

筑 波 大 学

博 士 （ 医 学 ） 学 位 論 文

Simple generation of hairless mice for *in vivo* imaging

(*in vivo* imaging のためのヘアレスマウス
の作製方法)

2 0 1 7

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

星 野 貴 一

目次

第 1 章 背景	5
<i>in vivo</i> イメージング	5
ヘアレスマウス	5
<i>Hr</i> 遺伝子	6
毛周期と Wnt シグナル経路	8
CRISPR/Cas9 システム	8
第 2 章 目的	10
第 3 章 材料と方法	11
実験動物	11
ベクターの構築	11
マイクロインジェクション	12
ゲノム PCR とシーケンス解析	13
インドシアニンググリーン (ICG) 充填チューブのイメージング	13
近赤外蛍光タンパク (iRFP) 発現胚のイメージング	14
RNA 抽出と cDNA 合成	14
採血	15
血液学的検査	15

血液生化学的検査	16
第 4 章 結果	17
CRISPR/Cas9 システムによるヘアレスマウスの作製	17
遺伝性と遺伝子発現	18
無毛の表現型	19
<i>Hr^{em1Utr/em1Utr}</i> マウスの <i>in vivo</i> イメージング	20
第 5 章 考察	22
新規ヘアレスマウスの作製	22
無毛の重要性	22
ヘアレスマウスの哺育能力	23
<i>Hr^{em1Utr}</i> mRNA の定型外翻訳	23
iRFP 発現胚の <i>in vivo</i> イメージング	25
結論	26
第 6 章 今後の展望	27
第 7 章 図表	28
図 1 マウスの Hr タンパクのドメイン	28
図 2 毛周期と Wnt シグナル経路	29
図 3 CRISPR/Cas9 システムの二本鎖切断の模式図	30

図 4	<i>pX330-Hr51</i> の模式図	31
図 5	<i>pX330-Hr51</i> ベクターのトランスフェクション	32
図 6	ファウンダーマウス #70 の系統図	34
図 7	野生型マウス、 <i>Hr^{em1Utr/em1Utr}</i> マウス、 <i>Hr^{hr/hr}</i> マウスの RT-PCR	35
図 8	<i>Hr^{em1Utr/em1Utr}</i> マウスの経時的変化	36
図 9	<i>Hr^{hr/hr}</i> マウスの経時的変化	37
図 10	野生型マウスと <i>Hr^{em1Utr/em1Utr}</i> マウスの体重の変化	38
図 11	ICG 充填チューブを移植した <i>Hr^{em1Utr/em1Utr}</i> マウスの <i>in vivo</i> イメージング	39
図 12	iRFP 発現マウスと交配した <i>Hr^{em1Utr/em1Utr}</i> マウスの <i>in vivo</i> イメージング	40
図 13	正常な <i>Hr</i> 遺伝子と変異型 <i>Hr</i> 遺伝子のアミノ酸配列	41
表 1	本研究に使用したプライマーの一覧	42
表 2	CRISPR/Cas9 システムを用いた <i>Hr</i> 変異マウスの作製	43
表 3	<i>pX330-Hr51</i> ベクターの off-target 解析	44
表 4	血液学的検査	45
表 5	血液生化学的検査	46
引用文献	47

謝辭.....	56
---------	----

第1章 背景

in vivo イメージング

in vivo イメージングは非侵襲的に標的を検出し、分子の位置を視覚化するために必要不可欠な実験方法である。インドシアニンググリーン (indocyanine green: ICG) は一般的な蛍光分子で、ヒトの臨床現場で用いられている[1]。ICG はシアニン色素であり、肝臓に取り込まれて胆汁中に排泄される[2]。タンパク結合時の ICG は 800 nm で隆起し、840 nm の蛍光を発する[3]。

近赤外蛍光タンパク質 (near-infrared fluorescent protein: iRFP) が過剰発現すると、外部からビリベルジンを投与しなくても細胞や組織、そして動物の体全体に強い蛍光を引き起こすことができる[4]。iRFP は 690 nm で隆起し、713 nm の蛍光を発する。600 nm 以下の波長域ではヘモグロビン等の吸収により光が透過せず、また 1300 nm 以上の波長域でも水の吸収により光が透過されないので、650 nm から 900 nm の近赤外領域に最大隆起波長と最大蛍光波長を持つ iRFP は生体内深部組織のイメージングに適している[5]。

ヘアレスマウス

iRFP を用いた *in vivo* イメージングにより、マウスが生きた状態で蛍光シグナルを検出することが可能になった[6]。しかし、マウスの毛は光を遮断し、吸

収し、散乱する。特に黒い毛は他の色の毛よりも強く吸収する[7][8]。白い毛でさえ光を吸収するので、蛍光シグナルを検出するのは非常に困難である。そのため、*in vivo* イメージングで iRFP シグナルを検出するためには、マウスの毛を除去する必要がある。第 11 染色体にある *FoxN1* 遺伝子を欠損したヌードマウスは無毛形質を示すが[9][10][11]、免疫不全も示すため[12][13]、多くの *in vivo* イメージングの場面での使用には適さない。Hos:HR-1 マウスのような *Hr* 遺伝子 (RefSeq Accession: NM_021877) 変異体ヘアレスマウスは無毛を示すが、免疫には異常を示さない。そのため、このヘアレスマウスは皮膚や免疫や癌の研究だけでなく、*in vivo* イメージングにも有用である[14][15]。実際に、*in vivo* イメージングのために遺伝子改変マウスをヘアレスマウスと戻し交配することがある[16]。しかしながら、*in vivo* イメージングのためのレポーター遺伝子と *Hr* 変異遺伝子の両遺伝子を持つマウスを作製するには時間を多くの要する。さらに、レポーター遺伝子が *Hr* 遺伝のある第 14 番染色体に存在する場合、両方の変異を導入するのは困難である。その上、これらの交配により遺伝背景が乱れる可能性がある。

Hr 遺伝子

Hr 遺伝子はマウス (第 14 染色体) やラット (第 15 染色体) やヒト (第 8 染

色体)等に存在し、約 130kDa の核内転写因子をコードしている。アミノ酸の長さはマウスが 1182、ラットが 1181 (マウスとの相同性が 95%)、ヒトが 1189 (マウスとの相同性が 80%) であり、その機能は保存されている。Hr タンパクは核内移行シグナル[17]、核マトリックス標的シグナル[18]、DNA に結合する性質を持つ zinc-finger[19]、レチノイン酸受容体関連オーファン受容体 (ROR α) 相互作用ドメインとして機能する LXXLL モチーフが二つ (LCRLL 及び LCELL) [20]、甲状腺ホルモンレセプター (TR) 相互作用ドメインとして機能する FXXFF モチーフが二つ (LDSII 及び VSDLI) [20]、ビタミン D 受容体 (VDR) シグナル経路を抑制する三つの repression domain (RD) [21]、及びヒストン脱メチル化酵素活性を持つ Jumonji C (JmjC) の機能的ドメインを持ち[19] (図 1)、以下の二つの異なる経路で標的遺伝子を制御していることが報告されている。一つ目の経路では、TR[21]や VDR[19]や ROR α [22]を介して DNA に結合して、転写を抑制する。この経路が毛周期を調整していると考えられている[20]。二つ目の経路では、p53 と p53 応答配列に結合して、p53 が制御する経路に影響を与える[23]。Hr と核内受容体のタンパク相互作用が分かっているにも関わらず、実際に Hr が核内受容体を介して転写抑制する分子的機構についてはまだ解明されていない。

毛周期と Wnt シグナル経路

毛は周期的に成長と脱毛を繰り返す。その周期は毛周期と呼ばれ、成長期、退行期、休止期の3つに分類されている[24]。成長期では毛包が再生して、毛が伸長する。退行期では毛の伸長が止まり、毛包が収縮し始める。休止期では、毛包が完全に収縮して脱毛する（図 2）。毛は毛包内に存在する毛包幹細胞が活性化されると伸長を始めるが[25]、活性化には Wnt が重要であると考えられている[26]。遺伝子改変マウスにおいては、Wnt を過剰に発現させると毛包が増加し[27]、Wnt を抑制すると毛及び毛包が形成されない。そのため、Wnt は毛周期の休止期から成長期に移行するためだけでなく、毛包形成にも重要であること分かる。*Hr* 遺伝子は Wnt modulator in surface ectoderm (Wise) を介して Wnt の発現を調整している[28]。*Hr* は Wise を抑制する作用があり、Wise もまた Wnt を抑制する作用がある。*Hr* 遺伝子に変異があると Wise を抑制できなくなり、その結果として Wise によって Wnt が抑制されてしまう。そのため、毛周期は休止期の状態で止まってしまい、*Hr* 遺伝子変異マウスは無毛を示すと考えられる。

CRISPR/Cas9 システム

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) /Cas9

(CRISPR-associated protein-9 nuclease) は外来性ウイルスやプラスミドへの獲得免疫を与える微生物の適応免疫システムとして細菌や古細菌で発見されたものであるが、これを応用して様々な動物に特定の変異を導入するのに非常に有用なツールになった。CRISPR/Cas9 システムは標的配列を認識する guide RNA(gRNA)と RuvC1 と NHN の二つのヌクレアーゼドメインを持つ Cas9 タンパク質で構成される。この二つのヌクレアーゼが部位特異的に DNA 二本鎖切断 (double-strand break : DSB) を引き起こし (図 3)、その結果として非同末端結合 (non-homologous end joining : NHEJ) による挿入欠損変異が起きる [29][30]。CRISPR/Cas9 システムを用いて *Hr* 遺伝子を変異させれば、無毛の遺伝子改変マウスを作製する時間を短縮し、さらに遺伝背景が変化する危険性を排除することができる。

第2章 目的

本研究の目的は、CRISPR/Cas9 システムを用いて *in vivo* イメージングのためのヘアレスマウスの作製方法を確立することである。

第3章 材料と方法

実験動物

C57BL/6J マウスは日本チャールス・リバー株式会社 (Kanagawa, Japan) から購入した。Jcl:CD1 (ICR) マウスは日本クレア株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。iRFP 発現マウスについては Tran らの論文で作製されたもの[8]を使用した。*Hr^{hr/hr}* マウス (RBRC01223) は理研バイオリソースセンターを介してナショナルバイオリソースプロジェクトから提供されたものである。マウスは温度が $23.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ 、湿度が $52.5\% \pm 12.5\%$ で微生物学的にコントロールされた部屋のプラスチックケージ内で飼育されている。飼料は MF diet (Oriental Yeast, Tokyo, Japan)、水はろ過したものをを用いている。本研究における動物実験は筑波大学実験動物取扱規程に従い、筑波大学動物実験委員会の承認を得て行った。

ベクターの構築

gRNA と Cas9 で構成される *pX330* プラスミド (Addgene plasmid 42230) は Feng Zhang 博士から授かったものである [31]。*Hr51 CRISPR F* (5'-caccAGCCCCTGTGAACGGCATTG-3') と *Hr51 CRISPR R* (5'-aaacCAATGCCGTTTACAGGGGCT-3') のオリゴヌクレオチドをアニーリン

グし、Mizuno らの報告の通りに *pX330* の挿入部位に挿入した[32]。構築されたプラスミドは、*pX330-Hr51* と表記した。*p2color-Hr51 F* (5'-aattAGCCCCTGTGAACGGCATTGTGG-1 3') と *p2color-Hr51 R* (5'-ggccCCACAATGCCGTTTCACAGGGGCT-3') のオリゴヌクレオチドをアニーリングし、*p2color* ベクターの挿入部位に挿入した。この二つのプラスミドを Mizuno らの報告の通りに HEK293T 細胞にトランスフェクションし、蛍光を測定した[32]。

