

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21373

研究課題名(和文) 光活性型Creシステムを利用した生体内遺伝子操作法の開発

研究課題名(英文) in vivo genome engineering by tTA-dependent photoactivatable Cre recombinase knock-in mouse

研究代表者

宝田 剛志 (TAKARADA, TAKESHI)

岡山大学・医歯薬学域・教授

研究者番号：30377428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、in vivoでの青色光/細胞種特異的なDNA組み換え反応を可能とするマウスの作製に成功した(TRE-PA-Creマウス)。本研究では、M2-rtTA, Foxp3-tTA, LepR-tTAマウスを準備し、TRE-PA-Cre;LSLtdTomatoマウスと交配し、それぞれの細胞種特異的なPA-Creマウスを作成することに成功した。ドキシサイクリンを飲水投与したM2-rtTA;TRE-PA-Cre;LSL-tdTomatoマウスに、青色光ハンドタイプレーザーを各組織に照射し、tdTomatoの発現を確認したところ、舌と皮膚において照射依存的なDNA組み換えを確認することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回開発したPA-Creシステムを利用することで、照射部位での細胞の長期ラベリング可能となる。そのため、免疫システムを時間空間的観点から長期的に解析でき、どのタイミングで免疫細胞が遊走しその後どのような分化/機能変化を起こすのか、に迫ることができる。また、ラベリングが永続的であるため、臓器間移動後の幹細胞(造血幹細胞や間葉系幹細胞など)の系譜追跡も可能であり、発生生物学を含め、幹細胞生物学分野に新しい概念を提唱することが可能となる。

研究成果の概要(英文)：We have successfully generated mice that are capable of blue light/cell type-specific DNA recombination reactions in vivo (TRE-PA-Cre mice). In this study, we prepared M2-rtTA, Foxp3-tTA, and LepR-tTA mice and crossed them with TRE-PA-Cre;LSLtdTomato mice to create each cell type-specific PA-Cre mouse. M2-rtTA;TRE-PA-Cre;LSL-tdTomato mice treated with doxycycline in drinking water were irradiated with a blue light hand-type laser in each tissue to confirm the expression of tdTomato, and irradiation-dependent DNA recombination was successfully observed in the tongue and skin.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：光遺伝学

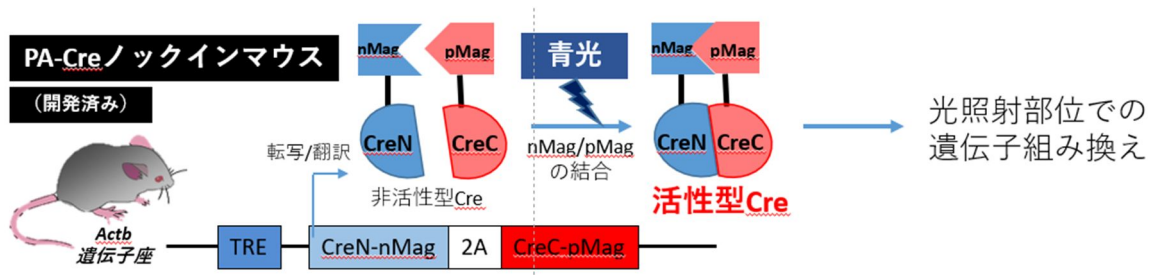
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体内遺伝子操作の精度(時期特異性や、細胞種特異性)は、Cre recombinase (Cre)-loxP 部位特異的 DNA 組換え酵素反応の応用により格段に上昇した。筆者らも同システムを利用することで Runt-related transcription factor 2 (Runx2, 骨格形成に必須の転写因子, 全身性欠損マウスでは生後まもなく死亡)の flox マウスを世界に先駆けて作製し、細胞種特異的な各種 Cre マウスラインを使用した解析を進めてきた。「全身性欠損」から「細胞種特異的欠損」の例のように、生体内遺伝子操作精度の向上は、新しい概念の提唱につながり、学術体系そのものを大きく転換させることができる。一方で、Cre 活性を「時間特異的」に制御するには、Cre 搭載ウイルス(アデノ随伴ウイルスなど)を、任意部位に直接投与することで可能だが、直接投与による侵襲性的問題があり、免疫システムや、発がん過程を観察する上では、より非侵襲的な方法が望まれている。一方で、光操作による細胞標識技術として、KikGR (kikume-green-red, 405nm 光照射により蛍光特性が変化)を発現するマウスが開発されているが、KikGR の蛍光特性変化は可逆的であるため、遊走後における細胞の分化・機能変化を長期的に追跡することには向かない。

