

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15780

研究課題名(和文) ゲノム編集技術を用いた鎖骨頭蓋異形成症モデルマウスの作成と解析

研究課題名(英文) Establishment of a new mouse model of cleidocranial dysplasia by TALEN mediated genome editing

研究代表者

宿南 知佐 (Shukunami, Chisa)

広島大学・医歯薬保健学研究科(歯)・教授

研究者番号：60303905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム編集技術を用いて、アルギニン(R)からグルタミン(Q)へ変化するヒトのR225Q変異に相当するR232Q変異を有する鎖骨頭蓋異形成症のモデルマウスの新規の系統を確立した。同時に、塩基欠失によるフレームシフトによってRunx2の翻訳が途中で停止する欠失マウスの2系統も樹立した。これらの変異ホモマウスでは、Runx2ノックアウトマウスで報告されているように、膜性骨化が観察されなかった。4ヶ月齢のRunx2のR232Qミスセンス変異マウスでは、R225Q変異を有するヒト鎖骨頭蓋異形成症患者のような多発性過剰歯は観察されなかったが、野生型と比較して歯根が短根化していた。

研究成果の概要(英文)：A new mouse model for cleidocranial dysplasia (CCD) has been successfully established by introducing the R232Q mutation into mouse Runx2 gene using transcription activator-like effector nucleases mediated gene editing. Two lines of mutant mice with the frameshift mutations (1-bp or 2-bp deletion) have been also established. In homozygotes of these mutant mice, intramembranous bone formation was not observed, as previously reported in Runx2 null mice. In 4-month old heterozygotes, supernumerary teeth in some CCD patients have not been observed in mutant mice with R232Q, but the length of the tooth root in the heterozygotes was shorter than that of wild type.

研究分野：分子生物学

キーワード：膜性骨化 Runx2 ゲノム編集 点変異 歯根

### 1. 研究開始当初の背景

鎖骨頭蓋異形成症 (CCD) は頭蓋縫合閉鎖遅延、鎖骨低形成あるいは無形成を主徴とし、軟骨内骨化の異常、多発性過剰歯、歯の埋伏・萌出遅延を随伴する常染色体優性の骨格異形成である。発症頻度は 100 万人に 1 人でヒト染色体 6p21 上の *Runt-related transcription factor 2 (RUNX2)* の変異によって発症する。*Runx2* ヘテロ欠損マウスはハプロ不全により CCD によく似た表現型を示すが、多発性過剰歯は観察されない (Cell 89: 755-764, 1997)。CCD では *RUNX2* のミスセンス変異、ナンセンス変異、挿入、欠失、スプライス部位の変異、フレームシフト変異などの多様な変異が知られているが、多くの場合、硬組織での異常は変異 *RUNX2* タンパク質の機能不全によって起こると考えられている (Am J Hum Gene 71: 724-738, 2002/Human Mutation 19: 209-216, 2002)。Lou らは、一部の転写産物だけが完全な長さの *Runx2* としてプロセシングされる *Runx2<sup>neo7/+</sup>* と *Runx2<sup>neo7/neo7</sup>* マウスを解析し、膜性骨の異常は *Runx2* の機能的活性の量的な減少に起因する可能性を報告した (Hum Mol Genet 18: 556-568, 2009)。しかしながら、膜性骨化の異常以外の表現型と遺伝子量効果との関連や変異蛋白質による発症機序は明らかにされておらず、CCD 患者と同じ *Runx2* 変異アレルを有する新たな CCD モデルマウスの樹立と表現型の解析が期待されている。

### 2. 研究の目的

CCD は常染色体優性遺伝の疾患で、*RUNX2* 遺伝子の変異が原因で発症する。CCD では頭蓋縫合閉鎖遅延、鎖骨低形成・無形成を呈し、多発性過剰歯や歯の埋伏・萌出遅延を伴う症例も多い。*Runx2* ヘテロ欠損マウスは、CCD によく似た骨格形成異常を呈するが、多発性過剰歯は観察されない。本研究では、ゲノム編集技術を用いて、CCD 患者において骨格形成異常だけでなく多発性過剰歯が報告されているミスセンス変異を有するマウスとフレームシフトによる欠失マウスの系統を樹立する。得られた変異マウスのヘテロ・ホモ個体を用いて、*Runx2* ミスセンス変異蛋白質が CCD 発症に関与する分子メカニズムを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### ① Platinum TALEN の構築

*Runx2* 遺伝子のエクソン 4 とイントロン 4 の配列にそれぞれ *mRunx2-TALEN-A-R* と *mRunx2-TALEN-A-L* が結合するように設計した。TALEN プラスミドは、Platinum Gate TALEN Kit (Addgene) を用いて構築した。Platinum TALEN プラスミドの活性

