

令和元年5月16日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10765

研究課題名(和文)汎用性のある内耳特異的ノックアウトマウス作製法の開発

研究課題名(英文)Development of a Versatile Method for Producing Inner-Ear-Specific Knockout Mice

研究代表者

櫻井 結華 (Sakurai, Yuika)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：50307427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らはSix1遺伝子のエンハンサー解析を行い内耳特異的に発現活性を有する内耳エンハンサーを発見した。この成果を基盤に、内耳特異的コンディショナルノックアウトマウスを作製する汎用性の高い実験系の開発を行った。まず、汎用されている技術であるCre/loxPシステムを用い、内耳エンハンサーを用いたCreマウスを作製した。さらに、新規ゲノム改変技術であるCRISPR/Cas9システムを用いた、より簡便なコンディショナルノックアウトマウス作製方法の基盤構築を行った。アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入と組み合わせることで、短期間低コストでコンディショナルノックアウトが可能になるものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天性難聴は1000人に1人の確率で発生する先天性疾患であり、近年、種々の原因遺伝子が指摘されている。この病態や病状の進行の仕方については未だに不明点が多いため、病態解析のための疾患のモデル動物作製が重要となる。しかし、現存のモデルマウスは心臓や肺などの他臓器合併症により多くは胎生致死となり、生後の聴覚生理が研究できないという問題がある。こうした問題に対する一つのアプローチとして、内耳特異的コンディショナルノックアウトマウスの作製が挙げられる。胎生致死を回避することで、出生後に成熟することが知られている内耳の聴覚と平衡覚が解析可能となる。本実験系は難聴の病態解析の進捗に寄与するものである。

研究成果の概要(英文)：We conducted the enhancer analysis of Six1 gene and found an inner-ear-specific enhancer (IESE) having expression activity specifically in the inner ear. Based on this finding, we have developed a versatile method for producing inner-ear-specific conditional knockout mice. We addressed this issue using two different experimental methods: Cre-loxP and CRISPR/Cas9. First, we developed the mouse strain that produces Cre recombinase specifically in inner ear using the IESE. The expression pattern of Cre recombinase was confirmed by mating with a reporter mouse, and inner-ear-specific expression pattern of IESE was confirmed. Then, we also developed the adenovirus-mediated CRISPR/Cas9 system that was designed to work only in the inner ear. We think that our experimental system for inner ear specific knockout can promote the research to unveil the pathology of the hearing loss.

研究分野：耳科学

キーワード：先天性難聴 コンディショナルノックアウトマウス CRISPR/Cas9

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

1. 研究開始当初の背景

先天性難聴は 1000 人に 1 人の確率で見られる頻度が高い先天性疾患である。これには多くの原因遺伝子が指摘されている。しかし、内耳は生体での研究が困難な部位であることから、先天性難聴の病態や病状の進行様式を解析するためには、疾患のモデルマウス作製が重要となる。近年の分子遺伝学的な研究の成果により、難聴と他臓器疾患を先天的に合併する症候群性難聴を引き起こす様々な原因遺伝子が同定された¹⁾。近年、これらの知見を基に原因遺伝子を欠失させたノックアウトマウスが作製され、先天性難聴の病態解明が進んでいる。症候群性難聴の原因遺伝子の一つである Six1 遺伝子の変異は先天性難聴と顎顔面奇形、腎尿路奇形を合併する鰓弓耳腎症候群 (BOR 症候群) を引き起こす。BOR 症候群のヒト疾患モデルマウスである Six1 遺伝子ノックアウトマウスは顕著な内耳初期発生異常を呈するが、無呼吸のため出生直後に致死となり、聴覚生理機能を評価できない^{2, 3)}。この他にも、DiGeorge 症候群 (Tbx1 遺伝子変異により難聴と心疾患を合併) や Waardenburg 症候群 (Sox10 遺伝子変異により難聴と巨大結腸症を合併)^{4, 5)}など、症候群性難聴のヒト疾患モデルマウスの多くは、内耳以外の発生異常が原因で発生中、あるいは、出生直後に致死となり、生後の聴覚生理機能を評価することは不可能である。そこで申請者は胎生致死とならずに出生後に聴覚生理機能を評価できるモデル動物の開発を検討することとした。

