

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 26 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670653

研究課題名(和文) 霊長類椎間板化キメラマウスの樹立・応用による椎間板変性疾患の包括的解析

研究課題名(英文) Establishment of chimeric mice having a primatized intervertebral discs and comprehensive research of the primatized intervertebral disc.

研究代表者

仙波 圭 (SEMBA, KEI)

熊本大学・学内共同利用施設等・研究員

研究者番号：00398190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の究極の目的は、チンパンジー化椎間板を持つ実験動物の樹立を提案した。まず既に樹立されたチンパンジー人工多能性幹細胞(iPS細胞)が1細胞に単離された後にマウス変異受精卵に移植しても生着・分化・キメラマウスの臓器発生に寄与するかどうか検討を行った。しかし、Ptf1a-nullホモ変異受精卵を使用した実験では単離されたチンパンジーiPS細胞がマウス臓器発生への寄与を認めなかった。このことは、異種細胞集団組織へ単離された1細胞レベルでの移植は、隣接細胞からのシグナル伝達機構が異種細胞間のミスマッチで消失することが決定的な負のバイアスとなっていることが推測された。

研究成果の概要(英文)：This research goal is the establishment of the experimental animal having a humanized intervertebral disc. However, nowadays, the production of a humanized chimeric animal is strongly restricted. In this study, a chimpanzee was used to be established such as an experimental animal having primatized intervertebral discs. At first, we microinjected chimpanzee induced pluripotent stem cells (induced pluripotent stem cells: iPS cells) into mutant mouse fertilized eggs. And, we examined whether isolated single chimpanzee iPS cell contributed to development of organ in chimeric mice. However, unfortunately we found that isolated chimpanzee iPS cell did not contribute to mouse development, using the Ptf1a-null homogenous fertilized egg. These results suggested that the transplant of isolated cells into the different species is difficult to engraft in a primordium during development because of mismatch neighboring environment of intercellular communication between a primate and a rodent.

研究分野：医歯薬学

キーワード：椎間板 霊長類化椎間板キメラ チンパンジーiPS Sd変異マウス Ptf1a CRISPR-Cas9 椎間板髄核マーカー分子 椎間板線維輪マーカー分子

1. 研究開始当初の背景

腰痛は、全人口の 70-85%に発生する(Lancet. 354: 581-585. 1999)。1998 年国民生活基礎調査(厚生労働省:国民生活基礎調査 第 4 巻 都道府県編(健康).厚生統計協会,1998)によると、日本での腰痛の有訴者数(人口千対)は 92.5 である。また、腰痛症の通院者率(人口千対)は 39.5 で、高血圧に続く common disease の 1つと報告されている。また、腰痛症と椎間板変性は正の相関を持つ事が過去の報告で示されている(Spine. 25:487-92. 2000; Spine. 30:1173-80. 2005)。そのため、椎間板変性の治療に結びつく基礎的・臨床的研究の成果が望まれている。また、ヒト疾患の治療に結びつける基礎的・臨床的研究のためには、チンパンジーをはじめとする同じ霊長類の実験動物の使用が理にかなっているのは当然である。しかし、霊長類実験では、大型動物専用の適切な施設の確保・実験動物の購入・飼育・維持のため膨大な費用・手間・時間がかかることは周知のことである。そのコストのため、目種の違う廉価なマウス・ラット・ウサギといった齧歯類をヒト疾患のモデル動物として汎用しているのが現状である。加えて、椎間板変性研究では、椎間板髄核細胞がヒトでは軟骨様細胞である一方、齧歯類では脊索細胞であるという構造的・質的相違があることが齧歯類を使用する椎間板研究の大きな懸案になっている。このギャップを解決するため、霊長類細胞の移植法や霊長類遺伝子を持つトランスジェニックマウス作製法といった技術によって霊長類化キメラマウスの作出が試みられてきたが、現在、iPS 細胞の樹立技術の誕生と胚発生技術を融合させることによる霊長類化臓器を持つキメラマウスの誕生が理論的に可能となったため、本研究では、このキメラマウス作出の先駆的技術を椎間板変性研究に応用することを計画した。またこの研究の知見は、これまでの多くのコンディショナルノックアウト

