

200/00253 A

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 13 年度 総括研究報告書

主任研究者 渡 辺 秀 人

平成 14 (2002) 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、初年度(平成 12 年度)は、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。本年度(平成 13 年度)は引き続き、キメラマウスの生殖細胞への導入 (germ line transmission) を試みた

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)。慢性関節リウマチや変形性膝関節症患者の関節液中のアグリカン分解産物の解析から、IGD 内の前半約三分の一の EGE | ARG の部位を切断する酵素の存在が提唱されていたが、近年、その酵素が A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motif, ADAMTS - 4、別名アグリカナーゼ 1 としてクローニングされた。その後の生化学的研究により、同酵素がアグリカン IGD の特異的部位の他に、その C-末端側のコンドロイチン硫酸付加ドメインの 4 カ所で切断することが明らかとなった。しかし、アグリカンの主たる機能は IGD より C-末端側の CS

ドメインに存在するので、IGD 内の特異的部位の切断がアグリカン分解の最も重要なプロセスと考えられる。そこで私は、IGD 内のアグリカナーゼ切断部位を除去したアグリカンを産生するマウスをノックインの技法を用いて作製し、生体内における、同酵素のアグリカン代謝、および軟骨破壊性疾患における役割を明らかにする研究を立案した。

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と考えている。

B. 研究方法

初年度（平成 12 年度）はノックインコンストラクトの作製、ES 細胞への同コンストラクトの導入、相同組換えを有する ES 細胞株のスクリーニング、さらにはキメラマウスの作製までを行った（図 3）。本年度（平成 13 年度）は引き続きキメラマウスの作製と生殖細胞系列への伝搬（germ line transmission）をめざした。初年度に得られた相同組換えを有する ES 細胞クローン 4 種、IGDKI-14、IGDKI-78、IGDKI-106、IGDKI-189) のうち IGDKI-14 と IGDKI-78 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た。

（倫理面への配慮）

当研究施設においては、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。また、委託先の日本エスエルシー株式会社は動物愛護に関する独自のガイドラインに従って実験を行っている。

C. 研究結果

委託先の日本エスエルシーでは、まず IGDKI-14 を胚盤胞に導入しキメラマウスを作製したところ、キメラ率 70%>>50%のキメラマウスが 2 匹得られた。これらのキメラマウスを C57Bl/6Cr 雌マウスと各々計 18 回と 10 回、交配したが、germ line transmission は得られなかった（表 1）。並行して IGDKI-78 の胚盤胞導入よりキメラマウスを作製したところ、キメラ率 100%>>70%のキメラマウスが 3 匹、70%>>50%のキメラマウスが 1 匹得られた。これらを同様に C57Bl/6Cr と交配したが、現在まで germ line transmission は確認されていない（表 2）。委託先の日本エスエルシーでは、動物センター内に感染が検出され、除感染に相当の労力を費やしており、胚盤胞導入の追加依頼が難しい状況にある。そこで、オリエンタル酵母株式会社に胚盤胞導入によるキメラマウスの作製を委託することにした。再び、上記の 4 クローンを再解凍し、細胞の状態を形態学的に確認し、日本エスエルシーにて高いキメラ率のマウスが得られた IGDKI-78 と細胞の状態が最も良好と思われる IGDKI-189 の胚盤胞導入を依頼中である。

さらに、使用している ES クローンでは germ line transmission が得られない場合を想定して、再度、ターゲットベクターの ES 細胞への導入による相同組換え ES クローンの樹立を行っている。

D. 考察

本年度は、初年度に引き続きキメラマウスの作製を行い、germ line transmissionを試みたが、100%以上のキメラ率を有するマウスが3匹得られたにもかかわらず、germ line transmissionは確認されていない。委託先の日本エスエルシーでは、感染が確認されており、当該のキメラマウスも感染の可能性を否定できない。このような予期せぬ事態に対処すべく、現在、オリエンタル酵母株式会社に胚盤胞導入を依頼中である。支障なく進めば本年9月頃にはgerm line transmissionが得られるものと期待している。研究計画は著しい遅延を余儀なくされたが、germ line transmissionが速やかに得られれば、以降の行程は滞りなく進めることができるものと期待している。

E. 結論

3年間の事業として立案された本研究の二年目にあたる平成13年度では、キメラマウスの作製と相同組み換え遺伝子の生殖細胞系列への伝搬(germ line transmission)をめざした。キメラ率70%以上のマウスが3匹得られたにもかかわらず、germ line transmissionは得られなかった。現在、別の委託先に胚盤胞導入を依頼中である。研究計画は著しい遅延を余儀なくされたが、germ line transmissionが速やかに得られれば、以降の行程は滞りなく進めることができるものと期待している。作製されたノックイン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。

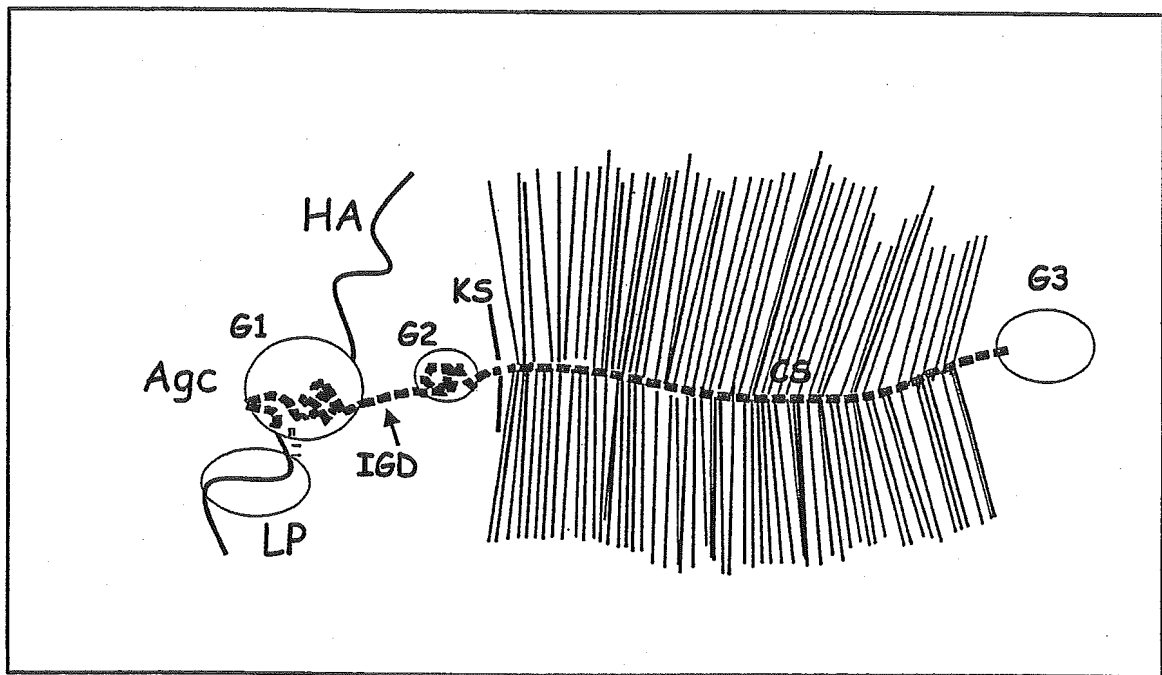


図1. プロテオグリカン会合体の模式図。 プロテオグリカン会合体はアグリカン (Agc)、リンク蛋白 (LP)、ヒアルロン酸 (HA) の三者から構成されている。アグリカンのコア蛋白は、G1, IGD, G2, KS, CS, G3等のドメインから成る。アグリカンはG1ドメインでリンク蛋白、ヒアルロン酸と結合している。CSドメインに付加する多数のコンドロイチン硫酸鎖は保水作用を通じて軟骨特有の硝子様形態と弾力性を与えている。

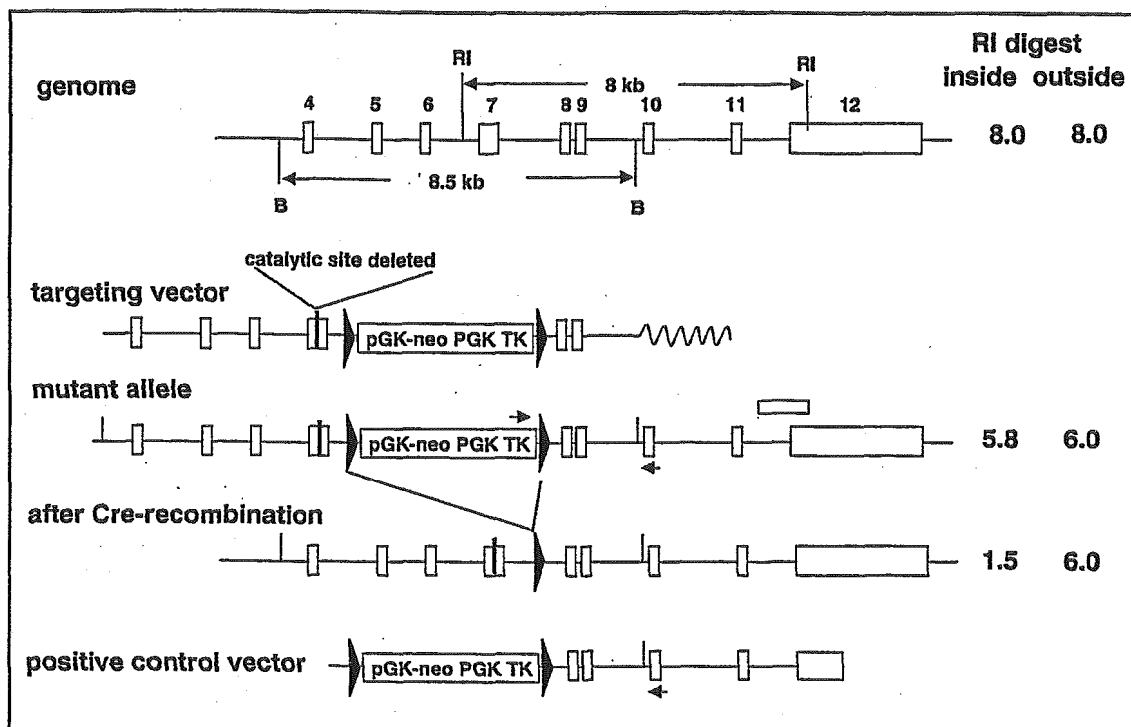


図3. ノックインマウス作製の行程。アグリカン遺伝子は18個のエクソンを含む。IGDはエクソン7によってコードされている (genome)。図2のアグリカナーゼ-1の切断部位の前後各2アミノ酸残基を除去する変異をゲノムDNAのエクソン7に作製し、イントロン7にLoxPによって挟まれたpGK-neo-pGK-TKフラグメントを挿入したターゲティングベクターを作製した。ターゲティングベクターの長腕、短腕の長さはそれぞれ6、および2 kbである (targeting vector)。相同組換えが生じたアレルでは図の mutant allele の如く遺伝子に変異が導入される。相同組換えをおこしたES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。

表 1. IGDKI-14 を用いたキメラマウスの作製と同マウスの交配

IGDKI-1 #14【標記No.00010K(1)】										
Male	x	Female		Mated	Delivered	No.	Agouti	Male	Female	
F1-1(70>>50%) 010218Birth	C57BL/6Cr		1st(A)	010406	010504	8	-	-	-	
			2nd(B)	010406	010509	9	-	-	-	
			3rd(C)	010427	010521	5	-	-	-	
			4th(D)	010427		9	-	-	-	
			5th(E)	010529	010623	7	-	-	-	
			6th(F)	010529	-	-	-	-	-	不妊
			7th(G)	010704	010727	12	-	-	-	
			8th(H)	010704	010820	5	-	-	-	
			9th(I)	010704	010910	9	-	-	-	
			10th(J)	Iの雄いかけ交配	011004	3	-	-	-	
			11th(K)	010815	011210	6	-	-	-	
			12th(L)	010815	011130	8	-	-	-	
			13th(M)	Jの雄いかけ交配	-	-	-	-	-	不妊
			14th(N)	Kの雄いかけ交配	020107	10	-	-	-	
			15th(O)	020108	020222	7	-	-	-	
			16th(P)	020108	020308	10	-	-	-	
			17th(Q)	020131						
			18th(R)	Nの雄いかけ交配	020204	3	-	-	-	
C57BL/6Cr	F1-2(70>>50%) 010218Birth		1st(A)	010406	010426	9	-	-	-	
			2nd(B)		010601	11	-	-	-	
			3rd(C)		010625	12	-	-	-	
			4th(D)		010717	7	-	-	-	
			5th(E)		010808	12	-	-	-	
			6th(F)		010924	1	-	-	-	
			7th(G)	011015	011027	7	-	-	-	
			8th(H)		011204	3	-	-	-	
			9th(I)		020115	4	-	-	-	
			10th(J)		020207	3	-	-	-	

表2. IGDKI-78 を用いたキメラマウスの作製と同マウスの交配

IGDKI-1 #78【課題No.00010K(3)】									
Male	×	Female		Mated	Delivered	No.	Agouti	Male	Female
R01-1			1st(A)	011009	011029	7	-	-	-
(100>>70%)		C57BL/6J	2nd(B)	011009	011115	8	-	-	-
010820Birth			3rd(C)	011009	011115	8	-	-	-
			4th(D)	011108	011203	7	-	-	-
			5th(E)	011126	011231	10	-	-	-
			6th(F)	011126	020103	10	-	-	-
			7th(G)	Fの追いかけて交配	020131	8	-	-	-
			8th(H)	020117	020220	11	-	-	-
			9th(I)	020218	020313	6	-	-	-
R01-2			1st(A)	011009					
(100>>70%)		C57BL/6J	2nd(B)	011009					
010820Birth			3rd(C)	011009					
R02-1			1st(A)	011009					
(100>>70%)		C57BL/6J	2nd(B)	011009					
010820Birth			3rd(C)	011009					
R04-1			1st(A)	011017					
(70>>50%)		C57BL/6J	2nd(B)	011017					
010820Birth			3rd(C)	011017					

未交配キメラ

R01-3

(30%)

010820Birth

R01-4

(50>>30%)

010820Birth

R03-1

(30%)

010820Birth