

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08674

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュにおける筋発生異常モデルと新規薬剤プラットフォームの作成

研究課題名(英文)Creation of abnormal muscle development model of zebrafish and novel drug platform

研究代表者

近藤 琢也 (KONDO, Takuya)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：00644725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：平滑筋形成不全モデルとして腸管機能不全症を用いることとし、ゼブラフィッシュ受精卵にCRISPR/Cas9でLMOD1遺伝子の欠失を引き起こした。稚魚の腸管蠕動に関して、排泄低下や腸管蠕動を動画で解析するSpatiotemporal Mappingを用い腸管蠕動所見を得た。qPCRでは、lmod1aの発現低下に加え、他の平滑筋の構成因子であるACTA2やMYH11、平滑筋の発達に関与するMYOD1の発現も低下しており、平滑筋自体の構成因子が減少していることを確認した。また、Pax7の挙動の追跡を試みるべく、GFP遺伝子を挿入するモデルを作成し、成長に伴うPax7発現細胞の挙動追跡を試みている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、主に筋肉の発生に関連する疾患の原因解明と、その治療法模索のために計画しました。筋肉には横紋筋と平滑筋があり、今回は平滑筋の発生や機能解明を重視しました。特に、消化管平滑筋の異常により生じると考えられている疾患で、現在有効な治療法のないヒルシュスプルング病類縁疾患を主なターゲットとし、その原因遺伝子とされている遺伝子を対象として用い、その発病機序を解明するとともに、疾患の新たな治療法や創薬に役立つ可能性のある研究となっています。

研究成果の概要(英文)：We decided to use intestinal dysfunction as a smooth muscle aplasia model, and induced deletion of the LMOD1 gene in fertilized zebrafish eggs using CRISPR/Cas9. Regarding intestinal peristalsis in young fish, we used Spatiotemporal Mapping, which analyzes reduced excretion and intestinal peristalsis using videos, to obtain findings on intestinal peristalsis. qPCR revealed that in addition to decreased expression of lmod1a, expression of other smooth muscle components ACTA2 and MYH11, as well as MYOD1, which is involved in smooth muscle development, was also decreased, indicating a decrease in the components of smooth muscle itself. It was confirmed. In addition, in order to track the behavior of Pax7, we have created a model in which the GFP gene is inserted, and are attempting to track the behavior of Pax7-expressing cells as they grow.

研究分野：小児外科

キーワード：ヒルシュスプルング病類縁疾患 ゼブラフィッシュ LMOD1

### 1. 研究開始当初の背景

先天性横隔膜ヘルニア (Congenital Diaphragmatic Hernia : CDH) は、先天的な横隔膜筋肉の欠損に伴う腹部臓器の胸腔内への嵌入により肺低形成が出現する疾患であり、いまだに死亡率 25%と予後不良な疾患である。特に重症 CDH については、広範囲の横隔膜筋肉の広範欠損に対する根本的な治療法はなく、原因の究明や新規治療法の開発が求められている。筋肉の先天的欠損・異常を伴う疾患モデルは、筋肉の発生機序がいまだ十分に解明されていない部分もあることや、遺伝子改変における系統維持が困難といわれている。

また、平滑筋の異常により生じると考えられているヒルシウスプルング病類縁疾患も、遺伝子が関連するものもあると解明されているものの、根本的な原因の解明や治療方法の開発には至っていない状況である。

上記のように、筋組織の欠損や筋機能の異常により発症する疾患の解明を十分に進めることが出来ているとはいえない状況であり、原因の究明と、治療法の実現が必要と考えている。

### 2. 研究の目的

今回の研究で、筋肉の発生機序に関する分子メカニズムを *in vivo* で解明し、最適な疾患モデルを開発することをし、新たな薬剤プラットフォームを作成する事を目標とした。

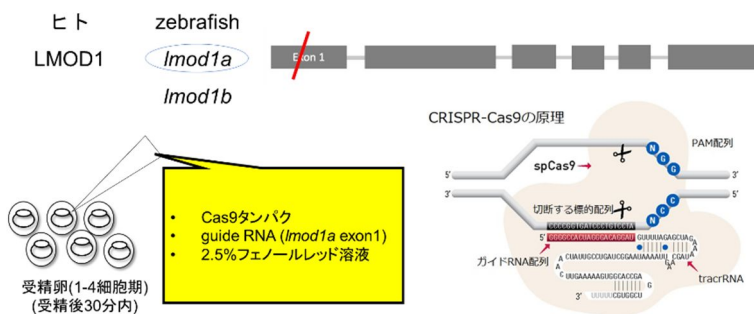
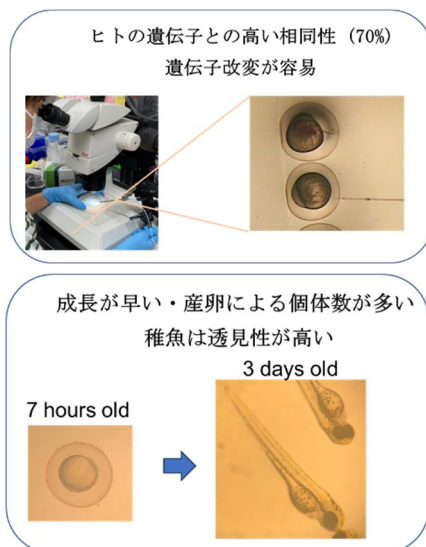
上記疾患モデルの解析を行うことで、希少難治性疾患である横隔膜ヘルニアやヒルシウスプルング病類縁疾患の根本的な原因を解明し、疾患予後の改善、ひいては新規治療薬の開発を視野に入れた研究を目的とした。