は、Single-strand annealing Assay によって確認した。*mRunx2-TALEN-A-R* あるいは *mRunx2-TALEN-A-L* プラスミドを線状化し、mMESSAGE mMACHINE T7 ULTRA Kit (Ambion) を用いて、Cap 構造と *polyA* が付加された mRNA を合成した。

#### ② *Runx2* 点変異マウスと *Runx2* 欠失マウスの作成

C57BL/6 系統マウスの前核期受精卵の細胞質に精製した *mRunx2-TALEN-A-R*、*mRunx2-TALEN-A-L* mRNA、点変異 (G→A の塩基置換による R→Q へのミスセンス変異) を含む一本鎖ドナーヌクレオチド (ssODN) を顕微注入した。Nonhomologous End-Joining (NHEJ) エラーによる変異を持つ個体と Homology dependent repair (HDR) によって ssODN がノックイン (KI) された KI 個体を区別できるように、ssODN にはサイレント変異によって ApaI 切断部位を導入してある。顕微注入された受精卵は、代理母マウスの卵管に移植し、それぞれのゲノム配列を確認した。

#### ③ Polymerase chain reaction (PCR)

得られたマウスの尾からゲノム DNA を抽出し *Runx2* 遺伝子の TALEN の標的部位を含む約 200 bp の断片を PCR にて増幅した。buffer 置換後、SmaI、ApaI による切断の有無とシーケンス配列の解析することによって、NHEJ エラーによる欠失、挿入を有する変異個体を識別した。PCR で増幅した DNA 断片は欠失変異のみの場合は SmaI 配列の破壊により、また点変異が導入できた場合は ApaI 配列の導入によって、野生型との判別することが出来る。

#### ④ 発現ベクターの構築

Site-directed mutagenesis により、マウス *Runx2* cDNA に変異を導入し、pcDNA3 にサブクローニングし発現ベクターを構築した。

#### ⑤ 細胞培養

SV40 Large T Antigen を高いレベルで発現する Lenti-X 293 細胞 (HEK293T 細胞) は、10% ウシ胎仔血清を含む DME にて培養した。マウス頭蓋冠由来の骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞は、10% ウシ胎仔血清を含む  $\alpha$ MEME にて培養した。

#### ⑥ 骨格標本の作製

胎生 18.5 日齢のマウス胎仔を 99.5% エタノールにて脱水固定後 0.015% アルシアンブルー溶液にて軟骨を染色、1% 水酸化カリウム溶液で軟部組織を溶解し 0.05% アリザリンレッド溶液で骨を染色した。KOH によって、軟部組織を透明になるまで溶解した。

- ⑦ アリザリンレッド染色  
95%メタノールで20分間固定して、pH6.4の1%アリザリンレッド溶液で染色した。
- ⑧ アルカリフォスファターゼ染色  
基質である2% NBT/BCIPをpH9.5のトリス塩酸バッファーにて希釈し、37°Cで5分間、非脱灰凍結切片をインキュベートした。その後、石灰化組織をpH6.4の0.5%アリザリンレッド溶液で染色した。
- ⑨ トルイジンブルー染色  
胎生18日齢の胎仔の上腕骨のパラフィン切片を6μmの厚さで作成し、キシレンで脱パラフィン処理し、再水和後に0.05%トルイジンブルー溶液で染色した。
- ⑩ デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイ  
MC3T3-E1細胞あるいはHEK293T細胞に、ホタルルシフェラーゼレポーター、*pGL4.74[hRluc/TK]* (内部コントロールのウミシイタケルシフェラーゼレポーター)、発現ベクターをLipofectamine LTX(Thermo Fisher Scientific)を用いてトランスフェクションし、48時間後にサンプルを回収した。ルシフェラーゼの活性は、ピッカジーンデュアルシーパンジー発光キット(東洋ビーネット)を用いて、ルミノメーターで測定した。
- ⑪ *in situ* hybridization  
胎生18日齢胎仔の上腕骨の6μmのパラフィン切片を脱パラフィン・再水和処理し、Digoxigenin(DIG)標識した*Col2a1*のRNAアンチセンスプローブを50°Cで一晩ハイブリダイゼーションした。非結合プローブを洗浄後、アルカリフォスファターゼで標識された抗DIG抗体を結合させ、基質であるBM Purpleを加え、発色によりmRNAの存在を検出した。
- ⑫ X線マイクロCTによる解析  
4ヶ月齢のマウスの頭部を剥皮後に4%PFA/PBSにて固定した。SHIMADZUの卓上型マイクロフォーカスX線CTシステムを用いて、臼歯部の撮影を行った。画像は、ImageJを用いて再構築し、歯根部の評価を行った。
4. 研究成果
- ① Runx2点変異マウスと欠失マウスの系統の樹立  
マウス*Runx2*遺伝子は17番染色体に存在し、8つのExonから構成され、遠位と近位のP1及びP2プロモーターから転写される2つのアイソフォームを発現する(図1)。

