

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592115

研究課題名(和文)ノックアウト・エクспレッション法を用いた新しいグリオーマモデルマウスの作出

研究課題名(英文)Generation of new model mice for brain tumors using conditional knockout method

研究代表者

薄井 宏 (Usui, Hiroshi)

新潟大学・脳研究所・非常勤講師

研究者番号：20192510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：脳腫瘍モデルマウスを作製するために、Trp53遺伝子が全身で欠失し、Nf1遺伝子が脳内細胞選択的に欠損するマウスを作製した。そのために、組み換え酵素Creを脳内細胞選択的に発現する3種類のCreマウス(GFAP-Cre、Nestin-Cre、及びNG2-Creマウス)を用いた。いずれの場合にも、得られたマウスは多くが9ヵ月齢までに死亡し、脳腫瘍の発生が高い確率で認められた。中でも、NG2-Creマウスを用いてNG2グリア選択的にNf1遺伝子を欠損させた場合には、89%(32/36)という高率に脳腫瘍が認められ、その組織像はoligodendrogliomaが多いという特徴があった。

研究成果の概要(英文)：In order to generate novel model mice for brain tumors, we produced Trp53 gene-knockout and Nf1 gene-conditional knockout mice, in which Trp53 gene was deleted in the whole body and Nf1 gene was destroyed specifically in the brain cells. For this purpose, Trp53-null/Nf1-flox mice were crossed with 3 types of Cre-knock in mice where Cre recombinase were expressed in the brain-specific manner (Nestin-Cre, GFAP-Cre, and NG2-Cre mice). Most of the resulting mice died by 9 months-old and expressed brain tumors in high frequency. Among them, when Trp53-null/Nf1-flox mice were crossed with the NG2-Cre mice in which Cre recombinase was expressed in NG2 glial cells (oligodendroglia progenitor cells), 89% (32/36) of mice exhibited brain tumors, most of which were oligodendrogliomas or anaplastic oligodendrogliomas. Our results showed that the model mice of brain tumors were efficiently produced by the conditional knockout method.

研究分野：分子神経病理学

キーワード：脳腫瘍 モデルマウス 癌抑制遺伝子 細胞選択的機能破壊

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒト脳腫瘍の原因として、癌抑制遺伝子の失活は重要である。しかし、動物モデルで、癌抑制遺伝子を失活させて脳腫瘍の発生させることは、これまで困難であった。その理由は、通常のノックアウト法を用いて全身で機能破壊すると、ほとんどの癌抑制遺伝子では胎生致死になるためである。そのため、細胞選択的に癌抑制遺伝子の機能破壊をするコンディショナルノックアウト(細胞特異的遺伝子破壊)法を導入する必要があった。しかし、そのような研究は、研究開始当時ほとんど行われていなかった。

(2) コンディショナルノックアウト法により脳内細胞選択的に癌抑制遺伝子を機能破壊するためには、脳内細胞選択的に組み換え酵素Creを発現するマウスが必要となる。しかし研究開始当時、脳腫瘍作出に利用できるCreマウスは限られていた。

(3) 我々はこれまでに、ベクター作製の高速化やES細胞スクリーニングの効率化に成功し、コンディショナルノックアウトマウスを多数、効率よく作製した実績を有している。(2007年神経科学学会シンポジウム「C57BL/6系ES細胞RENKAを用いたコンディショナルノックアウトマウスの系統的作製」で発表。)また我々は、組み換え酵素Creを脳内細胞選択的に発現するマウスを、ノックイン法を用いて作製していた。

(4) 我々のこれまでの研究成果を活用することにより、癌抑制遺伝子を脳内細胞選択的に機能破壊して脳腫瘍モデルマウスを作製できると考えられた。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、複数の癌抑制遺伝子を機能破壊することにより、脳腫瘍のモデルマウスを作製する。そのために、Trp53 遺伝子を全身で機能破壊した上に、Nf1 遺伝子を脳内細胞選択的に機能破壊したマウスを作出する。

(2) Nf1 遺伝子の脳内細胞選択的な機能破壊のために、脳内細胞選択的に発現する遺伝子(Nestin、GFAP、及び NG2) に組み換え酵素 Cre をノックインした 3 種類の Cre マウスを用いる。これらのマウスを用いた場合の結果を比較検討することにより、Nf1 遺伝子を破壊した細胞(腫瘍の発生母細胞)と発生する