マイクロインジェクション

雌の C57BL/6J マウスに 5 units の妊馬血清性性腺刺激ホルモン (pregnant mare serum gonadotropin : PMSG) を腹腔内投与し、その 48 時間後に 5 units のヒト絨毛性ゴナドトロピン (human chorionic gonadotropin) を腹腔内投与し、雄の C57BL/6J マウスと交配した。卵管膨大部から受精卵を採取した。標準プロトコルに沿って *pX330-Hr51* DNA ベクター (環状 DNA、5 ng/μl) を前核にマイクロインジェクションした[33]。その後、マイクロインジェクションした前核期胚を偽妊娠状態の ICR マウスの卵管に移植した。

ゲノム PCR とシーケンス解析

ファウンダーマウス (3 週齢) のスクリーニングには、尾から得たゲノム DNA を使用した PCR 法を用いた。PCR 増幅産物はマイクロチップ電気泳動装置の MCE-202 MultiNA (Shimadzu, Kyoto, Japan) で泳動した。off-target 効果は PCR 法とダイレクトシーケンス法で調べた [32]。PCR は AmpliTaq Gold® 360 Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) と表 1 で示したプライマーを用いた。PCR 産物は Fast Gene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon Gene Co., Ltd, Tokyo, Japan) で精製し、DNA 配列は BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) と Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて解析した。

インドシアニンググリーン (ICG) 充填チューブのイメージング

直径 2 mm、長さ 14 mm の円柱状のチューブに ICG を充填した。ICG 充填チューブは *in vivo* イメージングシステム (IVIS スペクトラム; PerkinElmer, Wellesley, MA) と CT スキャナー (ALOKA La Theta LCT-100; Hitachi, Tokyo, Japan) で検出した。解析したマウスはイソフルランで麻酔した。流量は 1 l/min に設定し、麻酔導入濃度は 5%、麻酔維持濃度は 2~3% で実施した。ICG 充填チューブは腹腔内に挿入した。蛍光シグナルの解析には Living イメージソフト

ウェア 4.0 (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA) を用いた。三次元 (3D) 再構成には OsiriX Lite 7.5 (Pixmeo, Bernex, Switzerland) を用いた。

近赤外蛍光タンパク (iRFP) 発現胚のイメージング

iRFP 蛍光シグナルは *in vivo* イメージングシステム (IVIS スペクトラム) で検出した。雄の iRFP 発現マウスと雌のヘアレスマウスを交配し、子宮内にある胎齢 10.5 日 (day post coitum : dpc) の iRFP 発現胚を評価した。解析したマウスはイソフルランで麻酔した。流量は 1 l/min に設定し、麻酔導入濃度は 5%、麻酔維持濃度は 2~3% で実施した。また、開腹前に麻酔濃度 5% のイソフルランを過剰投与することにより安楽死を実施した。蛍光シグナルの解析には Living イメージソフトウェア 4.3.1 (Caliper Life Sciences) を用いた。

RNA 抽出と cDNA 合成

皮膚の RNA は Isogen (Nippon Gene Co., Ltd) を用いて取扱説明書に基づいて抽出した。cDNA は Superscript III reverse transcriptase (Thermo Fisher Scientific Inc.) と oligo(dT) primer (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて合成した。PCR は AmpliTaq Gold® 360 Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) と表 1 で示したプライマーで実施した。PCR 産物は Fast Gene Gel/PCR

Extraction Kit (Nippon Gene Co., Ltd) を用いて精製し、塩基配列は BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc.) で解析した。

採血

誤差を最小限にするため、解析の前日より絶食させて採血は同じ時刻（10 時～12 時）に実施した。血液は 1 ml のシリンジと 26 ゲージの注射針を用いて、ペントバルビタールによる麻酔下で開腹後に後大静脈から採取した。血液学的検査のために、0.1 ml の血液は Na₂-EDTA (Dojindo Molecular 1 Technologies, Kumamoto, Japan) が入っている 1.5 ml チューブに分注し、すぐに解析した。残りの血液は血液生化学的検査のために 1.5 ml チューブに分注し、30 分間の静置後に 5 分間の遠心分離 (3000×g) して、血清を得た[34]。

血液学的検査

血液学的検査は Celltac α (MEK-6458; Nihon Kohden, Tokyo, Japan) を用いて実施した。検索項目は白血球数 (WBC)、赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン量 (HGB)、ヘマトクリット値 (HCT)、平均赤血球容積 (MCV)、平均赤血球へ

ヘモグロビン量(MCH)、平均赤血球ヘモグロビン濃度(MCHC)、血小板数(PLT)を調べた。測定方法は Tran らの報告と同じである[8]。

血液生化学的検査

血液生化学的検査の測定は Fuji Dri-chem 7000 (Fuji-Film, Tokyo, Japan) を用いて実施した。検査項目はアスパラギン酸アミノ基転移酵素、アラニンアミノ基転移酵素、アルカリホスファターゼ、血糖、尿素窒素、クレアチニン、総タンパク質、アルブミン、総ビリルビン、カルシウム、無機リン、総コレステロール、中性脂肪、ナトリウム、カリウム、クロールを調べた。測定方法は Tran らの報告と同じである[8]。

第 4 章 結果

CRISPR/Cas9 システムによるヘアレスマウスの作製

CRISPR/Cas9 システムによってヘアレスマウスを作製するために、*Hr* 遺伝子を標的とした。UCSC Genome Browser によると、*Hr* 遺伝子は第 14 染色体に位置し、20 のエクソンを持つ。我々は開始コドンのあるエクソン 3 を標的とした (図 4)。off-target 部位の少ない gRNA を設計するために、Web free software である CRISPRdirect を利用した [35]。設計した CRISPR は開始コドンの 51 bp から 73 bp 下流の配列を標的とした。20 bp の標的配列を含む gRNA を *pX330* に挿入し、そのプラスミドを *pX330-Hr51* とした。次に *pX330-Hr51* の切断活性を traffic reporter システムによって調べた [29]。その結果、*pX330-Hr51* は効率的に標的部位を切断できることが示された (図 5)。

次に、5 ng/μl の環状の *pX330-Hr51* を 437 個の C57BL/6J マウス由来の一細胞期胚の前核にマイクロインジェクションした。マイクロインジェクション直後の一細胞期胚において、437 個中 395 個で形態学的異常がみられなかった。これらの正常な外観を保った一細胞期胚を偽妊娠状態の ICR マウスの卵管へ移植した。88 匹の新生仔を得て、そのうちの 6 匹が無毛形質を示した。MultiNA を用いたヘテロ二本鎖移動度分析 (HMA) で、これら 88 匹のファウンダーマウ

スを解析した結果、67 匹（6 匹のヘアレスマウスを含む）に挿入欠損変異が認められた（表 2）。

pX330-Hr51 自体が染色体に組み込まれていないかを調べるために、ファウンダーマウスのゲノム DNA と Cas9 を検出するためのプライマー（表 1）で PCR を実施した。その結果、PCR 産物が 4 匹のマウスで検出された（表 2）。そのため、*pX330* が挿入されていない 63 匹の *Hr* 遺伝子変異体を持つマウス（5 匹のヘアレスマウスを含む）の作製に成功した（表 2）。*pX330-Hr* が染色体に組み込まれたマウスでは *Hr* 遺伝子を標的とした gRNA と Cas9 タンパクが至る所に発現するので、off-target の変異が体細胞や生殖細胞に蓄積していると予想された。雄のファウンダーのヘアレスマウスにおいて off-target 候補部位に変異はみられなかった（表 3）。

遺伝性と遺伝子発現

遺伝性と変異配列の詳細を確かめるために、無毛形質を示した雄ファウンダーのヘアレスマウス#70 を野生型マウスと交配した（図 6A）。そして、11 匹の有毛の F₁ マウスを得た。予期せぬことに、これらのマウスには $\Delta 2$ (TT 欠損)、 $\Delta 5$ (CGGCA 欠損)、+1 (A 挿入) という 3 種類の変異がみられた（図 6B）。次に同じ変異配列を有する個体同士で交配したところ、F₂ ホモ変異体はすべて

無毛だった。これら 3 種類の変異体において表現型に差はみられなかったので、 $\Delta 5$ の変異を Hr^{em1Utr} と名付け、以降の実験はこの変異があるマウスを使用した。

$Hr^{em1Utr/em1Utr}$ マウスと $Hr^{hr/hr}$ マウスの Hr RNA の発現とその配列について調べた。 $Hr^{hr/hr}$ の系統は Hr 遺伝子のイントロン 7 にある自然突然変異の挿入によって無毛の表現型を示すマウスで、*in vivo* の研究に広く利用されている。皮膚から total RNA を採取し、3 組のプライマー（エクソン 3 からエクソン 4、エクソン 7 からエクソン 12、エクソン 13 からエクソン 19）で RT-PCR を実施したところ、すべての条件下で PCR 産物を検出した（図 7B–D）。RT-PCR 産物の配列を確認したところ、 $Hr^{em1Utr/em1Utr}$ マウスの cDNA において CRISPR によって導入された 5 bp の欠損を検出した（図 6B）。これらの結果から CRISPR によって導入した変異アレルから変異 RNA が発現し、無毛の表現型になることが示唆された。

無毛の表現型

$Hr^{em1Utr/em1Utr}$ マウスと $Hr^{hr/hr}$ マウスの脱毛の経時的変化を調べた。 $Hr^{em1Utr/em1Utr}$ マウスは最初に 4 週齢で腹部が脱毛した。次に、4 週から 8 週間にわたって腹部から背部へ脱毛が進行した（図 8）。対照的に、 $Hr^{hr/hr}$ マウスは 2 週齢から脱毛が始まった[36]。頭側から尾側へ急速に脱毛が進行し、4 週齢で完全な無毛にな

った (図 9)。野生型マウスと比較すると $Hr^{em1Utr/em1Utr}$ マウスは成長が遅かった (図 10)。しかしながら、7 週齢以降では体重に差はなかった。血液学的検査と血液生化学的検査において、 $Hr^{em1Utr/em1Utr}$ マウスと野生型マウスを比較すると、赤血球に関係する項目でわずかに差がみられた (表 4、表 5)。なお、この表現型は $Hr^{hr/hr}$ マウスと一致している [37][38]。

$Hr^{em1Utr/em1Utr}$ マウスの *in vivo* イメージング

$Hr^{em1Utr/em1Utr}$ マウスが *in vivo* イメージングに利用可能かを確かめるために、ICG 充填人工チューブを $Hr^{em1Utr/em1Utr}$ マウスの腹腔内に移植した。チューブの位置は CT で、蛍光シグナルの位置は IVIS でそれぞれ検出した。その結果、チューブの位置と ICG 蛍光シグナルの位置が一致した (図 11)。以上のことから、 $Hr^{em1Utr/em1Utr}$ マウスの腹腔内の ICG 蛍光シグナルは容易に検出できることが示唆された。次に、 $Hr^{em1Utr/em1Utr}$ マウスが生体の iRFP の検出に利用可能かを確かめるために、雌の $Hr^{em1Utr/em1Utr}$ マウスと雄の iRFP 発現マウスを交配した。子宮内の iRFP 発現胚を 10.5 dpc に検出した。iRFP 発現胚は冠状面 (図 12A) と矢状面 (図 12B) と横断面 (図 12C) で検出された。生物発光イメージングの断層撮像法により 3D 再構築をすると、3つの iRFP 発現胚が検出された (図 12D)。開腹して確認すると、iRFP 発現胚の位置は 3D 再構成の位置とほとんど一致し

