

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06477

研究課題名（和文）マウス亜種系統を利用した多因子疾患のモデリング

研究課題名（英文）Modeling complex diseases using mouse subspecies strains

研究代表者

天野 孝紀（Amano, Takanori）

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・チームリーダー

研究者番号：20419849

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：シスバリアントの疾患表現型への影響を明らかにする目的で、ヒルシュスプルング病を対象とし、マウスによる多因子疾患のモデリングを行った。日本産モロシヌス亜種に属するJF1マウスは、エンドセリン受容体遺伝子（Ednrb）にレトロトランスポゾンの挿入変異があり低頻度でヒルシュスプルング病様の症状を呈する。ゲノム編集によってJF1ゲノムからこのレトロトランスポゾンを除去したところ、腸管神経発生と白斑の改善が認められた。C57BL/6とJF1マウスによる比較発現解析により、Ednrb以外にもシスバリアントの存在が示唆される遺伝子座が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多因子疾患の発症メカニズムとして、ゲノムのシス制御配列のバリエーションに基づく遺伝子発現量の変動が重要であることが提唱されている。しかし、複合的なシスバリアントの効果がどのように疾患表現型の違いを生み出しているのか、実験的に実証した研究はほとんどない。本研究では、ゲノム多様性を十分に有したマウス亜種系統を利用して、シスバリアントの効果を反映するアレル特異的遺伝子発現の検出を行った。多因子疾患のモデリングを通じて、ゲノムの非コード領域の役割を解明するためのin vivoの実験モデルを構築できた。

研究成果の概要（英文）：To clarify the influence of cis-variants on pathogenic phenotypes, we analysed mouse models of Hirschsprung's disease. Japanese Fancy Mouse 1 (JF1) is an inbred strain belonging to Japanese wild mouse subspecies, *Mus musculus molossinus*, and exhibits various disease symptoms including megacolon. The disease symptoms are thought to be caused by an insertional variant of a transposable element at the Ednrb locus. By using the CRISPR/Cas9 genome editing technology, the transposable element was deleted from the JF1 genome. Removal of the transposon insertion relieved piebald coat color and enteric nervous development in the colon. Comparative transcriptome analyses between C57BL/6 and JF1 mouse subspecies revealed potential risk variants associated with Hirschsprung's disease besides the transposon insertion at the Ednrb locus.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：疾患モデル マウス ゲノム 遺伝子発現 ヒルシュスプルング病

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シーケンシング技術の発展により、患者ゲノムから多数の原因バリエントが推定されている。米国の UDP や英国の DDD など各国でゲノム診断プロジェクトが進行しており、国内でも未診断疾患イニシアチブ (IRUD) によって、タンパク質コード領域の日本人バリエントが多数同定されてきた。特に単因子性の希少疾患やメンデル遺伝病については、3割もの診断が付き、ゲノム DNA 診断の有用性を物語っている。ただし、バリエントの機能解明の成果は、ヒトゲノムの 2% に過ぎないコード領域に集約しており、98% の非コード領域がどのように疾患に関与するのかは、ほとんど明らかにされていない。

加齢性疾患や生活習慣病は、多くのヒトが罹患し得るありふれた疾患であるため、メカニズム解明に対する社会的ニーズは高い。ゲノムワイドの関連解析 (GWAS) が全世界で盛んに行われ、数万人規模の疾患・体質関連のバリエントデータが蓄積している。GWAS で推定される多因子疾患関連バリエントの多くは、非コード領域に存在することがわかってきている。アミノ酸配列から機能の推測ができるコード領域に対して、非コード領域の機能推定は難しく、疾患あたりの候補因子数も膨大であるため、原因因子の同定や発症メカニズムの解明はなかなか進んでいない。それでも、非コード領域がゲノムの 98% に及ぶことを考慮すれば、その機能を明らかにすることが、多因子疾患の診断と治療法の確立に必須である。本研究のテーマは、多因子疾患のモデリングを通じて、暗黒ゲノムとも呼ばれる非コード領域の役割を解明することである。

