

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670523

研究課題名(和文)アトピー性皮膚炎の機序解明に向けた遺伝子改変NC/Ngaマウス作成システムの構築

研究課題名(英文) Generation of genetically modified NC/Nga mice using the CRISPR/Cas9-mediated gene editing system

研究代表者

大沢 匡毅 (Osawa, Masatake)

岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10344029

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)：NC/Ngaマウスの胚盤胞を用いて合計18株のES細胞株を樹立することに成功した。樹立直後のES細胞を8細胞胚に移植することによりES細胞がgermline transmission能を有していることを確認した。樹立したES細胞株を用いてI113とTslp遺伝子をそれぞれノックアウトしたES細胞を作成し、キメラマウスを作成することを試みた。しかし、マウスの誕生効率やキメリズムの著明な低下が認められ、また、germline transmission能が失われていることが判明した。今回樹立したNC/Ngaマウス由来ES細胞は、細胞の継代培養中に多能性を失い極めて不安定な特性を示すことが考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we sought to develop a platform by which genetically modified mice are readily allowed to be generated in the NC/Nga strain. To this end, we generated embryonic stem cell (ESC) lines using blastocyst embryos obtained from NC/Nga mice. Using a recently developed methodology for ESC derivation from non-permissive mouse strains, we successfully established 18 ESC lines from NC/Nga blastocysts. We assayed for their chimera formation and germline transmission capacities by 8-cell stage embryo injection. The results showed these ESCs exhibited satisfactory levels of chimera formation capacity and germline competency at early passages. However, these capacities were rapidly lost during the initial period of culture, and none of these ESCs after 6 passages showed chimera formation regardless culture conditions we tested. Therefore, we concluded that NC/Nga ESCs are extremely unstable in culture, suggestive of importance of further optimization of ECS culture conditions.

研究分野：皮膚科学、発生生物学

キーワード：NC/Ngaマウス ノックアウトマウス ES細胞 多能性 モデルマウス アトピー性皮膚炎 ゲノム編集
CRISPR/Cas9

1. 研究開始当初の背景

アレルギー皮膚炎は、皮膚バリアの異常、免疫学的素因、および搔破行動等の慢性化要因が複合的に作用することによって成立する疾患である。その病態の分子的機序を理解するためにはモデル動物を活用した解析が必要不可欠である。

NC/Nga マウスはヒトのアトピー性皮膚炎のモデル動物としての有効性が確立されている。しかし、当マウスの表現型の出現には複数の遺伝的背景が関与しており、複数系統のマウスの交配を経て遺伝子改変させた NC/Nga マウスを作製することは困難である。このことは、NC/Nga マウスを用いて病態の分子的機序を解析する際の大きな障害となっている。

我々は、平成 24~25 年度には科学研究費挑戦的萌芽研究の援助を受け、ES 細胞から簡便に遺伝子改変マウスを作成する方法を開発した。この技術をさらに発展されるため、さまざまな疾患モデルマウスから ES 細胞の樹立を試み、NC/Nga マウスから ES 細胞を樹立することに着手した。NC/Nga マウスから ES 細胞を樹立することができれば、それを用いて遺伝子改変を施すことによってから遺伝子改変 NC/Nga マウスを作製することが可能になると考えられ、本研究を提案するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、NC/Nga マウス胚から ES 細胞を樹立するとともに、樹立した ES 細胞に対しゲノム編集技術を用いて遺伝子操作を行うことにより遺伝子を改変した NC/Nga マウスを効率的に作成する技術を開発することを目指す。これにより、遺伝子改変 NC/Nga マウスを使用して疾患の機序について分子レベルでの解析を行うことが可能になる。このようにして疾患モデル動物の分子的解析によって得られた知見は生理的に重要な意味を持ち、今後、アトピー性皮膚炎に対する分子標的を指向した治療法の開発研究に大きく寄与するものと考えられる。

