

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25290038

研究課題名(和文) TRECK法を用いた神経変性疾患モデルマウスの作製とその利用

研究課題名(英文) Generation and application of mouse models for neurodegenerative diseases by TRECK method

研究代表者

米川 博通 (YONEKAWA, Hiromichi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術研究センター・特任研究員

研究者番号：30142110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：私たちはこれまでTRECK法で作製されたモデルマウスがヒト疾患の原因解析に役立つことを示した。本計画では、このTRECK法をさらに改良し、2種類のプロモーターと2種類の蛍光蛋白質で、非侵襲的に標的細胞の特異的破壊を観察できる系を考案した。また、標的としては神経変性症を選んだ。新たに開発したTRECKベクターはNIH3T3などの培養細胞では予想通り機能することを確認した。モデルマウスの作製には、NeuroDプロモーターを用いたトランスジェニックマウス、またはNestinプロモーターを用いたノックインマウスの2種類を作製した。現在、これらのマウスによる発現解析を行ない、有用性の確認を行なっている。

研究成果の概要(英文)：Toxin Receptor Mediated Cell Knockout (TRECK) method make it possible to deplete the cells of interest conditionally and cell lineage-specifically and consequently to disclose the in vivo function of the cells. In this project, we tried to generate model mice for human neurodegenerative diseases by newly developed TRECK method. To develop new TRECK method, we used 2 kind of fluorescent proteins and neuron-specific promoters, respectively. TRECK vector was constructed by Azami Green, tdTomato and hDTR, which were ligated with Cre/loxP system. Differential expression of these proteins was succeeded by the use of cultured cell line NIH3T3 or Jurkat cells. Then, we generated 2 kind of gene-manipulated mice; one was transgenic mice using the TRECK vector mentioned above and NeuroD promoter and the other was mouse knocked in the first exon of nestin gene using the vector. Both mice are now under investigation whether they are suitable for models for human neurodegenerative diseases.

研究分野：実験動物学

 キーワード：毒素受容体 ジフテリア毒素 組織特異的プロモーター トランスジェニックマウス 蛍光タンパク質  
Cre/loxPシステム ヒト疾患モデルマウス

### 1. 研究開始当初の背景

私たちは平成13年(2001年)に TRECK 法というマウス生体内に存在する細胞の生体内(in vivo)機能を解明するために、これまでに無い画期的な方法を開発した(Saito, M. et al., 2001)。

TRECK 法は、

- (1) ヒト由来のジフテリア毒素受容体(hDTR)のcDNAを標的となる細胞に特異的に発現する組織特異的プロモーターの下流に置き、そのプロモーターによって制御されたhDTRを標的細胞の上に発現するようなベクター(TRECKベクター)を構築する。
- (2) そのTRECKベクターを用い、マウスの前核期卵へのマイクロインジェクションを行ない、TRECKトランスジェニックマウス(TRECK-Tgマウス)を作製する。
- (3) 得られたTRECK-Tgマウスを飼育し、任意の時期にジフテリア毒素(DT)を腹腔内に投与することにより、マウス生体内のhDTRを発現している標的細胞を破壊する。
- (4) DTによって標的細胞が破壊されたことを組織学的、あるいは免疫組織化学的に確認すると同時に、DT投与後のマウスの表現型変化を観察し、破壊された標的細胞のin vivo機能を確認する。

という、段階を踏むことによって、標的細胞のin vivo機能が解明できる。

2001年の論文では、肝実質細胞に特異的に発現するタンパク質アルブミンのプロモーターを用いてTRECK-Tgマウスを作製した。このTRECK-TgマウスにDTを腹腔内に投与すると、投与後2日にそのTgマウスは急性の肝炎を発症した。肝臓での組織学的検索の結果、DT処理によって肝実質細胞が特異的に破壊されていることが観察された。また、肝実質細胞の破壊の程度、すなわち肝炎の重篤度は、DTの投与量( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )に概ね比例することも確認された。

この成功を基にして、私たちは平成27年度(2015年度)までに、2種類の糖尿病発症モデルマウスを樹立した。その1つはヒト細胞の移植を可能とする重度免疫不全マウス(SCIDマウス)を遺伝的背景としたモデルマウス、もう1つは組織特異的発現を確実にするための大腸菌人工染色体(Bacterial Artificial Chromosome: BAC)を基本としたTRECKベクターをC57BL/6Jに導入したTgマウスである(Matsuoka, K. et al., BBRC 2013)。

その他に、アトピー性皮膚炎の治療薬の開発のために有用と思われる無毛NC/Ngaマウス(Takada, T. et al., Transgenic Res. 2008)、尿細管の機能不全に基づく急性腎不全マウス(Sekine, M. et al., Transgenic Res., 2012)、好塩基球、抗酸球を欠損する免疫不全マウス(Matsuoka, K. et al. PLoS One, 2013)など、6種類の疾患に対する7系統の