トによる特異的組織・臓器を欠損させる実験で使用されてきた各種変異マウスと霊長類 iPS 細胞を使用することで、同様に霊長類化臓器保有マウスの作出を可能にする移植臓器作製の基盤ともなりえる可能性を持つと考えた。

2. 研究の目的

これまでの椎間板変性の多くの基礎的知見は、齧歯類を中心とした実験動物モデルの研究より得られているが、霊長類と齧歯類の椎間板髄核の性状に大きな相違が存在する問題がある。この問題の究極の解決策は、ヒト化椎間板を持つ実験動物の樹立である。しかし、ヒト化キメラ動物の作出は現行では強く規制されているため、本研究ではチンパンジー化椎間板を持つ実験動物の樹立を提案する。本研究は、「チンパンジー人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)」と「全脊椎で椎間板髄核を完全に欠損するマウスより樹立した変異 ES 細胞」を使用することで、霊長類化椎間板髄核組織を保有するキメラマウスを樹立し、加齢・荷重負荷・薬剤による椎間板変性モデル作出に供し、変性で発生するイベントを検証し、霊長類化椎間板の有用性を明確にすることである。また、本研究では椎間板髄核・線維輪細胞の判別方法確率、椎間板研究に欠かせない全脊椎の椎間板髄核消失をきたすゲノム領域の同定とその原因メカニズムにも言及したい。

3. 研究の方法

「チンパンジー由来 iPS 細胞を使用したキメラマウスの検討」準備実験として、既にチンパンジー iPS 細胞を申請者のグループで既に樹立した Ptf1a ノックアウトし null タイプとなったホモ接合体受精卵に移植してキメラマウスの作製を行い、Ptf1a-null によって消失する膵臓組織に移植したチンパンジー iPS 細胞が生着し膵臓組織の形成に寄与しているかどうか検討した。

「椎間板マーカー分子の検討」

髄核・線維輪組織に分け、RNA を抽出した。続いて椎間板で発現が報告された Pax1, Skt, T, Cd24, Glut1, Mmp2, Hif1a, Hif1b の発現量を定量 RT-PCR 法で検討した。加えて、SktGtAyu8021IMEG(SktGt)マウスと Pax1tm1Neu (Pax1lacZ)マウスを用い、薬剤誘発性椎間板変性モデル(Chondrotinase ABC[Ch ABC] 0.0005U/disc を 27G 針で注入、4 週後にサンプル採取)と Sd 変異マウスの椎間板組織切片を作製し HE 染色、トルイジンブルー(TB)染色で髄核と線維輪の位置情報・細胞形態・変性度を確認し、Xgal 染色で Skt・Pax1 発現を観察した。

「椎間板消失マウスの検討」

Ptf1a 遺伝子の発現制御領域の変異によって全脊椎の椎間板髄核が消失する。しかし、椎間板髄核を消失させるコアユニットの詳細なゲノム配列は不明のままであり、椎間板髄核を消失させる Ptf1a 遺伝子の発現メカニズムも不明のままである。よって、

Ptf1a 遺伝子の発現制御領域の原因候補領域に対して「ゲノム破壊実験(targeting)」を行い表現型への影響を検討した。また、Ptf1a 発現制御領域の 4 つの候補配列に対して

「CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)-Cas9」システムを利用したゲノム編集によって同領域の CRS に関する critical region を数塩基単位でゲノム編集を行い椎間板髄核を消失の原因コアゲノム配列を同定した。使用する CRISPR-Cas9 は、野生型の dsDNA 切断 Cas9 に加えて、ニック切断タイプの Cas9 変異体(D10A)を使用した予定である。これにより off-target 効果を低下させるだけでなく、ペアでニックを入れゲノム編集の効率を向上させた。