本目的のために、本研究では以下の到達目標を設定し、研究を行った。

NC/Nga マウスの胚を採取する方法、および胚から ES 細胞株を樹立する方法の指摘化を行い、NC/Nga マウスの ES 細胞株を樹立する。

CRISPR/Cas9 遺伝子編集システムを用いて、樹立した ES 細胞について特定の遺伝子ノックアウトした後、ノックアウトした ES 細胞を用いてノックアウトマウスを作成する。これにより、簡便に遺伝子改変を行った NC/Nga マウスを作成するための技術を構築する。

3. 研究の方法

NC/Nga マウスの飼育コロニーの作成・維持

NC/Nga マウスの凍結胚を理化学研究所バイオリソースセンターより入手し、凍結胚を融解後仮親の卵管内に移植し仔マウスを得た。これらのアウスを繁殖させコロニーを作成した。

NC/Nga マウス ES 細胞株の樹立

雌の NC/Nga マウスに卵巣刺激ホルモンおよび卵巣放出ホルモンを投与し過排卵を誘発させた。過排卵誘発マウスと雄マウスを交配させ、翌日に雌マウスの卵管から受精卵を得た。また、過排卵を誘発させた雌マウスの卵管より未受精卵を採取し、HTF 培地で培養後、雄マウス精巣上体尾部から採取した精子を用いて体外受精を行うことによって受精卵を得た。受精卵を KSOM 培地に移し、同培地中で 3 日間の培養を行い胚盤胞に誘導した。胚盤胞を酸性タイロイド液中に移し透明帯を除去した後に、予めフィーダー細胞を蒔いた 24 穴プレートに 1 つずつの胚盤胞を移し ES 細胞樹立誘導培地 (DMEM + 15% KSR + 10uM ACTH + 10³U/ml LIF) 中で 5 日間培養を行った。本培養後に各 well から内部細胞集塊の outgrowth を回収し、トリプシン処理によって単一細胞に解離させた。解離させた細胞を遠心によって回収し、フィーダー細胞を蒔いた 24 穴プレートのそれぞれの well に播種し、ES 細胞培養培地 (N2B27 + 1uM PD0325901 + 3uM CHIR99021 + 10³U/ml LIF) 中で培養を開始した。増殖した ES 細胞の一部を回収しゲノム DNA を抽出した後、PCR を行い樹立した ES 細胞の雌雄を決定した。

樹立した NC/Nga マウス ES 細胞株のキメラ寄与能と germline transmission 能の評価

樹立した ES 細胞株のキメラ寄与能と germline transmission 能を評価するために、ES 細胞を 8 細胞期の胚に移植することによりキメラマウス個体を作成した。ホストの 8 細胞期胚を得るために、雌の ICR マウスに対し過排卵処理を行い、雄マウスと交配をさせた翌日に受精卵を回収し、KSOM 培地中で 2 日間培養を行うことにより 8 細胞期胚を得た。

ES 細胞を移植した胚からキメラマウス個体を得るために仮親マウスを準備した。このために、発情期の雌の ICR マウスと予め精管結紮をおこなった雄マウスとを交配させ、翌日にプラグ形成が確認された擬妊娠マウスを回収し 3 日間飼育を続けた。

キメラマウス個体を得るために ES 細胞を 8 細胞期胚に移植した。培養 ES 細胞に accutase を加え 37°C で 5 分間インキュベーションを行い、細胞を解離させた。ES 細胞をマイクロインジェクション

ョンニードルに移し、倒立顕微鏡下でピエゾドライブにより8細胞期胚の透明帯を破り、1つの胚に対し10個のES細胞を移植した。移植した胚をKSOM中で1日培養を行い、胚盤胞胚を得た。胚盤胞胚を擬妊娠3.5日目の仮親マウスの子宮内に移植し妊娠および出産を待った。得られた仔マウスについては、体毛色を指標にキメラ率を決定するとともに、雌のICRマウスと交配させることによって得たF1マウスの体毛色を指標にしてgermline transmission能を調べた。I13またはTslp遺伝子をノックアウトしたES細胞の作成とキメラマウスの作成