TRECK-Tgマウスを樹立し、その大部分を国際誌に公表してきた。

### 2. 研究の目的

上述の様に私たちは、6種類の疾患に対する7系統のマウスを作製し、大きな成功を収めてきた。

しかし、近年脳科学の発展と共に、

- (1) 神経疾患、特に神経変性疾患のマウスモデルが必要となったこと、
- (2) 私たちがTRECK法で未だ神経変性疾患のモデルマウス作製に挑戦したことがないこと、

など2つの理由により、その様な神経変性疾患のモデルマウスを作製し、実際に中枢神経系のどの部分が脳機能のどの様な所に係わるのかを明らかにする目的で、本研究を計画した。

さらに、

- (1) 組織特異性のあまり高くないプロモーターの利用と
- (2) 中枢神経系細胞と標的細胞とを2種類の蛍光タンパク質で標識し、非侵襲的にhDTRの発現を観察できること、

を目的として、これまで成功している2種類のプロモーターによるTRECK法(Double Promoter Driven TRECK法: DPD-TRECK法)を応用したTRECK法の開発を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) DPD-TRECK法

DPD-TRECK法は、従来のTRECK法に一工夫を加え、2種類のTgマウスを用いて、プロモーターの組織特異性を著しく向上させる方法である。このことによって、組織特異性のあまり高くない、例えば複数の細胞系列に発現するプロモーターでも利用可能にする方法である。2種類のTgマウスのうち、

第1のTgマウスは、組織特異的プロモーター(第1のプロモーター)とhDTRの間に、loxP配列で挟んだneo遺伝子をstuffer(詰め物)として存在させることによって、第1のプロモーターによるhDTRの発現を抑えた状態のTgマウスである。

第2のTgマウスはCreドライバーTgマウスであり、第2の組織特異的プロモーターにCreリコンビナーゼを配置したものである。このCreドライバーTgマウスは、我国の理研バイオリソースセンターや米国のジャクソン研究所など、様々なマウス系統を保存している機関から比較的簡単に入手できる。

これら2種類のマウスを交配することによって、hDTRを発現する細胞は、第1のプロモーターと第2のプロモーターが同時に発現する細胞となる。そのため、上記のように複数の細胞に発言するプロモーターやleakyなプロモーター(漏出性のプロモーター)にも応用することができる優れた方法である。

(2) 2種類の蛍光色素を用いた組織の染め分け

このDPD-TRECK法のneo stuffer部分を第1の蛍光色素遺伝子で置き換え、hDTRの下流にhDTRと同時に第2の蛍光タンパク質を発現させるためのIRES配列を位置させたものに置換させたTgマウスを作製する。

もし、この様なTgマウスが作製できたなら、そのTgマウスはそのTgマウスそのものでは、第1のプロモーターで発現を制御される第1の蛍光蛋白質が発現する。

一方、第2の組織特異的プロモーターを持ったCreドライバーTgマウスを交配することにより、ダブルTgマウス(dTgマウス)を作製する。このdTgマウスでは、第1のプロモーターで発現する第1の蛍光タンパク質と第1と第2のプロモーターが同時に発現する場所で発現する第2の蛍光蛋白質で染め分けが可能になるはずである。そして、第2の蛍光蛋白質が発現する場所では、その蛍光タンパク質の上流に存在するhDTRは必ず発現するはずである。従って、この様なdTgマウスでは、第2の蛍光蛋白質が発現する細胞系列(細胞群)が標的細胞であり、DTをこのdTgマウスに投与したとき、その標的細胞は破壊されるため、第2の蛍光蛋白質の発現は見られなくなるはずである。

以上の様な考えの基に研究を開始した。

材料としては、神経組織に特異的に発現するNeuroD遺伝子のプロモーターを選び、第1の蛍光蛋白質にAzami Green、第2の蛍光蛋白質にtdTomatoを選んだ。

NeuroD遺伝子を選んだ理由は、この蛋白質が神経組織と共に膵臓の細胞にも発現していることから、第2のプロモーターに神経特異的なCaMKII $\alpha$ のプロモーターを持つCreドライバーTgマウスとの交配によって中枢神経系がtdTomatoで赤色に標識され、一方の膵臓細胞にはAzami Greenの緑色蛍光のまま残ると予想される。

また、このTgマウスが予想通りに発現しないことの安全策として、同様のTRECKベクターを用いて、同じく神経特異的に発現するNestin蛋白質の第1エキソン部分にノックインした遺伝子改変マウスの作製を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 培養組織による組織特異的発現

NIH3T3、およびJarkat培養細胞による発現実験

NIH3T3細胞にユビキタスに発現するCAGプロモーターと上記ベクターをさらに改良したベクターを用い実験を行なった。NIH3T3に上記ベクターのみを発現した場合には、細胞は緑色蛍光を発した。一方、このベクターとやはりユビキタスに発現するCreベクターを同時に導入すると、細胞は全て赤色蛍光に変わった。このことは、培養細胞では上記で予想したとおりの現象の起っていることが確

認できた。

同様の結果はJarkat細胞を用いた実験でも証明された。

そこで、このベクターを用いてTgマウスをマイクロインジェクション法によって作製した。現在までに、少なくとも2頭のファウンダーマウスが得られており、またそれらの子孫も得られている。今後、それらのマウスを用いて、培養細胞で得られた現象が得られるか否かを確認中である。

