

徳島大学先端酵素学研究所「共同利用・共同研究・熊本地震支援」成果報告書

- 申請者の氏名・所属・職位  
横山敦・東北大学大学院医学系研究科・助教
- 申請者に関する照会先  
東北大学大学院医学系研究科分子内分泌学分野  
〒980-8575 宮城県仙台市青葉区星陵町2-1  
電話 022-717-8079
- 申請項目：共同利用 A-4 ゲノム編集マウス作製
- 申請内容 「糖尿病性腎症におけるグルコース依存性転写因子 ChREBP の解析」

## 研究内容および研究成果

### ①目標

糖尿病性腎症は、我が国において腎不全になる原因一位の重要な腎疾患の一つであり、根本的治療法が存在せずその発症機構の詳細説明が急務である。ChREBP はグルコース依存的に標的遺伝子を転写促進する転写因子であり、糖尿病増悪との関連が強く予想されているがその詳細な分子機能は不明な点が多い。申請者はこれまで、糖尿病性腎症モデルマウス(iNOS/RAGE マウス)を用いてその腎系球体の機能低下に関わる遺伝子の探索および解析を行ってきた。そこで本申請課題では、新たに作出する ChREBP のノックアウトマウスと糖尿病性腎症モデルマウスを交配し腎系球体への影響を精査することで腎症の病態への ChREBP の寄与を解析するとともに、その結果を ChREBP を標的とした糖尿病性腎症治療法開発への分子基盤にしたい。

### ②研究計画

方法: 初期発生研究分野、竹本助教との共同研究の基、CRISPR-Cas9システムを用いた遺伝子改変技術を用いて ChREBP ノックアウトマウスを作出する。このノックアウトマウスを iNOS/RAGE マウスと交配することにより、ChREBP 遺伝子を欠損した糖尿病性腎症モデルマウスを作出する。このマウスについて、これまで確立してきた腎系球体の実験評価系(尿中アルブミン量の定量(クレアチニン補正)、腎系球体の病理学的解析(HE 染色、抗体染色)、腎系球体単離からの遺伝子発現解析)を用いて系球体機能への影響を精査し腎症への影響を解析する。

### ③実施内容

徳島大学先端酵素学研究所にて CRISPR-Cas9 システムを用いた遺伝子改変技術を用いて ChREBP ノックアウトマウスの作出を行った。作出に際しては、まず培養細胞において ChREBP を高効率にノックアウトできるようなガイド RNA の探索を行った。ガイド RNA の探索は脂溶性ビタミン研究分野にて行われた。得られたガイド RNA は受精卵にエレクトロポレーション法にて導入し、遺伝子編集を行った。遺伝子編集作業は初期発生研究分野において行った。遺伝子編集を行った受精卵をマウス子宮に戻すことでマウス個体を発生させた。産まれたマウスからゲノム DNA を抽出し PCR 法にてジェノタイプを判定することで、目的の遺伝子編集がされたキメラマウスを識別した。キメラマウスを交配し次世代のマウスのジェノタイプを判定することで生殖系への遺伝子編集を確認しこれをノックアウトマウスとした。

東北大学において腎臓系球体関連の実験を行うために、得られたゲノム編集マウスは2世代目まで繁殖させ性成熟させた後、受精卵(35 個、50 個)を採取し凍結胚を作製し東北大学へ輸送した。東北大学においては凍結胚からの個体復元を行った。個体復元は東北大学医学部動物実験施設にて実施した。凍結胚の融解には熊本大学にて開発された簡易ガラス化法を用いた。一回目の個体復元では 35 個入りの凍結胚を用いて行った。

受精卵の移植には偽妊娠マウスを適正な麻酔下で卵管に移植後体内に戻しクリップ留めをした。移植後 19 日後に出産を迎えた。離乳した後に母親マウスの微生物検査を実験動物中央研究所 ICLAS モニタリングセンターに依頼した。

#### ④研究結果および成果

脂溶性ビタミン研究分野においてマウス ChREBP を高効率にノックアウトすることができるガイド RNA を見出すことに成功した。また、このガイド RNA を受精卵にエレクトロポレーションすることで、ゲノム編集による ChREBP のノックアウトマウスを作製することに成功した。

この得られた ChREBP ノックアウトマウスより凍結胚を作製し個体復元を行った。個体復元の結果 7 匹の子マウスを得ることに成功した(このうち 1 匹は死亡した)。これらのマウスを動物舎に入れて実験を行うために、母親マウスを実験動物中央研究所 ICLAS モニタリングセンターに微生物検査を依頼しモニタリングを行っている。全ての検査項目で陰性が確認され次第、マウスのジェノタイプを調べ ChREBP ノックアウトマウスが得られたか確認し、計画した糖腎系球体の実験評価系(尿中アルブミン量の定量(クレアチニン補正)、腎系球体の病理学的解析(HE 染色、抗体染色)、腎系球体単離からの遺伝子発現解析)を用いて糸球体機能への影響を精査し腎症への影響を解析する予定である。