### 3. 研究の方法

遺伝子編集技術の進化により、胎生期の標的分子の可視化と高い再生能力が注目された小型魚類を用いた疾患モデルの創生が注目されている。多産で世代交代が早く、knock-out や knock-in, transgenic といった種々の遺伝子改変が可能なモデル動物としてゼブラフィッシュは最適である。疾患モデルとしてのコストパフォーマンスに優れ、疾患に紐づく鍵となる表現型さえ同定・評価できれば、系統の維持や個体数や介入期間の制限が大幅になくなり、より質の高い実験計画の立案が可能であると考え、本研究のモデルは zebrafish で作成することとした(右図)。

対象遺伝子は、ヒルシウスプルング病類縁疾患の中でも重症である巨大膀胱短小結腸腸管蠕動不全症 (MMHS) の原因遺伝子とされる LMOD1 とし、CRISPR-Cas9 を用いた knock-out zebrafish を作成し、系統を樹立する方針とした(下図)。系統を樹立した後に、qPCR や免疫染色を行い、遺伝子変異や表現型の確認を行うこととした。

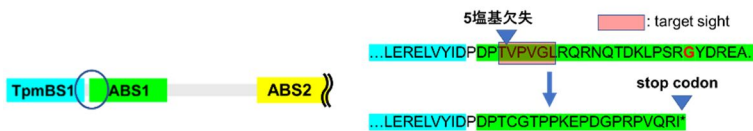
続いて症状の表現型評価として、野生型個体および変異型個体の消化管や膀胱の蠕動機能や収縮機能について、詳細な解析を行う方針とした。受精後 1 週間程度の稚魚を用いて稚魚をアガロース上に固定したうえで、蛍光飼料摂取後の通過状況の確認 (Gut Transit Assay) と、*in vivo* live imaging での腸蠕動の撮影を行い評価することとした。



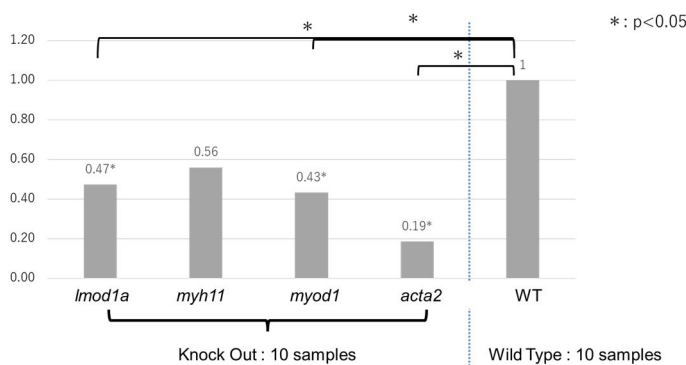
#### 4. 研究成果

モデル作成の確認を行うため、CRISPR/Cas9 により *lmod1* を knockout した zebrafish より試料を採取し、sanger 法により検討すると、target sight に 5塩基の欠失が確認され、さらにその下流で stop codon が形成される配列となっていることが確認されました。(図1)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
505 bits(273)	8e-148	303/316(96%)	7/316(2%)	Plus/Plus



次に、qPCR で *lmod1a* の評価を行うと、Knock out 群で *lmod1a* の発現低下が確認されました。同時に評価した平滑筋の構成因子である ACTA2 や MYH11、平滑筋の発達に与関する MYOD1 の発現も低下しており、平滑筋自体の構成因子が減少している可能性が示唆されました。(図2)



野生型と Knock out 群での摂取した試料の通過を評価する Gut Transit Assay では、排出された蛍光飼料は Knock out 群で Wild Type より有意に少なく、Knock out 群では摂取したものの通過時間の遅延があることが示されました。(図3、表1)



さらに、腸管蠕動を直接観察・評価する Spatiotemporal Mapping においても Knock out 群では腸管蠕動が、有意に遅く短いという結果になっていました。また、knock out の中には一部の腸管の蠕動が欠如している個体も見られました。(表2)

	蠕動回数	頻度 (/分)	蠕動間隔(秒)	距離(μm)	蠕動速度(μm/s)
KO 7dpf (10)	5.2 ± 1.7	1.21 ± 0.36	39.23 ± 6.15	367.03 ± 45.17	13.27 ± 2.75
WT 7dpf (10)	6.0 ± 0.7	1.51 ± 0.22	41.47 ± 3.61	526.80 ± 53.07	17.97 ± 1.78
p 値	0.23	0.04	0.35	<0.01	<0.01

以上の結果より、本研究において、*lmod1a* を遺伝子改変することにより、MMIHS 疾患モデルゼブラフィッシュを作製することに成功したと考えられる。本疾患モデルでは、各評価項目で腸管蠕動の低下が見られ、表現型も疾患に類似しているものと考えられる。今後、上記モデルを用いて、MMIHS の治療法の確立を目標にさらなる解析を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yukihiro Toriigahara
2. 発表標題 Zebrafish model of Allied disorders of Hirschsprung 's disease using CRISPR/Cas9
3. 学会等名 Fukuoka International Symposium on Pediatric/Maternal-child health Research (国際学会)
4. 発表年 2023年～2024年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	永田 公二 (NAGATA Kouji) (20419568)	九州大学・大学病院・講師  (17102)	
研究分担者	桐野 浩輔 (KIRINO Kosuke) (00621707)	九州大学・大学病院・助教  (17102)	

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
---------	---------