

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500485

研究課題名(和文) Sox17ヘテロ不全マウスの新生児肝炎疾患モデル動物としての応用

研究課題名(英文) Sox17 haploinsufficiency as applied to human disease model for newborn hepatitis.

研究代表者

金井 正美 (KANAI, MASAMI)

東京医科歯科大学・実験動物センター・教授

研究者番号：70321883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Sox17ヘテロ個体の呈する新生児肝炎と、肝臓、膵臓、胆嚢など組織特異的にSox17を欠損させたマウスラインの表現系の相違を形態学的に観察した。また、新規病態モデルマウスとして、TARGATT (site specificにコピー数を制御出来るトランスジェニックマウス系統)の遺伝子導入効率を確認した。今後、Sox17ヘテロ個体、SHIVA点変異モデルマウス(Met 72 Arg置換；肝臓代謝異常症を呈する)と比較検討することで、ヘテロ不全疾患モデルとして展開する。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have observed the phenotype about the condition of a patient of the newborn hepatitis that showing Sox17 haploinsufficiency comparative with Sox17 conditional knockout lines for liver, pancreas and gallbladder, morphologically. In addition, as a candidate of the new human disease model, we confirmed gene introduction efficiency by use of TARGATT (the transgenic mouse system which can control a copy number in site specific). We will apply it as a disease model compared with Sox17 heterozygous mouse and point mutated SHIVA mouse (Met 72 mutated to Arg; with the liver metabolism abnormality symptom).

研究分野：実験動物

キーワード：ヘテロ不全 疾患モデル動物 新生児肝炎 Sox17

1. 研究開始当初の背景

(1)ヒト遺伝疾患の病因としては、責任遺伝子の両アリルが全欠損することはまれで、点変異などによるハプロ不全(片方のアリル変異)によるものが多い。我々の作出した Sox(Sry-related HMG box)17 ノックアウトマウスは、ホモ個体では胚性内胚葉の形成不全により胎生致死であるが、ヘテロ個体の遺伝子背景を置換する過程で、胆管上皮脱落による新生児肝臓周囲炎を伴う肝炎が観察され、生後致死を呈した。

(2) Sox17 遺伝子は 1996 年に我々がマウス精巣より単離・報告したものである(Kanai Y, Kanai-Azuma M *et al.*, 1996 J Cell Biol)。その後の改変マウスの表現系から、ほ乳類における胚性内胚葉決定遺伝子であることを世界に先駆けて証明した(Kanai-Azuma M, *et al.*, 2002 Development)。また近年、培養系において、human iPS 細胞から生殖細胞(精子)に分化させる際のキー遺伝子であることが報告され、Sox17 遺伝子が、幹細胞維持・分化過程においても、非常に重要な役割を担うことが明らかになりつつある(Baumann K, 2015 Nat Rev Mol Cell Biol)。

2. 研究の目的

(1)新生児肝炎の原因の 20% は出生前後のウイルス感染によるものであるが、それ以外の 80% の発症機序は未だ不明であり有用な疾患モデル動物の開発が待たれていた。また、罹患率は 5000-1 万人に 1 人、家族性発症率は 10% であることから、出生前診断並びに治療方針の検討が急務である。そこで、我々の作出した Sox17 遺伝子コピー変異体マウスを用いることで新生児肝炎の病態発生機序の詳細を明らかにし、新規疾患モデル動物としての有効性を評価することを目的とした。

(2) Sox17 遺伝子はそもそも初期胚性内胚葉で発現し、その後 8.5dpc において発現が消えるが、膵臓、胆嚢、肝臓原基の発生に伴い、再活性化する。再活性化時期と周囲の組織発生のステージを詳細に遺伝子マーカーなどを用いて確認し、相互関係を理解する。

(3)Sox17 ヘテロ個体と組織特異的 Sox17 ノックアウト個体、また TRECK 法、TARGATT 法など新規技術により作出したトランスジェニックマウスを用いた表現系を比較観察することで、新生児肝炎の疾患モデル動物の新たな確立を目指す。

3. 研究の方法

(1)Sox17 ヘテロ変異体の肝臓病変は

17.5dpc から肉眼解剖的に観察される。そこで膵臓、肝臓、胆嚢など内胚葉由来組織の Sox17 の内在性発現パターンを胎齢 9.5dpc から 15.5dpc にかけて経時的に whole mount 組織染色(Pdx1;膵臓細胞, HNF4;肝臓細胞, DBA レクチン;胆嚢・胆管・肝管マーカー)と共に観察しヘテロ個体の表現系を詳細に検討する。

