

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K16219

研究課題名(和文)炎症性シグナルによる細胞極性制御因子を介した肝臓修復機構の解明

研究課題名(英文)Liver regeneration mechanisms via cell polarity regulator mediated by inflammatory signal

研究代表者

石橋 理基(Ishibashi, Riki)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：20778279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では細胞極性因子mInsc遺伝子のプロモーター領域のc-Rel結合配列を欠損したマウス(c-Rel Binding site (BS) delta)を樹立し解析を行った結果、肝臓障害からの再生メカニズムは肝臓再生メカニズムはc-Rel/mInsc axis非依存的である可能性、もしくはc-Rel/mInsc axisの欠損を補完する機構の存在が予想された。また、研究遂行の為に必要となる遺伝子改変マウスを効率的に樹立可能な汎用性の高いドナープラスミドシステムの開発に成功した。このシステムは遺伝子改変個体を必要とする様々な研究に貢献できると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、肝臓障害および再生時におけるNF-κBファミリー転写因子c-Rel/細胞極性制御因子mInsc axisの生理学的機能は不明であった。本研究により、肝臓障害からの再生メカニズムは肝臓再生メカニズムはc-Rel/mInsc axis非依存的である可能性、もしくはc-Rel/mInsc axisの欠損を補完する機構の存在が予想された。また、新規の汎用型ドナープラスミドを用いた遺伝子ターゲティングシステムの開発により、遺伝子改変個体を必要とする研究への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文)：This study suggested that liver regeneration mechanisms might not depend on c-Rel/mInsc axis or might exist any complementing system of lacking c-Rel/mInsc axis, via the analysis of c-Rel binding site delta mice in mInsc promoter region. In addition, we developed a new gene targeting system mediated by versatile donor plasmid, and succeeded to establish the new knock-in mouse. This system may be contributed to several researches which needed the establishment of the gene targeted animals.

研究分野：ゲノム編集

キーワード：肝臓障害・再生 炎症性シグナル 細胞極性因子 ゲノム編集 遺伝子ターゲティング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、マウス ES 細胞において細胞極性制御因子 *mInsc* のプロモーター領域を同定し、NF- κ B ファミリー転写因子 *c-Rel* が *mInsc* 遺伝子の発現を調節することで ES 細胞の分化を制御していることを見出した (Ishibashi R. et al. *J Bio Chem*, 2016)。これまでに *mInsc* はマウス生体肝臓において発現していることは報告されていたが (Lechler T. et al., *Nature*, 2005) その遺伝子発現調節機構、及び生理学的機能については全く研究がなされていなかった。また、肝臓は非常に再生能力の高い臓器であり、肝臓再生時には *c-Rel* が肝細胞の増殖を促進することが報告されているが (Gleling RG. et al., *Hepatology*, 2010) どのようなシグナルで *c-Rel* が活性化し *mInsc* 遺伝子の発現を制御するかどうかは不明であった。

研究代表者は *mInsc* プロモーター領域の *c-Rel* 結合配列を欠損したマウス (*c-Rel* Binding site (BS)) を樹立し、生体肝臓において *mInsc* 遺伝子の発現量を確認したところ、その発現量が減少していた。また、*mInsc* プロモーター領域に *c-Rel* が結合することも確認した。これらの結果から、*c-Rel/mInsc* axis が肝臓傷害、および再生にも関与する可能性が考えられる。*c-Rel/mInsc* axis がどのように肝臓傷害・再生に関わり、その詳細なシグナル伝達メカニズムを解明することで新たな肝臓疾患治療法の確立につながる可能性が期待された。

2. 研究の目的

(1) 本研究は、マウス生体肝臓における炎症性シグナルによる細胞極性制御因子の発現制御メカニズムと、それが肝臓再生にいかに関与するかを明らかにすることを目的とした。具体的には、肝臓再生時における NF- κ B ファミリー転写因子 *c-Rel* を介した細胞極性制御因子 *mInsc* 発現制御による生理学的機能の解明、および肝臓再生時に *c-Rel/mInsc* axis を活性化させるシグナル伝達メカニズムの解明である。マウス生体肝臓における NF- κ B ファミリー転写因子 *c-Rel* による細胞極性制御因子 *mInsc* の発現制御機構についてはこれまで報告されていない。また、*c-Rel* は肝臓再生時に肝細胞の増殖を促進することが報告されているが、*c-Rel/mInsc* axis を活性化するシグナル、およびその生理学的機能は不明である。さらに、肝臓再生時における肝細胞極性の再構築メカニズムに関する報告は少ない。炎症性シグナルによる細胞極性制御因子の発現を介した肝臓再生メカニズムを明らかにすることは独自性が高いと言える。また、本研究により *c-Rel/mInsc* axis による肝臓再生メカニズムを解明することで、肝臓疾患に対する新たな治療法の開発につながる可能性があるという点で意義のある研究である。