4. 研究成果

① 霊長類化椎間板マウスの作出の試み

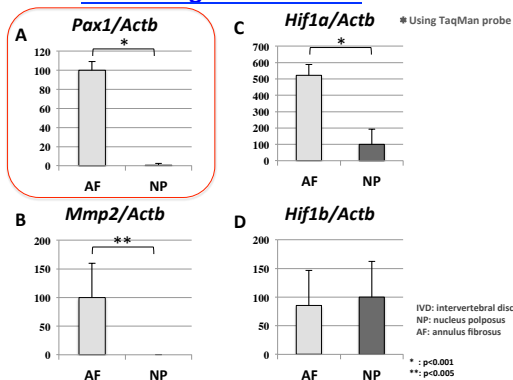
過去の椎間板変性の多くの基礎的知見は、齧歯類を中心とした実験動物モデルの研究より得られているが、霊長類と齧歯類の椎間板髄核の性状に大きな相違が存在する問題がある。この問題の究極の解決策は、霊長類化椎間板を持つ実験動物の樹立である。本研究は、「チンパンジー人工多能性幹細胞 (iPS 細胞)」と「全脊椎で椎間板髄核を完全に欠損するマウスより樹立した変異 ES 細胞」を使用することで、霊長類化椎間板髄核組織を保有するキメラマウスを樹立し、加齢・荷重負荷・薬剤による椎間板変性モデル作出に供し、変性で発生するイベントを検証し、霊長類化椎間板の有用性を検討する計画を立てた。そのため、既に樹立された霊長類 iPS 細胞がマウス生体に生着するかどうかの検討を行った。まず、1 細胞レベルに単離した霊長類細胞をマウス胚盤胞へ移植を試みた。その後、成長させたマウス後期胚に対して単離して移植したドナー細胞の生着の有無の解析を行った。その結果、細胞レベルに分離した霊長類細胞を移植したマウス胚組織内において齧歯類ホストへ霊長類ドナー細胞は全く生着しないことが判った。この現象の理由は、細胞間ネットワークの消失・構築不全だけでなく異種細胞間のクロストーク障害によるものと推測される。つまり、同種細胞間ネットワークが保たれたままでの多細胞集団レベルでの移植の場合、栄養供給に障害さえなければ、組織移植というストレス環境でも隣接細胞とのクロストーク等の情報伝達によって生存率の向上に寄与すると考えられるが、異種細胞集団組織への単離された 1 細胞レベルでの移植になると、異種細胞間のミスマッチ条件下において、周囲の環境に適応するための内分泌型、傍分泌型、自己分泌型、接触型といった情報伝達機構のなかでも細胞の運命や行動が決定される隣接細胞からのシグナル伝達機構の消失が決定的バイアスとなったことが推測された。これを払拭す

るためには、ホスト細胞をドナー細胞と細胞間ネットワークの基礎となる細胞間情報伝達系のクロストークが出来る環境を構築する必要があるだろう。また、霊長類 ES 細胞のナイーブ化による多能性幹細胞としてのキメラ形成能の獲得にも注意を払う必要がある。

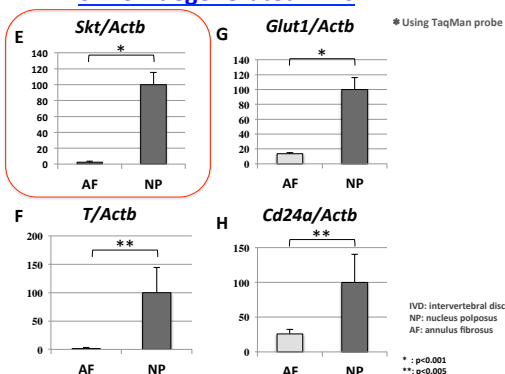
②椎間板マーカー分子の検討

定量 RT-PCR 法、組織学的方法によって髄核・線維輪で *Skt*・*Pax1* が最も特異的発現を示した。加齢・ChABC を注入した椎間板は全て細胞形態、TB 染色で変性所見を認めた。Sd 変異マウスの椎間板では髄核組織が確認できず中心部が線維輪様細胞で占められ TB 染色の増強を認めた。検討した変性・異常椎間板の髄核・線維輪の両方で正常椎間板と同様に *Skt* と *Pax1* は細胞特異的発現を保っていた。*Skt*・*Pax1* は病的条件下でも髄核・線維輪細胞特異的に発現が維持されていた。この結果は各種椎間板病態での髄核・線維輪細胞の識別法確立と椎間板治療のターゲット細胞の同定に貢献できるツールとなる。