2. 研究の目的

本研究では、多因子疾患の中でも遺伝的に制御されるポリジェニックな疾患に着目し、非コード領域の役割と多因子性という二つの重大な課題を克服する疾患マウスモデルの開発を目的とする。不完全浸透のメンデル遺伝病では、主要因となるバリエントのほかに表現型に影響する別因子があり、ポリジェニックな側面を示すため、メンデル遺伝病と多因子疾患を明確に分類できないケースも多い。そこで、多因子疾患モデルという困難な概念実証のために、本研究ではメンデル遺伝病のように影響の大きい主要因を有する多因子疾患に焦点を絞る。

ヒルシュスプルング病は、新生児 5,000 人あたり 1 人の割合で見られる疾患で、腸管の神経嚢の形成不全によって、蠕動運動の低下と巨大結腸を主症状とする。もっともよく知られた主要因として RET シグナリングに関わる遺伝子群があり、疾患原因の約半数を説明する。エンドセリンシグナリングの関連遺伝子群も疾患原因の 1 割程度を説明する比較的影響の強い要因である。さらに、この二大シグナルパスウェイ以外にも GWAS 等により数十の候補遺伝子が挙げられている。ヒルシュスプルング病は、症状のよく似た類縁疾患が多く、多因子がどのように多様な疾患表現型を生み出すのかをモデリングする対象として適している。

本研究ではヒト集団のゲノムと疾患表現型の多様性をマウスモデルに反映するために、ゲノム多様性を十分に有したマウス亜種系統を利用する。マウス亜種間のアレル発現量を正確にモニターすることで、ヒルシュスプルング病発症に影響する遺伝子群を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウスを用いたゲノム編集

採卵に際して、8 週齢の C57BL/6 (B6、日本クレアより購入) には、PMSG と hCG を用いて過排卵処理を行った。5-8 週齢の JF1/Msf (理研 BRC : RBRC00639) には、IVF 実施の 6 日前からプロゲホルモンを 2 日続けて皮下投与し、抗インヒビン血清と hCG を用いて過排卵処理を行った。IVF を行った B6 および JF1 の受精卵は、前核が確認できたものを選別し、ガラス化法にて凍結した。

ゲノム編集の際には、融解後の胚を人工合成した gRNA および Cas9 タンパク質 (IDT 社) と HBS バッファー中で混合し、エレクトロポレーター (CUY21EDIT II, Bex 社) を用いて Cas9-gRNA 複合体の導入を行った。エレクトロポレーション後の胚は、偽妊娠させた ICR マウスの卵管へと移植した。

(2) 腸管の遺伝子発現解析

胎齢 12.5 日のマウス胚より腸管を採取し、TRIzol (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて total RNA を調製した。total RNA の一部は、RNA-seq によるトランスクリプトーム解析に使い、残りは RNeasy kit (Qiagen 社) による精製後に Superscript IV (Thermo Fisher Scientific 社) を利用した逆転写反応による cDNA 合成に用いた。合成された cDNA は、Pyro シーケンシング、RT-PCR、Amplicon-seq の発現解析に使用した。

(3) 神経マーカー発現解析

マウス胚より調製した腸管組織をホルマリン固定の後にパラフィン包埋し、組織切片を作製した。得られた腸管組織切片は、HE 染色ならびに TuJ1 抗体を用いた免疫蛍光染色に供した。また、マウス胚および成体から腸管組織を採取し、ウェスタンブロッティングによる神経マーカータンパク質の発現量解析を行った。

(4) ルシフェラーゼアッセイ

マウスゲノム DNA から PCR 増幅したシス制御因子を pGL4.23 プラスミド (Promega 社) にクローニングした。また、マウス胚由来の cDNA より *Sox10* 遺伝子全長を PCR 増幅し、CMV プロモーター下で遺伝子発現が制御される pcDNA3.1 プラスミド (Thermo Fisher Scientific 社) にクローニングすることで発現ベクターを構築した。pGL4.23 とコントロール用の pGL4.74 および *Sox10* の発現ベクターは、Lipofectamine3000 (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて NIH3T3 細胞にトランスフェクションした。細胞に導入されたルシフェラーゼの活性は、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega 社) を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) JF1 における腸管神経叢の低形成