た（図 12E）。しかしながら、 $Hr^{em1Utr/em1Utr}$ マウスの子宮には 3 つではなく 4 つの iRFP 発現胚が存在した（図 12F）。これらの結果から、 $Hr^{em1Utr/em1Utr}$ マウスの子宮にある iRFP 発現胚は検出できることが示唆された。

第5章 考察

新規ヘアレスマウスの作製

CRISPR/Cas9 システムを用いて、我々は新規のヘアレスマウス $Hr^{em1Utr/em1Utr}$ を作製した。この系統は完全に脱毛し、ICG や iRFP による *in vivo* イメージングを可能にした。この系統は赤血球に関してわずかな異常が観察されたが、これは $Hr^{hr/hr}$ マウスでも観察される表現型であり [37][38]、通常の生物活動や長期の *in vivo* イメージングを妨げるような大きな異常ではない。これらの結果から、CRISPR/Cas9 システムにより作製されたヘアレスマウスは *in vivo* イメージングに有用であることが示された。

無毛の重要性

毛は光を遮断し、吸収し、散乱するので、*in vivo* イメージングを実施する前に毛を除去する必要がある。遺伝子操作を必要としない毛の除去方法はいくつかある。カミソリで毛を剃ることは容易に可能であるが、出血して瘡蓋を形成するリスクがある。瘡蓋もまた光を遮断し、吸収し、散乱する。徐毛クリームも利用されることがあるが、これは手間と時間がかかる。3D *in vivo* イメージングの場合は全身の毛を除去する必要があるので、特に時間がかかる。これらとは対照

的に *Hr* 変異体であるヘアレスマウスは毛の除去処理することなく、すぐに *in vivo* イメージングを開始できる。これは多くのマウスを使用する場合や長期に何回も *in vivo* イメージングを繰り返すときに、大きな長所となる。

ヘアレスマウスの哺育能力

一般的に、雌の $Hr^{hr/hr}$ マウスは乳汁分泌異常により出産したマウスの哺育を失敗する。Hos:HR-1 マウスのようなアウトブレットの $Hr^{hr/hr}$ マウスでは出産したマウスの哺育をすることができるが、C57BL/6J の遺伝背景をもつ $Hr^{em1Utr/em1Utr}$ マウスも哺育に失敗した。そのため、我々の観察では低い哺育能力は遺伝背景に依存するという提案を支持している[39]。

Hr^{em1Utr} mRNA の定型外翻訳

分子レベルでは *Hr* 変異が脱毛を引き起こす機序について完全に解明されていないが[40]、いくつかの *Hr* 変異体マウスが報告されている。Gene targeting によって作製された null *Hr* 変異体マウス ($Hr^{-/-}$) は脱毛に加え、皮膚過形成による重度のしわを示す[41]。この系統では、*Hr* 遺伝子のエクソン 7 からエクソン 11 を含む領域が排除され、*Hr* mRNA や Hr タンパクの発現はない。自然突然変異 Hr^{rh-8j} マウスもまた脱毛と皮膚のしわを示す。この動物は *Hr* 遺伝子のエクソ

ン5において、1910と1911の位置のGAがTTに置換したナンセンス突然変異を持っている[42]。*Hr^{th-8j}*変異型 mRNA は、その大部分がナンセンス変異依存 mRNA 分解機構(nonsense-mediated mRNA decay:NMD)によって分解され、皮膚においてわずかに mRNA が検出された[41]。対照的に、*Hr^{hr/hr}*マウスは皮膚のしわがみられないが、脱毛はみられる。この系統はイントロン7に約13 kb のレトロトランスポゾンが挿入され[39]、野生型 mRNA と2つの延長した mRNA が発現している[41]。これらの延長した mRNA は異常なスプライシングから生じ、ドミナントネガティブに作用して脱毛を引き起こすと予想されている。*Hr* null 変異により脱毛と重度な皮膚のしわの両方が生じていることが、これらの過去の報告から示唆されている。逆に、*Hr* の部分的な阻害では脱毛を示すが、重度な皮膚のしわはみられない。興味深いことに、*Hr^{hr/hr}*マウスは完全な脱毛を示すが、皮膚のしわはとても軽度である。加えて、*Hr^{em1Utr}* mRNA は分解されていなかった(図7B-D)。本研究では *Hr* 遺伝子のエクソン3を標的とし、標的部位に5 bp の欠損が導入されたマウスを各解析に用いた。理論的には、この変異により終止コドンの出現を伴うフレームシフトが誘発され、この変異 mRNA は NMD によって分解されるはずである(図13A)。しかしながら、野生型と *Hr^{em1Utr/em1Utr}*マウスの間で、mRNA の発現量に大きな差はなかった(図7B-D)。これらの結果は同一フレーム内の本来の開始コドンとは違うメチオニン

をコードする ATG が開始コドンとして機能する定型外翻訳が起こり、N 末端が短くなった Hr タンパクが発現し、この現象が無毛と軽度な皮膚のしわの原因になった可能性が考えられる (図 13A)。このように挿入欠損変異による短くなったタンパクが発現する定型外翻訳は別のグループからも報告されている [43]。本研究において、変異の後方で最初に現れるメチオニンは 103 番目に存在する (図 13B)。仮に 103 番目のメチオニンから定型外翻訳が起きた場合、N 末端が短くなるが報告されているドメインをすべて保持したタンパクが出現するので、N 末端が短くなったことによって生じるタンパク質の立体構造の変化が影響を与えた可能性が考えられる (図 1)。一方で、 $Hr^{hr/hr}$ マウスは C57BL/6Jcl 由来で $Hr^{em1Utr/em1Utr}$ マウスは C57BL/6J 由来なので、表現型の差は遺伝的背景によるものである可能性も否定できない。

iRFP 発現胚の *in vivo* イメージング

生物発光イメージングの断層撮像法による 3D 再構築で、3 つ iRFP 発現胚は確認されたが (図 12D)、開腹後の子宮内には 4 つの iRFP 発現胚がみられた (図 12F)。実際、我々の実験系では 10.5 dpc の隣接する iRFP 発現胚を区別することは困難であった。胚がより成長した妊娠後期であれば、隣接する iRFP 発現胚を区別することは可能かもしれないが、着床から出産直前における子宮内の胚

を解析する方法を確立するには、さらなる研究が必要である。

結論

我々は CRISPR/Cas9 システムを用いて、新規のヘアレスマウスである $Hr^{em1Utr/em1Utr}$ マウスを作製した。このヘアレスマウスは ICG 充填チューブと iRFP 発現マウスの子宮内 *in vivo* イメージングを可能にした。CRISPR/Cas9 システムは *in vivo* イメージングのための遺伝子改変のヘアレスマウスを作製するのに有用であるに違いない。

第 6 章 今後の展望

今後は mRNA の発現の詳細を調べるために定量 RT-PCR を実施して、 $Hr^{em1Utr/em1Utr}$ マウスと自然突然変異体である $Hr^{hr/hr}$ マウスの mRNA 発現量を比較したい。またウェスタンブロット法で Hr タンパクの発現や分子量を確認し、実際に定型外翻訳によって通常の Hr タンパクより短いが変異型 Hr タンパク発現が発現しているかどうかを調べたい。

第 7 章 図表

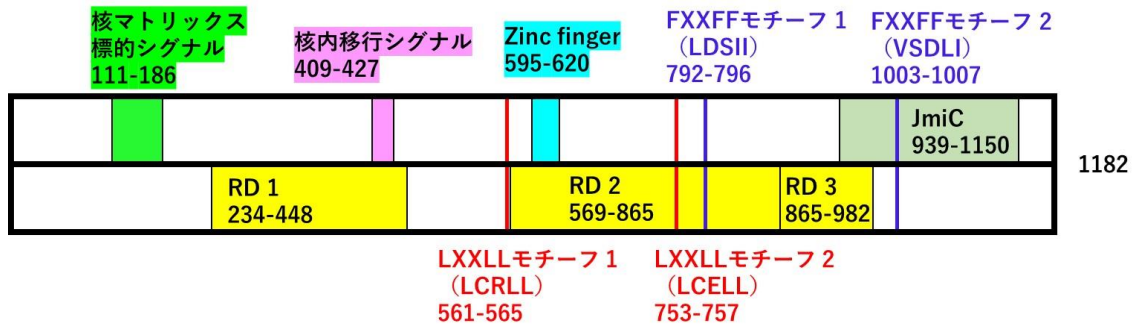


図 1 マウスの Hr タンパクのドメイン

マウスの Hr タンパクのドメインを示した。核マトリックス標的シグナルと核内移行シグナルについては、ヒトで報告されている領域に相同している領域を示した。マウスとヒトで比較したところ、核マトリックス標的シグナルでは 76 のうち 10 がミスマッチであり、核内移行シグナルでは 19 のうち 3 がミスマッチであった。repression domain (RD) 1 と RD2 と RD3 についてはラットで報告されている領域に相同している領域を示した。マウスとラットで比較したところ、RD1 では 215 のうち 42 がミスマッチであり、RD2 では 297 のうち 7 がミスマッチであり、RD3 では 118 のうち 6 がミスマッチであった。

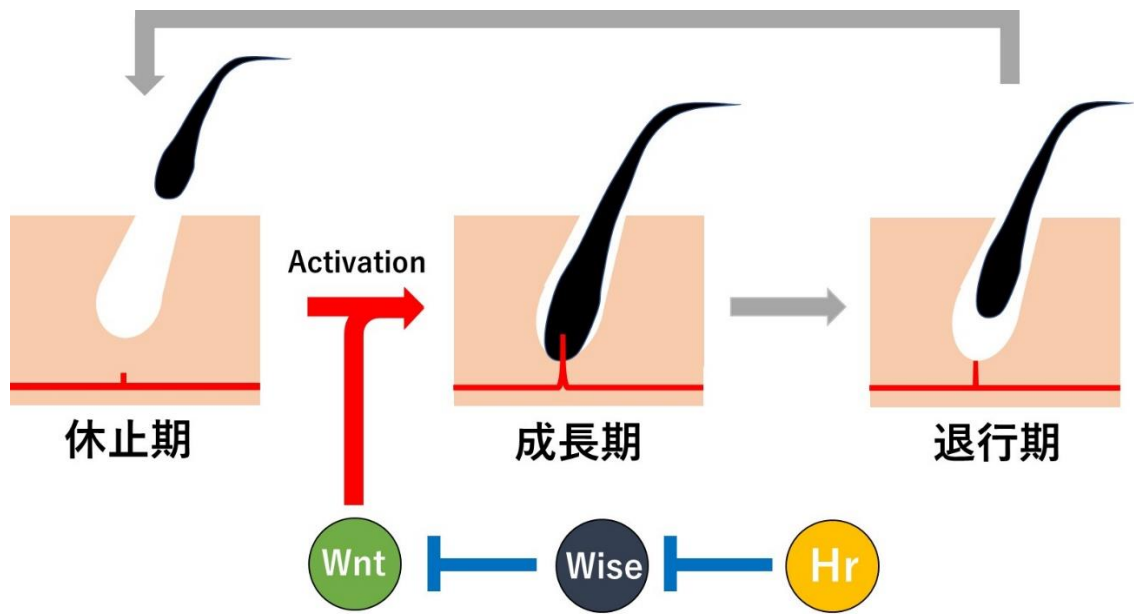


図2 毛周期と Wnt シグナル経路

毛周期と呼ばれ、成長期、退行期、休止期の3つに分類される。成長期では毛包が再生して、毛が伸長する。退行期では毛の伸長が止まり、毛包が収縮し始める。休止期では、毛包が完全に収縮して脱毛する。休止期から成長期に移行するには Wnt が重要であると考えられている。Hr は Wise を介して、Wnt の発現を調整していると考えられている。