近年、研究分担者である佐藤守俊らは、Cre を N 末端断片(CreN)と C 末端断片(CreC)に二分割し、光スイッチタンパク質(nMag と pMag)をそれぞれ連結することで、青光(470 nm)照射で DNA 組み換え反応をコントロールできる光活性型 Cre(Photoactivatable(PA)-Cre)システムを開発した (*Nature Commun*, 2015; *Nature Chem Biol.*, 2016)。

上記の PA-Cre 技術をマウス個体レベルでの解析に応用することを目指し、テトラサイクリン誘導発現系システムへのノックインにより、*in vivo*での青色光/細胞種特異的な DNA 組み換え反応を可能とする PA-Cre ノックインマウスの作製に成功した(TRE-PA-Cre マウス、*BBRC*, 2021)。tTA 発現ベクターを TRE-PA-Cre:ROSA26-tdTomato マウスの肝臓に導入することで、青色 LED 光下でのマウスの肝臓では tdTomato が強く発現していることが確認できた。このことから、我々が作製した TRE-PA-Cre マウスは、tTA 依存的・光照射依存的に生体内で DNA 組換えを誘導できることが証明された。



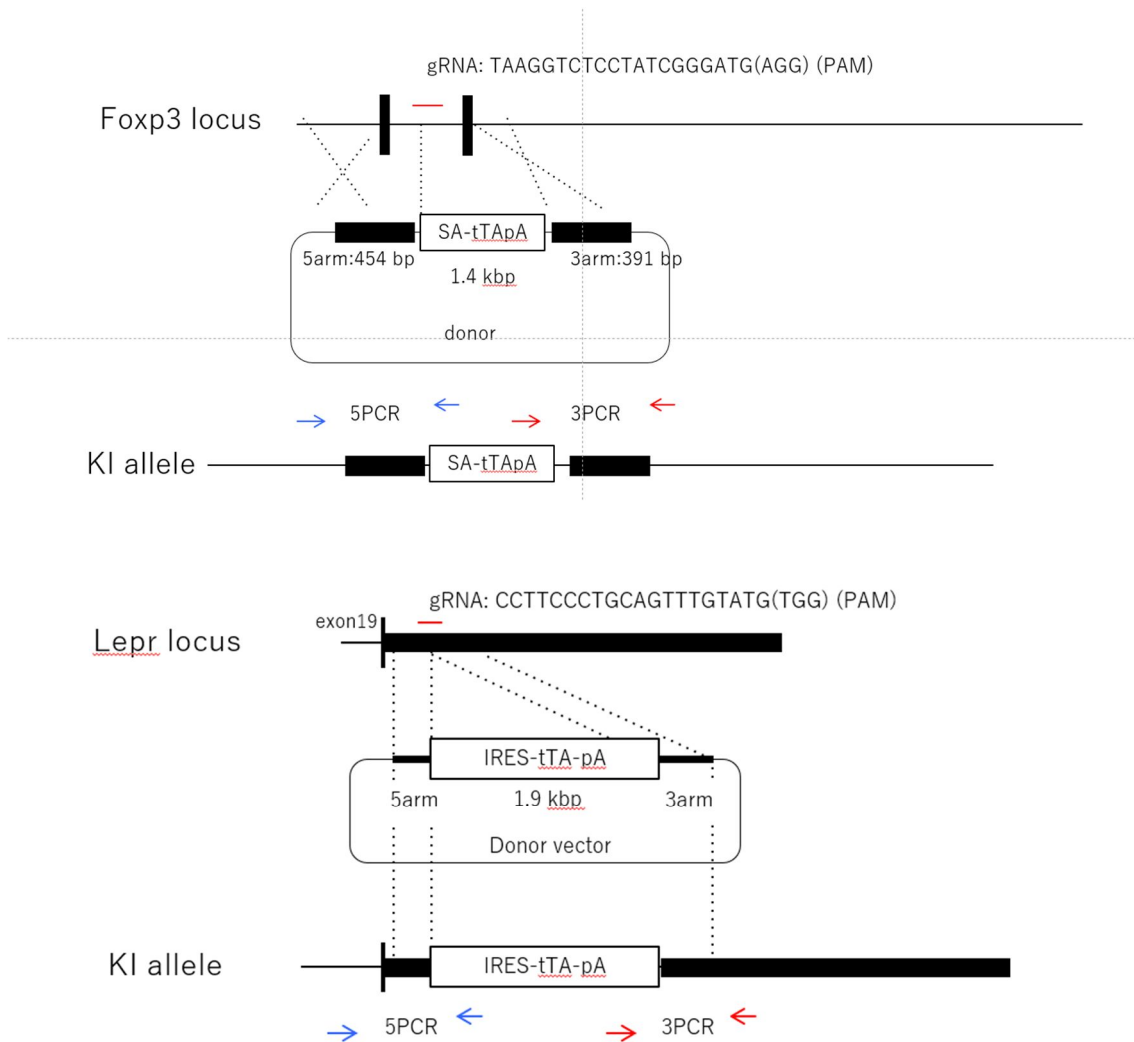
2. 研究の目的

これらの研究背景を踏まえ本研究では、各細胞種特異的 tTA マウスを新たに開発することで、これらのマウスと TRE-PA-Cre マウスを交配し、個体レベルでの光活性型 Cre システムの有用性を実証することを目指す。そして、免疫/幹細胞の細胞動態研究(例:どのタイミングで傷害部位へ遊走し、遊走後どれくらい滞在するのか?遊走後の細胞は分化/機能変化の点でどのような運命を辿るのか?)や、がん研究(例:遺伝子変異細胞の動態を極めて早期に生体内で観察)への応用を目指す。