(2) 本研究遂行の為に必要な遺伝子改変マウスを迅速に作出するため、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いた遺伝子ターゲティング技術の開発を目指した。

3. 研究の方法

(1) 肝臓障害および再生時における *c-Rel/mInsc* axis の機能解析

c-Rel BS マウスを作出し、生体肝臓における *mInsc* 遺伝子の発現量が減少することを確認した。また、*c-Rel* BS マウスに四塩化炭素(CCl₄)を投与し、肝臓障害および修復の程度について継時的にヘマトキシリン-エオジン染色法を用いた肝臓組織切片の観察を行った。さらに、細胞極性因子についても蛍光免疫染色法による局在の観察を行った。

(2) 肝細胞における *mInsc* の局在および相互作用因子の同定

高効率遺伝子ターゲティングドナープラスミドシステムの開発

研究遂行の為に必要な遺伝子改変マウスの迅速な作出を行うため、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いた高効率遺伝子ターゲティングドナープラスミドシステムを開発し、*mInsc* 遺伝子座の開始コドンの直下に *3xFlag-EGFP* レポーター遺伝子配列を挿入したノックインマウス (*mInsc*^{3xFlag-EGFP}) の樹立を試みた。

mInsc^{3xFlag-EGFP} マウスにおける肝臓組織切片観察

蛍光免疫染色法による *mInsc*^{3xFlag-EGFP} マウスにおける肝臓組織切片観察を行い、これまで不明であった *mInsc* 遺伝子の局在解析を行った。

肝細胞における *mInsc* の局在および相互作用因子を同定するため、CRISPR-Cas9 ゲノム編集技術を用いた高効率遺伝子ターゲティングドナープラスミドシステムを開発し、*mInsc* 遺伝子座の開始コドンの直下に *3xFlag-EGFP* レポーター遺伝子配列を挿入したノックインマウスを樹立した。

4. 研究成果

(1) 肝臓障害および再生時における c-Rel/*mInsc* axis の機能解析

作出していた c-Rel BS マウスの生体肝臓における *mInsc* 遺伝子の発現量が減少することが確認された(図1)。CCI4 を腹腔内投与して肝臓障害を誘導し、肝臓障害および修復過程における肝臓組織切片観察の結果、野生型マウスと比較して肝臓障害および修復の程度に有意な差は認められなかった。また、細胞極性因子 Partitioning defective protein3 (Par-3)、および肝細胞の細胞極性規定因子 Depeptidyl peptidase4 (DppIV)についても野生型マウスと比較して大きな変化は認められなかった。以上の結果から、肝臓再生メカニズムは c-Rel/*mInsc* axis 非依存的、もしくは c-Rel/*mInsc* axis の欠損を補完する機構の存在が予想される。

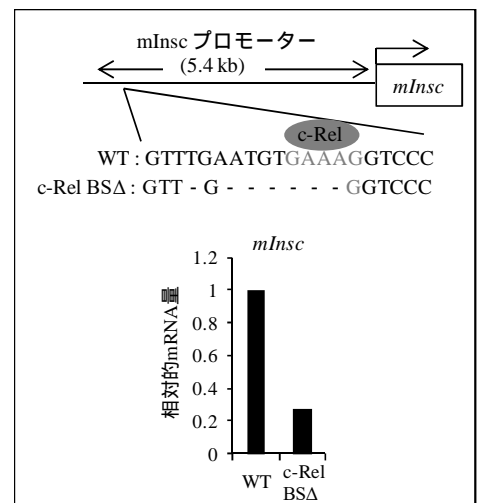


図1. c-Rel BS マウス肝臓の *mInsc* 発現

(2) 肝細胞における *mInsc* の局在および相互作用因子の同定

高効率遺伝子ターゲティングドナープラスミドシステムの開発

マウスとヒトのゲノム上でのオフターゲットを最小化した人工 CRISPR/Cas9 切断配列 (Syn-crRNA-TS (Synthetic crRNA target sequence)) をデザインし、これをマルチクロニングサイト (MCS) の両端に配した汎用性の高いドナープラスミド pCriMGET (plasmid of synthetic CRISPR coded RNA target sequence-equipped donor plasmid mediated gene targeting) をした(図2)。本システムでは、標的遺伝子座と同時にドナープラスミドも細胞内に