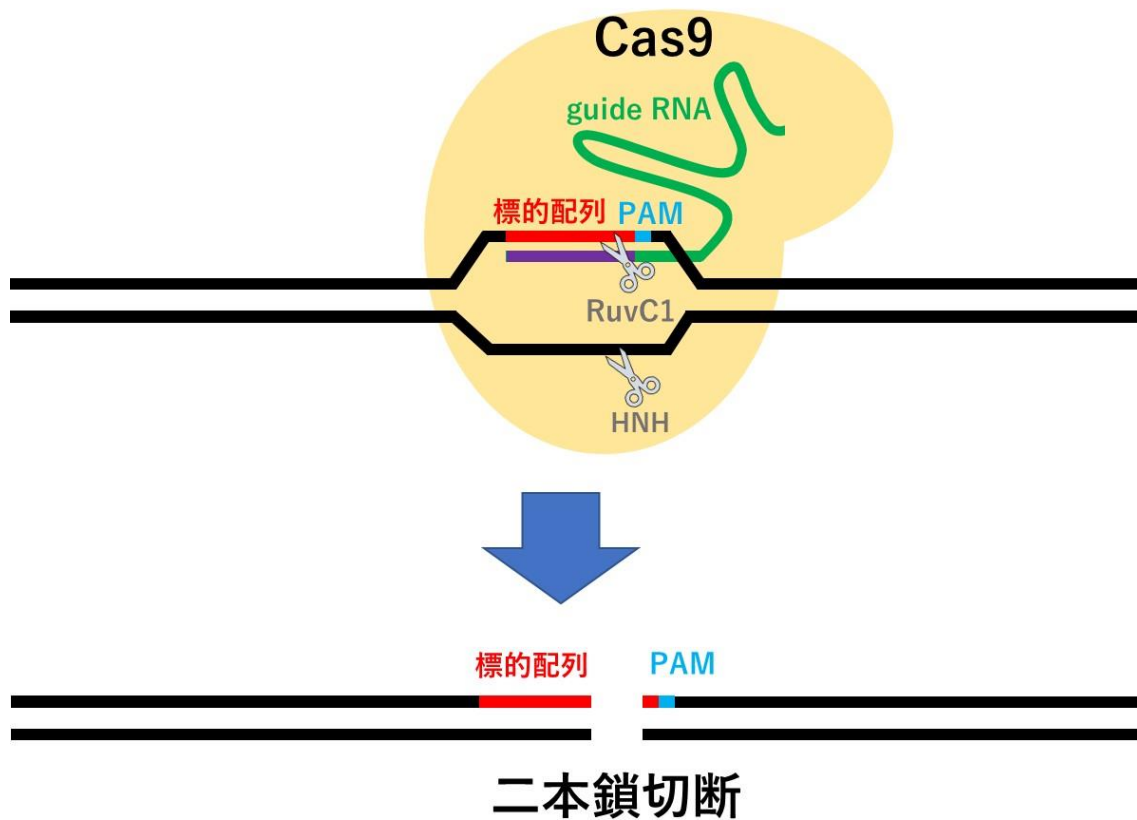


図3 CRISPR/Cas9 システムの二本鎖切断の模式図

guide RNA が標的配列を認識し、Cas9 タンパクを誘導する。Cas9 タンパクの RuvC1 ヌクレアーゼが標的配列側の DNA を切断し、HNH ヌクレアーゼが反対側の DNA を切断して二本鎖切断を引き起こす。

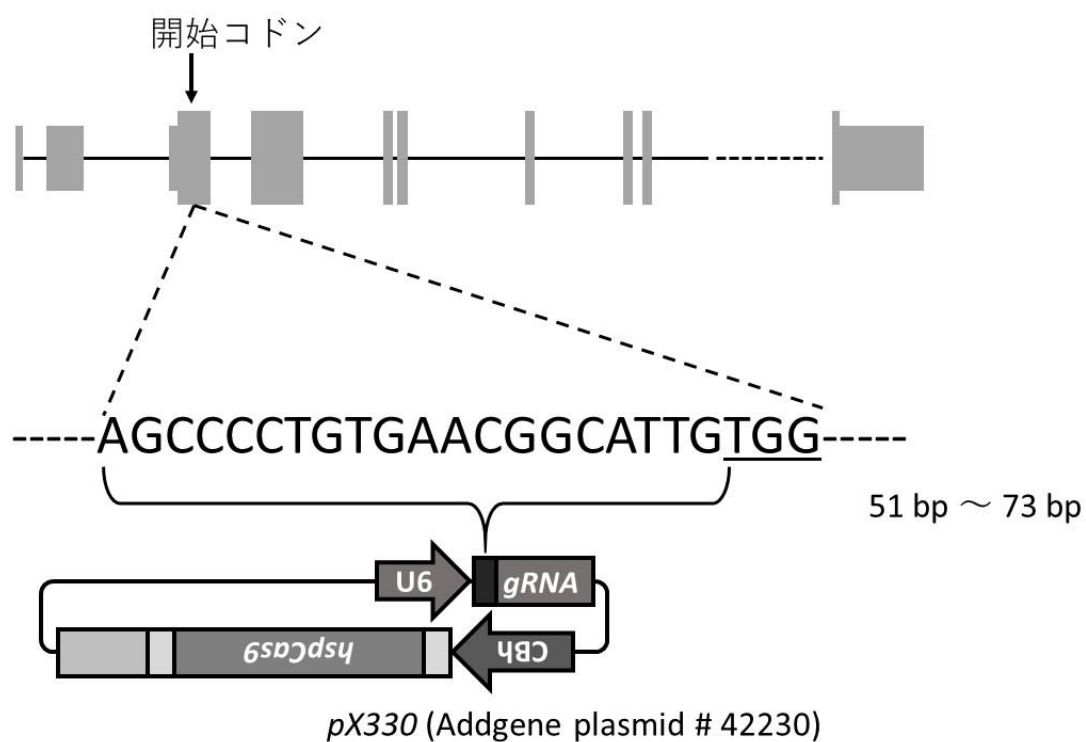


図4 *pX330-Hr51* の模式図

DNA 配列は CRISPR gRNA の標的部位を示している。下線部の文字は protospacer adjacent motif (PAM) 領域を示している。図の上部の太い灰色の四角は翻訳領域、細い灰色の四角は非翻訳領域を示している。

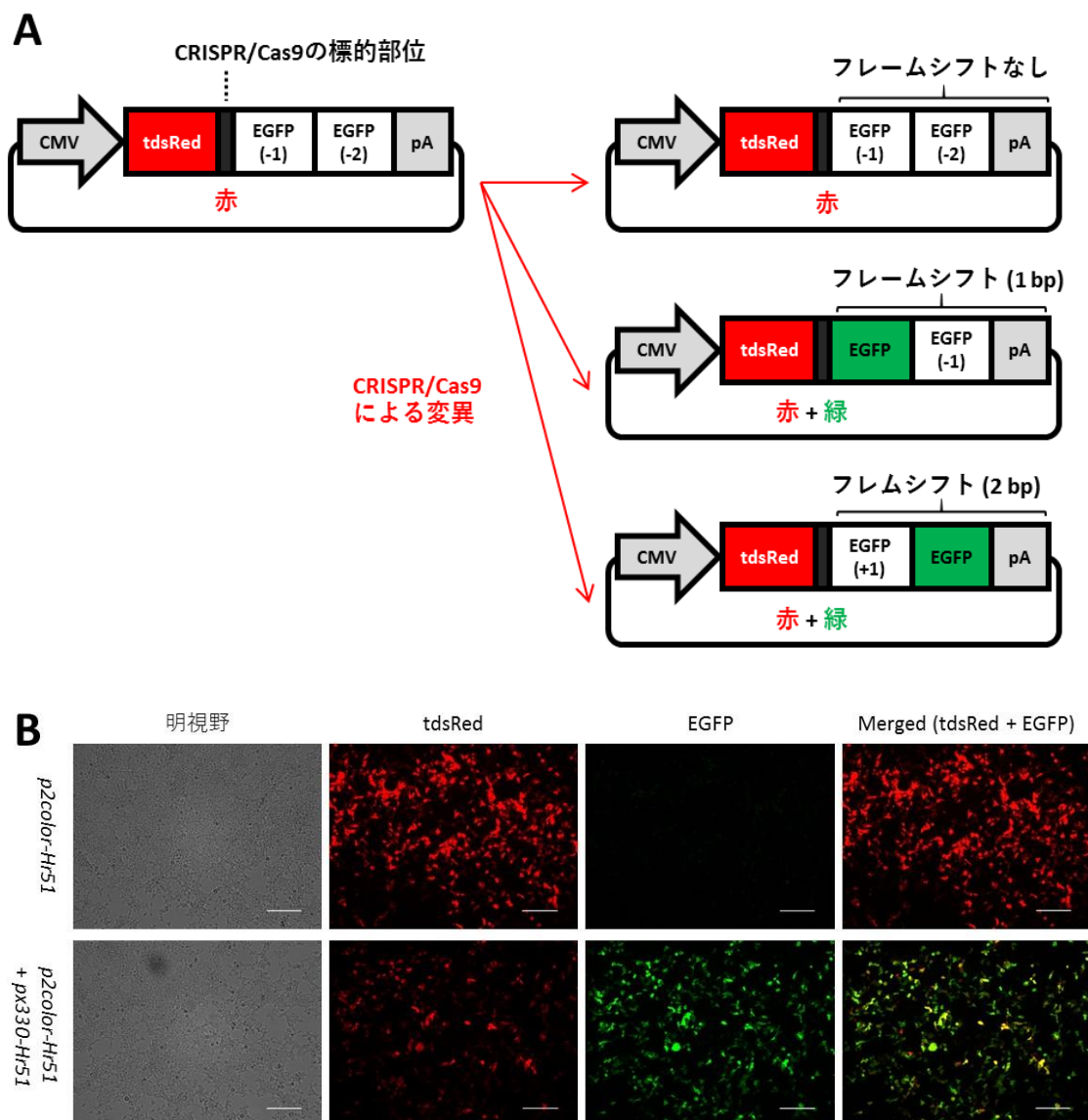


図5 *pX330-Hr51* ベクターのトランスフェクション

*pX330-Hr51*ベクターの切断活性を調べるために、traffic reporterシステムを実施した[29]。(A) tdsRedと最初のEGFPの間に、CRISPR標的配列が挿入されている。このプラスミドは*p2color-Hr51*と表記する。最初のEGFPフラグメント

と次のEGFPフラグメントはリーディングフレームが異なるので、tdsRedだけ翻訳される。*px330-Hr51*から転写・翻訳されたCRISPR/Cas9により二本鎖切断が引き起こされると、非相同末端結合により*p2color-Hr51*にフレームシフトが起きることがある。その結果、最初か次のEGFPが翻訳される。(B) *p2color-Hr51*がトランスフェクションされたHEK293T細胞のみの場合ではtdsRedだけがみられたが、*p2color-Hr51*がトランスフェクションされたHEK293T細胞と*pX330-Hr51*の両方を導入した細胞ではtdsRedとEGFPの両方のシグナルが観測された。スケールバー：200 μm