2. 研究の目的

申請者は内耳特異的に発現活性を有する遺伝子エンハンサー領域 (内耳エンハンサー) を発見した。この研究成果を基盤に、内耳特異的コンディショナルノックアウトマウスを作製する汎用性の高い実験系の開発を目指す。この新しい実験系により、内耳にのみ表現型を表す、全ての難聴原因遺伝子の疾患モデルマウスを作製することが可能となる。胎生致死を回避することで、出生後に成熟することが知られている内耳の聴覚と平衡覚が解析可能となることが想定される。

3. 研究の方法

申請者が発見した内耳エンハンサーは、内耳初期発生に重要な役割を演じている Six1 遺伝子が内耳において発現するためのゲノム配列である。前述の通り、Six1 遺伝子は BOR 症候群の原因遺伝子の一つであり内耳原基全体に発現する事が知られている。まず、Six1 遺伝子が内耳の発生過程において発現するのに必要なエンハンサー領域を比較ゲノムブラウザにより脊椎動物間で共通に保存されている Six1 遺伝子近傍のゲノム配列を抽出し、さらに転写因子結合ドメインの組み合わせを考慮して塩基配列を短くしていく事で、約 200 塩基まで絞り込んだ。同塩基配列の下流にレポーター遺伝子となる GFP の発現配列をつないだ DNA コンストラクトをエレクトロポレーション法によりニワトリ初期胚に導入し、内耳原基である耳胞のみ (特異的) に GFP を発現させることに成功した。遺伝子導入の指標として、CAG プロモーターの制御下に発現マーカーとして赤色蛍光蛋白質 Kusabira Orange を発現させ、遺伝子コンストラクトは全身に等しく導入されていることも確認した。以上の研究成果を基盤とし、内耳エンハンサーの制御下に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスを作製することとした。同マウスと各種の難聴原因遺伝子を loxp 配列で挟んだ遺伝子組み換えマウスと交配することにより、生後の聴覚生理機能も観察可能な内耳特異的なノックアウトマウスの作製が可能になる事が想定された。以上の仮説に基づき、以下の研究計画を立案した。

【計画 1】内耳特異的に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスの作製
内耳エンハンサー及び全身弱発現プロモーターである tk プロモーターの制御下に CreERT2 リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウスを作製する。tk プロモーターはエンハンサーによる活性化を受けることで発現を強める性質を持つため、臓器特異的な遺伝子発現を目的とする実験に適したプロモーターである。

【計画 2】新規 Cre マウスの発現解析

レポーターマウス CAG-loxP-STOP-loxP-EGF との交配を行い、内耳発生領域のみで EGFP が発現する事を確認する。

【計画 3】既に存在する難聴原因遺伝子の Flox マウスと計画 1 で作製したマウスを交配し、得られたコンディショナルノックアウトマウスの表現型を解析

DiGeorge 症候群の原因遺伝子である Tbx1 の Flox マウスが存在するため、本マウスを計画 1 で作製したトランスジェニックマウスと交配することで Tbx1 コンディショナルノックアウトマウスの作製を行う。現在までに、Tbx1 ノックアウトマウスでは内耳の重度低形成が生じる事が分かっているが、他臓器の発生異常により胎生致死となるため、生後の内耳形態の観察や聴力測定などは不可能であった。今回作製するコンディショナルノックアウトマウスを解析し、内耳のみで表現型が現れていることを確認する。申請者の所属する研究室では、マウスの ABR を測定可能であり、生後の聴力変化も経時的に観察する。本解析を DiGeorge 症候群患者の内耳形態、聴力所見と照らし合わせ、本研究から得られる知見を臨床情報に投影する事の妥当性について検討する。

【計画 4】CRISPR/Cas9 システムを用いた内耳コンディショナルノックアウトモデルの作製

計画 1~3 で行う Cre/loxP システムを用いて行いうコンディショナルノックアウトは、実績が多くありコンセンサスの得やすい実験手法であると言える。しかし、Cre マウスおよび Flox