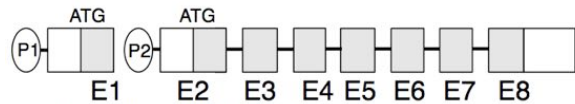
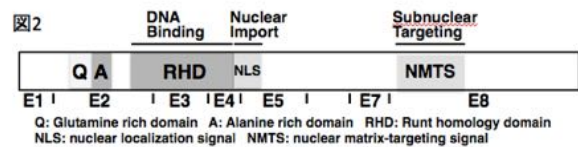


図1 Coding領域は灰色で示す。

DNA結合を担う128アミノ酸残基からなるRuntドメイン(RHD)はExon2からExon4にコードされており、核局在化シグナル(NLS)はExon4とExon5にコードされている(図2)。



ヒトCCDにおいては、RHDと近接するNLSにおいてミスセンス変異、ナンセンス変異、挿入欠失変異などが多数報告されている。

本研究では、Platinum TALENを用いて、NLSをコードするExon4上に存在する塩基をGからAに置換し、アミノ酸がアルギニン(R)からグルタミン(Q)に変化するミスセンス変異を導入した(図3)。

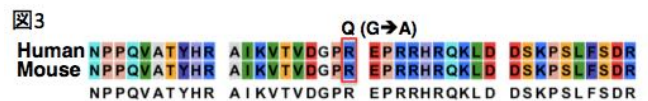


図4には、ターゲット部位を含むExon4とIntron5の配列を示している。変異導入に用いるssODNの塩基配列は、図5に示す。

図4 ターゲット配列 (Exon4→Intron4)

GCAAGAGTTTCACCTTGACCATAACAGCTTTCACAAATCCTCCCAAGTGG  
CCACTTACCACAGAGCTATTAAAGTGACAGTGGACGGTCCCCGGAACCA  
AGAAGTAAGTGCCCTACCTTTCTATTGAAAATGCTAATAGAGTTTGTGGGGA  
CCCTGTGAAGAATTCACCTCTGAAGGTGTTAGTGTCACTGTCACACTACATG  
GCCTCTGCAAATTTATCGTACTTTATTTTTGAATACATTTTCAGGGAAGGGC  
AGTTCATAGAAGCTTTACAGTTAATAGAAAATAAAATTATAG

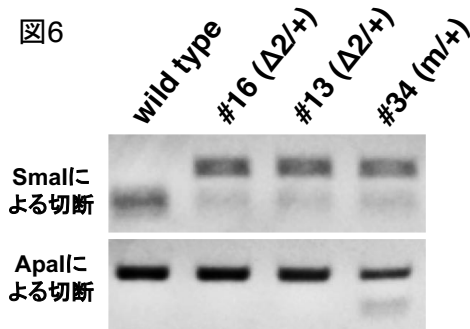
図5 ssODN配列

TGGCCACTTACCACAGAGCTATTAAAGTGACAGTGGACGGgCCCCA  
GGAACCAAGAAGTAAGTGCCCTACCTTTCTATTGAAAATGC

受精卵へのPlatinum TALENとssODNの顕微注入によって51個体のファウンダーマウスを得ることが出来た。それらのマウスの尾から抽出したゲノムDNAを鋳型にして、約200bpの断片をPCRによって増幅し、制限酵素(ApaIとSmaI)消化による切断パターンの確認、シーケンス解析を行った。

その結果、14 個体で NHEJ による欠失・挿入変異が認められ、2 個体で HR による変異体が認められた。これらの変異を有するファウンダーマウスのうち、アルギニン (R) からグルタミン (Q) へ変化するヒトの R225Q 変異に相当する R232Q 変異を有するミスセンス変異マウスと 1 塩基あるいは 2 塩基欠失によるフレームシフトによって Runx2 の翻訳が途中で停止する欠失マウスの 3 つの変異体を系統として樹立した (図 6)。