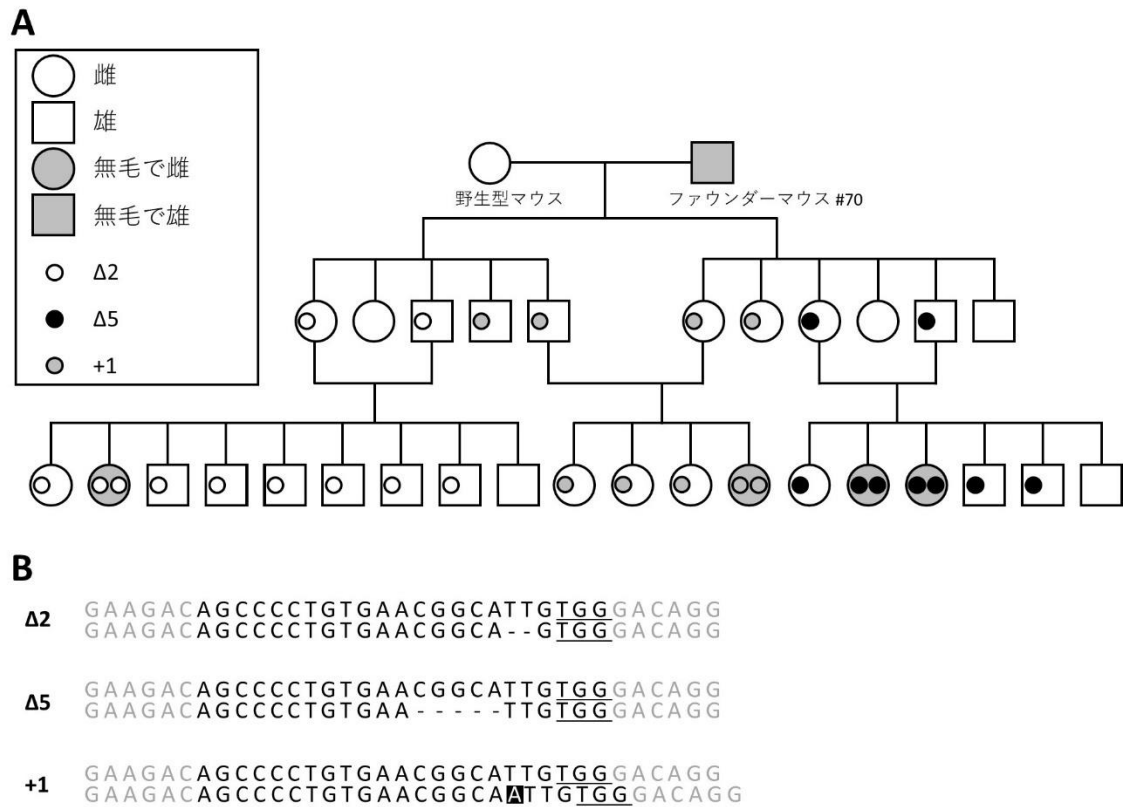


図6 ファウンダーマウス #70 の系統図

(A) 丸は雌、四角は雄を示している。灰色の丸は無毛の雌、灰色の四角は無毛の雄を示している。小さい白と灰色と黒の丸はそれぞれ 2 bp 欠損、5 bp 欠損、1 bp 挿入を示している。(B) ファウンダーマウス #70 には 3 種類の変異がみられた。ハイフンは欠損、黒い四角の白い文字は挿入を示している。下線部の文字は PAM 領域を示している。

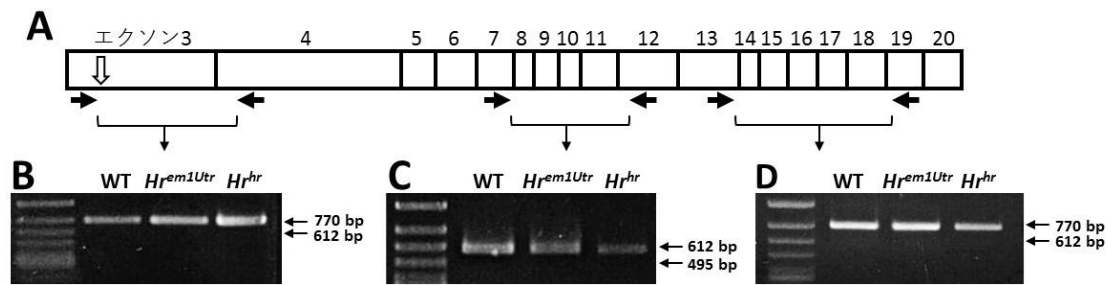
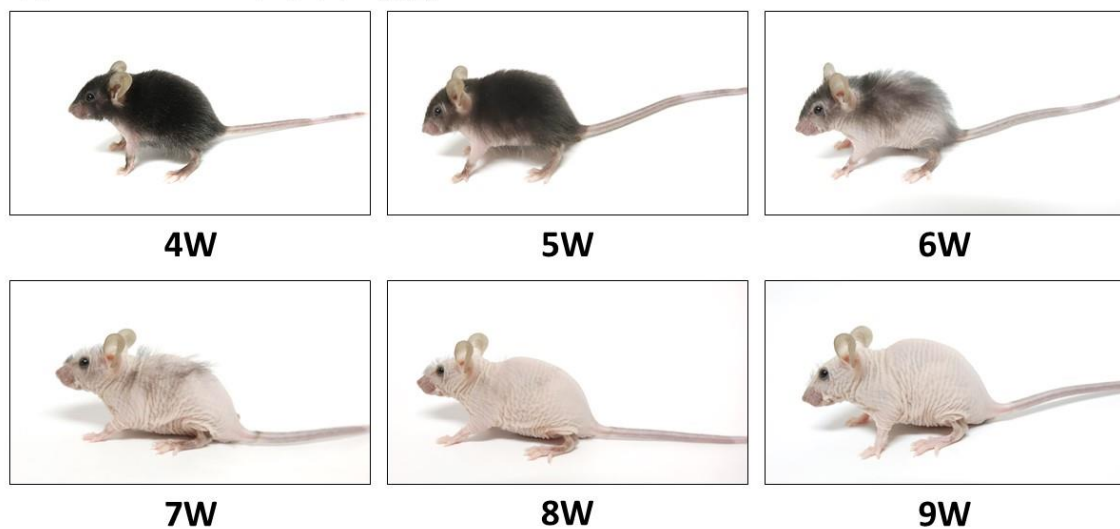


図7 野生型マウス、*Hrf^{em1Utr/em1Utr}*マウス、*Hrf^{hr/hr}*マウスの RT-PCR

(A) RT-PCR の模式図。白い矢印は欠損領域を示す。黒い矢印はプライマーを示している。mRNA の発現を証明するために、(B) エクソン 3 からエクソン 4 までの 755 bp の PCR 産物、(C) エクソン 7 からエクソン 12 までの 588bp の PCR 産物、(D) エクソン 13 からエクソン 19 までの 760 bp の PCR 産物を示した。WT は野生型、*Hrf^{em1Utr}* は *Hrf^{em1Utr/em1Utr}* マウス、*Hrf^{hr}* は *Hrf^{hr/hr}* マウスを示している。

***H^rem1Utr/em1Utr* マウス (雌)**



***Hr^em1Utr/em1Utr* マウス (雄)**

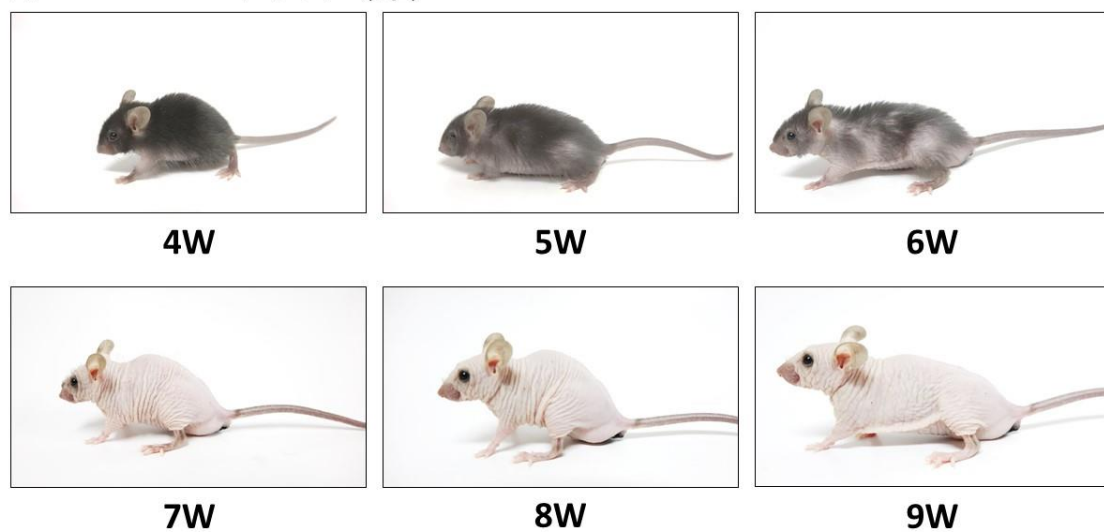
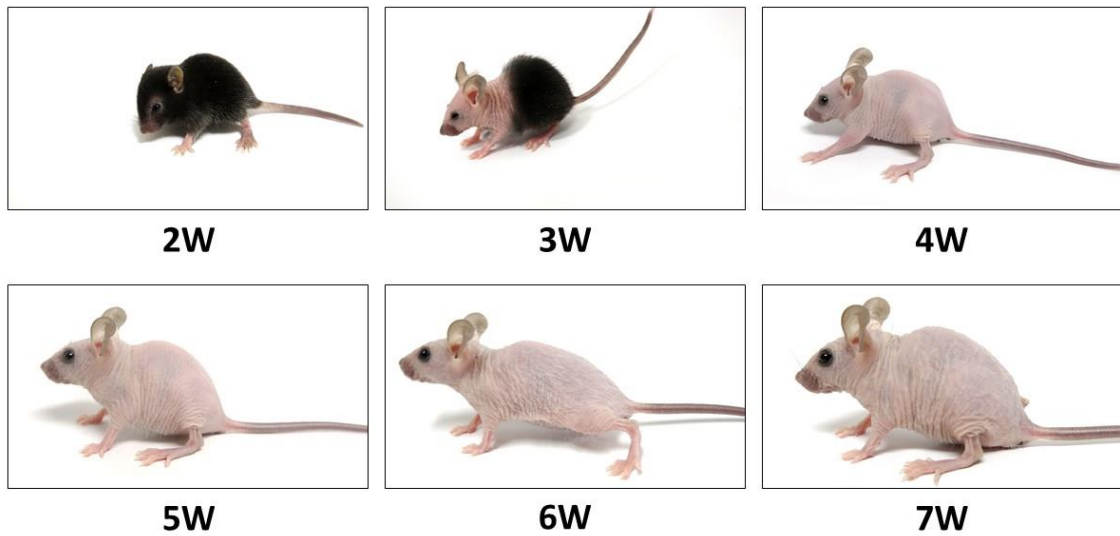


図 8 *Hr^em1Utr/em1Utr* マウスの経時的変化

Hr^em1Utr/em1Utr マウスは雌雄共に、4 週齢で腹部の毛が抜けた。4 週齢以降は背部の毛が徐々に抜けていった。

$Hr^{hr/hr}$ マウス (雌)