腫瘍の相関を解析する。

(3) これらを通じて、これまでに作製されていない優れた脳腫瘍のモデルマウスを作製することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) まず、Trp53 遺伝子のエクソン 5 - 7 をピュロマイシン耐性遺伝子で置き換えたベクターを、C57/B6 系マウスから作製した ES 細胞 RENKA に導入し、Trp53 遺伝子がノックアウトされた ES 細胞を作製した。Trp53 遺伝子は、全身でノックアウトしても胎生致死にならない数少ないがん抑制遺伝子の 1 つである。

(2) 次に、Nf1 遺伝子を脳内細胞選択的に欠損させることを目的として、Nf1 遺伝子のフレームシフトエクソン 4 を Cre recombinase の認識配列 loxP で挟んだ Nf1-fllox ベクター(ネオマイシン耐性遺伝子を持つ)を、(1) で選択した Trp53-null の ES 細胞に導入した。そして、Trp53-null/Nf1-fllox の ES 細胞を作製した。Trp53 遺伝子と Nf1 遺伝子は共に第 10 染色体上の近傍に存在するために、Trp53-null と Nf1-fllox の形質は、一緒に次の世代に引き継がれると考えられる。

(3) Trp53-null/Nf1-fllox の ES 細胞を初期胚に導入し、キメラマウスを作製した。得られたキメラマウスを野生型マウスと交配することにより、Trp53^{+/-};Nf1^{fllox/+}マウスを作出した。

(4) Cre-loxP 組み換え系を利用して、脳内細胞選択的に Nf1 遺伝子を機能破壊するために、脳内細胞選択的に組み換え酵素 Cre を発現する 3 種類の Cre マウスを作製した。各マウスで Cre のノックインに使用した遺伝子は、神経幹細胞に選択的に発現する Nestin 遺伝子(Nestin-Cre マウス)、アストログリア細胞選択的に発現する GFAP 遺伝子(GFAP-Cre マウス)、オリゴデンドログリアの前駆細胞である NG2 グリアに選択的に発現する NG2 遺伝子(NG2-Cre マウス)である。これらのマウスをレポーターマウスと交配し、得られたマウスの組織を X-gal 染色することにより、3 種類のマウスにおける Cre 発現細胞の分布を確認した。

(5) (3)の Trp53^{+/-};Nf1^{fllox/+}マウスを、(4)の脳

内細胞選択的に Cre を発現するマウスと交配することにより、Trp53 遺伝子が全身で欠失し、かつ Nf1 遺伝子が脳内細胞選択的に欠損するマウスを作製した。その際に、3 種類の Cre マウス (Nestin-Cre マウス、GFAP-Cre マウス、及び NG2-Cre マウス) を用いて比較解析した。

(6) (5) で得られたマウスの遺伝子型ごとの生存率を確認すると共に、死亡したマウスから脳組織切片を作成して、脳腫瘍の発生の有無を解析した。また、発生した脳腫瘍の組織像を形態学的に解析した。

4. 研究成果

(1) Trp53-null/Nf1-flox マウスの作製：Trp53 遺伝子のエクソン 5-7 をピューロマイシン耐性遺伝子と置き換えたベクター (図 1 上段) を、C57/B6 系マウスから樹立した ES 細胞 REBKA に導入し、ピューロマイシン耐性になった細胞から DNA を抽出して、サザンブロット解析により Trp53 遺伝子で相同組み換えを起こしたクローンを選択した。次に、選択した ES 細胞に、ネオマイシン耐性遺伝子を持つ Nf1-flox ベクター (図 2 上段) を導入し、得られたネオマイシン耐性クローンから DNA を抽出して、サザンブロット法により Nf1 遺伝子で相同組み換えを起こしたクローンを選択した。

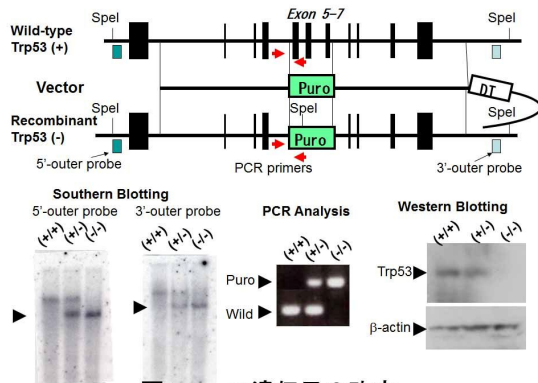


図1: Trp53遺伝子の改変

得られた Trp53-null/Nf1-flox の ES 細胞を初期胚に注入してキメラマウスを作製し、キメラマウスを野生型マウスと交配して、ヘテロマウス Trp53^{+/-};Nf1^{flox/+} を作製した。ヘテロマウス同士を交配することによりホモのマウス Trp53^{-/-};Nf1^{flox/flox} を作出し、ヘテロとホモのマウスから DNA と蛋白を調整して、サザンブロット解析、PCR 解析、ウェスタンブロット解析を行った。その結果、Trp53 遺伝子がノックアウトされていること (図 1 下