3. 研究の方法

細胞種特異的 tTA/rtTA 発現マウスの開発

全身性に rtTA を発現するマウス (M2-rtTA マウス) は、東京大学 山田泰広先生よりご提供いただいた。制御性 T 細胞にて tTA を発現するマウスは、Foxp3 の locus に SA-tTA-polyA をノックインすることで行った (下図、理化学研究所との共同開発)。LepR 陽性間葉系細胞にて tTA を発現するマウスは、LepR の locus に IRES-tTA-polyA をノックインすることで行った (下図、理化学研究所との共同開発)。

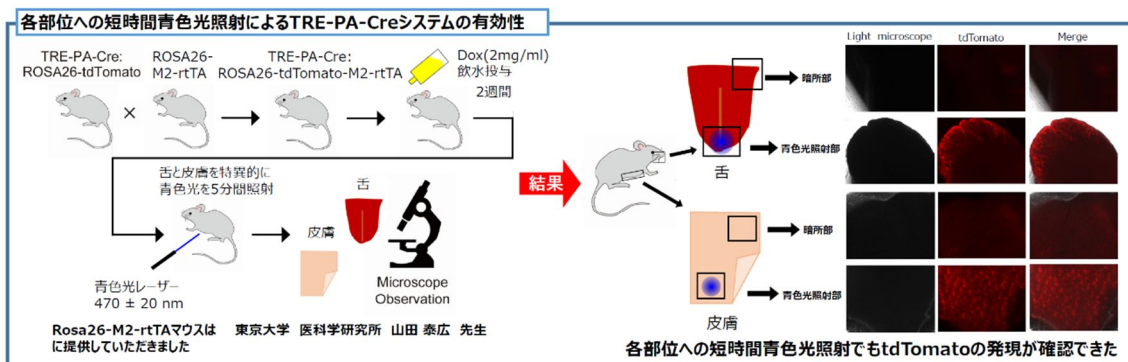


細胞種特異的 PACre マウスの開発と光照射による検討

TRE-PA-Cre ノックインマウスと、細胞種特異的 tTA 発現マウス (ROSA26-rtTA:全身性、Foxp3-tTA:制御性 T 細胞、LepR-tTA:骨髄間葉系幹細胞) と、Cre 依存的に tdTomato を発現するマウスを交配し、細胞種特異的 tTA;TRE-PA-Cre;LSL-tdTomato マウスを作成する。また、光照射による細胞のマーキングは、麻酔下のマウスを開腹し、任意の部位 (脾臓、鼠経リンパ節、大腿骨骨髄) に、青色光ハンドタイプレーザー (488nm) を照射する。照射後の組織の免疫染色や、回収細胞でのフローサイトメトリーにより tdTomato の発現を確認し、レーザー強度や照射時間、あるいは細胞種特異性に関して検討する。

