

Title	Dkk3-Cre BAC Transgenic Mouse Line : A Tool for Highly Efficient Gene Deletion in Retinal Progenitor Cells
Author(s)	佐藤, 茂
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/48938
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	佐藤 茂 <small>しげる</small>
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 21562 号
学位授与年月日	平成 19 年 9 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学位論文名	Dkk3-Cre BAC Transgenic Mouse Line : A Tool for Highly Efficient Gene Deletion in Retinal Progenitor Cells (Dkk3-Cre BAC トランスジェニックマウスライン : 網膜前駆細胞における高効率な遺伝子不活化のためのツールの開発)
論文審査委員	(主査) 教授 不二門 尚 (副査) 教授 吉峰 俊樹 教授 戸田 達史

論文内容の要旨

[目 的]

従来のノックアウト (KO) マウスを用いた遺伝子の機能解析では、しばしば KO マウスが胎児期や新生児期に致死となる表現型を示し、発生後期や成体における遺伝子機能を調べるのが困難になる。Cre/loxP システムを用いたコンディショナルノックアウト (CKO) マウスシステムでは空間的・時間的制御下での遺伝子不活化が可能になり、胎児・新生児致死を回避し、発生後期や成体における遺伝子の機能解析が可能になる。これまでに、網膜前駆細胞に Cre 組み換え酵素 (Cre) を発現する多くのトランスジェニック (Tg) マウスのラインが報告されている。しかしそれらには、網膜における組み換えが不均一であったり、網膜以外の領域に広く Cre が発現するなどの問題がある。そのため、網膜前駆細胞特異的かつ均一に Cre を発現する Tg マウスラインを開発することは、網膜発生における遺伝子ネットワークを解明するのに非常に役立つと考えられる。本研究では、*Dickkopf3* (*Dkk3*) が胎児期網膜前駆細胞に特異的に発現することを示し、bacterial artificial chromosome (BAC) を用いて *Dkk3* プロモーター制御下に Cre を発現させるトランスジェニックマウスを複数作成した。その中で、Cre の発現プロファイルを検討し、最も均一に組み換えを起こすライン (D9) を選定した。更にこのラインを *Otx2 flox* マウスラインと交配することにより *Otx2* CKO マウスを作成し、その表現型を解析した。

[方法ならびに成績]

マウスにおける *Dkk3* の空間的・時間的発現パターンを詳細に調べるためにホールマウント及びセクション *in situ* hybridization を行った。その結果、胎児期には網膜 Neuroblastic layer (NBL) に限局して発現することが分かった。発生期の NBL は網膜前駆細胞と新たに生まれたニューロンもしくはグリアで形成されていることが知られているため、*Dkk3* のプロモーター制御下に Cre を発現する Tg マウスを作成すれば、ほとんど全ての網膜前駆細胞で特異的に Cre を発現するラインが作成できる可能性があると考えた。そのようなマウスを作成するために Cre 遺伝子を *Dkk3* 遺伝子領域に組み込んだ改変 BAC コンストラクトを用い、Dkk3-Cre BAC Tg マウスを作成した。実際に網膜前駆細胞に Cre が発現しているかを免疫染色で検討したところ、胎生 13.5 日の網膜では Cre 陽性細胞は網膜前駆細胞

胞マーカーである Pax6 と Chx10 陽性であった。生体における Cre の組み換え活性の検討のために、レポーターマウスラインである CAGCATZ マウスラインとの交配を行い、X-gal 染色で組み換え効率を検討した。X-gal 染色陽性細胞は胎生 10.5 日に網膜においてはじめて検出された。その後発生の進行に伴い陽性細胞は増加した。胎児期においては X-gal 染色陽性細胞はほぼ網膜に限局することが分かった。成体網膜では、ほぼ全ての細胞が X-gal 染色陽性であり、このことからほぼ全ての網膜前駆細胞が Cre を発現し組み換えを起こしたと考えた。次に Dkk3-Cre BAC Tg マウスが胎児致死を回避できるかを検討するために、KO マウスが胎児致死になることが知られる *Otx2* 遺伝子の flox

論文審査の結果の要旨

網膜の発生や生理機能を生体レベルで研究する上で、網膜特異的コンディショナルノックアウト (CKO) マウスのシステムを開発することは重要である。しかし、現在までのところ、網膜前駆細胞特異的に Cre リコンビネースを発現する適切なマウスラインは知られていない。本研究では、*Dkk3* mRNA が、胎児期マウスにおいて網膜前駆細胞に強く発現することを見出した。また、*Dkk3* のプロモーター制御下に Cre リコンビネースを組み込んだ BAC コンストラクトを用いて、トランスジェニックマウスを作成した。これを CAGCATZ レポーターマウスと交配し、生体での遺伝子組み換えを確認したところ、D9 ラインでは、成体においてほぼすべての網膜細胞が X-gal 染色陽性となった。また *Otx2*^{flox} マウスと交配し得られた *Otx2*CKO マウスは胎児致死を回避し、生殖能も確認できた。本研究で作成した *Dkk3*-Cre マウスは網膜における遺伝子機能解析のための CKO マウス作成に非常に有用であると考えられ、博士 (医学) の学位授与に値する。