段)、Nf1 遺伝子に loxP 配列を含む Neo 遺伝子が挿入されていること (図 2 下段) が確認できた。

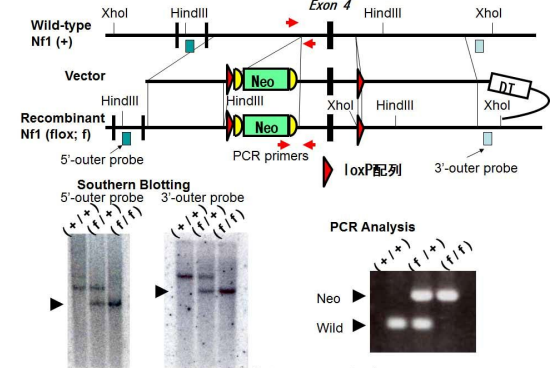


図2: Nf1遺伝子の改変

(2) 脳内細胞選択的 Cre 発現マウスの解析：これまでに作製した 3 種類の Cre 発現マウスを、レポーターマウスと交配し、得られたマウスから組織切片を作製して X-gal 染色を行い、Cre 発現細胞の分布を解析した。

Nestin-Cre マウスとレポーターマウスを交配して得られたマウスの解析では、ガラクトシダーゼ陽性細胞は脳内に局限しており、肝臓や腎臓など脳以外の臓器では X-gal 染色陰性であった。このことは Nestin-Cre マウスでは、組み換え酵素 Cre が脳内細胞選択的に発現していることを示している。

GFAP-Cre マウスとレポーターマウスを交配して得られたマウスの解析では、ガラクトシダーゼ陽性細胞は脳内に局限していたが、グリア細胞ばかりではなく神経細胞も陽性となった。このことは、GFAP がアストログリアに発現するばかりではなく、神経幹細胞にも発現しているという最近の知見を反映するものと考えられた。

NG2-Cre マウスとレポーターマウスを交配して得られたマウスの解析では、ガラクトシダーゼ陽性細胞は検出されなかった。このことは、NG2 陽性の小型グリアでは、X-gal 染色陽性細胞の検出が難しいことを反映しているものと考えられた。

(3) Nestin-Cre マウスを用いた場合に発生した脳腫瘍：Trp53^{+/-};Nf1^{flox/+} マウスを Nestin-Cre マウスと交配し、得られたマウスを解析した。これらのマウスの中には、Trp53 遺伝子が全身で欠失し、かつ Nf1 遺伝子が脳内細胞選択的に欠損したマウスが存在する。解析した 133 匹のマウスの中には、ホモのノックアウトマウス Trp53^{-/-};Nf1^{flox/flox};Nestin^{Cre/+} は存在しなかった。このことはホモのマウス

が胎生致死であることを示している。一方、ヘテロのノックアウトマウス $Trp53^{+/-}; Nf1^{flox/+}; Nestin^{Cre/+}$ は 32 匹得られたが、生後 18 週から 36 週の間にはほとんどが死亡し、62 週までに全例が死亡した。

死亡したマウスから切片を作製して解析したところ、32 匹中 11 匹 (34.4%) のマウスで脳腫瘍が形成された。その組織像は GFAP 染色陽性の Anaplastic astrocytoma 3 例、Oligo2 染色陽性の Oligodendroglioma 6 例、小型の未分化細胞からなる PNET (Primitive Neuroectodermal Tumor) 2 例であった。図 3 に Anaplastic astrocytoma の例を示す。ここでは、脳内に発生した腫瘍は、抗 GFAP 抗体染色陽性の異形成の高い細胞で占められていた。