(2)Sox17 遺伝子は Sox2 同様に幹細胞維持に重要な役割を担う一方、初期胚では上皮化、管腔形成に関与することが報告されている。そこで、新生児肝炎の原因である胆管上皮脱落像について、エポン厚切り切片によるスクリーニングを行い、TEM(透過型電子顕微鏡)を用いて上皮形態をより詳細に観察する。

(3)(1)において Sox17 再発現・活性化の確認されたステージの胆嚢・胆管原基を単離し、組織培養系を確立する。また本系を用いることで、関連因子の添加・阻害実験モデルとして応用する。

(4)Tre-cre(全身性)、Alb-cre(肝細胞)、Pdx1-cre(膵臓、胆嚢)マウスをそれぞれ Sox17 flox マウスと掛け合わせた 3 ラインを作出し、各組織レベルにおける表現系を方法(1)(2)に則り評価する。

(5)細胞種特異的に Sox17 を除去する方法として TRECK(toxin-receptor-mediated cell knockout)マウスを、コピー変異体の作出方法として TARGATT(第 11 染色体上 attP に site specific にコピー数を制御出来るトランスジェニックマウス系統)マウスを用いることで、肝細胞ならびに胆管上皮細胞特異的に Sox17 遺伝子の欠損する、もしくは Sox17 遺伝子をドミナントネガティブに発現させるヘテロ不全個体を作出する。

4. 研究成果

(1)Sox17 ヘテロ個体は 17.5dpc において、肺、膵臓、食道、胃、十二指腸などの内胚葉由来組織の病態変化は認められず、肝臓周辺部位炎症のみが認められた。また、DBA による胆嚢・胆管のトレース実験において、同時期に胆嚢領域の脆弱化、肝外胆管の異所性の発達が観察された。Sox17 抗体染色並びに GFP KI マウスの観察結果から、9.5dpc から再活性化し、将来の胆嚢領域に局限することが明らかとなった。また、肝炎マーカーである ALT, ALP 並びに胆汁の生化学的上昇が認められたものの、胆管上皮、胆管上皮細胞そのもの形態はほぼ正常であった。胆のう上皮には特異的に Sox17 の発現が観察され、発現の半量になるヘテロ個体においては、胆嚢上皮の脱落とそれに伴う胆管閉塞が形態学的に観察さ

れた。

(2)(1)を受けた結果から、肝臓周辺領域では肝細胞の成熟マーカーであるPAS染色陰性細胞において、ER ストレスマーカーであるGRP78 陽性を組織学的に示し、また、電顕観察により肝細胞内のERの膨化が観察された。15.5dpcの胆嚢上皮をTEM観察したところ、上皮細胞のオルガネラなどには大きな変化は認められなかったが、基底膜の薄弱化と円柱状から方形状に細胞形態の変化が顕著に認められた。

(3) Sox17 欠損マウスは10.5dpcに胎生致死となるため、それ以降の内胚葉系臓器の発生・発達の個体での解析は困難である。(1)(2)の結果から Sox17 の再活性化の観察された9.5dpcの肝原基・膵芽を含む前腸領域を取り出し、器官培養を行うことにより、PDX1, HNF4a の発現と胆管形成を *in vitro* で維持、再現した。millipore フィルター上で3日間(12.5dpc相当)培養し伸長率を観察したところ、ヘテロ個体において、組織極性を失い、上皮が薄弱化することを培養系にて再現した。また、正常で観察されるPCNAによる細胞増殖の組織偏在(伸長方向でのみ強陽性を示す)はヘテロ個体では観察されず、胆嚢領域が自立的分化能を有することを証明した。今後、本系を用いることで、Sox17 発現に影響を与える因子の同定が可能となる。

(4) Tre-cre (全身性) /Sox17-flox の掛け合わせホモ個体は、Sox17-bulk ノックアウト個体(10.5dpcに胎生致死)と比較すると表現系がマイルドで、10.5dpc以降も生存し、内胚葉派生組織(胆嚢・胆管、肝臓、膵臓)領域の病変変化を観察することが可能であると予想したが、Sox17-bulk ノックアウト個体と同時期に表現系を呈し、胎生期後半の病態変化を観察することは出来なかった。Alb-cre, Pdx 1-cre と Sox17 ホモ変異体については、胆管上皮脱落を伴う新生児肝炎は観察されないことから、本発症原因が肝細胞、膵細胞ではなく、胆嚢・胆管に発現する Sox17 が原因である可能性が強く示唆された。今後、各変異マウスを用いたDNAarrayなど遺伝子レベルでの差異の詳細を検討して行く必要がある。