$Hr^{hr/hr}$ マウス (雄)

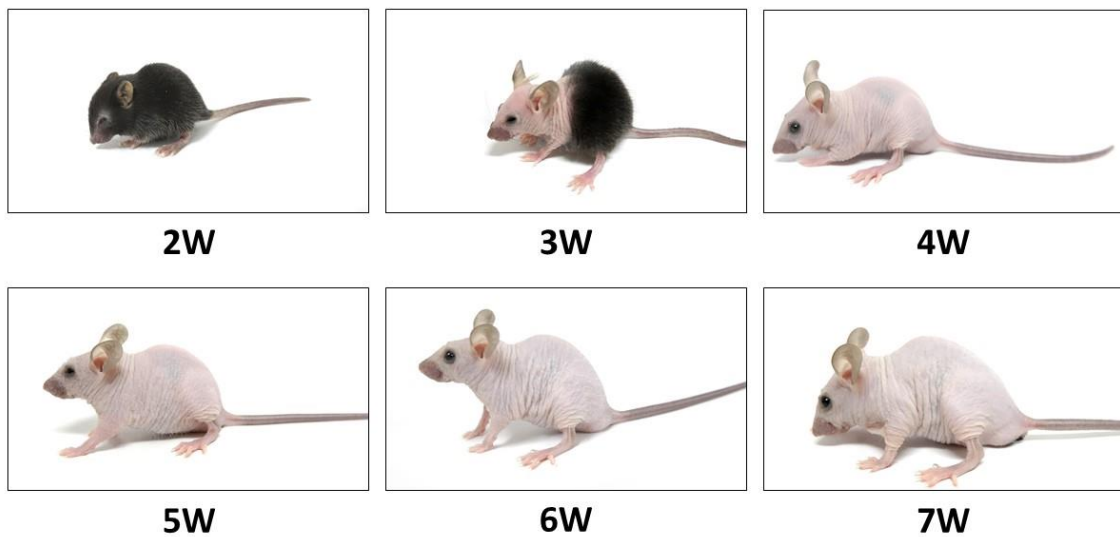


図9 $Hr^{hr/hr}$ マウスの経時的変化

$Hr^{hr/hr}$ マウスは雌雄共に、2週齢で目の周りの脱毛が始まり、頭側から尾側に向けて徐々に脱毛が進行していく。 $Hr^{hr/hr}$ マウスは4週齢で完全なヘアレスマウスになった。

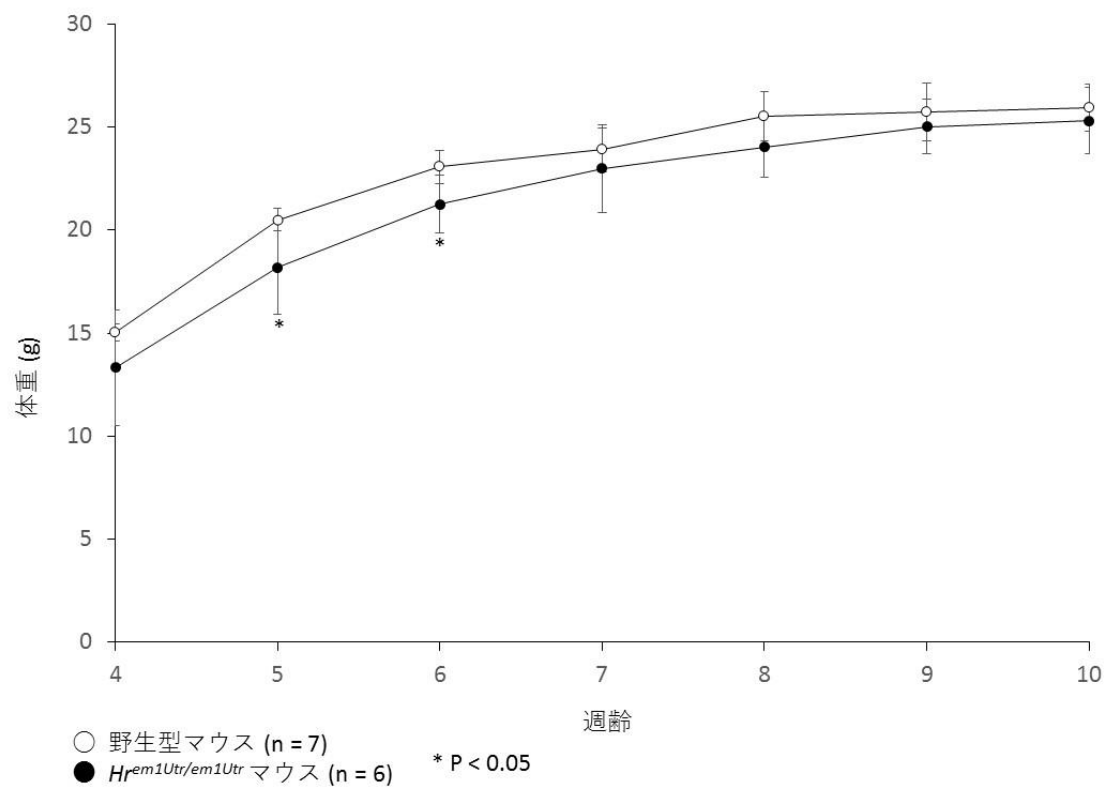


図 10 野生型マウスと $Hr^{em1Utr/em1Utr}$ マウスの体重の変化

雄の野生型マウスと $Hr^{em1Utr/em1Utr}$ マウスの体重を 4 週齢から 10 週齢の間で比較した。野生型マウスと $Hr^{em1Utr/em1Utr}$ マウスの体重は 5 週齢と 6 週齢で有意な差がみられたが、7 週齢以降は差がなかった。

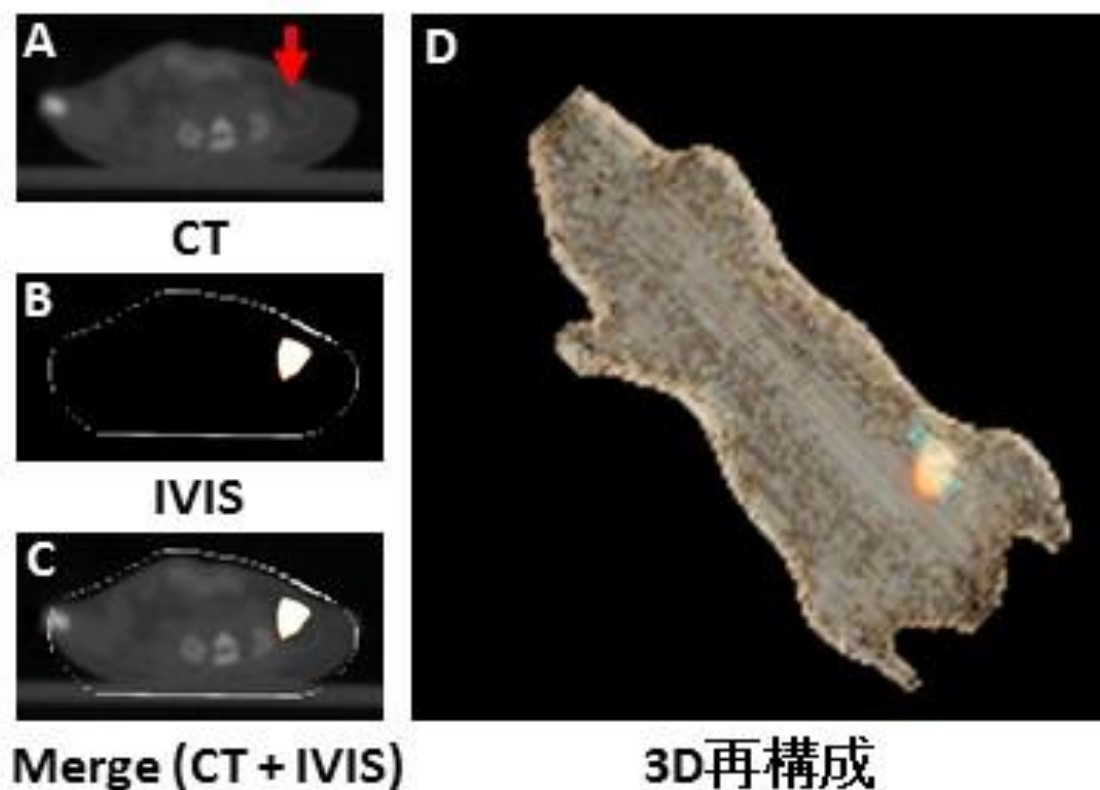


図 11 ICG 充填チューブを移植した $H^{em1Utr/em1Utr}$ マウスの *in vivo* イメージング

(A) CT 断面。赤い矢印は ICG チューブを指している。(B) IVIS 断面。(C) Merge (CT+IVIS) (D) OsiriX Imaging Software によって Merge を 3D 再構築した。オレンジの光は蛍光シグナルを示している。青い光は ICG チューブを示している。745 nm の隆起フィルターと 820 nm 蛍光フィルターを装着した IVIS スペクトラム *in vivo* イメージングシステムを用いて ICG チューブは容易に同定できた。

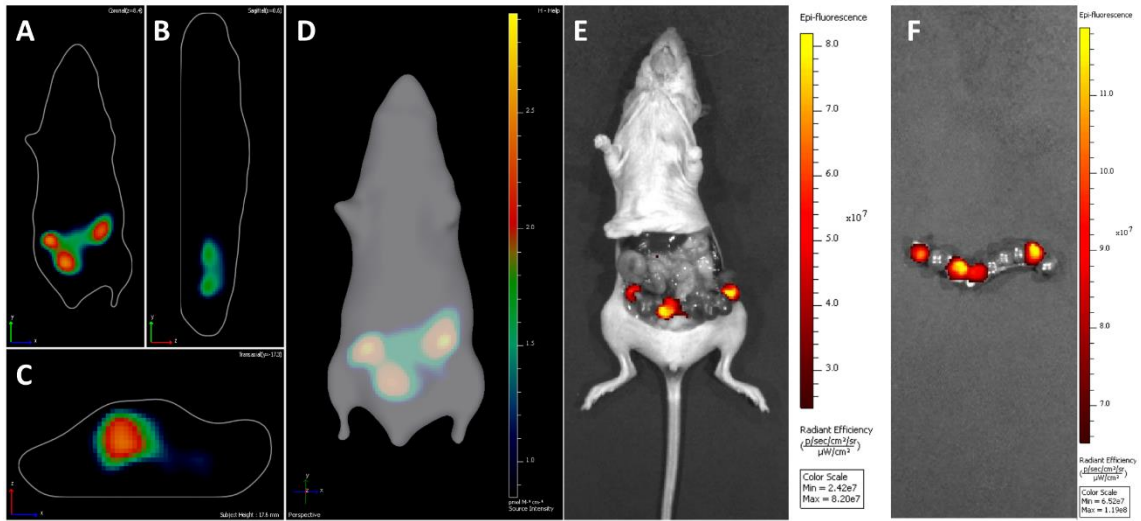


図 12 iRFP 発現マウスと交配した $H^{em1Utr/em1Utr}$ マウスの *in vivo* イメージング

(A) 冠状面。(B) 矢状面。(C) 横断面。(D) 生物発光イメージングの断層撮像法による 3D 再構成。(E) (F) 開腹後の子宮。675 nm の隆起フィルターと 720 nm 蛍光フィルターを装着した IVIS スペクトラム *in vivo* イメージングシステムを用いて iRFP 発現胚 (10.5 dpc) が同定された。

