岐阜大学機関リポジトリ
Gifu University Institutional Repository

Generation of Pmel-dependent conditional and inducible Cre-driver mouse line for melanocytic-targeted gene manipulation

メタデータ	言語: English
	出版者:
	公開日: 2023-02-14
	キーワード (Ja):
	キーワード (En):
	作成者: Morsheda Nasrin
	メールアドレス:
	所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/89796

氏名（本籍）	Morsheda Nasrin　　（バングラディシュ）
学位の種類	博　士（再生医科学）
学位授与番号	甲第1217号
学位授与日付	令和5年1月18日
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Generation of *Pmel*-dependent conditional and inducible Cre-driver mouse line for melanocytic-targeted gene manipulation
審査委員	（主査）教授　坂口　裕和
	（副査）教授　岩田　浩明　　教授　長岡　仁

論文内容の要旨

【緒言】

再生医療は，生体外で培養・増殖させた幹細胞を移植することにより，機能不全に陥った臓器や組織について機能的に再生させることを目指す医療である。再生医療を安全かつ確実に実現化するためには，まず，組織の幹細胞の分子的制御機序を十分に理解することが重要であり，得られた知見に基づいて幹細胞の制御機序を成体外で模倣した培養系を構築することが必要となる。幹細胞制御の分子的機序を解明するためには，組織特異的に Cre 組換え酵素を発現するマウス(Cre ドライバーマウス)を用いて幹細胞制御への関与が期待される候補遺伝子をノックアウトしたマウスを順次作製し，それらの中から幹細胞の異常によってもたらされる表現型を呈するものを検索することが最も有効な手段である。

色素細胞はメラニン色素を周囲の細胞に供給することによって皮膚や体毛に色を付与する役割を果たしている。毛包には色素細胞の幹細胞が存在し，色素細胞の幹細胞の制御機構が破綻したマウスは毛周期の進展に伴って体毛が白髪化するという特徴的な表現型を示す。このような特性を活用し，色素細胞特異的な遺伝子ノックアウトマウスを作製し，白髪化の表現型を示すものをスクリーニングすることによって幹細胞制御に関わる遺伝子を同定しようとする試みが進められている。しかし，既存の色素細胞特異的な Cre ドライバーマウスの組換え効率は不十分であり，より効率的な新たな Cre ドライバーマウスを構築することが望まれている。そこで，本研究では新たに色素細胞特異的な Cre ドライバーマウスを作製し，その有用性を評価した。

【対象と方法】

1) 本研究では，色素細胞特異的かつ Doxycycline (Dox) 誘導的に Cre 組換え酵素を発現するノックインマウスを作製した。このために，色素細胞特異的に発現する *Pmel* 遺伝子の Exon 11 の終止コドンを含む遺伝子座に *P2A-TetON3G-TRE3G-iCre* カセットをノックインした ES 細胞を作製した。正確にノックインされた ES 細胞では，*Pmel* 遺伝子の終止コドンが *P2A-TetON3G-TRE3G-iCre* カセットによって置換されるために，P2A ペプチド配列の作用によって PMEL タンパク質と TetON3G タンパク質が同時に発現するようになる。また，Dox 存在下では，TetON3G タンパク質が *TRE3G* プロモーターに結合することによって Dox 誘導性に Cre 組換え酵素が発現するようになる。ノックインされた ES 細胞を用いてノックインマウスを取得した。以下，このノックインマウスを $Pmel^{P2A\text{-}TetON3G\text{-}TRE3G\text{-}iCre}$ マウスとする。
2) $Pmel^{P2A\text{-}TetON3G\text{-}TRE3G\text{-}iCre}$ マウスの Cre/loxP 組換え効率と特異性を調べるために，このマウスと Cre レポーターマウス($Rosa^{Ai9}$ マウス：Cre/loxP 組換えによって tdTomato 赤色蛍光タンパク質が発現するマウス)とを交配させ，$Pmel^{P2A\text{-}TetON3G\text{-}TRE3G\text{-}iCre}$；$Rosa^{Ai9}$ マウスを得た。