マウスを作製・維持する必要があり、多くの労力と期間を有する。そこで、内耳エンハンサーと CRISPR/Cas9 システムを組み合わせることを想起した。CRISPR/Cas9 システムは、gRNA が遺伝子配列を特定し、Cas9 が同配列を切断することで簡単にノックアウトが可能な新規ゲノム編集技術である。「内耳エンハンサー-tk promoter-Cas9」と、「U6 promoter-gRNA」の2種類の遺伝子カセットを同時に胎仔に導入することで、任意の遺伝子に対して設計した gRNA に応じたコンディショなるノックアウトが可能となる。

4. 研究成果

【成果1】

内耳エンハンサー-tk promoter-CreERT2 の遺伝子カセットを作製し、外部委託により Cre マウスを作製した。トランスジェニックマウスのバックグラウンドとして C57BL/6 マウスを選択した(既存の難聴原因遺伝子の Flox マウスに C57BL/6 をバックグラウンドとして作製された系統がいるため)ことにより、トランスジーンのジャームライトランスミッションを確認できた産仔が想定よりも少なく、3 ラインのみとなった。領域的に発現特性を持たせるために、時間的にも発現特性を持たせるために CreERT2 リコンビナーゼを用いた。

【成果2】

成果1で得られた Cre マウスと、レポーターマウス CAG-loxP-STOP-loxP-EGFP との交配を行い、GFP の発現領域を確認した。タモキシフェンの投与量決定に多くの検討を要したが、1 ラインにおいて内耳発生領域で発現を示すラインの選定に成功した。

【成果3】

DiGeorge 症候群の原因遺伝子である Tbx1 の Flox マウスと、成果2で得られた Cre マウスとの交配を行いフェノタイプの解析を開始した。Cre リコンビナーゼの発現がやや弱い可能性があり、タモキシフェン投与量の調整を要した。本 Cre マウスの発現活性が根本的に弱いと判断した場合は、プロモーターを変更する、あるいはシスエレメントである内耳エンハンサー領域をタンデムにつなぎ、転写因子の結合領域を増やす必要があると考えられた。具体的な代替プロモーター候補としては CMV プロモーター、EF1 プロモーター、CAG プロモーター、Six1 minimal プロモーターなどを考えた。Six1 minimal プロモーターが候補として挙げられる理由として、内耳特異的エンハンサー領域の検索にあたって Six1 の脊椎動物における conserved region を利用したことがあった。

【成果4】

CRISPR/Cas9 システムを活用するにあたり、そのシステム構成タンパクを発現するための遺伝子導入を行う必要があった。遺伝子導入方法としては、短時間で高発現を得ることを目的とし、アデノウイルスベクターを用いることとした。まず、内耳エンハンサー-tk promoter-EGFP カセットを搭載したアデノウイルスを作製し(東京慈恵会医科大学 分子遺伝学教室に委託)、マウス胎仔への遺伝子導入を行ったところ、内耳領域での GFP 発現が確認された。アデノウイルスの投与時期、投与方法に関しては追加実験が必要と考えられた。

<引用文献>

1) Deafness and Hereditary Hearing Loss Overview. GeneReviews® 2) Zheng et al. 2003. Development 3) Weiming et al. 2003. Development 4) Jerome. 2001. Nat Genet 5) Tachibana et al. 2003. Pigment Cell Res

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

栗原 涉, 宇田川 友克, 櫻井 結華, 小島 博己.ニワトリ胚を用いた内耳特異的エンハンサーの解析. 第26回日本耳科学会総会・学術講演会、2016年

〔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 0

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：原央子
ローマ字氏名： Hara, Chikako
所属研究機関名：東京慈恵会医科大学
部局名：再生医学研究部
職名：助教
研究者番号(8桁): 40528452

(2)研究協力者

研究協力者氏名：小島博己
ローマ字氏名：Kojima, Hiromi
研究協力者氏名：宇田川友克
ローマ字氏名：Udagawa, Tomokatsu
研究協力者氏名：栗原渉
ローマ字氏名：Kurihara, Sho

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。