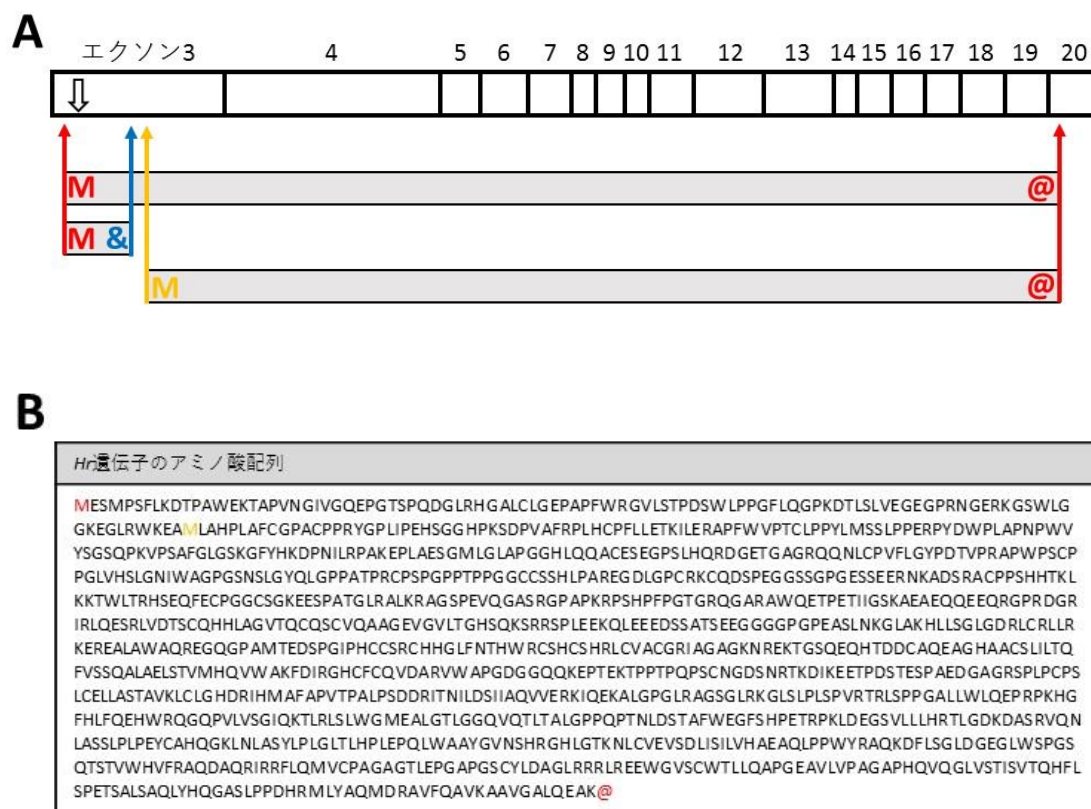


図 13 正常な *Hr* 遺伝子と変異型 *Hr* 遺伝子のアミノ酸配列

(A) アミノ酸配列の長さの模式図。赤の文字 (M と @) は開始コドンと終止コドンそれぞれを示している。青の文字 (&) は変異以降の最初の終止コドンを示している。白い矢印は変異の領域を指し示している。野生型、変異型、N 末端が短くなったアミノ酸配列のそれぞれ長さを示した。(B) *Hr* 遺伝子のアミノ酸配列。赤の文字 (M と @) は開始コドンと終止コドンそれぞれを示している。オレンジの文字 (M) は変異以降で想定される定型外翻訳産物の最初の開始コドンを示した。

表 1 プライマー

Cas9検出のプライマー	プライマーの配列 (5'- to 3')
<i>Cas9</i> detection primer F	AGTTCATCAAGCCCATCCTG
<i>Cas9</i> detection primer R	GAAGTTTCTGTTGGCGAAGC
変異検出のプライマー	プライマーの配列 (5'- to 3')
detection primer of MultiNA F	GGCAGGAGAGTGATGGAGAG
detection primer of MultiNA R	GAGCAGGTTCTCCTAGGCACAG
<i>Hr</i> exon3 genotyping F	CATTCAGATAGGGGCCAGAA
<i>Hr</i> exon3 genotyping R	ACAGGGTCACTCTTGGGATG
Off targetのプライマー	プライマーの配列 (5'- to 3')
Off-target 1 detection primer F	GCATGCCCCCTGTATTTATG
Off-target 1 detection primer R	TTCCAGGTCTCCATTGCTTC
Off-target 2 detection primer F	GCACACACACACACACCTCA
Off-target 2 detection primer R	TTGCCACTCACCATCAACTC
RT-PCRのプライマー	プライマーの配列 (5'- to 3')
<i>Hr</i> exon3-4 RT primer F	ATGAGGGCAGGAGAGTGATG
<i>Hr</i> exon3-4 RT primer R	AAGTGAGGGGCCTTCTGATT
<i>Hr</i> exon7-12 RT primer F	ACCACGGA CTCTTCAACACC
<i>Hr</i> exon7-12 RT primer R	TGCTGTCCAGGATGTTGGTA
<i>Hr</i> exon13-19 RT primer F	AGCATTCTGGGAGGGATTCT
<i>Hr</i> exon13-19 RT primer R	GGCATAAAGCATACGGTGGT

表 1 本研究に使用したプライマーの一覧

導入した DNA	インジェクション した胚の数	移植した 胚の数	誕生したマウスの数		<i>pX330</i> の非挿入
<i>pX330-Hr51</i> (5 ng/ μ l)	437	395	変異があり 無毛を示す	6 (6.8 %) ^a	5
			変異のみで 表現型なし	61 (69.3 %) ^b	58
			野生型	21 (23.9 %) ^c	21
			合計	88	84 (95.5 %) ^d

a : 変異があり無毛を示す / 誕生したマウスの合計

b : 変異のみで表現型なし / 誕生したマウスの合計

c : 野生型 / 誕生したマウスの合計

d : *pX330* が非挿入の誕生したマウス / 誕生したマウスの合計

表 2 CRISPR/Cas9 システムを用いた *Hr* 変異マウスの作製

off-target配列候補		PAM領域に隣接する12 bp
chr8: 109209355-109209369	off-target 1	GTGAACGGCATTG <u>GGG</u>
	解析結果	GTGAACGGCATTGGGG
chr5: 20146003-20146017	off-target 2	<u>CCT</u> CAATGCCGTTCA
	解析結果	CCTCAATGCCGTTCA

表 3 *pX330-Hr51* ベクターの off-target 解析

	野生型マウス (n=12)	<i>Hr^{em1Utr/em1Utr}</i> マウス (n=12)
WBC (× 10 ² /μl)	33.7 ± 10.5	28.8 ± 9.7
RBC (× 10 ⁴ /μl)	705.0 ± 157.4	925.7 ± 55.5*
HGB (g/dl)	11.0 ± 2.3	14.4 ± 1.0*
HCT (%)	34.0 ± 6.9	45.8 ± 3.1*
MCV (fl)	47.9 ± 1.0	49.4 ± 0.7*
MCH (pg)	15.5 ± 0.4	15.6 ± 0.3
MCHC (g/dl)	32.2 ± 0.5	31.5 ± 0.3*
PLT (× 10 ⁴ /μl)	59.5 ± 21.3	55.5 ± 13.9

値はmean ± SD

* 野生型と比較してP<0.05

表 4 血液学的検査

	野生型マウス (n=7)	<i>Hr^{em1Utr/em1Utr}</i> マウス (n=7)
アスパラギン酸アミノ基転移酵素(U/l)	48.3 ± 6.0	71.3 ± 15.2*
アラニンアミノ基転移酵素(U/l)	24.7 ± 2.6	24.9 ± 3.5
アルカリホスファターゼ(U/l)	375.4 ± 99.0	298.3 ± 30.9
血糖(mg/dl)	116.3 ± 22.4	127.7 ± 35.5
尿素窒素(mg/dl)	37.7 ± 2.7	36.0 ± 4.6
クレアチニン(mg/dl)	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
総タンパク質(g/dl)	4.6 ± 0.2	4.4 ± 0.3
アルブミン(g/dl)	2.1 ± 0.2	2.0 ± 0.2
総ビリルビン(mg/dl)	0.4 ± 0.1	0.4 ± 0.1
カルシウム(mg/dl)	8.9 ± 0.2	8.3 ± 0.3*
無機リン(mg/dl)	13.9 ± 1.5	13.7 ± 2.2
総コレステロール(mg/dl)	92.7 ± 14.5	54.3 ± 10.6*
中性脂肪(mg/dl)	107.7 ± 10.5	54.3 ± 10.0*
ナトリウム (mEq/l)	153.0 ± 2.9	150.9 ± 1.1
カリウム(mEq/l)	4.4 ± 0.8	3.6 ± 0.4
クロール(mEq/l)	119.1 ± 2.5	116.9 ± 2.7

値はmean ± SD

* 野生型と比較してP<0.05

表 5 血液生化学的検査

引用文献

- [1] M. L. Landsman, G. Kwant, G. A. Mook, and W. G. Zijlstra, ‘Light-absorbing properties, stability, and spectral stabilization of indocyanine green.’, *J. Appl. Physiol.*, vol. 40, no. 4, pp. 575–83, Apr. 1976.
- [2] C.-C. Chang, H.-C. Huang, K.-L. Liu, Y.-M. Wu, J. J. S. Lee, S.-F. Jiang, and M.-Y. M. Su, ‘Clinical feasibility of Gd-EOB-DTPA-enhanced MR imaging for assessing liver function: validation with ICG tests and parenchymal cell volume.’, *Clin. Imaging*, vol. 40, no. 4, pp. 797–800, 2016.
- [3] N. Arichi, Y. Mitsui, K. Ogawa, T. Nagami, S. Nakamura, T. Hiraoka, H. Yasumoto, and H. Shiina, ‘Intraoperative fluorescence vascular imaging using indocyanine green for assessment of transplanted kidney perfusion.’, *Transplant. Proc.*, vol. 46, no. 2, pp. 342–5, 2014.
- [4] G. S. Filonov, K. D. Piatkevich, L.-M. Ting, J. Zhang, K. Kim, and V. V. Verkhusha, ‘Bright and stable near-infrared fluorescent protein for *in vivo* imaging.’, *Nat. Biotechnol.*, vol. 29, no. 8, pp. 757–61, Aug. 2011.
- [5] F. F. Jöbsis, ‘Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters.’, *Science*, vol. 198, no.

4323, pp. 1264–7, Dec. 1977.