4 . 研究成果

M2-rtTA, Foxp3-tTA, LepR-tTA マウスは、genotyping により、目的の locus にノックインされていることを確認し、KI マウスの colony を繁殖させた。その後、TRE-PA-Cre;LSLtdTomato マウスと交配し、それぞれの細胞種特異的 tTA;TRE-PA-Cre;LSL-tdTomato マウスを作成することに成功した。M2-rtTA;TRE-PA-Cre;LSL-tdTomato マウスに関しては、ドキシサイクリンを飲水投与し、PA-Cre を全身に発現させることで使用した。ドキシサイクリンを飲水投与した M2-rtTA;TRE-PA-Cre;LSL-tdTomato マウスに、青色光ハンドタイプレーザー (488nm) を各組織に照射し、tdTomato の発現を確認したところ、舌と皮膚において照射依存的な DNA 組み換えを確認することに成功した。Foxp3- or LepR-tTA;TRE-PA-Cre;LSL-tdTomato マウスについては、繁殖に時間がかかり、解析に資するマウスの数をそろえることが難しく、期間内に照射して組み換えを確認することはできなかった。今後は、より詳細な照射条件を検討していくとともに、免疫細胞・間葉系細胞の体内動態を検討するための条件設定を行っていく必要がある。



今回開発した PA-Cre システムを利用することで、照射部位での細胞の長期ラベリング可能となる。そのため、免疫システムを時間空間的観点から長期的に解析でき、どのタイミングで免疫細胞が遊走しその後どのような分化/機能変化を起こすのか、に迫ることができる。また、ラベリングが永続的であるため、臓器間移動後の幹細胞(造血幹細胞や間葉系幹細胞など)の系譜追跡も可能であり、発生生物学を含め、幹細胞生物学分野に新しい概念を提唱することが可能となる。がん研究への応用では、任意の組織/細胞で、非侵襲的に特定の遺伝子変異を起こすことができる。これは、腫瘍免疫研究や、その創薬研究に資するだけでなく、従来困難であった、遺伝子変異細胞動態の生体内での極めて早期な観察が可能となる。このように、本研究を遂行することで、細胞動態研究や、がん研究の学術体系/方向性に变革をもたらし、新規研究領域の創造が可能となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takao T, Yamada D, Takarada T.	4. 巻 76
2. 論文標題 Mouse Model for Optogenetic Genome Engineering.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Acta Med Okayama.	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matthijssens Filip, Sharma Nitesh D., Takarada Takeshi, et al.	4. 巻 131
2. 論文標題 RUNX2 regulates leukemic cell metabolism and chemotaxis in high-risk T cell acute lymphoblastic leukemia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Investigation	6. 最初と最後の頁 JCI141566
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1172/JCI141566	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Joko Ryoji, Yamada Daisuke, Nakamura Masahiro, Yoshida Aki, Takihira Shota, Takao Tomoka, Lu Ming, Sato Kohei, Ito Tatsuo, Kunisada Toshiyuki, Nakata Eiji, Ozaki Toshifumi, Takarada Takeshi	4. 巻 14
2. 論文標題 PRRX1 promotes malignant properties in human osteosarcoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Oncology	6. 最初と最後の頁 100960 ~ 100960
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.tranon.2020.100960	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takao Tomoka, Hiraoka Yuichi, Kawabe Kenji, Yamada Daisuke, Ming Lu, Tanaka Kohichi, Sato Moritoshi, Takarada Takeshi	4. 巻 526
2. 論文標題 Establishment of a tTA-dependent photoactivatable Cre recombinase knock-in mouse model for optogenetic genome engineering	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 213 ~ 217
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.03.015	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高尾知佳, 明路, 山田大祐, 北條宏徳, 宝田剛志
2. 発表標題 マウス四肢骨格発生過程の一細胞遺伝子発現解析
3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 檀本有希雄, 高尾知佳, 山田大祐, 平岡優一, 田中光一, 佐藤守俊, 宝田剛志
2. 発表標題 青色光/細胞種特異的なDNA組み換え反応を可能とするTRE-PA-Creノックインマウスの開発
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

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
研究分担者	高尾 知佳 (Takao Tomoka) (40612429)	岡山大学・学術研究院医歯薬学域・講師 (15301)	
研究分担者	山田 大祐 (Yamada Daisuke) (50733680)	岡山大学・学術研究院医歯薬学域・研究准教授 (15301)	
研究分担者	佐藤 守俊 (Sato Moritoshi) (00323501)	東京大学・大学院総合文化研究科・教授 (12601)	

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
---------	---------