3) *Pmel*$^{P2A\text{-}TetON3G\text{-}TRE3G\text{-}iCre}$; *Rosa*^{Ai9}妊娠マウスに対し，胎生 10.5-12.5 日の間 Dox を飲水投与した。胎生 15.5 日目の胎児を回収し，CUBIC 法によって胎児を透明化し，tdTomato レポーターの発現パターンを観察した。また，Whole Mount 免疫染色法によって，皮膚における tdTomato レポーターの発現の特異性を解析した。さらに，皮膚の単細胞懸濁液をフローサイトメーターによって解析し，Cre 組換えの効率と特異性を算定した。

4) 色素幹細胞における Cre 組換え効率を調べるために，8 週齢の *Pmel*$^{P2A\text{-}TetON3G\text{-}TRE3G\text{-}iCre}$; *Rosa*^{Ai9}マウスに対し Dox の飲水投与を行った。その後，皮膚を採取し，免疫組織染色法によって色素幹細胞における Cre 組換え効率を調べた。

5) *Pmel*$^{P2A\text{-}TetON3G\text{-}TRE3G\text{-}iCre}$マウスの有用性を確かめるために，本マウスを用いて Notch シグナルを色素細胞特異的にノックアウトしたマウスを作製した。このために，*Pmel*$^{P2A\text{-}TetON3G\text{-}TRE3G\text{-}iCre}$ マウスと *Rbpj*^{Flox}マウスを交配させ，*Pmel*$^{P2A\text{-}TetON3G\text{-}TRE3G\text{-}iCre}$; *Rbpj* $^{Flox/Flox}$マウスを得た。得られたマウスに対し Dox を飲水投与することによって *Rbpj* 遺伝子をノックアウトした後，*Rbpj* 遺伝子のノックアウトが色素細胞に及ぼす影響について体毛色変化を指標にして評価した。同時に，免疫組織染色法によって色素幹細胞に対する *Rbpj* 遺伝子のノックアウトの影響を解析した。

【結果】

透明化した *Pmel*$^{P2A\text{-}TetON3G\text{-}TRE3G\text{-}iCre}$; *Rosa*^{Ai9}胎児を光学セクショニング蛍光顕微鏡によって観察したところ，色素細胞特異的に tdTomato レポーターが発現していることが確認された。また，フローサイトメーターによる解析によって，胎児の色素細胞における Cre 組換え効率が 91%以上であり，かつ 89%以上の特異性をもって色素細胞特異的に Cre 組換えが誘導されることが示された。同様に，成体の *Pmel*$^{P2A\text{-}TetON3G\text{-}TRE3G\text{-}iCre}$; *Rosa*^{Ai9}マウスにおいても高効率に色素幹細胞特異的な Cre 組換えが起こることが確認された。実際に，*Pmel*$^{P2A\text{-}TetON3G\text{-}TRE3G\text{-}iCre}$マウスを用いて *Rbpj* 遺伝子のノックアウトを誘導したところ，ほぼ全てのマウスの体毛が白髪化することを認めた。この結果より，色素細胞特異的な遺伝子ノックアウトを誘導する上で，本マウスが高い有用性を有することを確認することができた。

【考察】

本研究で作製した Cre ドライバーマウスは，色素細胞系譜の細胞に対して，高い特異性と高効率な Cre/loxP 組換えを誘導することができる。このような特性をもつマウスを作製することができた理由として，Dox 誘導性に Cre を発現するコンストラクトを活用したことと，Cre 発現コンストラクトを色素細胞特異的に発現する *Pmel* 遺伝子座にノックインしたことが有効に作用した可能性が考えられる。本マウスは既存の Cre ドライバーマウスの問題点を大幅に改善することができることから，色素細胞の幹細胞の研究の有用なツールとなることが期待される。

【結論】

本研究によって，新規な色素細胞特異的な Cre ドライバーマウスを作製することができた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者　Morsheda Nasrin は，新たな色素細胞特異的 Cre ドライバーマウスを作製し，その高い効率性と有用性を示した。本研究結果は，色素細胞関連疾患の病態解明につながる重要な成果であり，皮膚科学の進歩に少なからず寄与するものと認める。

［主論文公表誌］

Morsheda Nasrin, Osama Ahmed, Xujun Han, Md Nojebuzzaman, Ahmed I. Abo-Ahmed, Shigenobu Yazawa, Masatake Osawa : Generation of *Pmel*-dependent conditional and inducible Cre-driver mouse line for melanocytic-targeted gene manipulation., Pigment Cell & Melanoma Research, doi:10.1111/pcmr.13074 (2022).