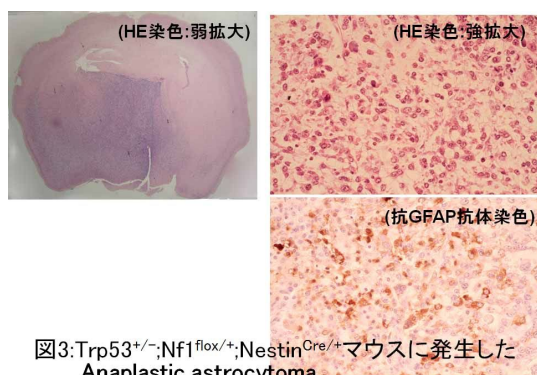


図3: $Trp53^{+/-}; Nf1^{flox/+}; Nestin^{Cre/+}$ マウスに発生した Anaplastic astrocytoma

(4) GFAP-Cre マウスを用いた場合の脳腫瘍: $Trp53^{+/-}; Nf1^{flox/+}$ マウスを GFAP-Cre マウスと交配し、得られたマウスを解析した。解析した 132 匹のマウスの中には、ホモのノックアウトマウス $Trp53^{-/-}; Nf1^{flox/flox}; GFAP^{Cre/+}$ は 5 匹だけ存在していたが、生後 14 週から 22 週の間には全例が死亡した。一方、ヘテロのノックアウトマウス $Trp53^{+/-}; Nf1^{flox/+}; GFAP^{Cre/+}$ は 22 匹得られた。得られたマウスは、生後 25 週から 52 週の間にはほとんどが死亡し、61 週までに全例が死亡した。

死亡したマウスから切片を作製して解析したところ、ホモのマウス $Trp53^{-/-}; Nf1^{flox/flox}; GFAP^{Cre/+}$ の 60% (3/5) に脳腫瘍が認められ、その組織像は、GFAP 染色陽性の Anaplastic astrocytoma 2 例、未分化の小型細胞からなる PNET 1 例であった。一方、ヘテロのマウス $Trp53^{+/-}; Nf1^{flox/+}; GFAP^{Cre/+}$ では、22 匹中 14 匹 (58%) に脳腫瘍が認められ、その組織像は、Anaplastic astrocytoma 3 例、Oligodendroglioma 3 例、Oligo-astrocytoma 5 例、PNET 1 例の他に、シナプトフィジン陽性の Neurocytoma 2 例、ケラチン陽性の

Choroid plexus papilloma 2 例が認められ、多彩であった。図 4 に、発生した Neurocytoma の例を示した。腫瘍細胞には口ゼット形成が認められ、抗シナプトフィジン抗体染色陽性であった。

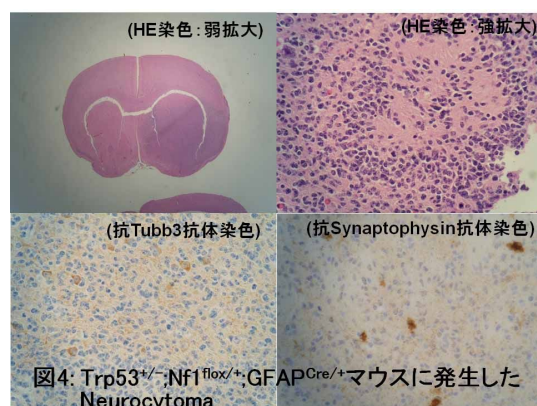


図4: $Trp53^{+/-}; Nf1^{flox/+}; GFAP^{Cre/+}$ マウスに発生した Neurocytoma

(5) NG2-Cre マウスを用いた場合の脳腫瘍: $Trp53^{+/-}; Nf1^{flox/+}$ マウスを NG2-Cre マウスと交配し、得られたマウスを解析した。このマウスの中には、 $Trp53$ 遺伝子が全身で欠失し、かつ $Nf1$ 遺伝子が oligodendroglia の前駆細胞である NG2 グリア選択的に欠損したマウスが存在する。解析した 135 匹のマウスの中には、ホモのノックアウトマウス $Trp53^{-/-}; Nf1^{flox/flox}; NG2^{Cre/+}$ は存在せず、ホモのマウスが胎生致死であることが示された。一方、ヘテロのノックアウトマウス $Trp53^{+/-}; Nf1^{flox/+}; NG2^{Cre/+}$ は 36 匹得られたが、生後 19 週から 37 週の間にはほとんどが死亡した。

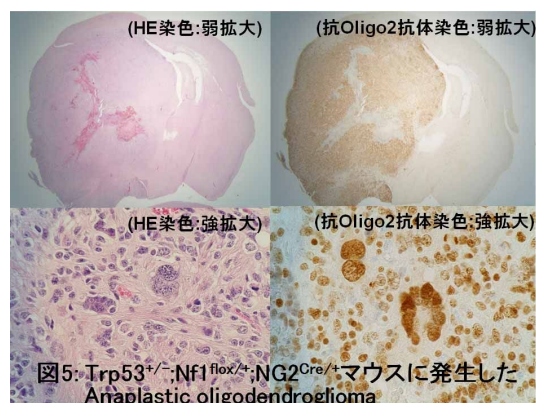


図5: $Trp53^{+/-}; Nf1^{flox/+}; NG2^{Cre/+}$ マウスに発生した Anaplastic oligodendroglioma