- [6] C.-W. Lai, H.-L. Chen, C.-C. Yen, J.-L. Wang, S.-H. Yang, and C.-M. Chen, ‘Using Dual Fluorescence Reporting Genes to Establish an *In Vivo* Imaging Model of Orthotopic Lung Adenocarcinoma in Mice.’, *Mol. Imaging Biol.*, vol. 18, no. 6, pp. 849–859, Dec. 2016.
- [7] H. Ozeki, S. Ito, K. Wakamatsu, and J. Thody, ‘Spectrophotometric characterization of eumelanin and pheomelanin in hair.’, *Pigment cell Res.*, vol. 9, no. 5, pp. 265–70, Oct. 1996.
- [8] M. T. N. Tran, J. Tanaka, M. Hamada, Y. Sugiyama, S. Sakaguchi, M. Nakamura, S. Takahashi, and Y. Miwa, ‘*In Vivo* image Analysis Using iRFP Transgenic Mice.’, *Exp. Anim.*, vol. 63, no. 3, pp. 311–9, 2014.
- [9] L. G. Byrd, ‘Regional localization of the nu mutation on mouse chromosome 11.’, *Immunogenetics*, vol. 37, no. 2, pp. 157–9, 1993.
- [10] M. Nehls, D. Pfeifer, M. Schorpp, H. Hedrich, and T. Boehm, ‘New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations.’, *Nature*, vol. 372, no. 6501, pp. 103–7, Nov. 1994.
- [11] Y. Takahashi, A. Shimizu, T. Sakai, Y. Endo, N. Osawa, H. Shisa, and T. Honjo, ‘Mapping of the nu gene using congenic nude strains and in situ

- hybridization.’, *J. Exp. Med.*, vol. 175, no. 3, pp. 873–6, Mar. 1992.
- [12] S. P. Flanagan, “‘Nude’”, a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse.’, *Genet. Res.*, vol. 8, no. 3, pp. 295–309, Dec. 1966.
- [13] E. M. Pantelouris, ‘Absence of thymus in a mouse mutant.’, *Nature*, vol. 217, no. 5126, pp. 370–1, Jan. 1968.
- [14] F. Benavides, T. M. Oberyszyn, A. M. VanBuskirk, V. E. Reeve, and D. F. Kusewitt, ‘The hairless mouse in skin research.’, *J. Dermatol. Sci.*, vol. 53, no. 1, pp. 10–8, Jan. 2009.
- [15] M. Fujii, F. Endo-Okuno, A. Iwai, K. Doi, J. Tomozawa, S. Kohno, N. Inagaki, T. Nabe, and S. Ohya, ‘Hypomorphic mutation in the hairless gene accelerates pruritic atopic skin caused by feeding a special diet to mice.’, *Exp. Dermatol.*, vol. 25, no. 7, pp. 565–7, Jul. 2016.
- [16] T. Nakanishi, K. Kokubun, H. Oda, M. Aoki, A. Soma, M. Taniguchi, Y. Kazuki, M. Oshimura, and K. Sato, ‘Bioluminescence imaging of bone formation using hairless osteocalcin-luciferase transgenic mice’, *Bone*, vol. 51, no. 3, pp. 369–375, 2012.
- [17] K. Djabali, V. M. Aita, and M. Christiano, ‘Hairless is translocated to the nucleus via a novel bipartite nuclear localization signal and is

- associated with the nuclear matrix.’, *J. Cell Sci.*, vol. 114, no. Pt 2, pp. 367–376, 2001.
- [18] K. Djabali and A. M. Christiano, ‘Hairless contains a novel nuclear matrix targeting signal and associates with histone deacetylase 3 in nuclear speckles’, *Differentiation*, vol. 72, no. 8, pp. 410–418, 2004.
- [19] V. M. Aita, W. Ahmad, a a Panteleyev, U. Kozłowska, a Kozłowska, T. C. Gilliam, S. Jablonska, and a M. Christiano, ‘A novel missense mutation (C622G) in the zinc-finger domain of the human hairless gene associated with congenital atrichia with papular lesions.’, *Exp. Dermatol.*, vol. 9, no. 2, pp. 157–62, 2000.
- [20] J. Hsieh, S. A. Slater, G. K. Whitfield, J. L. Dawson, G. Hsieh, C. Sheedy, C. A. Haussler, and M. R. Haussler, ‘Analysis of hairless corepressor mutants to characterize molecular cooperation with the vitamin D receptor in promoting the mammalian hair cycle.’, *J. Cell. Biochem.*, vol. 110, no. 3, pp. 671–86, Jun. 2010.
- [21] G. B. Potter, G. M. J. Beaudoin, C. L. DeRenzo, J. M. Zarach, S. H. Chen, and C. C. Thompson, ‘The hairless gene mutated in congenital hair loss disorders encodes a novel nuclear receptor corepressor’, *Genes Dev.*, vol.

15, no. 20, pp. 2687–2701, 2001.

- [22] A. N. Moraitis and V. Giguère, ‘The co-repressor hairless protects RORalpha orphan nuclear receptor from proteasome-mediated degradation.’, *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 52, pp. 52511–8, Dec. 2003.
- [23] C. O’Driscoll and J. P. Bressler, ‘Hairless expression attenuates apoptosis in a mouse model and the cos cell line; involvement of p53’, *PLoS One*, vol. 5, no. 9, 2010.
- [24] C. C. Thompson, ‘Hairless is a nuclear receptor corepressor essential for skin function.’, *Nucl. Recept. Signal.*, vol. 7, p. e010, 2009.
- [25] P. Rabbani, M. Takeo, W. Chou, P. Myung, M. Bosenberg, L. Chin, M. M. Taketo, and M. Ito, ‘Coordinated Activation of Wnt in Epithelial and Melanocyte Stem Cells Initiates Pigmented Hair Regeneration’, *Cell*, vol. 145, no. 6, pp. 941–955, 2011.
- [26] C. C. Thompson, J. M. Sisk, and G. M. J. Beaudoin, ‘Hairless and Wnt signaling: allies in epithelial stem cell differentiation.’, *Cell Cycle*, vol. 5, no. 17, pp. 1913–7, Sep. 2006.
- [27] S. Reddy, T. Andl, A. Bagasra, M. M. Lu, D. J. Epstein, E. E. Morrissey, and S. E. Millar, ‘Characterization of Wnt gene expression in developing

- and postnatal hair follicles and identification of Wnt5a as a target of Sonic hedgehog in hair follicle morphogenesis.’, *Mech. Dev.*, vol. 107, no. 1–2, pp. 69–82, Sep. 2001.
- [28] J.-C. Hsieh, R. C. Estess, I. Kaneko, G. K. Whitfield, P. W. Jurutka, and M. R. Haussler, ‘Vitamin D receptor-mediated control of Soggy, Wise, and Hairless gene expression in keratinocytes.’, *J. Endocrinol.*, vol. 220, no. 2, pp. 165–78, Feb. 2014.
- [29] Y. Hasegawa, Y. Hoshino, A. E. Ibrahim, K. Kato, Y. Daitoku, Y. Tanimoto, Y. Ikeda, H. Oishi, S. Takahashi, A. Yoshiki, K.-I. Yagami, H. Iseki, S. Mizuno, and F. Sugiyama, ‘Generation of CRISPR/Cas9-mediated bicistronic knock-in Ins1-cre driver mice.’, *Exp. Anim.*, vol. 65, no. April, pp. 319–327, Apr. 2016.
- [30] P. Singh, J. C. Schimenti, and E. Bolcun-Filas, ‘A mouse geneticist’s practical guide to CRISPR applications.’, *Genetics*, vol. 199, no. 1, pp. 1–15, Jan. 2015.
- [31] L. Cong, F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini, and F. Zhang, ‘Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems.’, *Science*, vol. 339, no. 6121, pp.

819–23, Feb. 2013.

- [32] S. Mizuno, T. T. H. Dinh, K. Kato, S. Mizuno-Iijima, Y. Tanimoto, Y. Daitoku, Y. Hoshino, M. Ikawa, S. Takahashi, F. Sugiyama, and K. I. Yagami, ‘Simple generation of albino C57BL/6J mice with G291T mutation in the tyrosinase gene by the CRISPR/Cas9 system’, *Mamm. Genome*, vol. 25, no. 7–8, pp. 327–334, 2014.
- [33] J. W. Gordon and F. H. Ruddle, ‘Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei.’, *Science*, vol. 214, no. 4526, pp. 1244–6, Dec. 1981.
- [34] O. N. Khokhlova, E. A. Tukhovskaya, I. N. Kravchenko, E. S. Sadovnikova, I. A. Pakhomova, E. A. Kalabina, A. V. Lobanov, E. R. Shaykhutdinova, A. M. Ismailova, and A. N. Murashev, ‘Using Tiletamine-Zolazepam-Xylazine Anesthesia Compared to CO₂-inhalation for Terminal Clinical Chemistry, Hematology, and Coagulation Analysis in Mice.’, *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, vol. 84, pp. 11–19, Oct. 2016.
- [35] Y. Naito, K. Hino, H. Bono, and K. Ui-Tei, ‘CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduced off-target sites.’, *Bioinformatics*, vol. 31, no. 7, pp. 1120–3, Apr. 2015.

- [36] J. P. Sundberg and L. E. King, 'Morphology of hair in normal and mutant laboratory mice.', *Eur. J. Dermatol.*, vol. 11, no. 4, pp. 357–61.
- [37] A. B. Reske-Kunz, M. P. Scheid, and E. A. Boyse, 'Disproportion in T-cell subpopulations in immunodeficient mutant hr/hr mice.', *J. Exp. Med.*, vol. 149, no. 1, pp. 228–33, Jan. 1979.
- [38] S. Suzu, M. Tanaka-Douzono, K. Nomaguchi, M. Yamada, H. Hayasawa, F. Kimura, and K. Motoyoshi, 'p56(dok-2) as a cytokine-inducible inhibitor of cell proliferation and signal transduction.', *EMBO J.*, vol. 19, no. 19, pp. 5114–22, Oct. 2000.
- [39] O. Suzuki, M. Koura, Y. Noguchi, K. Uchio-Yamada, and J. Matsuda, 'Zygoty determination in hairless mice by PCR based on Hr(hr) gene analysis.', *Exp. Anim.*, vol. 62, no. 3, pp. 267–73, 2013.
- [40] Y. Liu, J. P. Sundberg, S. Das, D. Carpenter, K. T. Cain, E. J. Michaud, and B. H. Voy, 'Molecular basis for hair loss in mice carrying a novel nonsense mutation (Hrrh-R) in the hairless gene (Hr).', *Vet. Pathol.*, vol. 47, no. 1, pp. 167–76, Jan. 2010.
- [41] J. M. Zarach, 'The co-repressor hairless has a role in epithelial cell differentiation in the skin', *Development*, vol. 131, no. 17, pp. 4189–4200,

2004.

- [42] W. Ahmad, a a Panteleyev, V. Henson-Apollonio, J. P. Sundberg, and a M. Christiano, 'Molecular basis of a novel rhino (hr(rhChr)) phenotype: a nonsense mutation in the mouse hairless gene.', *Exp. Dermatol.*, vol. 7, no. 5, pp. 298–301, 1998.
- [43] S. Makino, R. Fukumura, and Y. Gondo, 'Illegitimate translation causes unexpected gene expression from on-target out-of-frame alleles created by CRISPR-Cas9.', *Sci. Rep.*, vol. 6, no. June, p. 39608, Dec. 2016.

謝辞

本研究と論文作成にあたり、ご指導、ご高閲を賜りました杉山文博博士（筑波大学医学医療系教授）、水野聖哉博士（筑波大学医学医療系助教）に心から感謝いたします。また、実験の指導をして頂いた加藤花名子殿（筑波大学生命科学動物資源センター）、水野沙織博士（筑波大学生命科学動物資源センター）、谷本陽子殿（筑波大学生命科学動物資源センター）、石田みゆき殿（筑波大学生命科学動物資源センター）、梶原典子殿（筑波大学生命科学動物資源センター）、*in vivo* イメージング装置の指導を頂いた三輪佳宏博士（筑波大学医学医療系講師）、逆井智貴殿（筑波大学大学院人間総合科学科）、助言を頂いた八神健一博士（筑波大学医学医療系特命教授）、高橋智博士（筑波大学医学医療系教授）に深謝いたします。