また、一方Nestin遺伝子へのノックインマウスの作製にも成功し、現在子孫を獲得しているところである。

残念ながら当初予定したTRECK法による神経変性疾患のモデルマウス作製には一歩及ばなかったが、現在も引き続きin vivoでの発現を確認中であり、できる限り早い時期にモデルマウスを完成したいと考えている。

#### <引用文献>

- Saito, M. et al, Nature Biotechnol. 19: 746-750, 2001  
Matsuoka, K. et al., BBRC 436: 400-405, 2013  
Takada, T. et al., Transgenic Res. 17: 1155-1162, 2008  
Sekine, M. et al., Transgenic Res., 21: 51-62, 2012  
Matsuoka, K. et al. PLoS One 8: e60958, 2013

#### 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12件)

- H. Shitara, L. Cao, M. Yamaguchi, H. Yonekawa, C. Taya; Establishment of a heteroplasmic mouse strain with interspecific mitochondrial DNA haplotypes and improvement of a PCR-RFLP-based measurement system for estimation of mitochondrial DNA heteroplasmy. Transgenic Res. 査読有 in press.  
doi:10.1007/s11248-017-0009-2  
Y. Miyasaka, H. Shitara, S. Suzuki, S. Yoshimoto, Y. Seki, Y. Ohshiba, K. Okumura, C. Taya, H. Tokano, K. Kitamura, T. Takada;, H. Hibino, T. Shiroishi, R. Kominami, H. Yonekawa, Y. Kikkawa; Heterozygous mutation of *Ush1g/Sans* in mice causes early-onset progressive hearing loss, which is recovered by reconstituting the strain-specific mutation in *Cdh23*. Hum. Mol. Genet., 査読有 25: 2045-2059, 2016.  
T. Nishimura, O. Kaminuma, M. Saeki, N. Kitamura, K. Matsuoka, H. Yonekawa, A. Mori, T. Hiroi; Essential

Contribution of CD4+ T Cells to Antigen-Induced Nasal Hyperresponsiveness in Experimental Allergic Rhinitis. PLoS ONE 査読有 11: e0146686, 2016.

doi.org/10.1371/journal.pone.0146686

A. Shimizu, T. Mito, O. Hashizume, H. Yonekawa, K. Ishikawa, K. Nakada, J-I. Hayashi; G7731A mutation in mouse mitochondrial tRNA<sup>Lys</sup> regulates late-onset disorders in mitochondrial mice. Biochim. Biophys. Res. Commun. 査読有 459: 66-70, 2015

K. Matsuoka, M. Saito, K. Shibata, M. Sekine, H. Shitara, C. Taya, X. Zhang, T.A. Takahashi, K. Kohno, Y. Kikkawa, and H. Yonekawa. Generation of mouse models for type 1 diabetes by selective depletion of pancreatic beta cells using toxin receptor-mediated cell knockout. Biochim. Biophys. Res. Commun. 査読有 436: 400-405, 2013

K. Matsuoka, H. Shitara, C. Taya, K. Kohno, Y. Kikkawa, and H. Yonekawa. Novel basophil- or eosinophil- depleted mouse models for functional analyses of allergic inflammation. PLoS One. 査読有 8: e60958, 2013.

doi.org/10.1371/journal.pone.0060958

Y. Miyasaka, S. Suzuki, Y. Ohshiba, K. Watanabe, Y. Sagara, S. P. Yasuda, K. Matsuoka, H. Shitara, H. Yonekawa, R. Kominami, Y. Kikkawa; Compound Heterozygosity of the Functionally Null Cdh23<sup>vngt</sup> and Hypomorphic Cdh23<sup>ahl</sup> Alleles Leads to Early-onset Progressive Hearing Loss in Mice. Exp. Anim., 査読有 62: 333-346, 2013.

E. Sueoka, N. Sueoka-Aragane, A. Sato, M. Ide, H. Nakamura, Y. Sotomaru, C. Taya, H. Yonekawa, T. Kitagawa, Y. Kubota, S. Kimura, K. Nakachi, K. Tanimoto; Development of Lymphoproliferative Diseases by Hypoxia Inducible Factor-1alpha Is Associated with Prolonged Lymphocyte Survival. PLoS ONE 査読有 8(4): e57833, 2013.

doi.org/10.1371/journal.pone.0057833

〔その他〕

ホームページ等

米川博通・設楽浩志：

[http://www.igakuken.or.jp/center/basic/animal\\_research.html](http://www.igakuken.or.jp/center/basic/animal_research.html)

吉川欣亮：

<http://www.igakuken.or.jp/project/detail/mammal.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

米川博通 (YONEKAWA, Hiromichi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術研究センター・特任研究員

研究者番号：30142110

### (2) 研究分担者

吉川欣亮 (KIKKAWA, Yoshiaki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・プロジェクトリーダー

研究者番号：20280787

設楽浩志 (SHITARA, Hiroshi)

公益財団法人東京都医学総合研究所・基盤技術研究センター・主任基盤技術研究職員

研究者番号：90321885