Quantitative RT-PCR analyses of non-degenerated IVDs



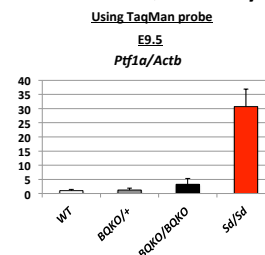
Quantitative RT-PCR analyses of non-degenerated IVDs



③椎間板消失マウスの検討

申請者の研究グループは、自然発生で得られた椎間板髄核消失モデルマウスである Danforth's short tail (Sd) 変異の原因が transposon の挿入変異によって腭臓発生に必須である *Ptf1a* 遺伝子の脊索での異所性発現を原因とした脊索の早期変性であることを発見・報告した (Semba K. PLoS Genet. 9:e1003204.2013.)。Sd 変異の本体である transposon 挿入変異による椎間板髄核消失を起す *Ptf1a* 遺伝子の異所性発現の制御メカニズムを解明するため、Sd 内の「ゲノム変異」と「遺伝子発現制御ゲノム配列」との関係を検討したところ、発生期の Sd 胚内に挿入変異の影響によると考えられる *Ptf1a* 遺伝子のエンハンサー領域がその critical 領域であることを発見した。この領域を含む *Ptf1a* 発現制御領域 (4,375bp) を当研究室で樹立した Sd-胚性幹細胞 (Embryonic Stem cells : ES) において Homologous recombination によって破壊し変異マウスを作成すると、挿入変異が intact に残存しているにもかかわらず *Ptf1a* 発現が 1/10 に著減し椎間板髄核消失の表現型がなくなった。続いて、その critical 領域を CRISPR-Cas9 (nickase) のゲノム編集によって脱メチル化を示した *Ptf1a* の転写制御配列を破壊すると椎間板髄核消失の表現型がマイルド化・発症率の低下を示した。上記先行研究結果は、「*Ptf1a* 近傍の挿入変異が *Ptf1a* 転写制御配列のエンハンサーを通して椎間板髄核消失を発症する」ことを強く示唆した。

Ptf1a expression of Sd-BQKO embryos by Q-RT-PCR

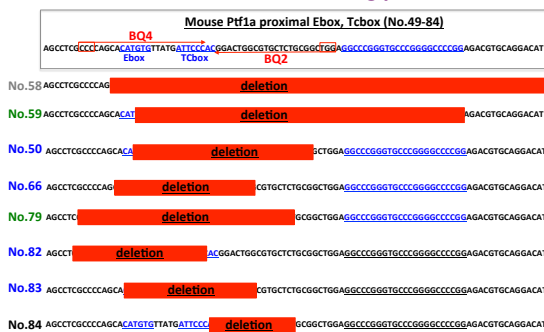


1. In Sd-BQKO embryos, *Ptf1a* expression is increased, compared with WT embryos (1.5-3.8 folds).
2. In E9.5 Sd-BQKO embryos, *Ptf1a* expression is decreased, compared with Sd embryos (0.1 fold).

**Establishment of genome editing mice nickase type
Distal E/TC-box deletion using pX335-BQ7/9**

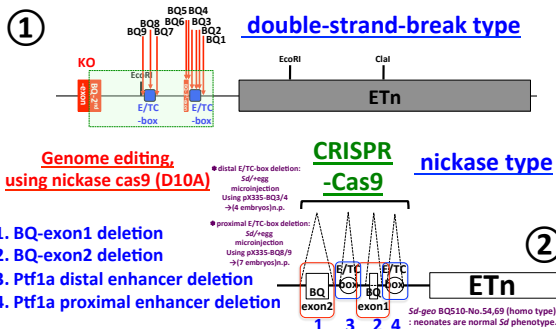


**② Establishment of genome editing mice
Proximal E/TC-box deletion using pX335-BQ2/4**



**Genome editing by CRISPR Cas9 in the BQ locus
to detect the main unit of Sd phenotype.**

Genome editing, using double strand brake type of CRISPR-Cas9



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 3 件)

論文 : Ectopic expression of Ptf1a induces spinal defects, urogenital defects, and anorectal malformations in Danforth's short tail mice.