JF1 マウスはヒルシュスプルング病のリスク因子であるエンドセリン受容体遺伝子 (*Ednrb*) にトランスポゾン挿入バリエーションを有し、低頻度でヒルシュスプルング病に類似した巨大結腸を呈することが知られている。軟便を生じた JF1 個体を詳細に調べたところ、大腸に巨大結腸を生じていることが確認できた。この巨大結腸部では、神経マーカーの発現が低下しており、腸管神経叢の低形成が確認できた (図 1)。

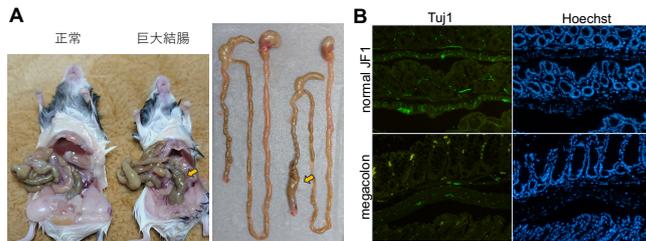


図 1: (A) 軟便を生じた個体の消化管。巨大結腸の発症が確認できる (矢印)。正常な JF1 と巨大結腸を発症した JF1 の結腸部組織切片の免疫蛍光染色。神経マーカー発現 (TuJ1) と核染色 (Hoechst)。

JF1 の腸管表現型を他の亜種系統と比較するため、標準系統である B6 を用いて腸管の組織解析を行った。B6、JF1 および両者の正逆交配 F1 雑種の消化管長を比較したところ、JF1 の小腸および大腸は B6 に比較して有意に長く、特に大腸でその傾向が顕著であった (図 2)。さらに、B6 と JF1 の腸管での神経マーカー発現を比較したところ、mRNA レベルとタンパク質レベルのいずれにおいても JF1 の発現が有意に低く、正常な腸管神経叢が形成されていないことが示唆された。

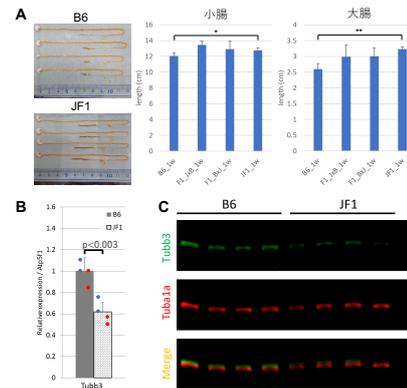


図 2: (A) B6 と JF1 における腸長の亜種間多様性。B6 と JF1 の腸管における神経マーカーの mRNA 発現 (B) とタンパク質発現 (C)。

(2) 黒化 JF1 系統の樹立

JF1 の *Ednrb* 遺伝子座の配列解析を行い、約 5.0 kb の LTR/ERVK トランスポゾンが第一イントロンに挿入されていることを確認した。*Ednrb* 遺伝子のトランスポゾン挿入変異の上流と下流をターゲットとする 2 種類の gRNA を人工合成によって作製し、Cas9 と組み合わせる JF1 受精卵に導入した。出生した産子において JF1 に特徴的な白斑が改善しており、腹部の一部以外で毛色が黒化していることが観察された。発生期のエンドセリンシグナリングは、色素細胞の移動と分化に関与することが知られているため、このゲノム編集システムでは、*Ednrb* 遺伝子の発現が回復していることが示唆された。

ゲノム編集による *Ednrb* 遺伝子の修復システムは、ヘテロ個体同士を交配してホモ系統を作出した。ホモ個体では、腹部の白斑がより小さくなり、軟便や巨大結腸などの疾患表現型も認められなくなった。大腸の近位部と遠位部からタンパク質サンプルを調製し、発現解析を行ったところ、神経マーカーの発現が上昇していることが確認できた。これにより、色素細胞だけでなく、腸管神経叢形成も回復傾向にあることが示唆された (図 3)。

