

厚生科学研究研究費補助金  
長寿科学総合研究事業

アグリカン遺伝子ノックインマウスの  
作製による軟骨破壊機序の解析

平成 12 年度 総括研究報告書

主任研究者 渡 辺 秀 人

平成 13 (2001) 年 3 月

## 目次

### I. 総括研究報告書

アグリカン遺伝子ノックインマウスの作製による軟骨破壊機序の解析 1

厚生科学研究費補助金 (長寿科学総合研究事業)  
総括研究報告書

アグリカン遺伝子ノックインマウスの作製による軟骨破壊機序の解析

渡辺秀人 (愛知医科大学分子医科学研究所助教授)

「軟骨破壊の決め手となるアグリカン IGD ドメインの分解機序を、最先端の遺伝子操作技術の駆使により同ドメインを人為的に変化させたノックインマウスモデルを用いて解明すること」を目的として、本年度はまず、ターゲティングベクターの作製、相同組み替え ES 細胞クローンの樹立、および同細胞を用いたキメラマウスの作製を行った。

分担研究者

木全弘治  
(愛知医科大学分子医科学研究所)

A. 研究目的

本研究の目的は、「軟骨破壊の決め手となるアグリカン IGD ドメインの分解機序を、最先端の遺伝子操作技術の駆使により同ドメインを人為的に変化させたノックインマウスモデルを用いて解明すること」である。

慢性関節リウマチ、変形性膝関節症等の進行性関節破壊疾患に於ける最も重要な問題は関節軟骨の破壊に伴う運動機能の低下である。軟骨組織の主成分であるプロテオグリカン会合体は、水分を貯溜し硝子様形態と弾力性を軟骨に与えている。この会合体は、アグリカンのアミノ側球状ドメイン (G1) でヒアルロン酸とリンク蛋白の両者と結合し、これら三者の結合によって会合体が安定化する (図 1)。会合体の保水作用に基づく軟骨の耐久性は、アグリカンの有

する多数のコンドロイチン硫酸鎖によるものであるが、G1 ドメインに隣接する IGD ドメインの切断によって会合体の構造は破壊され、その機能は失われる。関節破壊は、蛋白分解酵素の IGD ドメイン切断による会合体構造の破壊によって進むと考えられる (図 2)。

種々の蛋白分解酵素によるアグリカンの分解に関する研究はもっぱら生化学的手法によるものであった。今後、関節破壊の機序を解明するためには、生体内という統合的微小環境下における各分子の機能を解析していかなければならない。従って、最先端の遺伝子操作技術を駆使したマウスモデルを用いた解析が不可欠である。

B. 研究方法

ノックインコンストラクトから相同組換えまでの行程の概略を図 3 に示す。

ノックインコンストラクトの作製：IGD の蛋白分解酵素による切断部位

を含む部分（IGD の前半三分の一）を欠損させたノックインコンストラクトを、すでに得られているゲノムクローンを用いて作製した。

ノックインマウスの作製：上記のコンストラクトとマウス ES 細胞を用いて、ノックイン allele を有する ES 細胞株を得、胚盤胞導入法により、キメラマウスを作製した。

（倫理面への配慮）

動物愛護の観点から定められている愛知医科大学動物実験センターの「動物実験のガイドライン」に則って当該研究を行った。

### C. 研究結果

まず、129 系マウス由来アグリカンゲノム DNA を用いて遺伝子置換のためのノックインコンストラクトの作製を以下の手順で行った。ゲノム DNA ライブラリーより単離したアグリカン遺伝子の約 8kb のゲノム DNA を用いて、IGD ドメインのプロテアーゼ標的部位に対応するエクソン 7 内の 12 bp を PCR 法に基づく site-directed mutagenesis 法により欠損させ、さらに遺伝子導入クローン選択目的で loxP 配列によって挟まれたネオマイシン耐性遺伝子をイントロン 7 に挿入して、コンストラクトを作製した。

次に、遺伝子を導入した ES 細胞の中で、相同組換えを起こした細胞を簡便に検出するための PCR の条件検討を行った。相同組換え部分の外側の部分を含むポジティブコントロールベクターをゲノム内に有するマウス腫瘍細胞株を Stable Transfection 法により得た。次に、ネオマイシン耐性遺伝子内、および相同組み替え部分の外側にそれぞれプライマーを設定し、上記細胞株より得たゲノム

DNA をテンプレートとして、PCR の条件検討をおこなった。確立された条件による PCR 法は ES 細胞のスクリーニングの際にも有効であることを確かめた。

次に、ES 細胞を用いて遺伝子ターゲティングを行う準備段階として ES 細胞培養用のフィーダー細胞を調製したのち、エレクトロポレーション法によるターゲティングベクターの導入と相同組換え ES 細胞株の単離を以下の手順で行った。制限酵素処理にて直線化したノックインコンストラクトをエレクトロポレーション法によって ES 細胞に導入し、翌日から約 6 日間の G418 処理によるスクリーニングを行い、280 個の遺伝子導入細胞株を単離した。これらの細胞株より調製したゲノム DNA を用いて、上記の PCR 法にて相同組換えを有する ES 細胞クローン 4 個を得た。さらに、挿入 DNA の外側のプローブを用いたサザン・ハイブリダイゼーションによって、相同組換えを確認した。