(5)新規病態マウスとして、TRECK マウスの導入を試みたが、GFP と transgene の発現が比例せず、導入効率の高さからTARGATTを採用し、GFP KI vector を前核受精胚へ導入し発現量を同定した。今後、本系を用いて、Sox17 遺伝子の72番目のメチオニンをアルギニンに置換する個体、もしくは、shRNAを発現させることで遺伝子の半量抑制を行うヘテロ変異体を作り、SHIVA(Met 72Arg 置換; 肝臓代謝異常症を

呈する)点変異個体同様の病態再現が可能であるかなど、既存の Sox17 ヘテロマウス、SHIVA マウスと比較検討し、ハプロ不全によって引き起こされる疾患モデル動物として応用する予定である。

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5件)

(1) Fate mapping of gallbladder progenitors in posteroventral foregut endoderm of mouse early somite-stage embryos.

Uemura M, Igarashi H, Ozawa A, Tsunekawa N, Kurohmaru M, Kanai-Azuma M, Kanai Y. J Vet Med Sci. 2015;175(5):587-591.(審査有)

(2) Induction of the G2/M transition stabilizes haploid embryonic stem cells.

Takahashi S, Lee J, Kohda T, Matsuzawa A, Kawasumi M, Kanai-Azuma M, Kaneko-Ishino T, Ishino. Development. 2014;141(20):3842-3847. (審査有)

(3) Sox17-mediated maintenance of fetal intra-aortic hematopoietic cell clusters.

Nobuhisa I, Osawa M, Uemura M, Kishikawa Y, Anani M, Harada K, Takagi H, Saito K, Kanai-Azuma M, Kanai Y, Iwama A, Taga T. Mol Cell Biol. 2014;34(11):1976-1990. (審査有)

(4) Sox17 haploinsufficiency results in perinatal biliary atresia and hepatitis in C57BL/6 background mice.

Uemura M, Ozawa A, Nagata T, Kurasawa K, Tsunekawa N, Nobuhisa I, Taga T, Hara K, Kudo A, Kawakami H, Saijoh Y, Kurohmaru M, Kanai-Azuma M, Kanai Y#. (#equally contribution) Development. 2013 ;140(3):639-648. (審査有)

(5) Gut endoderm is involved in the transfer of left-right asymmetry from the node to the lateral plate mesoderm in the mouse embryo.

Saund RS, Kanai-Azuma M, Kanai Y, Kim I, Lucero MT, Saijoh Y. Development. 2012 ;139(13):2426-2435. (審査有)

[学会発表](計23件)

(1)Masami Kanai-Azuma, Sox17 is necessary for uterine receptivity during embryo implantation. 4th international Sox research conference. September 8th - 12th 2014, Cleveland, Ohio, USA

(2)Kento Miura, Masami Kanai-Azuma,

Yoshiakira Kanai. Common molecular pathway between SRY-dependent and- independent testiculogenesis in mouse fetal ovary. 4th international Sox research coferece. September 8th - 12th 2014, Cleveland, Ohio, USA

(3) **Masami Kanai-Azuma** *et al.*, Luminal fluid flow supports continuous spermatogenesis through the balanced GDNF regulation. Gordon Reseach Confernces “Germ stem cell biology” 14th-19th July 2013 The Chinese Univ. Hong Kong. Hong Kong.

(4) **Masami Kanai-Azuma** and Yoshiakira Kanai, Haploinsufficiency of Sox17 causes bilary atresia and perinatal hepatitis in C57BL/6 mice. Hong Kong Society of Dev. Biol. Symposium. Nov 26th -27th. 2012. Hong Kong National Univeristy. Hong Kong.

(5) Ikuo Nobushira, Mitsujiro Osawa, Mami Uemura, Yoko Kishikawa, Maha Anani, Kaho Harada, Haruna Takagi, Akihiro Kudo, **Masami Kanai-Azuma**, Yoshiakira Kanai, Tetsuya Taga. Sox0F family proteins have roles in the maintenance of immature phenotype of the hematopoietic cell clusters in the aorta-gonad-mesonephoros regions od mouse embryo. ISSCR June 13th-16th. 2012 Yokohana

他 18 件

〔図書〕(計2件)

(1)ジュンケイラ組織学(第4版);131-137. 第6章;脂肪組織;丸善; 2015

(2) 獣医組織学 (第6版);221-232. 第15章胎盤;学窓社 2014

〔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
<http://www.tmd-cea.jp/eam/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者
金井正美 (KANAI, Masami)
東京医科歯科大学・実験動物センター・教授
研究者番号: 70321883

(2)研究分担者
()
研究者番号:

(3)連携研究者
()
研究者番号: