

A gene expression atlas of the central nervous system based on bacterial artificial chromosomes

Shiaoching Gong¹, Chen Zheng¹, Martin L. Doughty¹, Kasia Losos¹, Nicholas Didkovsky², Uta B. Schambra⁴, Norma J. Nowak⁵, Alexandra Joyner⁶, Gabrielle Leblanc⁷, Mary E. Hatten² & Nathaniel Heintz²

¹GENSAT Project, ²Laboratory of Developmental Neurobiology and ³Laboratory of Molecular Biology, Howard Hughes Medical Institute, The Rockefeller University, 1230 York Avenue, Box 260, New York 10021, USA

⁴Department of Anatomy and Cell Biology, East Tennessee State University, Tennessee 37614, USA

⁵Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, New York 14263, USA

⁶Developmental Genetics Program, Skirball Institute of Biomolecular Medicine, Department of Cell Biology, New York University School of Medicine and Howard Hughes Medical Institute, New York 10016, USA

⁷National Institute of Neurological Disorders and Stroke, NIH, Bethesda, Maryland 20892, USA

The mammalian central nervous system (CNS) contains a remarkable array of neural cells, each with a complex pattern of connections that together generate perceptions and higher brain functions. Here we describe a large-scale screen to create an atlas of CNS gene expression at the cellular level, and to provide a library of verified bacterial artificial chromosome (BAC) vectors and transgenic mouse lines that offer experimental access to CNS regions, cell classes and pathways. We illustrate the use of this atlas to derive novel insights into gene function in neural cells, and into principal steps of CNS development. The atlas, library of BAC vectors and BAC transgenic mice generated in this screen provide a rich resource that allows a broad array of investigations not previously available to the neuroscience community.

Nature (2003) 425 917-925

Cited 462 times

GENSAT Daily Showcase for Sat, Jul 23, 2011

The GENSAT Project at The Rockefeller University

GENSAT is an NIH-funded, publicly available gene expression atlas of the developing and adult central nervous system in the mouse. The project also generates transgenic BAC-EGFP reporter and BAC-Cre recombinase driver mouse lines, which are available as research resources to the scientific community.

Enter GENSAT (Gene Expression Nervous System Atlas)

Principle Investigator: Nathaniel Heintz

Project Officer: Laura Mamounas

Supported by: National Institute of Neurological Disorders and Stroke, contract # NO1-NS-7-2370

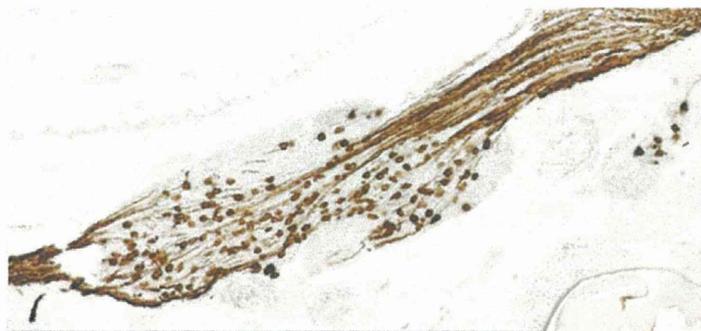
BAC Modification Core
Shiaoching Gong
Sanjay Mehta
Sri Ramulu Pulligara
Lain Rajeev-Beddybattula
Cuidong Wang

BAC Transgenic Core
Huifen Feng
Jesse Llerena
Kim Schwabe
Lanzhen Yan

Histology Core
Terence Duarte
Ana Milosevic
Paul Dyer
Christine Grevstad
Nadiya Kryachko
Christine Lai
Ming Petry
Yu Wei

Annotation Core
Chen Zheng
Laura Kus
Ana Milosevic

Bioinformatics Core
Nick Didkovsky



WWW.GENSAT.ORG

ER α 遺伝子に融合させることにより、
ER α 遺伝子を発現しているニューロンの投射を
明らかにする

Cells of embryonic mouse brain (right) can be tagged by replacing the coding region of a native gene (*TrkC*, in this example) with that of the EGFP 'reporter'. Immunohistochemical detection of EGFP, magnified in the image above, reveals that *TrkC* is normally expressed in nerves that carry sensory information from the face to the brain. The technique allows the nerve-cell projections as well as the cell bodies (small round dots) to be traced.

研究の流れ

1. ER α 遺伝子を含むBACクローンの選択と取得
2. BACクローンにレポーター遺伝子を挿入
3. トランスジェニックマウスの作製
4. レポーター遺伝子の発現の確認
- TGラインの選択
5. 胎児期のBPAおよびエストロゲン曝露
6. 曝露マウスにおけるレポーター遺伝子の発現の確認

ER α ノックアウトマウスの利用

EREレポーターマウスの利用

トランスジーンおよび本来の遺伝子の制御領域の修飾

関連遺伝子のBAC-レポーターTGマウスの構築など

研究の流れ

1. ER α 遺伝子を含むBACクローンの選択と取得
2. BACクローンにレポーター遺伝子を挿入
3. トランスジェニックマウスの作製
4. レポーター遺伝子の発現の確認
 - TGラインの選択
5. 胎児期のBPAおよびエストロゲン曝露
6. 曝露マウスにおけるレポーター遺伝子の発現の確認

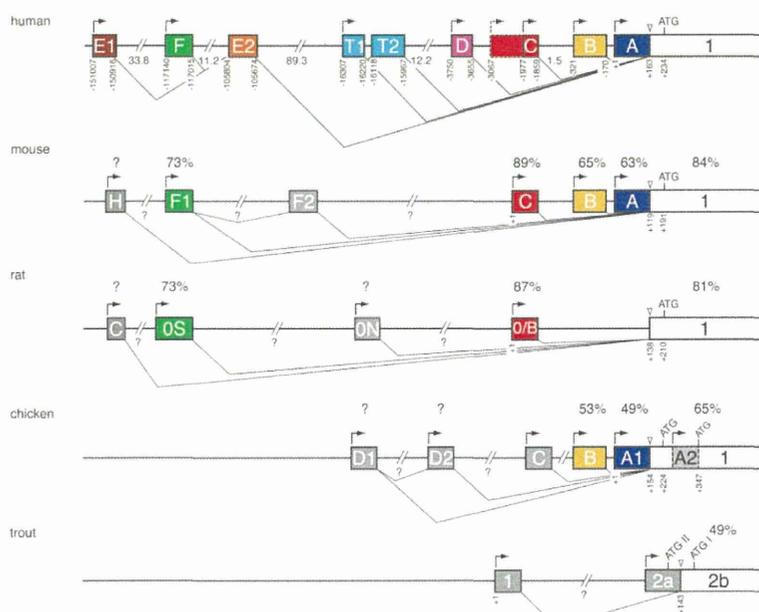
ER α ノックアウトマウスの利用

EREレポーターマウスの利用

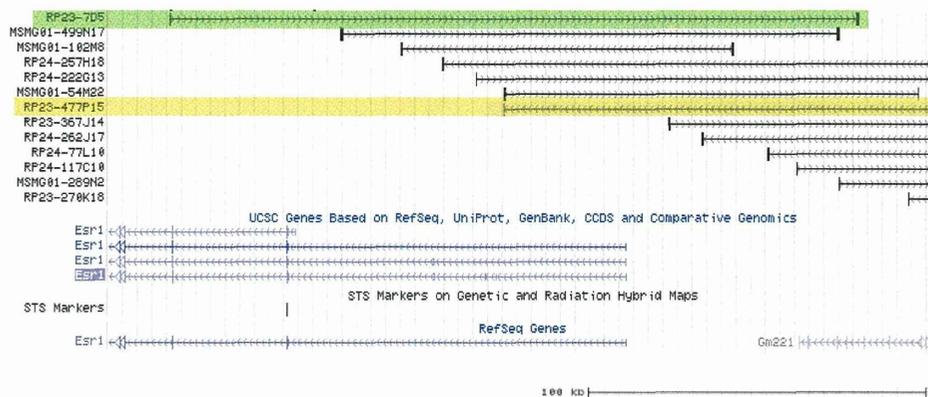
トランスジーンおよび本来の遺伝子の制御領域の修飾

関連遺伝子のBAC-レポーター-TGマウスの構築など

エストロゲン受容体プロモーター領域の比較



BAC clone selection



RP23-7D5 and RP23-477P15

研究の流れ

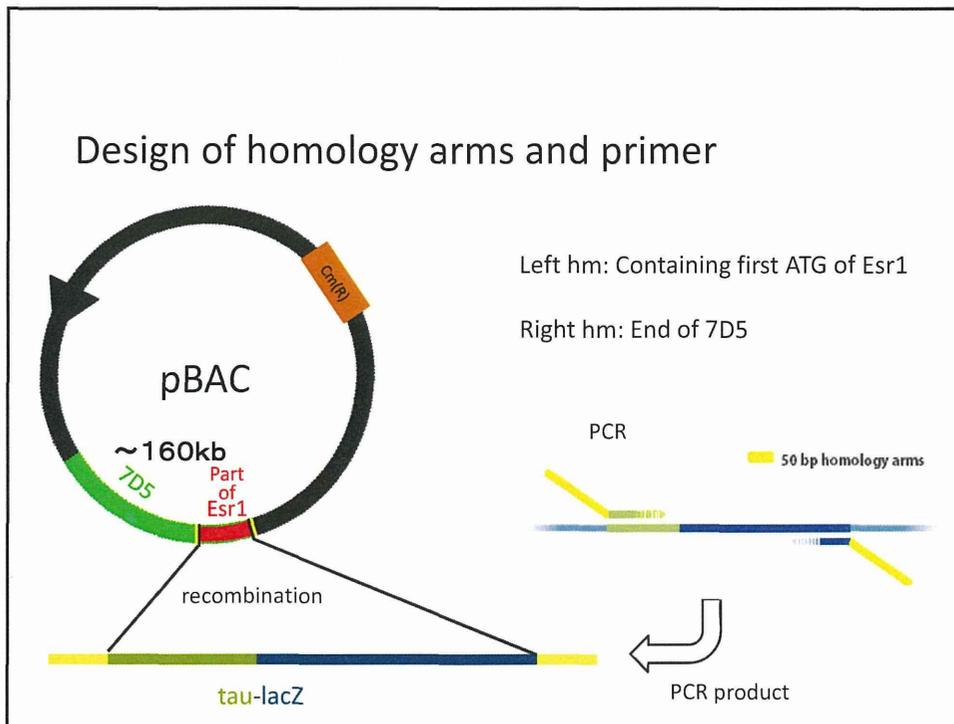
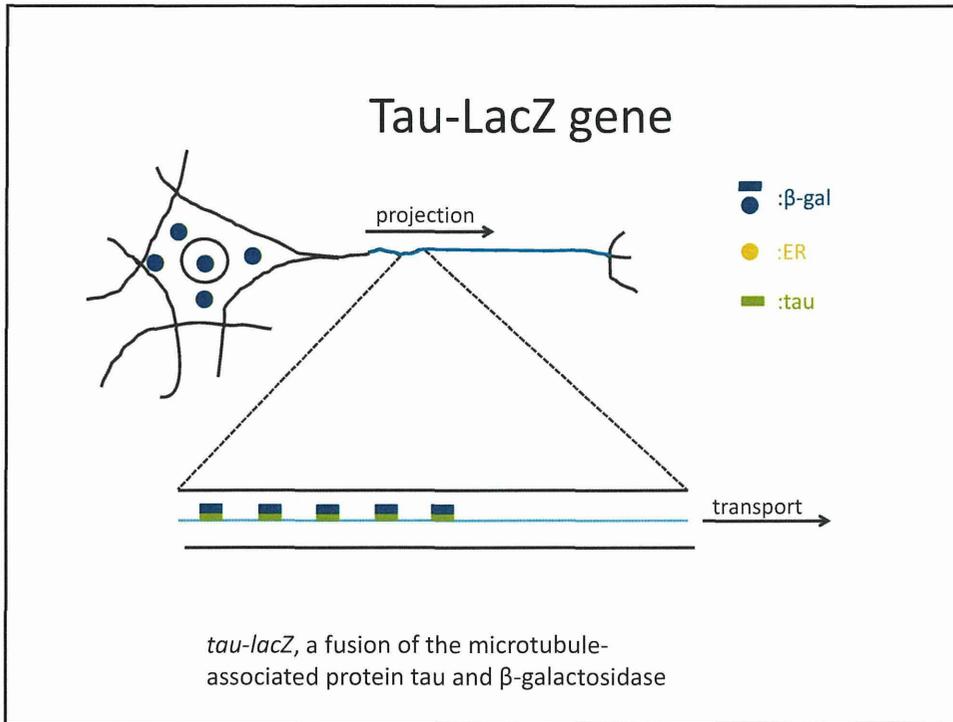
1. ER α 遺伝子を含むBACクローンの選択と取得
2. BACクローンにレポーター遺伝子を挿入
3. トランスジェニックマウスの作製
4. レポーター遺伝子の発現の確認
- TGラインの選択
5. 胎児期のBPAおよびエストロゲン曝露
6. 曝露マウスにおけるレポーター遺伝子の発現の確認

ER α ノックアウトマウスの利用

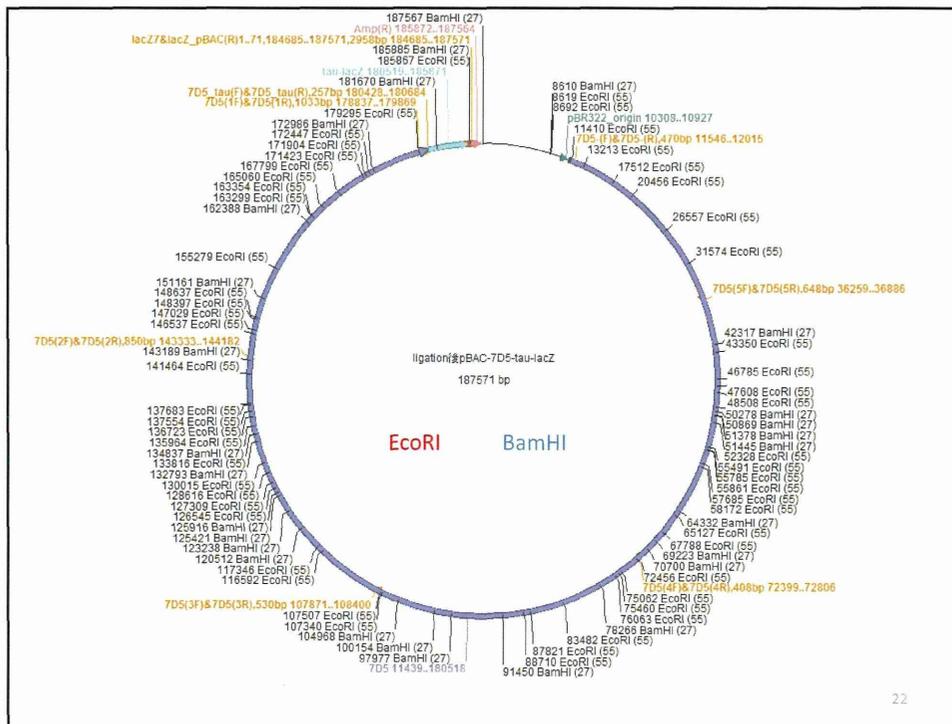
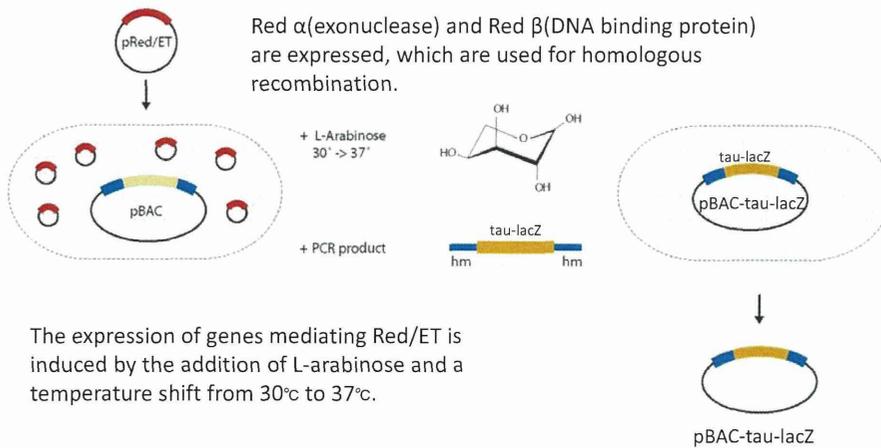
EREレポーターマウスの利用

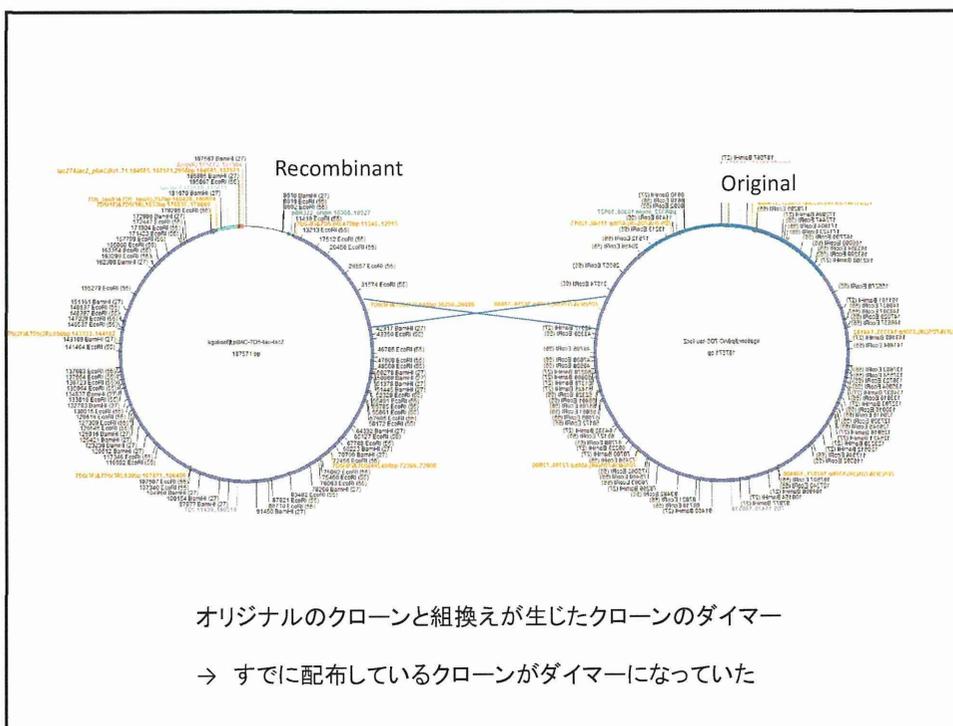
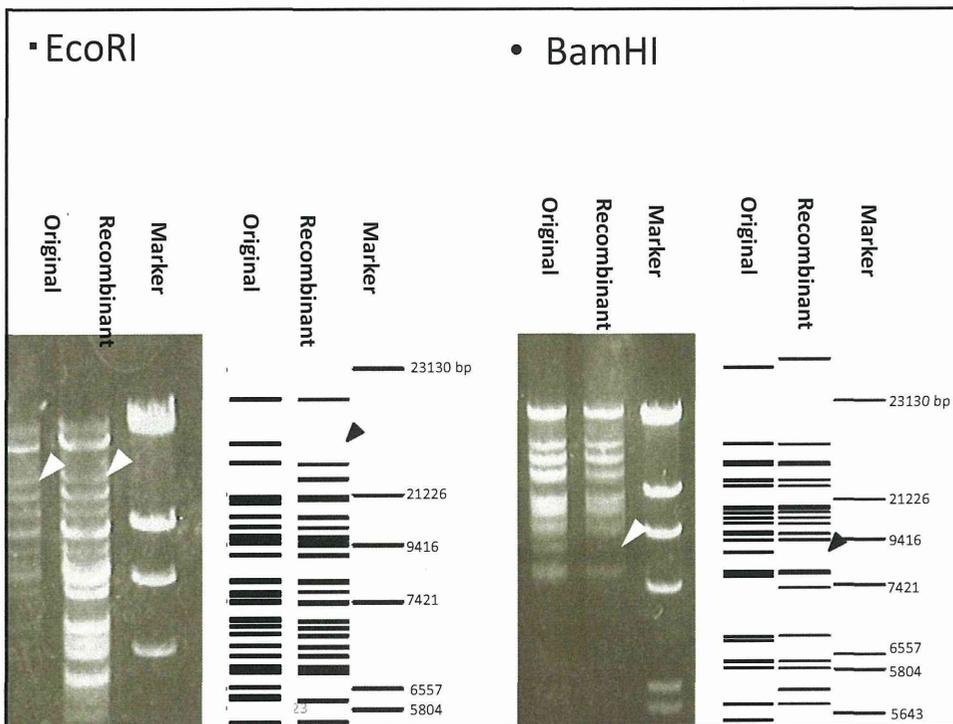
トランスジーンおよび本来の遺伝子の制御領域の修飾

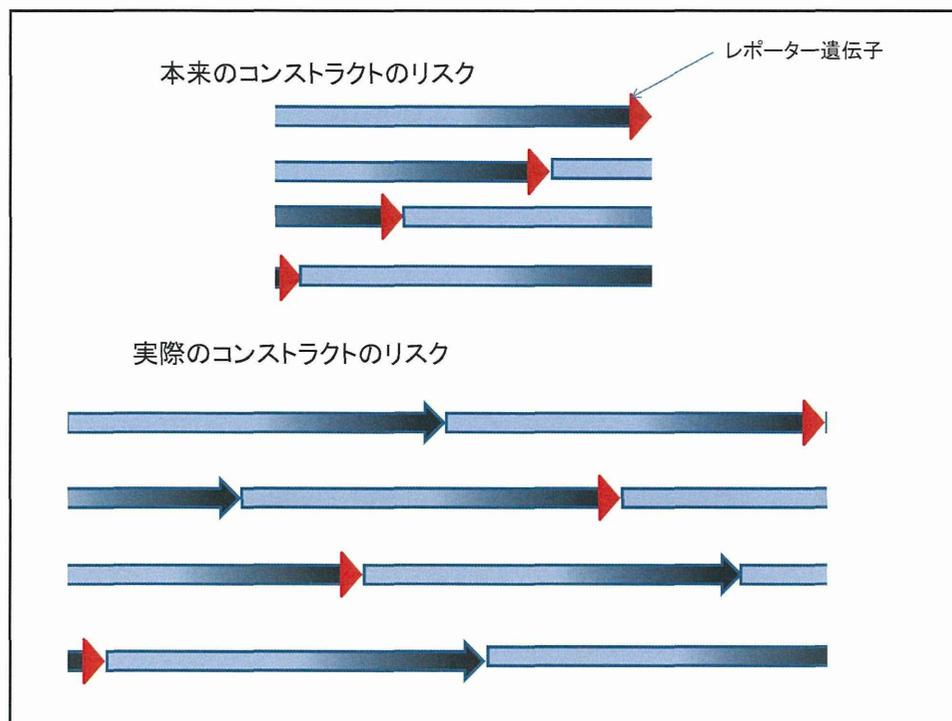
関連遺伝子のBAC-レポーターTGマウスの構築など



• Construction of ER tau-lacZ fused gene







研究の流れ

1. ER α 遺伝子を含むBACクローンの選択と取得
2. BACクローンにレポーター遺伝子を挿入
3. **トランスジェニックマウスの作製**
4. レポーター遺伝子の発現の確認
 - TGラインの選択
5. 胎児期のBPAおよびエストロゲン曝露
6. 曝露マウスにおけるレポーター遺伝子の発現の確認

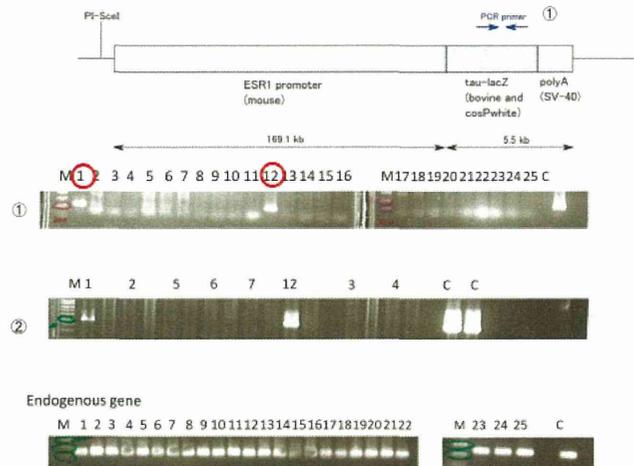
ER α ノックアウトマウスの利用

EREレポーターマウスの利用

トランスジーンおよび本来の遺伝子の制御領域の修飾

関連遺伝子のBAC-レポーター-TGマウスの構築など

インジェクションは理研CDBに依頼 (CD-1)
 347の受精卵にインジェクション 253個を移植
 25匹の仔を取得 2系統がTG



研究の流れ

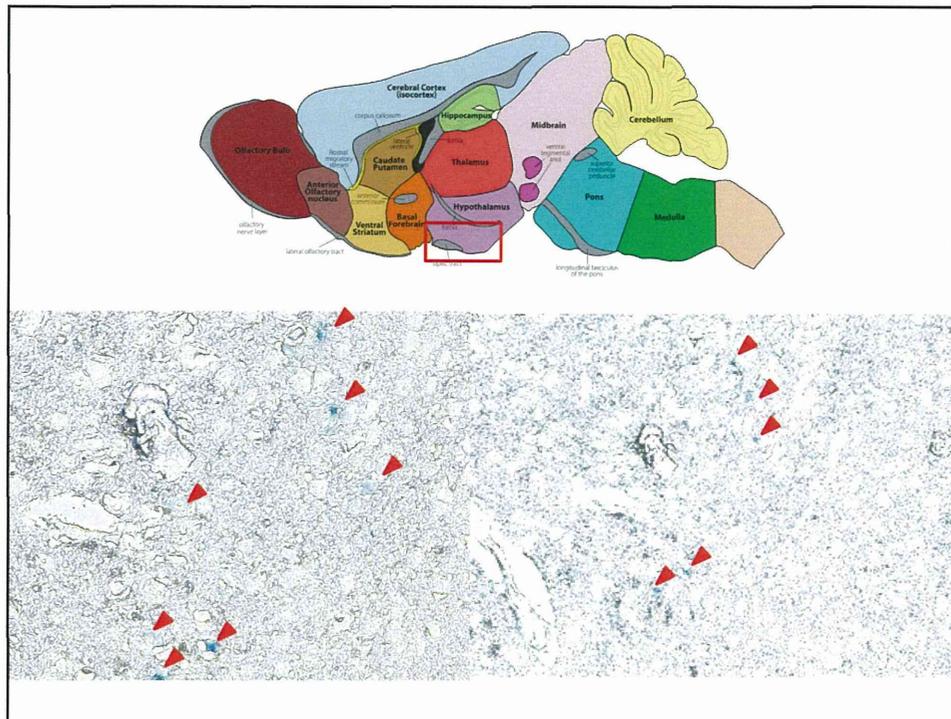
1. ER α 遺伝子を含むBACクローンの選択と取得
2. BACクローンにレポーター遺伝子を挿入
3. トランスジェニックマウスの作製
4. **レポーター遺伝子の発現の確認**
 - TGラインの選択
5. 胎児期のBPAおよびエストロゲン曝露
6. 曝露マウスにおけるレポーター遺伝子の発現の確認

ER α ノックアウトマウスの利用

EREレポーターマウスの利用

トランスジーンおよび本来の遺伝子の制御領域の修飾

関連遺伝子のBAC-レポーターTGマウスの構築など



研究の流れ

1. ER α 遺伝子を含むBACクローンの選択と取得
2. BACクローンにレポーター遺伝子を挿入
3. トランスジェニックマウスの作製
4. レポーター遺伝子の発現の確認
- TGラインの選択
5. 新生児期のBPAおよびエストロゲン曝露
6. 曝露マウスにおけるレポーター遺伝子の発現の確認

ER α ノックアウトマウスの利用

EREレポーターマウスの利用

トランスジーンおよび本来の遺伝子の制御領域の修飾

関連遺伝子のBAC-レポーターTGマウスの構築など

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
化学物質の子どもへの影響評価に関する研究
- 発生・発達期の脳や免疫系が示す高感受性の責任標的の同定と、
それに基づく試験スキームの最適化 -
(H23-化学-一般-002)
分担研究報告書

周産期低用量暴露による免疫影響評価

研究分担者 林 良夫 徳島大学・名誉教授
研究協力者 石丸直澄 徳島大学大学院・教授
新垣理恵子 徳島大学大学院・助教
菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部長
高木篤也 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部動物管理室長
五十嵐勝秀 国立医薬品食品衛生研究所・毒性部第三室室長

研究要旨

妊娠期におけるダイオキシン暴露による胸腺組織での遺伝子発現に関して、*in vitro* 及び *in vivo* での解析を進めている。妊娠、非妊娠 B6 及び AhR ノックアウトマウスを用いて、胸腺組織に *in vitro* で直接ダイオキシンを添加することによって変化する遺伝子の発現を PCR アレイあるいは DNA マイクロアレイによって解析している。さらに、*in vivo* での変化についてもダイオキシンを妊娠、非妊娠、AhR ノックアウトマウス、コントロールマウスを用いて検討を進めている。

A. 研究目的

本研究では、周産期における内分泌かく乱化学物質を主体とした化学物質の低用量暴露によって、子どもあるいは母体の免疫システムに与えられる異常に関してマウスを用いて生体影響への分子メカニズムを詳細に検討することにより、周産期における化学物質の免疫系への安全性を評価する。周産期でのホルモン作動性物質の低用量暴露により、免疫システムの構築がどの段階でどのような分子機序によって異常となるかを解析する。周産期及び新生児期における低用量暴露が引き起こす各種の遅発影響を明らかにするため、遅発症状を引き起こす生体内組織異常の同定、及び、それに至る分子機構の解明、更に、遺伝

子制御の改変機構の同定に関わる基盤研究を実施し、個体の免疫系への低用量影響の体系的、総合的な安全性評価系の完成をめざす。

B. 研究方法

妊娠期における胸腺組織への TCDD 暴露による影響を網羅的な遺伝子発現解析によって検討した。妊娠後期（妊娠 15 日目）、対照マウス（B6 マウス）あるいは AhRKO マウスの胸腺組織に *in vitro* で TCDD (100 nM) を添加し、2 時間組織培養を行った。mRNA 抽出後、84 個の T 細胞分化関連遺伝子発現に関して PCR アレイによって解析した。さらに、網羅的遺伝子発現を検討するために DNA マイクロアレイを実施した。一方、*in vivo* での TCDD 暴露による妊娠期の胸腺組織への影響を検討

するために、妊娠期（妊娠 15 日目）のマウスあるいは対照マウスへの TCDD の投与を行い、胸腺組織を用いて DNA マイクロアレイを実施した。

（倫理面への配慮）

マウスを用いた動物実験に関しては、実験動物に関する取り扱いについて使用する動物の苦痛の軽減や安楽死の方法などを中心として徳島大学実験動物委員会および国立医薬品食品衛生研究所において定められている倫理面に配慮した実験動物運営規定に基づき、厳格な審査を経た上で実施されている。

C. 研究結果

本年度は、*in vitro* での妊娠期胸腺組織への TCDD の暴露による遺伝子発現の変化を検討した。T 細胞分化に関与する 84 遺伝子に関して PCR アレイによって解析を加えた。

ケモカイン及びケモカイン受容体遺伝子に関しては、B6、AhRKO マウスともに妊娠によって発現が増加していた CCL5、逆に妊娠によって発現が低下していた CCL7 遺伝子は TCDD の添加によっていずれも遺伝子発現に差異が見られなかった（図 1）。また、CCR3、CCR6 はそれぞれ妊娠によって変動はなかったが、TCDD 添加によってそれらの遺伝子発現が低下していた（図 1）。

サイトカイン及びサイトカイン受容体遺伝子に関しては、IL-12b、IL-13ra1、IL18、IL-18r1、IL-1r1、IL-1r2、IL-1rl1、IL-21、TNF など妊娠によって B6 マウス AhRKO マウスともに発現の亢進が見られ、それらほとんどの遺伝子発現は TCDD 添加により低下することが判明した（図 2）。

T ヘルパー 1 型に関連する遺伝子に関しては、B6 と AhRKO マウス間での差異は目立たず、妊娠によって Igsg6、IL-12b、IL-18、Socs1、Tlr4、Tlr6、TNF など発現が亢進し、TCDD 添加に

よってそれらの発現の低下が観察された（図 3）。

T ヘルパー 2 型に関連する遺伝子に関しては、CCL5 は B6 マウス、AhRKO マウスともに妊娠により発現が低下する一方で、CCL7、IL-13ra1、Nfatc2ip、Tmed1 は妊娠期に発現が亢進する（図 4）。TCDD の添加によって、それらケモカイン、サイトカイン、転写因子の発現の変動は見られなくなった（図 5）。

T 細胞の分化過程でエピジェネチクスな変化が知られている遺伝子群に関して検討すると、Th1 細胞関連では、B6 マウスでは妊娠に伴って Ifng、IL-12rb2、Fasl、Tbx21 の発現が増加するが AhRKO マウスでは変化が見られなかった（図 6）。IL-18r1、IL-18rap は B6、AhRKO マウスともに妊娠によって発現の亢進が確認された（図 6）。TCDD の添加によって、それらの遺伝子の変動に差異が見られなくなることが判明した（図 6）。

Th2 細胞関連でのエピジェネチクスな変化が知られている遺伝子に関しては、B6 マウスでの妊娠により Gata3 の発現が亢進するが、TCDD の添加によりその差異は観察されなくなった（図 7）。B6、AhRKO マウスともに妊娠に伴って IL-1rl1、Pparg の発現が亢進するが、TCDD の添加によってそれらの遺伝子発現の亢進は認められなくなった（図 7）。

Th17 細胞関連でのエピジェネチクスな変化が知られている遺伝子に関しては、B6、AhR マウスともに妊娠に伴って IL-17a、IL-1r1、IL-21、Rora、Rorc の発現が亢進するが、TCDD の添加によってそれらの遺伝子発現亢進は見られなくなった（図 8）。

制御性 T 細胞 (iTreg、nTreg) 関連でのエピジェネチクスな変化が知られている遺伝子に関しては、B6、AhRKO マウスともに妊娠期に Ccr6、IL9、Ifn4、Myb、Pou2f2 の発現が増加するが、TCDD 添加によりそれらの発現は低下することが明らかとなった（図 9）。

さらに、Percellome 解析を用いた DNA マイ

クローレイによる網羅的遺伝子発現に関しては、健常 B6 マウスの胸腺組織に TCDD を添加すると、対照群に比較して有意に上昇した遺伝子 (P<0.05) は 42 遺伝子、有意に低下したものは 273 遺伝子であった。妊娠 B6 マウスの胸腺組織に TCDD を添加すると、上昇したものは 625 遺伝子、低下したものは 15 遺伝子であった。AhRKO マウスの胸腺組織に TCDD を添加すると、366 遺伝子が上昇し、511 遺伝子が低下した。さらに、妊娠 AhRKO マウスの胸腺組織に TCDD を添加すると、425 遺伝子が上昇し、64 遺伝子が低下していた。変動の大きかった遺伝子の一部を提示すると、Parathyroid hormone (PTH) 遺伝子は正常胸腺組織ではほとんど発現が認められないが、妊娠マウス胸腺ではその発現が大きく上昇し、TCDD の添加により妊娠マウスでの発現は正常マウスとほぼ同程度に低下した (図 10)。AhRKO マウスでも同様の傾向が認められたことから、TCDD の AhR を経由しないシグナルの関与が考えられた。また、上皮の生存に関与する遺伝子である Repetin (Pptn) は妊娠すると発現が上昇し、TCDD の添加によりその発現上昇は抑制されることが判明した (図 10)。AhRKO では妊娠によってその発現は B6 マウスと同様に上昇するが、TCDD の添加によってその遺伝子発現に変動は確認されなかった (図 10)。したがって、妊娠によって発現上昇した Rptn は TCDD-AhR を介した経路で制御されている可能性が示された。

D. 考察

ダイオキシンなどの環境ホルモンの生体への影響として、発癌、奇形などがよく知られているが、免疫系への正確な影響に関しては報告が少ない。我々はすでに、新生時期に低容量のダイオキシンの暴露により、出生後晩発性に自己免疫性病変が誘導されることを報告した (J Immunol

182:6576, 2009)。さらに、シェーグレン症候群モデルマウスを用いて、妊娠後期でのダイオキシンの暴露が母体側にも自己免疫性病変の発症に影響を及ぼすことを見いだしている (未公表データ/厚生労働科学研究費補助金事業平成 22 年度報告済み)。

平成 24 年度では、妊娠後期における胸腺組織への TCDD の暴露による遺伝子の変動に関して、T 細胞の分化に関与する 84 遺伝子発現を PCR アレイ法にて検討した。ケモカイン、サイトカイン、それらの受容体、各種転写因子、Th1 関連遺伝子、Th2 関連遺伝子、Th17 関連遺伝子に加え、エピジェネティックな変化が想定される遺伝子に関して、*in vitro* での TCDD 暴露の有無での遺伝子の変動を定量化した。全体的に B6 マウス、AhRKO マウスでの遺伝子発現の差は小さくなく、妊娠によっていずれのマウスにも多くの遺伝子の発現が亢進することが明らかとなり、TCDD の暴露によって、妊娠にて変動した多くの遺伝子の発現が低下していた。中でも、Th1 関連遺伝子では Igsf6、IL-18、Socs1、Tlr4、Tlr6 の発現の変動が目立った。Th2 関連遺伝子では Ccl7、IL-13ra1、Nfatc2ip の変動が見られた。エピジェネティックな変化が想定される遺伝子では、特に、Th17 関連の遺伝子は B6 マウス、AhRKO マウスともに妊娠によって大きく発現が亢進し、TCDD によってその発現の変動が見られなくなることから、Th17 への分化に TCDD の暴露がエピジェネティックな変化を来す可能性があるが、実際の DNA のメチレーションなど更なる検討が必要である。さらに、PerceLLome 解析を用いた DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現に関しても様々な遺伝子群の変動が見られ、妊娠によって胸腺組織に発現するいくつかの遺伝子と TCDD/AhR を介した遺伝子制御機構が明らかになる可能性が十分に考えられる。また、in

vivo での TCDD 投与による妊娠、非妊娠マウスの胸腺組織での遺伝子変化に関しても検討を加える予定であり、より生体での変化の解明が進むものと考えられる。

E. 結論

妊娠期における胸腺組織での遺伝子発現の変動は TCDD の暴露により大きく制御され、T 細胞の分化に極めて重要な遺伝子発現に影響を及ぼしていることが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Ishimaru N, Yamada A, Nitta T, Arakaki R, Lipp M, Takahama Y, Hayashi Y. CCR7 with S1P1 signaling through AP-1 for migration of Foxp3+ regulatory T-cells controls autoimmune exocrinopathy. *Am J Pathol* 180:199-208, 2012

(2) Izawa T, Kondo T, Kurosawa M, Oura R, Matsumoto K, Tanaka E, Yamada A, Arakaki R, Kudo Y, Hayashi Y, Ishimaru N. Fas-independent T-cell apoptosis by dendritic cells controls autoimmune arthritis in MRL/lpr mice. *PLoS One* 7:e48798, 2012

(3) Oura R, Arakaki R, Yamada A, Kudo Y, Tanaka E, Hayashi Y, Ishimaru N. Induction of rapid T cell death and phagocytic activity by Fas-deficient lpr macrophages. *J Immunol* 190:578-585, 2013

2. 学会発表

(1) 石丸直澄、山田安希子、新垣理恵子、林良夫：自己免疫疾患における CCR7 を介した制御性 T 細胞のパトローリング機能 第 101 回日本病理学会総会、2012 年 4 月、東京（発表誌名巻号・頁・発行年等も記入）

(2) 大浦律子、新垣理恵子、山田安希子、林良

夫、石丸直澄：Fas 分子を介したマクロファージによる末梢 T 細胞の維持機構 第 101 回日本病理学会総会、2012 年 4 月、東京

(3) 新垣理恵子、山田安希子、江口洋、林良夫、石丸直澄：シェーグレン症候群モデルマウスを利用したレバミピド点眼投与による病態抑制機序の解明 第 101 回日本病理学会総会、2012 年 4 月、東京

(4) 山田安希子、新垣理恵子、林良夫、石丸直澄：シェーグレン症候群における制御性 T 細胞の役割 第 101 回日本病理学会総会、2012 年 4 月、東京

(5) Akiko Yamada, Rieko Arakaki, Mie Kurosawa, Tomoyuki Kondo, Yasusei Kudo, Yoshio Hayashi, Naozumi Ishimaru. Functional defect of Foxp3+Treg cells in Sjögren's syndrome. 第 41 回日本免疫学会総会、2012 年 12 月、神戸

(6) Rieko Arakaki, Hiroshi Eguchi, Akiko Yamada, Yasusei Kudo, Yoshinori Mitamura, Yoshio Hayashi, Naozumi Ishimaru. An effective therapy of ocular lesions in a murine model for Sjögren's syndrome by eye drop administration of rebamipide. 第 41 回日本免疫学会総会、2012 年 12 月、神戸

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

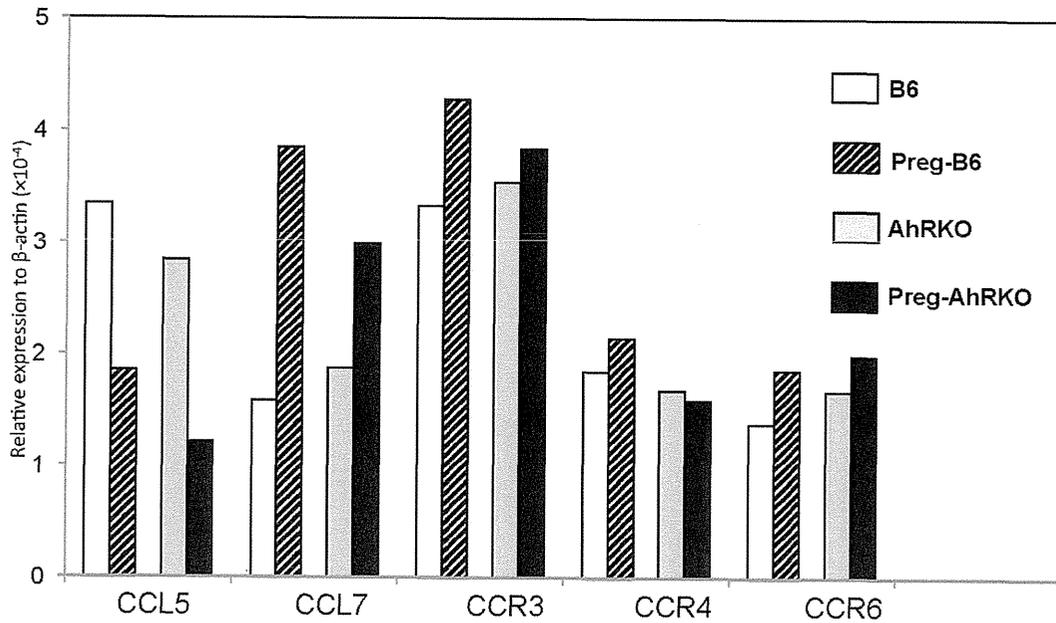
3. その他

無し

図1

Chemokines & Chemokine Receptors

TCDD 無添加群



TCDD 添加群

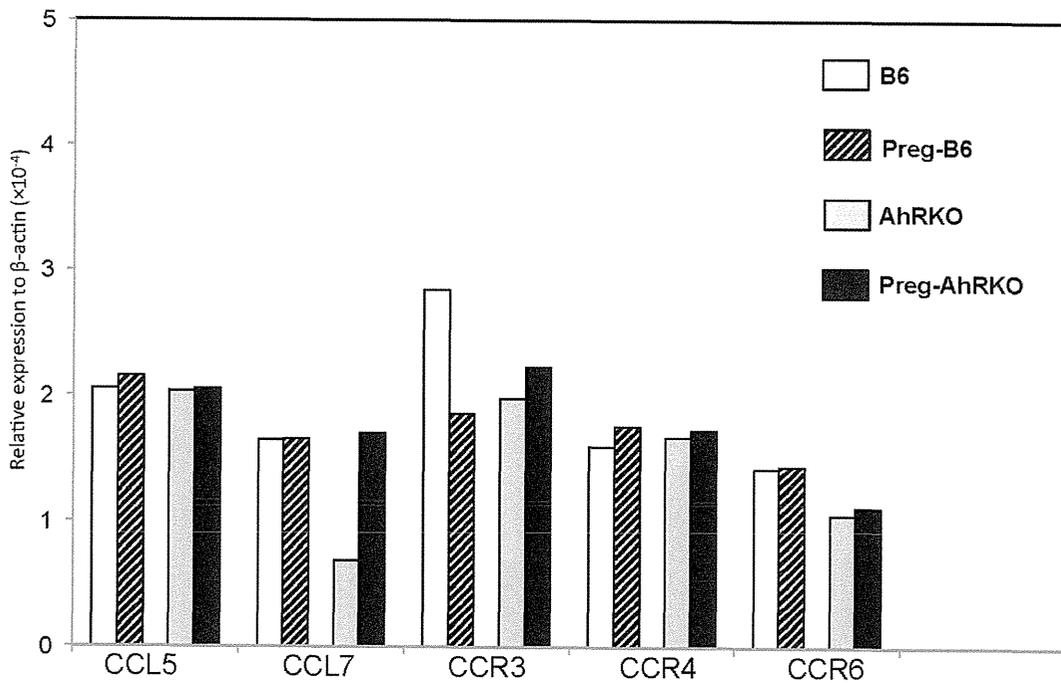
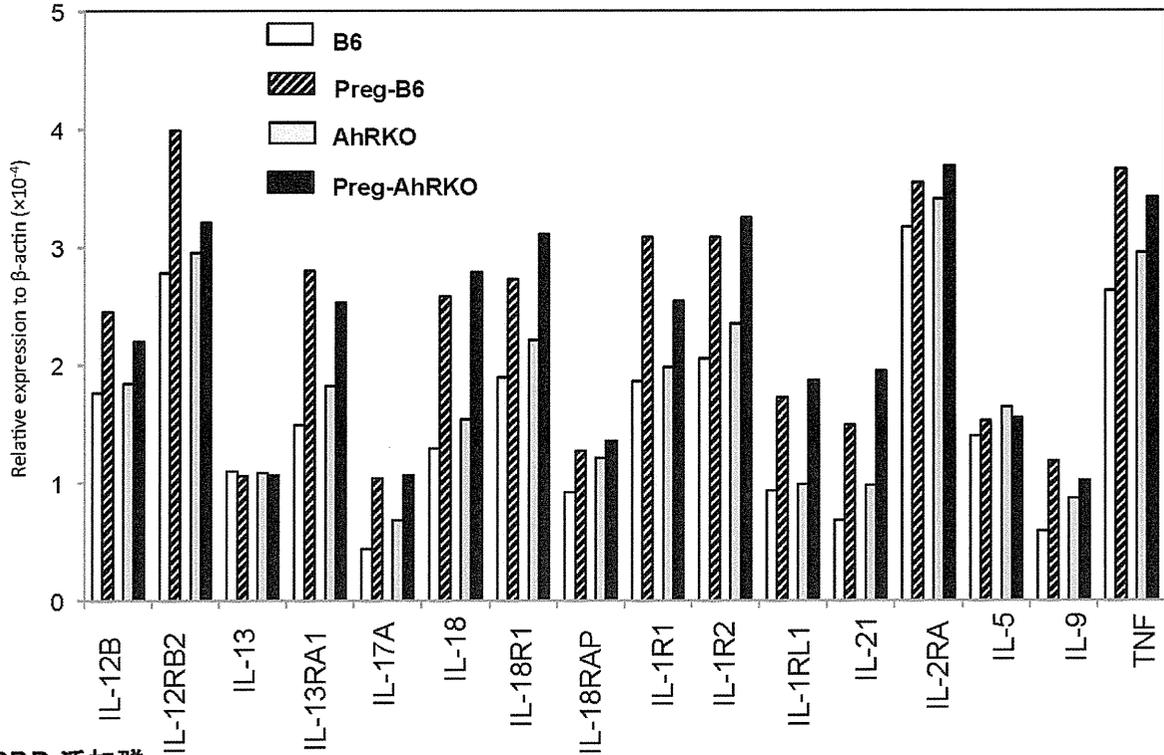


図1: 非妊娠あるいは妊娠(15日目)B6及びAhRKOマウスの胸腺組織におけるケモカイン及びケモカイン受容体遺伝子発現。上段がTCDD非添加群(各群3匹)。下段がTCDD添加2時間後の遺伝子変化(各群3匹)。

図2

Cytokines & Cytokine Receptors

TCDD 無添加群



TCDD 添加群

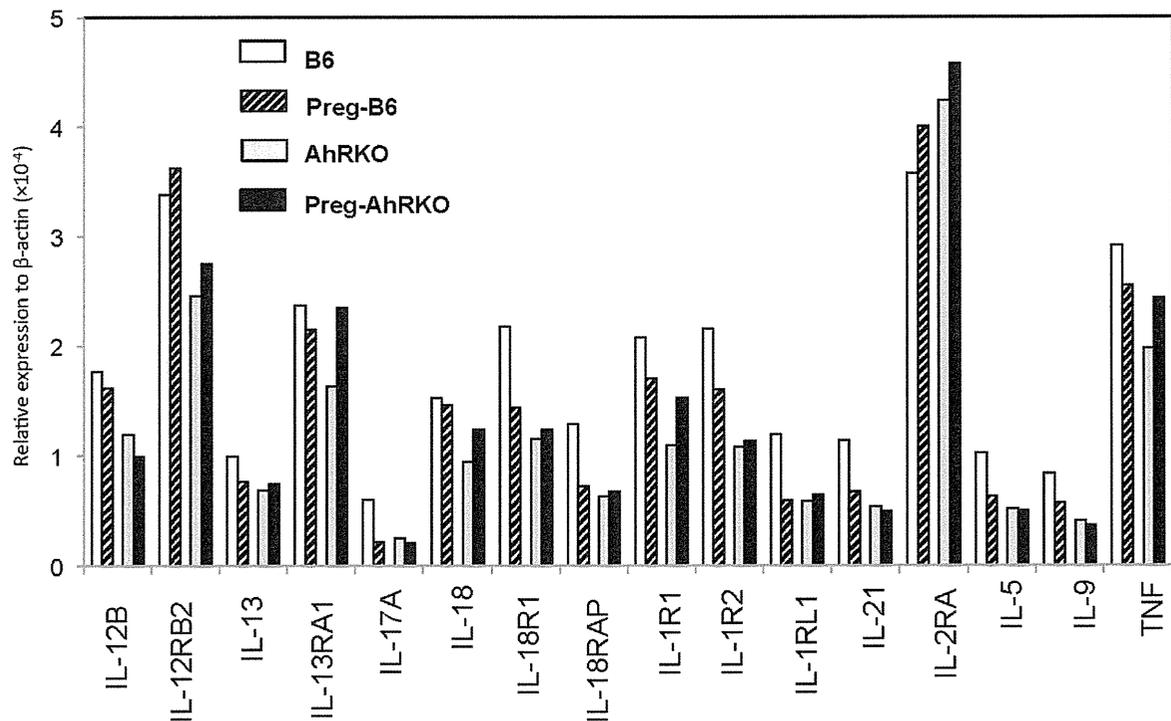
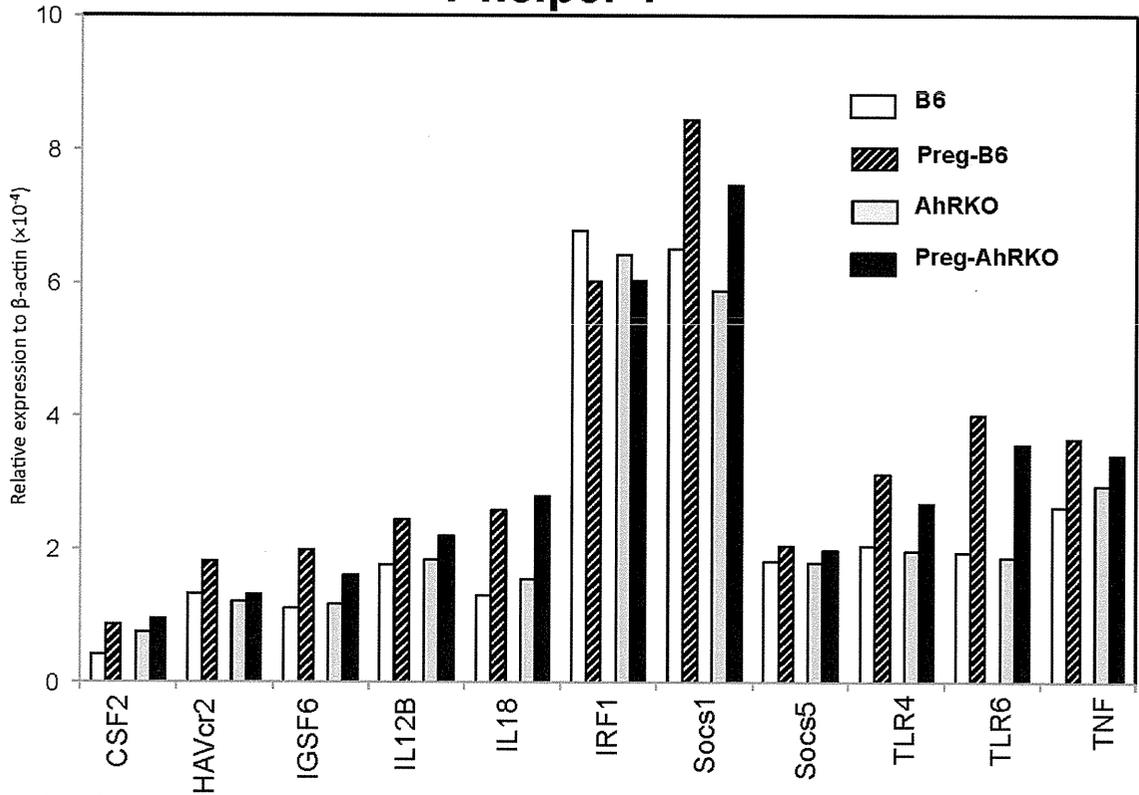


図2: 非妊娠あるいは妊娠(15日目)B6及びAhRKOマウスの胸腺組織におけるサイトカイン及びサイトカイン受容体遺伝子発現。上段がTCDD非添加群(各群3匹)。下段がTCDD添加2時間後の遺伝子変化(各群3匹)。

図3

TCDD 無添加群

T helper 1



TCDD 添加群

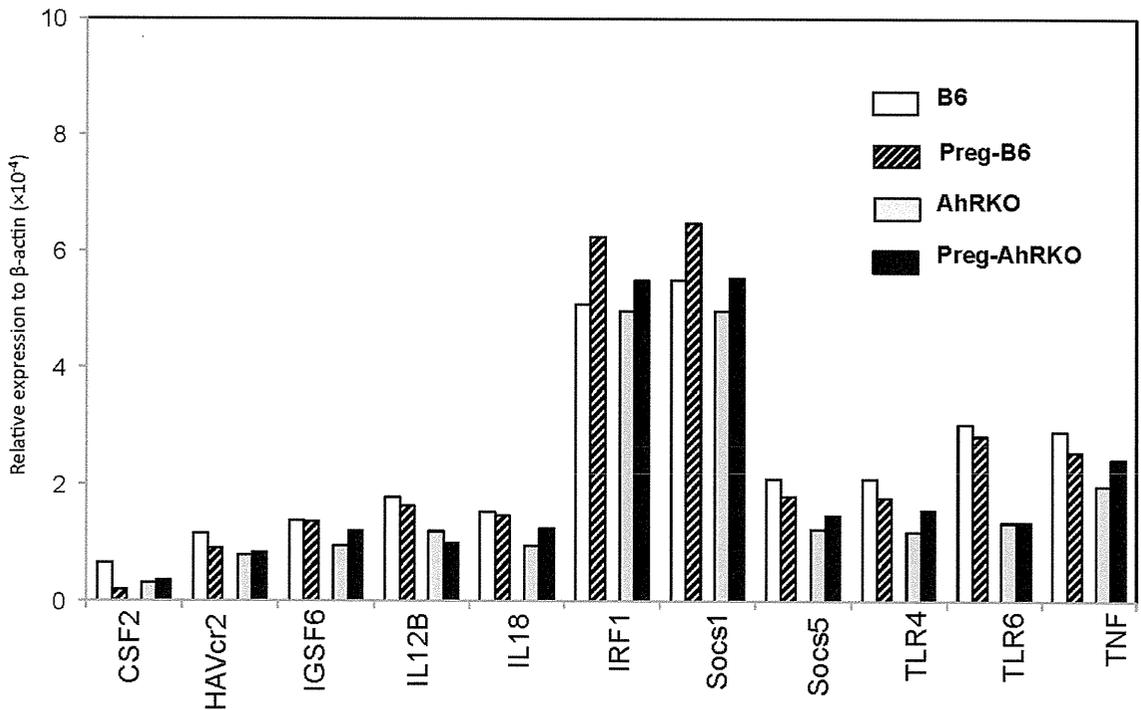
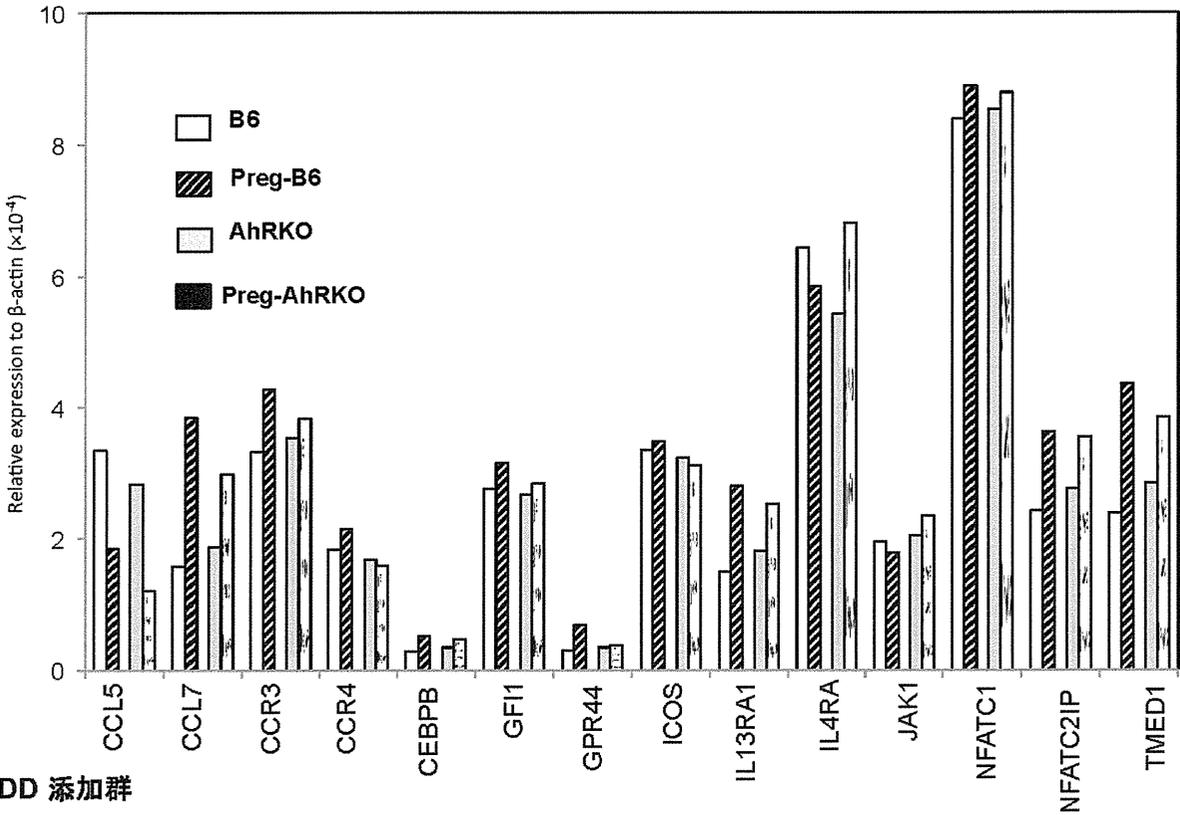


図3: 非妊娠あるいは妊娠(15日目)B6及びAhRKOマウスの胸腺組織におけるTh1関連遺伝子発現。上段がTCDD非添加群(各群3匹)。下段がTCDD添加2時間後の遺伝子変化(各群3匹)。

図4

TCDD 無添加群

T helper 2



TCDD 添加群

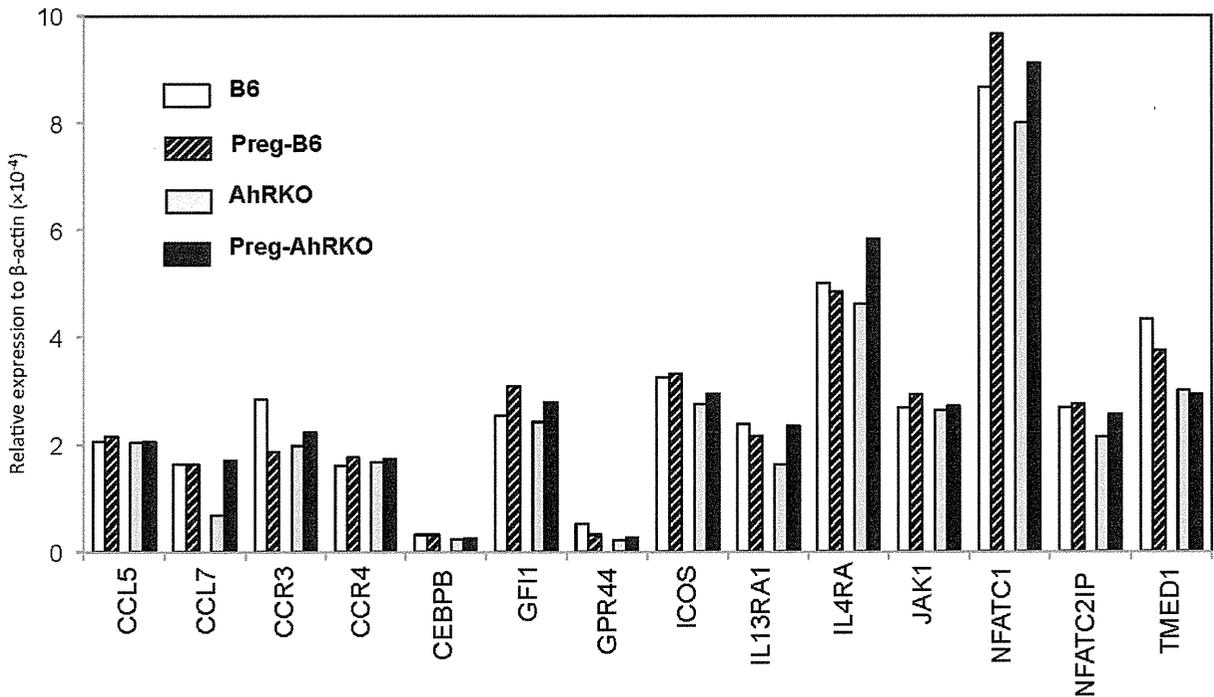
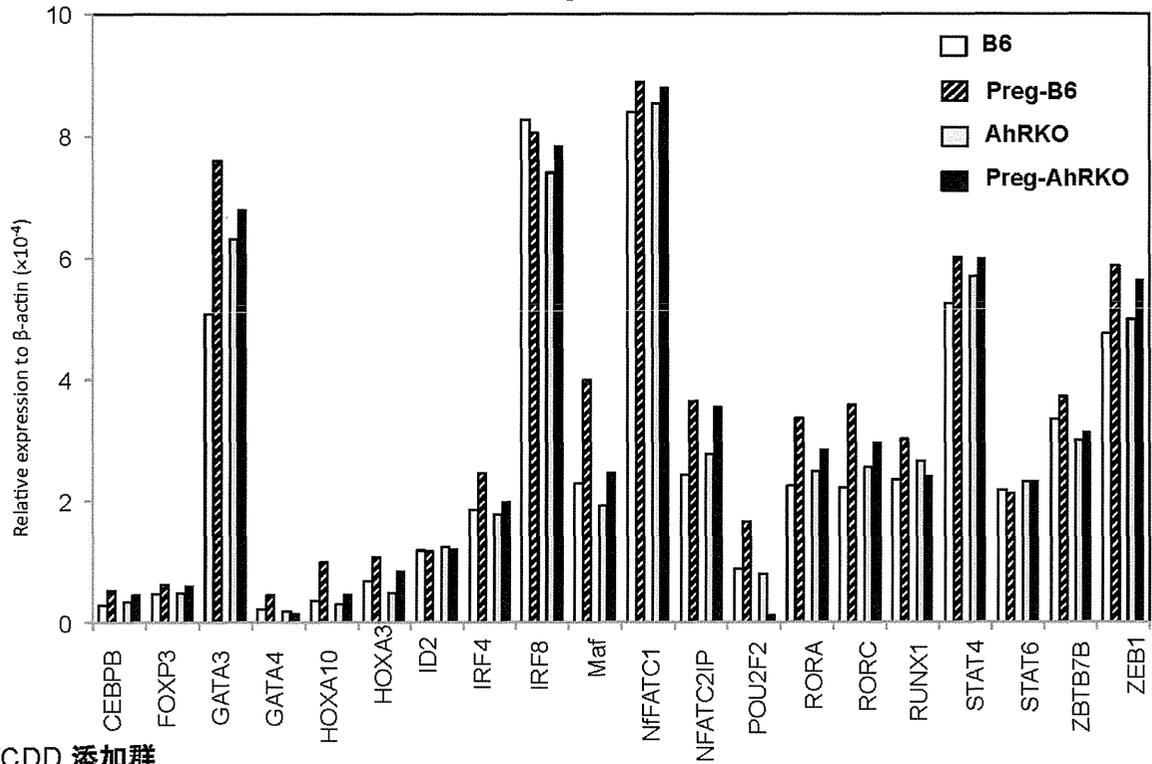


図4: 非妊娠あるいは妊娠(15日目)B6及びAhRKOマウスの胸腺組織におけるTh2関連遺伝子発現。上段がTCDD非添加群(各群3匹)。下段がTCDD添加2時間後の遺伝子変化(各群3匹)。

図5

TCDD 無添加群

Transcription Factors



TCDD 添加群

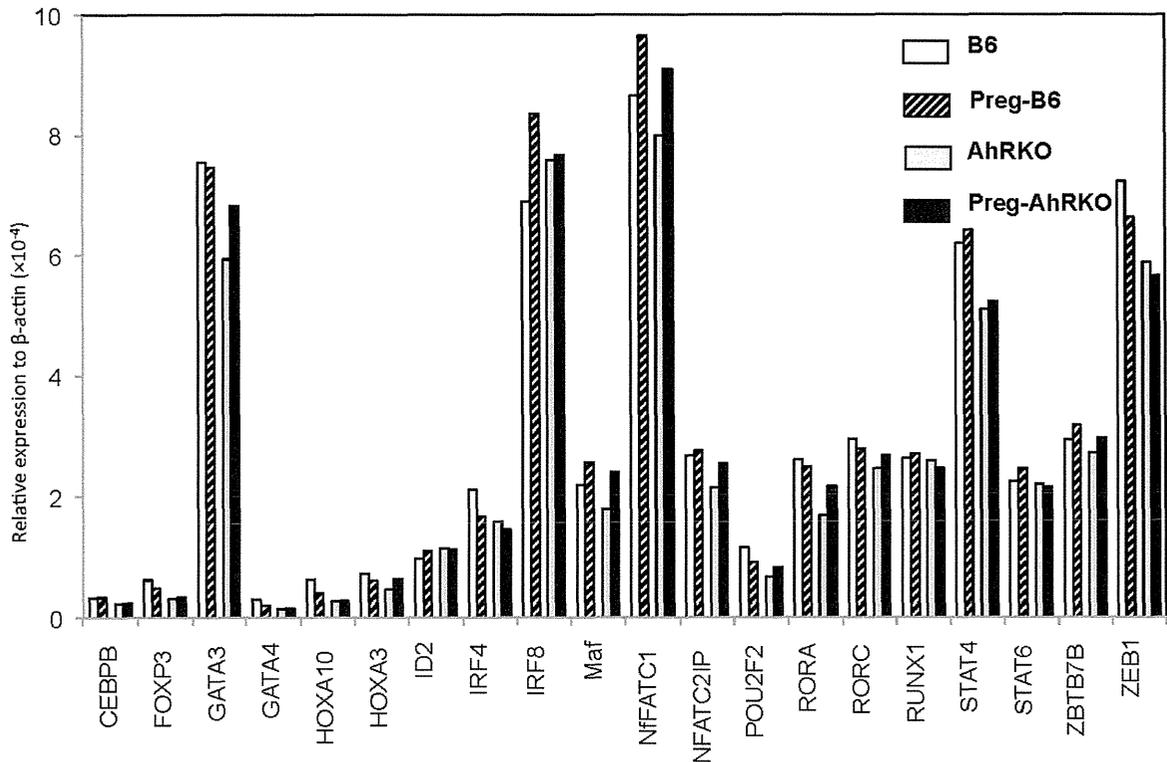
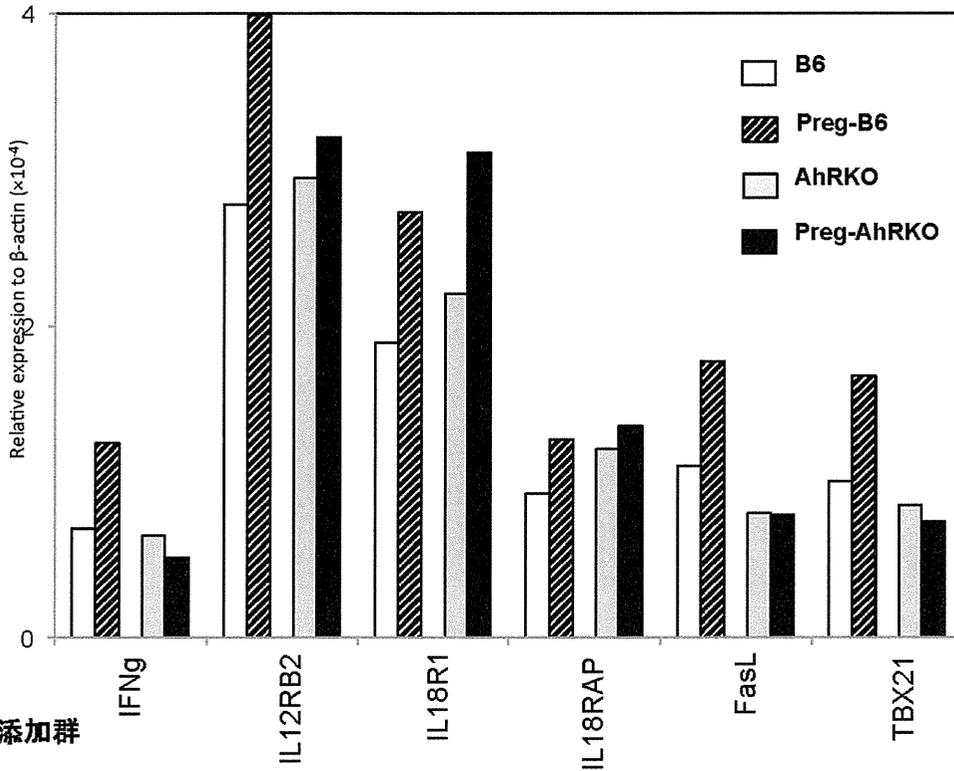


図5: 非妊娠あるいは妊娠(15日目)B6及びAhRKOマウスの胸腺組織における転写因子の変化。上段がTCDD非添加群(各群3匹)。下段がTCDD添加2時間後の遺伝子変化(各群3匹)。

図6

Epigenetically Regulated Genes: Th1 Cells

TCDD 無添加群



TCDD 添加群

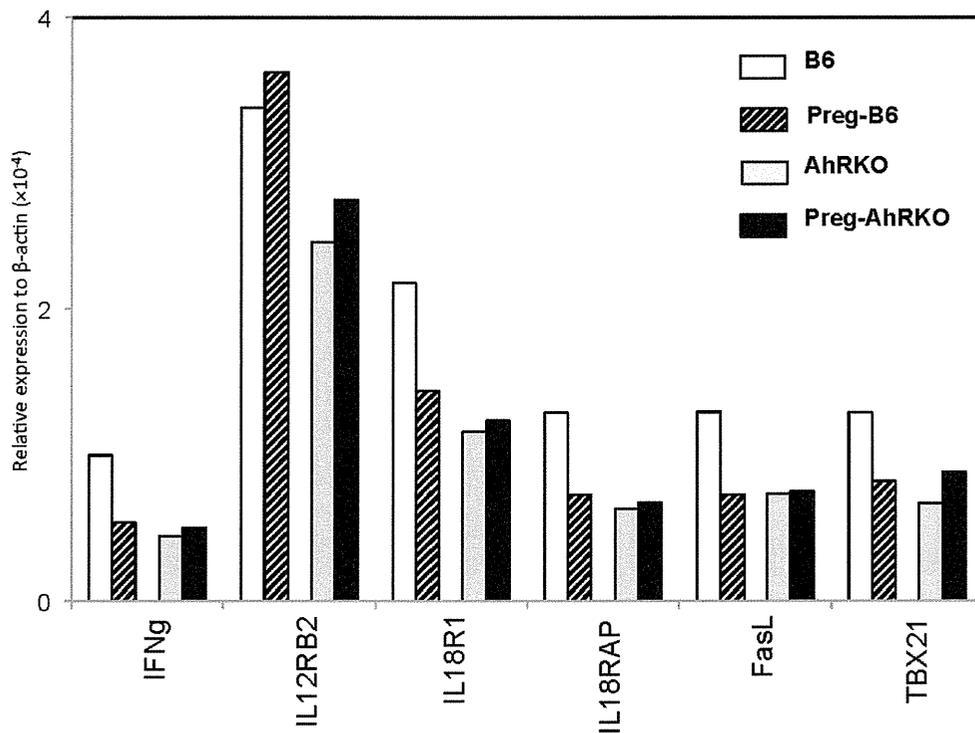


図6: 非妊娠あるいは妊娠(15日目)B6及びAhRKOマウスの胸腺組織におけるエピジェネチクス関連Th1細胞遺伝子発現。上段がTCDD非添加群(各群3匹)。下段がTCDD添加2時間後の遺伝子変化(各群3匹)。