これら 4 種のクローンを用いて胚盤胞導入法によるキメラマウスの作製を日本エスエルシー株式会社に委託し、キメラマウス雄一匹が得られた。

### D. 考察

ターゲティングベクターの作製からキメラマウスの作製まで、一連の行程はすべて滞りなく達成することができた。特に PCR 法による相同組換えクロンの同定技術により、スクリーニングの時間とサザン・ハイブリダイゼーションの手間を大幅に短縮することができ、極めて有効な

手法であることが確認された。

#### E. 結論

3年間の事業として立案された本研究の初年度では、ノックインコンストラクトの作製と相同組換え ES 細胞株の樹立、さらに同 ES 細胞株を用い

たキメラマウスの作製を目的とした。一連の行程はすべて滞りなくほぼ予定通り終了した。作製されたマウスを用いた今後の研究によって、軟骨破壊機序が解明されるものと期待される。

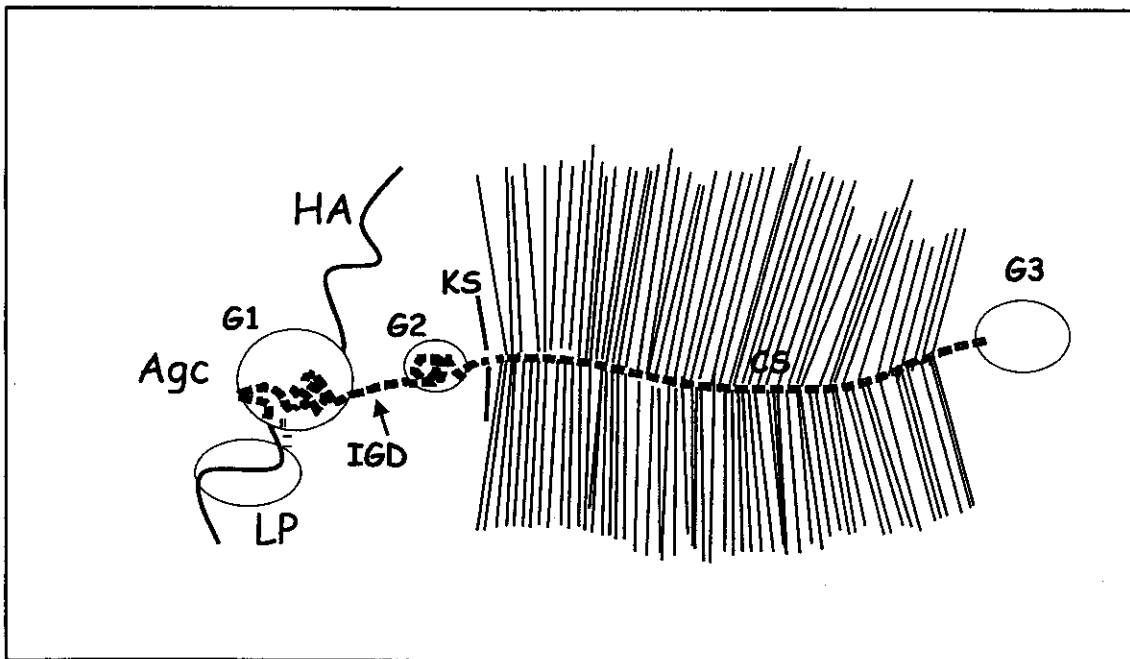


図1. プロテオグリカン会合体の模式図。プロテオグリカン会合体はアグリカン (Agc)、リンク蛋白 (LP)、ヒアルロン酸 (HA) の三者から構成されている。アグリカンのコア蛋白は、G1, IGD, G2, KS, CS, G3等のドメインから成る。アグリカンはG1ドメインでリンク蛋白、ヒアルロン酸と結合している。CSドメインに付加する多数のコンドロイチン硫酸鎖は保水作用を通じて軟骨特有の硝子様形態と弾力性を与えている。