図6

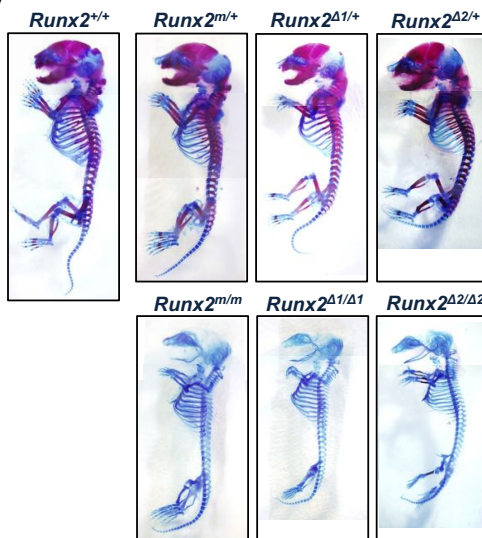


PCRによって増幅した断片の制限酵素消化による切断パターン

② Runx2 点変異マウスと欠失マウスの膜性骨化不全

これまでに報告されている Runx2 欠失マウスと同様、R232Q のミスセンス変異ホモマウス、1 塩基/2 塩基欠失マウスのいずれにおいても骨化が観察されず、ヘテロマウスでは鎖骨の形成不全や頭蓋の骨化不全、縫合不全が観察された(図 7)。

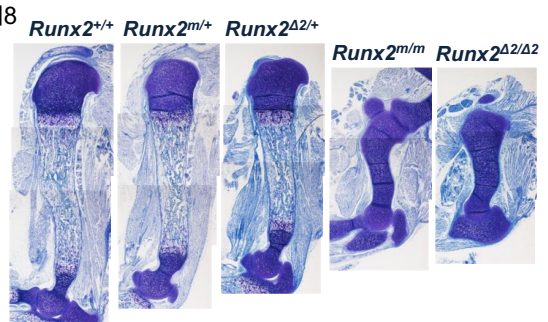
図7



上腕骨のトルイジンブルー染色では、野生型と比較すると、変異ヘテロマウスでは、骨幹部の骨化に顕著な差は認められなかったが、骨長がやや短く低形成を示した。変

異ホモマウスは、さらに上腕骨長は短くなり、骨幹部の骨化がほとんど認められず、上腕骨全体が軟骨のままであった。in situ hybridization の結果、野生型とヘテロマウスでは、軟骨は骨へ置換されているので、骨幹部における Col2a1 の発現はほとんど消失していた。一方、変異ホモマウスでは軟骨が残存し、上腕骨全体で Col2a1 発現していることから、内軟骨性骨形が進行していないことが示唆された。

図8



トルイジンブルー染色

③ 変異 Runx2 の転写活性化能

骨芽細胞株MC3T3-E1を用いた解析では、野生型Runx2はosteocalcin promoterと osteocalcin-specific element 2 である OSE2の6 tandem repeatsを有するレポータープラスミドのluciferase活性をコントロールの6.5倍上昇させるが、ミスセンスR232Q変異を導入したRunx2では転写の活性化は認められないことを確認している。同様に、HEK293T細胞においても、ミスセンスR232Q変異を導入したRunx2では転写の活性化は認められなかった。

④ Runx2 点変異マウスと欠失マウスにおける歯根の短根化

8週齢の野生型とRunx2のR232Qミスセンス変異、欠失ヘテロマウスの上顎骨の臼歯部切片を用いて解析したところ、いずれも歯周靭帯では高いレベルでアルカリフォスファターゼが発現し著明な組織学的変化は観察されなかった。4ヶ月齢の野生型マウスとRunx2のR232Qミスセンス変異、欠失ヘテロマウスを、X線マイクロCTを用いて解析すると、R225Q変異を有するヒト鎖骨頭蓋異形成症患者のような多発性過剰歯は観察されなかったが、いずれの系統においても歯根の短根化が観察された。乳歯列と永久歯列を有するヒトと異なり、一生歯性動物であるマウスではRunx2のR232Qミスセンス変異により過剰歯が生じることがないことが明らかになった

## 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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 吉本由紀、森 健吾、星野 麻里、田中、誠真、渡邊 仁美、佐久間 哲史、山下 寛、岡本 哲治、近藤 玄、山本 卓、開 祐司、宿南 知佐:ゲノム編集技術を用いた鎖骨頭蓋異形成症モデルマウスの作成、日本ゲノム編集学会 第2回大会、2017. 6. 29. 千里ライフサイエンスセンター (豊中市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宿南 知佐 (Shukunami Chisa)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・教授  
研究者番号：60303905

### (2) 研究分担者

三浦 重徳 (Miura Shigenori)  
京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教  
研究者番号：70511244

### (3) 連携研究者

山本 卓 (Yamamoto Takashi)  
広島大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号：90244102

佐久間 哲史 (Sakuma Tetsushi)  
広島大学・大学院理学研究科・特任講師  
研究者番号：90711143

### (4) 研究協力者

吉本 由紀 (Yuki Yoshimoto)  
広島大学大学院医歯薬保健学研究科・医歯薬学専攻・特任助教  
研究者番号：40735304