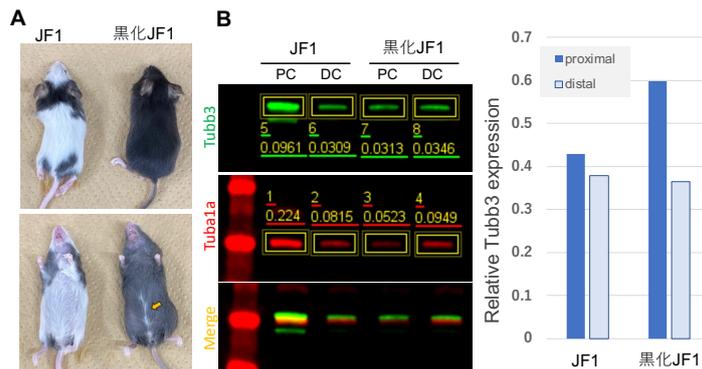


図 3: (A) トランスポゾン挿入変異の除去による白斑症の回復。腹部の一部のみに白斑 (矢印)。 (B) JF1 と黒化 JF1 の腸管における神経マーカーのタンパク質発現。Tubb3 (神経マーカー)、Tuba1a (コントロール)。

(3) F1 マウスを用いたアレル発現解析

マウスを構成する亜種のうち B6 の属する西欧産ドメスティカスと JF1 の属する日本産モロシヌスの間には、膨大なゲノム多型 (1,000 万以上の SNVs と 100 万以上の Indel) が存在する。この亜種間交配 F1 個体において、転写産物上の配列多型は遺伝子のアレル発現を識別することを可能にする。B6 と JF1 の交配 F1 個体 (BxJ F1 と略記) の組織から total RNA を調製し、以下のアレル発現解析を行った。

① Pyro シーケンシングによる *Ednrb* の発現解析

トランスポゾン挿入変異がどのように JF1 の *Ednrb* 遺伝子発現に影響しているのか調べる目的で、トランスポゾン挿入部位の 5' 側と 3' 側に存在するエクソンにそれぞれプライマーをデザインし、BxJ F1 の腸管における *Ednrb* のアレル発現比を Pyro シーケンサーで測定した (図 4A)。

トランスポゾン挿入部位の 5' 側領域では、B6 と JF1 由来の転写産物の存在比に差がなかった一方で、3' 側領域の発現レベルが JF1 由来のアレルで有意に低下しており、JF1 では完全長の *Ednrb* mRNA が十分に転写されていないことが示唆された。

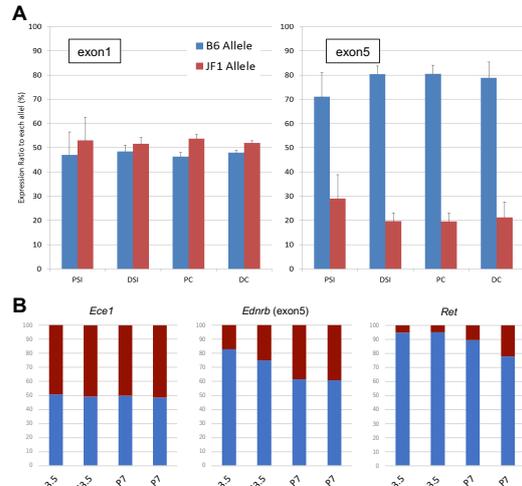


図 4: (A) F1 腸管を用いた *Ednrb* のアレル発現解析。PSI: proximal small intestine、DSI: distal small intestine、PC: proximal colon、DC: distal colon。(B) Amplicon-seq による F1 組織のアレル発現解析。