得られたヘテロのノックアウトマウスでは、36 匹中 32 匹 (89%) という高い確率で脳腫瘍が認められた。その組織像は、(Anaplastic) oligodendroglioma 18 例 (56.3%)、Anaplastic glioma/Glioblastoma 7 例 (21.9%)、Neuroblastoma or Neurocytoma 7 例 (21.9%) であり、Oligo2 陽性の oligodendroglioma が多いという特徴があった。図 5 に、Anaplastic oligodendroglioma の例を示した。脳腫瘍は、抗 Oligo2 抗体染

色強陽性の異形成の高い細胞で占められていた。

(6) まとめると、

発生工学的な手法により、全身で Trp53 遺伝子が欠失し、かつ脳内細胞選択的に Nf1 遺伝子が欠損したマウスを作製した。得られた遺伝子改変マウスで高率に脳腫瘍の発生が認められ、Trp53 と Nf1 の機能破壊が脳腫瘍の発生につながることを実験的に示された。

使用する Cre マウスによって、脳腫瘍の発生頻度と組織像は異なっており、Nf1 遺伝子が失活した細胞(すなわち脳腫瘍の発生母細胞)が異なることを反映するものと考えられた。

特に、NG2-Cre マウスを用いた場合には、ヘテロのノックアウトマウス Trp53^{+/-}; Nf1^{fllox/+}; NG2^{Cre/+}で、36 例中 32 例(89%)という高い確率で脳腫瘍が認められ、発生した脳腫瘍の組織像は Oligodendroglioma が過半数を占めるという特徴があった。

本研究を通して、癌抑制遺伝子の細胞選択的な機能破壊により、脳腫瘍の優れたモデルマウスを作製できることが示された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 51 件)

Sakamaki A, Katsuragi Y, Otsuka K, Tomita M, Obata M, Iwasaki T, Abe M, Sato T, Ochiai M, Sakuraba Y, Aoyagi Y, Gondo Y, Sakimura K, Nakagama H, Mishima Y, Kominami R: Bcl11b SWI/SNF-complex subunit modulates intestinal adenoma and regeneration after -irradiation through Wnt/ -catenin pathway. 査読有, Carcinogenesis 35(5), 2015, 1-10. DOI:10.1093/carcin/bgv044

Takegawa W, Mitakidis N, Miura E, Abe M, Matsuda K, Takeo YH, Kohda K, Motohashi J, Takahashi A, Nagao S, Muramatsu S, Watanabe M, Sakimura K, Aricescu AR, Yuzaki M: Anterograde C1q11 signaling is required in order to determine and maintain a single-winner climbing fiber in the mouse cerebellum. 査読有, Neuron 85(2), 2015, 316-29. DOI: 10.1016/j.neuron.2014.12.020.

Tsutsumi S, Yamazaki M, Miyazaki T, Watanabe M, Sakimura K, Kano M, Kitamura K: Structure-function relationships between aldolase C/zebrin II expression and complex spike synchrony in the cerebellum. 査読有, J Neurosci 35(2), 2015, 843-52. DOI:10.1523/JNEUROSCI.2170-14.2015.

Yamazaki M, Le Pichon CE, Jackson AC, Cerpas M, Sakimura K, Scearce-Lavie K, Nicoll RA: Relative contribution of TARPs -2 and -7 to cerebellar excitatory synaptic transmission and motor behavior. 査読有, Proc Natl Acad Sci USA 112(4), 2015, E371-9. DOI: 10.1073/pnas.1423670112. Epub 2015 Jan 12.

Otsu Y, Marcaggi P, Feltz A, Isope P, Kollo M, Nusser Z, Mathieu B, Kano M, Tsujita M, Sakimura K, Dieudonné S: Activity-dependent gating of calcium spikes by A-type K⁺ channels controls climbing fiber signaling in Purkinje cell dendrites. 査読有, Neuron 84(1), 2014, 137-51. DOI: 10.1016/j.neuron.2014.08.035. Epub 2014 Sep 11.