Semba K., Araki K., Matsumoto K, Suda H, Ando T, et al.

PLoS Genet. 2013;9(2):e1003204. (省略 13 名, 1 番目), (査読有)

論文 : Etiology of caudal regression

syndrome.

Semba K. and Yamamura, K.

Human Genet Embryol. 3(2): 107. 2013. (省略無し, 1 番目), (査読有)

論文 : GNASR201H and KrasG12D cooperate to promote murine pancreatic tumorigenesis recapitulating human intraductal papillary mucinous neoplasm.

Taki K, Ohmuraya M, Tanji E, Komatsu H, Hashimoto D, Semba K., Araki K. et al.

Oncogene. 2015 doi: 10.1038/onc.2015.294. (省略 3 名, 6 番目), (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

仙波 圭、脊索欠損から椎間板変性を引き起こす Ptf1a 異所性発現の機能解析, 第 27 回日本軟骨代謝学会, 2014.2.28.-3.1., 京都府医師会館(京都市)

Kei Semba. Caudal regression in Danforth's short tail is caused by the ectopic expression of Ptf1a induced by the insertion of a transposon., The 27th International Mammalian Genome Conference (IMGC), 2013.9.15-18, Spain, Colegio Fonseca (Salamanca)

Kei Semba. Ectopic expression of Ptf1a induces spinal defects, urogenital defects, and anorectal malformations in Danforth's short tail mice., The 26th annual Mouse Molecular Genetics meeting, 2013.9.18-21, UK, Wellcome Trust Genome Campus (Cambridge)

仙波 圭、尾部退行症候群の疾患モデル動物である Danforth's short tail 変異マウスの解析, 第 60 回日本実験動物学会総会, 2013.5.15, つくば国際会議場(つくば市)

仙波 圭、骨細胞内のオートファジー発生とその病態解析, 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会, 2014.10.9, 城山観光ホテル(鹿児島市)

仙波 圭、椎間板変性モデルマウス

(Danforth's short tail)の発症原因の解明、第
29 回日本整形外科学会基礎学術集会、
2014.10.9、城山観光ホテル(鹿児島市)

仙波 圭、椎間板髄核細胞・線維輪細胞のマ
ーカー分子になり得る Skt・Pax1 の加齢にお
ける発現動態の解析、第 28 回日本軟骨代謝
学会、2015.3.6、東京医科歯科大学鈴木章夫
記念講堂(東京都)

仙波 圭、椎間板線維輪細胞・髄核細胞のマ
ーカー分子になり得る Pax1・Skt の変性椎間
板・発生異常椎間板における発現動態の解析、
第 30 回日本整形外科学会基礎学術集会、
2015.10.22、富山国際会議場(富山市)

仙波 圭、発生期の脊索・中腎・総排泄腔で
の Ptf1a 異所性発現が尾部退行症候群を発症
させる、第 31 回日本糖尿病・妊娠学会、
2015.11.21、リーガロイヤルホテル東京(東京
都)

(ホームページ)

熊本大学生命資源研究・支援センター・疾患
モデル分野・Sd and Skt グループ

<http://irda-genetics.kuma-u.jp/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

仙波 圭 (SEMBA KEI)

熊本大学生命資源研究・支援センター・疾
患モデル分野・助教

研究者番号：00398190

(2)連携研究者

荒木 喜美 (ARAKI KIMI)

熊本大学生命資源研究・支援センター・疾
患モデル分野・教授

研究者番号：90211705