Micro Injection

Knock-in mouse

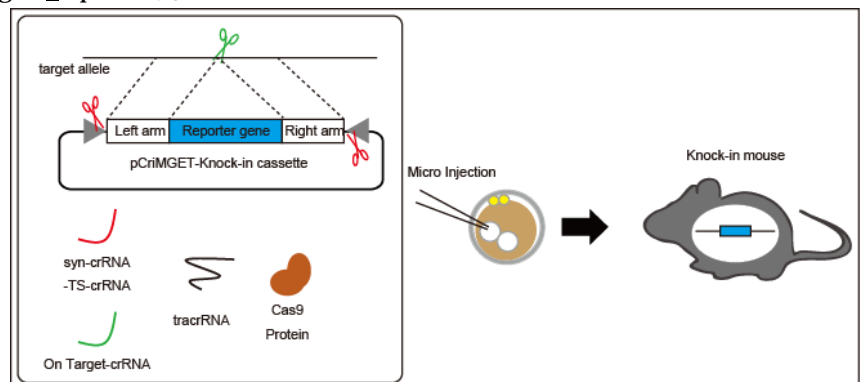


図2 pCriMGET システムによるノックインマウス作出法

て CRISPR-Cas9 により切断されることで、遺伝子ターゲティング効率の向上が認められた。

pCriMGET の MCS に 500bp の相同性アーム配列を有する 3xFlag-EGFP レポーター遺伝子を挿入し、Syn-crRNA-TS-crRNA、mInsc crRNA、tracrRNA、Cas9 タンパク質とともに、マウス受精卵にマイクロインジェクションした結果、*mInsc* 遺伝子座の開始コドン直下にレポーター遺伝子が挿入された *mInsc*^{3xFlag-EGFP} マウスを樹立した (図 3)。また、野生型マウスとの戻し交配により、*mInsc*^{3xFlag-EGFP} マウスの挿入レポーター遺伝子はメンデルの法則に従って次世代へ遺伝することが確認された。さらに、遺伝子挿入領域の DNA 配列をサンガーシーケンス解析により確認したところ、塩基の欠損および重複は確認されなかった。

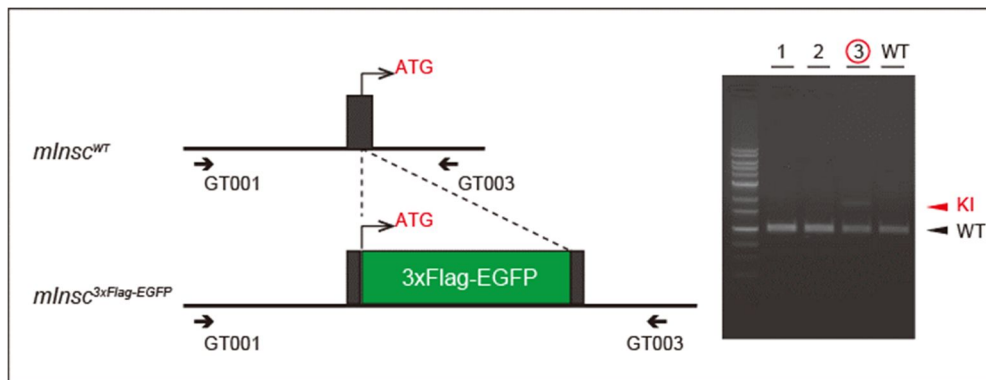


図 3 *mInsc*^{3xFlag-EGFP} ノックインマウスの樹立

mInsc^{3xFlag-EGFP} マウスにおける肝臓組織切片観察

野生型マウスとの戻し交配により拡大された *mInsc*^{3xFlag-EGFP} マウスの生体肝臓において蛍光免疫染色法により *mInsc*^{3xFlag-EGFP} 遺伝子の発現を確認した。その結果、3xFlag タグおよび EGFP タンパク質の発現は検出されなかった。このことから、レポーター遺伝子挿入により *mInsc* 遺伝子の発現量が減少した可能性が示唆された。生体肝臓における *mInsc* 局在および相互作用因子の同定には、*mInsc* 遺伝子の一過的過剰発現等による解析が有効であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ishibashi Riki, Abe Kota, Ido Nanami, Kitano Satsuki, Miyachi Hitoshi, Toyoshima Fumiko	4. 巻 10
2. 論文標題 Genome editing with the donor plasmid equipped with synthetic crRNA-target sequence	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14120-14133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-70804-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石橋 理基
2. 発表標題 CRISPR Cas9遺伝子ターゲティング技術における汎用型ドナープラスミドの開発
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石橋 理基
2. 発表標題 汎用型ドナープラスミドpCrimGETを用いたCRISPR-Cas Gene targetingシステムの開発
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会第6回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石橋 理基
2. 発表標題 高汎用型ドナープラスミドpCrimGETを用いたCRISPR-Cas Gene targeting システムの開発
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

CRISPR-Cas9遺伝子ターゲティング技術における汎用型ドナープラスミドを開発
<https://www.infront.kyoto-u.ac.jp/post-1639/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------