② Amplicon-seq によるヒルシュスプルング病関連遺伝子の発現解析

Ednrb にみられた B6 と JF1 のアレル発現の違いをヒルシュスプルング病関連遺伝子でも評価するため、胎齢 13.5 日の腸管ならびに生後 7 日の大腸を採取して total RNA を調製し、iSeq100 を用いた Amplicon-seq 解析を行った (図 4B)。 *Ednrb* は、Pyro シーケンシングの結果と同様に、JF1 アレルで低発現だった。一方、エンドセリン変換酵素遺伝子 (*Ece1*) などエンドセリンシグナリング関連遺伝子では、B6 と JF1 のアレル発現は同レベルであった。興味深いことに、ヒルシュスプルング病の代表的なリスク因子である *Ret* は JF1 由来のアレルで有意に低下していた。

③ RNA-seq による B6 と JF1 のアレル発現解析

B6 と JF1 の正逆交配を行い、母系と父系の系統が異なる 2 種類の F1 胎仔より、それぞれ腸管の total RNA を調製し、RNA-seq 解析を行った。転写産物上のバリエーションを指標にして、B6 と JF1 のアレルごとにリードのマッピングを行い、全遺伝子の 80% 以上でアレルごとの発現を識別することができた。これらの中には、すでに報告されている母系・父系のインプリント遺伝子が含まれており、アレル特異的な発現を適切に検出できていることが確認できた。およそ 600 の遺伝子座では系統特異的なアレルの発現差があり、シス制御配列にバリエーションを有することが推測される遺伝子群をリストアップすることができた。

(4) *Ret* 遺伝子のシス制御配列

Amplicon-seq によって B6 と JF1 でアレル発現差があった *Ret* 遺伝子についてシスバリエーションの探索を行った。ヒトの *RET* 遺伝子は、第一イントロンに存在するエンハンサーである RET+3 によって正の制御を受けていることが知られている。B6 および JF1 の相同ゲノム領域を探索した結果、ヒト RET+3 配列とホモロジーを有する領域が認められた。B6 および JF1 の RET+3 配列は、ゲノム DNA の PCR 増幅によりプラスミドベクターにクローニングした。

ヒト RET+3 配列には転写因子である SOX10 が結合して発現の制御を行うことが知られている。B6 と JF1 の RET+3 配列を比較したところ、JF1 由来の RET+3 配列では SOX10 の結合モチーフ数が少なかった。実際に B6 と JF1 の RET+3 配列に機能的な違いがあるのか明らかにするために、培養細胞を用いたルシフェラーゼアッセイを行った。マウスの *Sox10* 発現ベクターとルシフェラーゼレポーターベクターを共発現させたところ、JF1 の RET+3 配列の方が SOX10 への応答性が低かった。この結果は、*in vivo* でみられた *Ret* の JF1 アレルが低発現であった結果と矛盾しない。

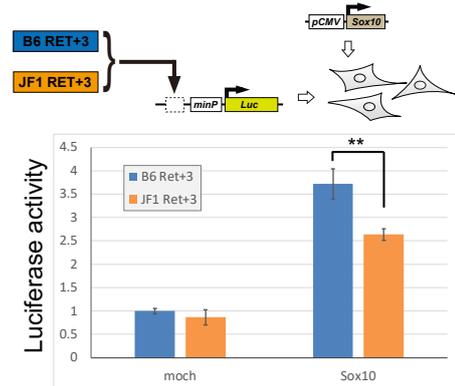


図 5: ルシフェラーゼアッセイの模式図 (上段)。 *Sox10* 発現ベクターとシス制御配列をもつレポーターベクターを細胞に共発現した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Amano Takanori	4. 巻 62
2. 論文標題 Gene regulatory landscape of the sonic hedgehog locus in embryonic development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 334 ~ 342
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/dgd.12668	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 天野孝紀、綾部信哉、吉田圭介
2. 発表標題 マウスEdnrb遺伝子座のトランスポゾン挿入変異による白斑発症メカニズム
3. 学会等名 第61回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 澤田嗣郎、小澤岳昌、北森武彦、中村洋、藤浪真紀、宮村一夫、石丸洋一郎、浦野泰照、加地範匡、坂真智子、鈴木茂、瀬藤光利、宗林由樹、馬場嘉信、船津公人、本田暁紀、末永智一、宮野博、本山晃、天野孝紀	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 1072 (449-454)
3. 書名 先端の分析法 第2版	

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------