I13またはTslp遺伝子の翻訳開始点近傍に対するgRNAを設計し、Cas9/gRNA発現ベクター(pX459: Addgene)にサブクローニングを行った。リポソーム(Fugene HD: Promega)を用いてCas9/gRNA発現ベクターをES細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションから24時間後に、培養ES細胞にpuromycinを添加しその後36時間インキュベーションを行うことによりトランスフェクションされた細胞を選択した。トランスフェクションを行ったES細胞をフィーダー細胞を敷いた10cmディッシュに播種、ES細胞のコロニーが形成されるまで培養を行った。ES細胞コロニーを回収して2等分した後に2枚の96穴プレートに移し培養を続けた。一方の96穴プレートで培養したES細胞からゲノムDNAを抽出し、ジェノタイプングPCR法により、I13またはTslp遺伝子座がbi-allelicにノックアウトされたES細胞クローンを選別した。ノックアウトES細胞を8細胞期胚にインジェクションした後、擬妊娠マウスの子宮内に移植することによりキメラマウスを作成した。

4. 研究成果

NC/Nga マウス ES 細胞株の樹立

本研究ではNC/Ngaマウス由来のES細胞株を樹立するとともに、樹立したES細胞に対しCRISPR/Cas9ゲノム編集システムを用いて遺伝子改変を施すことにより遺伝子改変NC/Ngaマウスを作成することを目指した。

まず、NC/Ngaマウスの胚を得るために、過排卵処理を行った雌マウスと雄マウスとを自然交配させ受精卵を得ることを試みた。しかし、この方法では、過排卵が起こるものの十分な数の受精卵を得ることができないことがわかった。そこで、より効率的に十分な数の受精卵を得るために、人工授精によって受精卵を作成することを試みた。その結果、一回の人工授精によって30~40個程度の受精卵が得ることが

できることがわかり、以後は人工授精によって受精卵を調製した。

次に、受精胚をKSOM培地中で3日間培養することによって得られた胚盤胞から内部細胞集塊(ICM)のoutgrowthを得るための培養条件の検討を行った。胚盤胞をフィーダー細胞を敷いた24穴プレートに移し、以下の4種類の培地中で培養を行った。(1)DMEM + 15% KSR + 10³U/ml LIF, (2) DMEM + 15% KSR + 10³U/ml LIF + 10uM ACTH, (3) DMEM + 15% KSR + 10³U/ml LIF + 1uM PD0325901 + 3uM CHIR99021 (4) DMEM + 15% KSR + 10³U/ml LIF + 10uM ACTH + 1uM PD0325901 + 3uM CHIR99021。その結果、(4)の培地で培養した時のみ、>30%の効率でICMのoutgrowthの形成が認められた。この結果より、NC/NgaマウスはES細胞の樹立に関してnon-permissiveな系統であることが示唆された。

ICMのoutgrowthを回収しES細胞株を樹立することを試みた。ICMのoutgrowthを起こした細胞を上記の4種類の培地で培養を行ったところ、徐々に細胞のコロニーが扁平化していくことが観察され、未分化なES細胞株を樹立することができなかった。しかし、細胞をN2B27+ 1uM PD0325901 + 3uM CHIR99021 + 10³U/ml LIFの培地中で培養した場合に、ドーム状の未分化なES細胞コロニーが形成されることが判明し、最終的にこの培養方法により18株のES細胞株を樹立することができた。興味深いことに、PCR法によりこれら18株の雌雄の判別を行ったところ、雄由来のES細胞株は3株しか存在せず、残り15株は全てメス由来の細胞であった。この結果より、NC/Ngaマウスの系統に関しては、ES細胞樹立効率について雌雄間に差が存在することが考えられた。