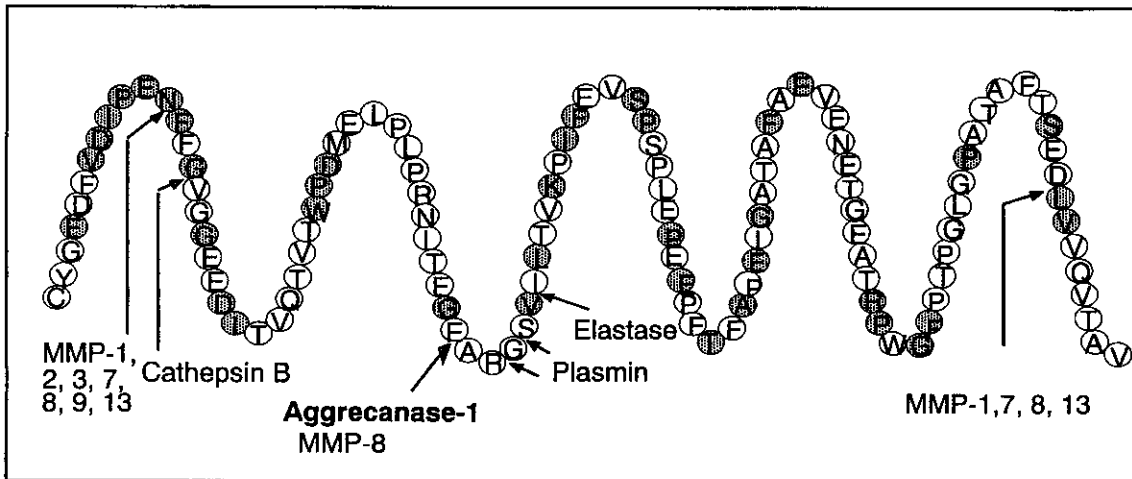


図 2. Interglobular domain (IGD)のアミノ酸配列と各蛋白分解酵素による切断部位。アグリカンコア蛋白はマトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) 群とアグリカナーゼ-1によって分解される。IGD 内の各プロテイナーゼによる切断部位を示す。

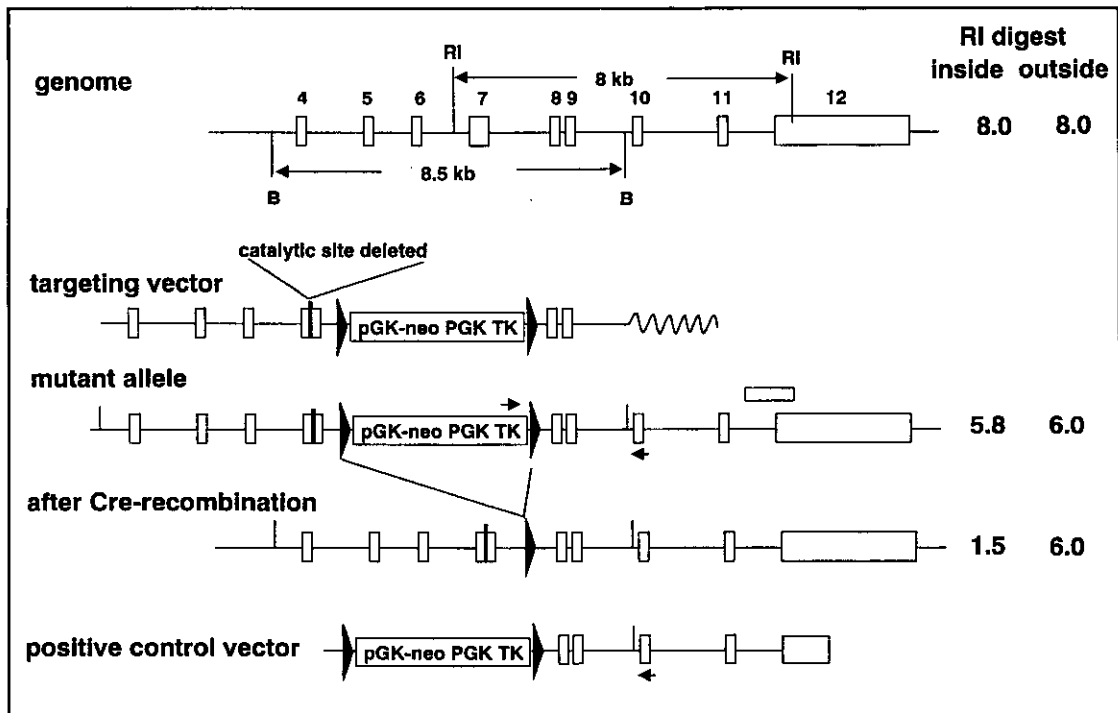


図3. ノックインマウス作製の行程。アグリカン遺伝子は 18 個のエクソンを含む。IGD はエクソン7によってコードされている (genome)。図2のアグリカナーゼ-1の切断部位の前後各2アミノ酸残基を除去する変異をゲノムDNAのエクソン7に作製し、イントロン7にLoxPによって挟まれたpGK-neo-pGK-TKフラグメントを挿入したターゲティングベクターを作製した。ターゲティングベクターの長腕、短腕の長さはそれぞれ6、および2 kbである (targeting vector)。相同組換えが生じたアリルでは図の mutant allele の如く遺伝子に変異が導入される。相同組換えをおこしたES細胞クローンにCreリコンビナーゼをトランスフェクトさせるか、あるいはこの mutant allele を有するマウスにCreリコンビナーゼを発現するマウスを交配させることによって、pGK-neo-pGK-TKフラグメントのない mutant allele が得られる。本研究では、後者の方法でノックインマウスを作製する。相同組換えのスクリーニングのPCRの条件検討に用いた positive control vector の構造を最下段に示す。