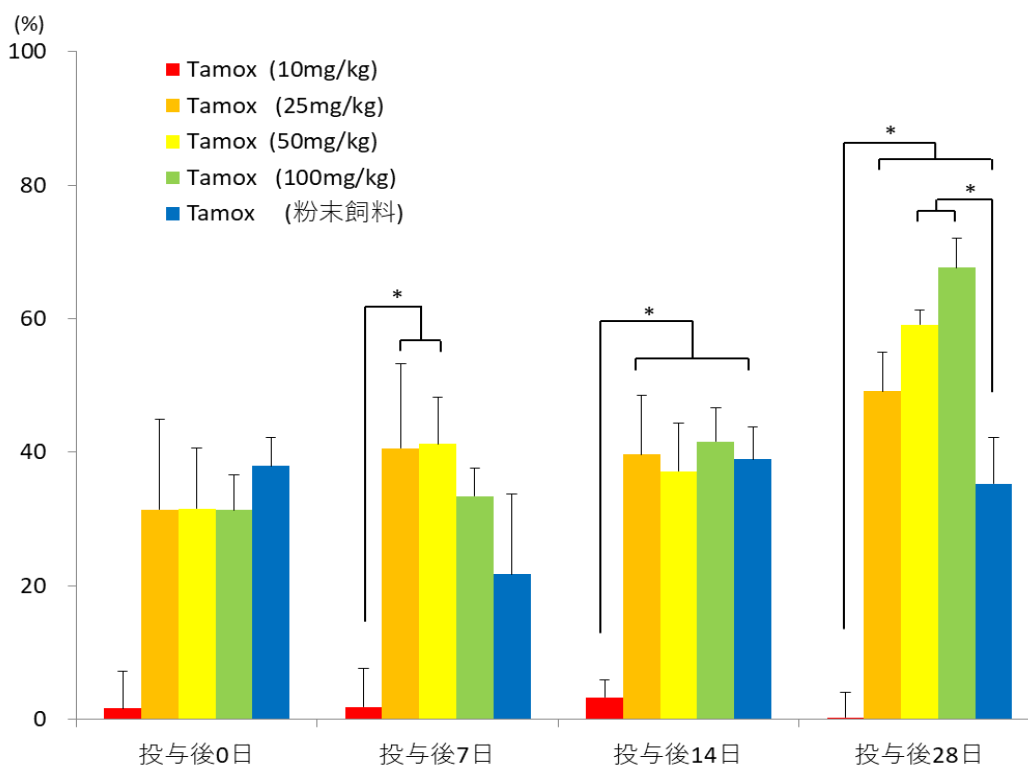


図1. DI-*Chst14*マウス(皮膚)の*Chst14*遺伝子の欠損率

Tamox 10、25、50、100 mg/kg腹腔内投与群およびTamox混合粉末飼料経口投与群の *Chst14*遺伝子欠損率の平均値±標準誤差(n=5)を経時的に示した。*: Tukey検定 $p < 0.05$

Tamox 投与後 28 日目では、関節、心臓、肺、肝臓についても採取して解析した。心臓、肝臓、肺については、安定した結果が得られなかったため、再度解析をする予定である。関節については皮膚と同様の欠損率の推移を示した。

以上の結果から、Tamox の投与量と遺伝子欠損率は必ずしも相関しないことが明らかになった。Tamox 25mg/kg 以上の投与量では、欠損率に有意差はなく、Tamox 投与量の増加は副作用のリスクが増す可能性があるため、効果的な欠損誘導には、25mg/kg 腹腔内投与が適していることが示唆された。また、Tamox 混合粉末飼料によっても欠損誘導が可能であった。解析時期については、欠損率の個体差を抑えるために、投与後 7 日目以降が適当であることが示唆された。今後は、本研究で得られた知見を基に、より高い欠損率を実現するために、投与期間等の検討を行う予定である。将来的に、本研究で樹立した DI-*Chst14* KO マウスは mcEDS の疾患モデル動物として、病態メカニズム解明研究に寄与することが期待される。

〈引用文献〉

- ①Kosho, T. 2016. CHST14/D4ST1 deficiency: New form of Ehlers-Danlos syndrome. *Pediatr. Int.* 58: 88-99.
- ②Yoshizawa, T., Mizumoto, S., Takahashi, Y., Shimada, S., Sugahara, K., Nakayama, J., Takeda, S., Nomura, Y., Nitahara-Kasahara, Y., Okada, T., Matsumoto, K., Yamada, S. and Kosho, T. 2018. Vascular abnormalities in the placenta of Chst14^{-/-} fetuses: 330 implications in the pathophysiology of perinatal lethality of the murine model and 331 vascular lesions in human CHST14/D4ST1 deficiency. *Glycobiology* 28: 80-89.

3. 主な発表論文等

〔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 :

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 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

4. 研究組織

研究協力者

研究協力者氏名 : 吉沢 隆浩

※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。