樹立された3種類の雄由来のES細胞株について、キメラマウス形成能とgermline transmission能を有しているかどうかを調べるために、継代2代目のES細胞を8細胞期胚にインジェクションし、擬妊娠マウスの子宮内に移植することによりキメラマウスを誕生させることができるかどうかを調べた。その結果、キメラ率が50%以上のマウスを得ることができ、また、誕生したマウスを交配させたところES細胞由来のF1世代マウスが生まれ、樹立したES細胞がキメラマウス形成能とgermline transmission能を有していることが確認された。

I13またはTslp遺伝子をノックアウトしたマウスの作成

樹立された雄由来のES細胞株を用いてI13またはTslp遺伝子をノックアウトしたマウスを作成することを試みた。I13およびTslpはともにアレルギー皮膚炎の

発症や悪性化に関与していることが示されている。まず、*I13* または *Tslp* 遺伝子の翻訳開始点近傍の遺伝子配列に対する gRNA を作成し、Cas9/gRNA 発現ベクターに組み込んだ。その後、Cas9/gRNA 発現ベクターを ES 細胞にトランスフェクションをし、トランスフェクションされた細胞由来の ES 細胞コロニーをジェノタイプ PCR 法によりスクリーニングすることによって bi-allelic にノックアウトされた ES 細胞クローンを得た。

これらの ES 細胞を用いて *I13* または *Tslp* 遺伝子をノックアウトしたマウスを作成することができるかどうかを調べるために、ES 細胞を 8 細胞期胚にインジェクションした後に擬妊娠マウスの子宮内に移植し仔マウスを得ることを試みた。しかし、多くの場合、妊娠中に胎児が死亡し、また、誕生したマウスについても ES 細胞によるキメラ率が極めて低く (<30%)、germline transmission が認められなかった。

これらの ES 細胞がキメラマウス形成能と germline transmission 能を失った原因を調べるために、今回樹立した 3 つの ES 細胞の染色体数を調べたところ、継代 4 代目から頻りに 8 番染色体のトリソミー化が認められ、NC/Nga マウス ES 細胞については染色体が極めて不安定であることがわかった。

これらの結果より、今後、NC/Nga マウス由来の ES 細胞を使用して遺伝子改変マウスを作成するためには、ES 細胞の培養条件をさらに検討して、安定的に ES 細胞を維持するための指摘条件を見出す必要があることが分かった。

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 1 件)

1) Moriyama M, Moriyama H, Uda J, Matsuyama A, Osawa M, Hayakawa T. BNIP3 plays crucial roles in the differentiation and maintenance of epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 134(6):1627-34 2014. PMID: 24402046 査読 あり

〔学会発表〕(計 4 件)

1) 大沢匡毅, Xujun Han. A novel tool for melanocyte lineage-specific inducible gene mutagenesis. 第 26 回日本色素細胞学会学術大会 2015 年 11 月 14 日～15 日 札幌医科大学 (北海道・札幌市) 演者

2) 大沢匡毅 遺伝子機能解析ツールとしてのメラノサイト～神経堤症発症機序の分子的理解にむけて～

日本病理学会総会、2015 年 4 月 30 日～5 月 2 日、名古屋国際会議場 (愛知県・名古屋市) 招待シンポジスト

3) Masatake Osawa, Mizuki Matsumoto, Dongsoo Lee. Phenotype-Based Gene Function Assessment Using A Melanocyte-Specific Transgenesis Approach.

International Pigment Cell Conference 2014 2014 年 9 月 4 日～7 日 (シンガポール・シンガポール島) 、演者

4) Masatake Osawa. A rapid melanocyte-specific gene disruption to identify genes involved in the regulation of melanocyte stem cells in the hair follicle.

World Congress for Hair Research 2014 2014 年 5 月 14 日～17 日 (韓国・チェジュ島) 、招待講演・演者

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大沢 匡毅 (OSAWA, Masatake)
岐阜大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号:10344029