Yamasaki M, Okada R, Takasaki C, Toki S, Fukaya M, Natsume R, Sakimura K, Mishina M, Shirakawa T, Watanabe M: Opposing role of NMDA receptor GluN2B and GluN2D in somatosensory development and maturation. 査読有, J Neurosci. 34(35), 2014, 11534-48. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.1811-14.2014.18.

Konno K, Matsuda K, Nakamoto C, Uchigashima M, Miyazaki T, Yamasaki M, Sakimura K, Yuzaki M, Watanabe M: Enriched expression of GluD1 in higher brain regions and its involvement in parallel fiber-interneuron synapse formation in the cerebellum. 査読有, J Neurosci. 34(22), 2014, 7412-24. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.0628-14.2014.

Hartmann J, Karl RM, Alexander RP, Adelsberger H, Brill MS, Rühlmann C, Ansel A, Sakimura K, Baba Y, Kurosaki T, Misgeld T, Konnerth A: STIM1 controls neuronal Ca²⁺ signaling, mGluR1-dependent synaptic transmission, and cerebellar motor behavior. 査読有, Neuron 82(3), 2014,

635-44. DOI:10.1016/j.neuron.2014.03.027.
Go R, Hirose S, Katsuragi Y, Obata M, Abe M, Mishima Y, Sakimura K, Kominami R: Cell of origin in radiation-induced premalignant thymocytes with differentiation capability in mice conditionally losing one Bcl11b allele. 査読有, Cancer Sci. 104(8), 2013, 1009-16. DOI: 10.1111/cas.12193. Epub 2013 Jun 17.
Miyazaki T, Yamasaki M, Hashimoto K, Yamazaki M, Abe M, Usui H, Kano M, Sakimura K, and Watanabe M: Ca_v2.1 in Cerebellar Purkinje Cells Regulates Competitive Excitatory Synaptic Wiring, Cell Survival, and Cerebellar Biochemical Compartmentalization. 査読有, The Journal of Neuroscience 32(4), 2012, 1311-1377. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2755-11.2012
John A. Gray, Yun Shi, Usui H, Matthew J. During, Sakimura K, and Roger A. Nicoll: Distinct Modes of AMPA Receptor Suppression at Developing Synapses by GluN2A and GluN2B: Single-Cell NMDA Receptor Subunit Deletion In Vivo. 査読有, Neuron 71, 2011, 1085-1101. DOI:10.1016/j.neuron.2011.08.007. Epub 2011 Sep 21

[学会発表](計148件)

熊西敏郎、鈴木諭、若宮富浩、竹下岩男、薄井宏、鷲山和雄、丸山暁、竹内幸美：実験的マウス脳腫瘍の発生母細胞（第三報）：神経幹細胞マーカーSox2発現からみた解析。日本脳腫瘍病理学会、2014年5月23日～24日、あわぎんホール（徳島県徳島市）。
熊西敏郎、鈴木諭、若宮富浩、竹下岩男、薄井宏、鷲山和雄、丸山暁、竹内幸美：実験的マウス脳腫瘍の発生母細胞：免疫染色による解析（第二報）。日本脳腫瘍病理学会、2013年5月24日～25日、KFC Hall 国際ファッションセンター（東京）。
熊西敏郎、丸山暁、竹内幸美、薄井宏、鷲山和雄：実験的マウス脳腫瘍の発生母細胞：免疫染色による解析。日本脳腫瘍病理学会、2012年5月24日～26日、名古屋国際会議場（名古屋）。

薄井宏、鷲山和雄、市川富夫、小林一雄、阿部学、夏目里恵、崎村建司：コンディショナルノックアウト法による髄芽細胞腫モデルマウスの作製。日本神経病理学会、2011年6月2日～4日、京都テルサ（京都）。

薄井宏、鷲山和雄、市川富夫、小林一雄、阿部学、夏目里恵、崎村建司：Trp53及び選択的Nf1遺伝子欠損マウスに発生した多彩な脳腫瘍の解析。日本脳腫瘍病理学会、2011年5月20日～21日、タワーホール船堀（東京）。

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)
取得状況(計0件)

[その他]
ホームページ等:(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

薄井 宏 (USUI, Hiroshi)
新潟大学・脳研究所・非常勤講師
研究者番号：20192510

(2) 研究分担者

崎村 建司 (SAKIMURA, Kenji)
新潟大学・脳研究所・教授
研究者番号：40162325

鷲山 和雄 (WASHIYAMA, Kazuo)
新潟大学・脳研究所・准教授
研究者番号：00183715