

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293085

研究課題名(和文)次世代遺伝子改変技術を応用した炎症性腸疾患におけるR2・R3の機能連関の解明

研究課題名(英文) Different roles of receptor activity modifying protein subtypes: ramp2 and ramp3 in development of colitis

研究代表者

桜井 敬之 (SAKURAI, Takayuki)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：80317825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：大腸におけるRamp3(R3)機能とR2・R3相互機能連関を、一連のR3解析用遺伝子改変マウス(R3(-/-)、R3全身過発現(R3Tg)、R2(+/-)および、研究代表者が本研究で独自開発した多遺伝子同時改変マウス作製法で産出の3遺伝子変異系統)のDSS大腸炎モデルにより検討した。その結果、R2およびR3ともに腸炎の病態に関与することが明らかとなり、さらに本来、R2は腸炎に抑制的に、R3は増強的にそれぞれが異なる役割を担っていることが示唆された。Rampサブタイプは抗炎症の新規ターゲットになる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we analyzed the pathophysiological role of ramp2, and ramp3 using dextran sodium sulfate (DSS) -induced colitis model of various gene modified mice. Both ramp2 and ramp3 have been implicated in the DSS-induced colitis. Furthermore, we demonstrated that development of colitis is augmented by ramp3, whereas ramp2 is protective against it. Our results provide novel insights into ramp signaling in colon.

研究分野：発生工学、発生生物学

キーワード：アドレノメデュリン RAMP 炎症性腸疾患 ゲノム編集 発生工学 遺伝子改変動物 疾患モデル

1. 研究開始当初の背景

アドレノメデュリン(AM)遺伝子は、強力な血管拡張降圧作用ペプチドとして、北村・寒川らにより単離されたが、その後の研究から心血管系にとどまらず、神経系、泌尿生殖系、消化器系、呼吸器系において抗炎症作用、抗動脈硬化作用、抗酸化作用など実に多彩な生理作用に関与することが明らかとされた。

AMの細胞内シグナルは、AM受容体、CRLRの活性調節タンパクRAMP2(R2)およびRAMP3(R3)で規定される。AMの多彩な生理活性は、臓器を構成する各細胞でのR2/R3の使い分けが重要であると推定されている。事実、我々の先行解析からR2はAMによる血管、臓器の恒常性維持、R3は自然免疫細胞の炎症刺激応答に関与と両者は別機能を果たすという重要知見を世界に先駆けて見出してきた(投稿準備中)。しかしRAMPの機能、特にR3の機能の詳細、R2・R3機能連関の解析は殆ど為されていない。また、これら多生理作用にはRAMPファミリーの一つ; RAMP1(R1)とそのリガンドであるCGRP遺伝子のシグナルとの相互関与性も指摘されているが詳細は不明である。AM-RAMPシステムは日本発の治療薬や診断薬となる可能性が期待されており、臨床応用に向けたプロジェクトが数多く進行しているが、その分子基盤はまだ多くが不明の状態である。AM-RAMPシステムの的確な臨床応用には、RAMPの各臓器における機能解明が知識基盤として必須である。

そこで我々は解析が遅れているR3機能の解明に向け、炎症関与のR3の役割が顕著と想定される腸・循環器系を対象にアプローチすることを先ず考えた。R2・R3のような相互に作用する遺伝子の解析ならびに関連遺伝子との作用を個体・臓器レベルで解析するには遺伝子改変動物がマストであるが、しかし従来のES細胞を介した遺伝子改変マウス作製法では、1操作、1遺伝子座、1カ所の遺伝子改変しかできないため、数種の改変遺伝子を同時に扱うことは出来なかった。

2. 研究の目的

自然免疫が関与する炎症性腸疾患に注目し、大腸におけるR3機能とR2・R3相互機能連関を検討する。R1遺伝子とR3との関係も検討する。このため先ず迅速に多遺伝子同時加工を可能とする新規マウスシステムの樹立を目指す。この新規法でRAMP解析用の遺伝子改変マウスを産

出させる。そして炎症性腸疾患モデル解析を実施する。

3. 研究の方法

(1) CRISPR/Cas9によるゲノム編集技術の応用による新規多遺伝子同時改変マウス作製法を開発する。

(2) R3機能解析のための同時3遺伝子(R1、R3、ET1(Endothelin 1))改変マウスを作製する。

(3) 新規3遺伝子改変マウスに加え、我々が独自に樹立したR3(-/-)、R3TgおよびR2(+/-)(-/-は胎生致死)を加えた一連のR3解析マウスでのDSS誘発炎症性腸疾患モデルの作製とその解析を行う。

4. 研究成果

(1) 独自の多遺伝子同時改変マウス作製法の開発の成功

多遺伝子同時改変マウス作製を可能にするsCAT(systemic Cas9 expressed transgenic mice)システムマウスの樹立に成功した。この系統の受精卵における非遺伝性の母性Cas9(maCas9)を活用することで、現在少なくとも9種の標的遺伝子座を同時編集することができることを証明した(T.Sakurai et al., Sci Rep 2016)。母性Cas9を用いる遺伝子改変マウス法は、従来の外来Cas9を胚導入する方法に比べ、遺伝子改変のモザイク率は低減され、かつ仔発生率も優れていた(投稿中)。この系統は今後、遺伝子群解析や疾患モデル作製のため、活用性の高い有用なリソースになると期待できた。現在、sCATは、活用希望者に分与を行っており、さらに今後、公的機関に預ける予定である。

(2) 研究代表者が開発した独自の多遺伝子同時改変マウス作製法を用いて同時3遺伝子改変マウス産出に成功

自然免疫細胞では、我々の先行するR3解析でR1およびET1はR3機能と相互関与性が示唆されいた(投稿準備中)。そこでsCAT受精卵による、これら3遺伝子の同時遺伝子改変マウスの産出を試みた。それぞれの遺伝子のタンパク質翻訳領域にgRNAを設定した。ET1はホモ欠損で生後致死となるためホモ欠損仔が得られないようにgRNA濃度を調整した。sCATから準備した受精卵に3遺伝子のgRNAのみを導入し、この導入受精卵由来の仔を誕生させた。仔の産出率は約50%。仔における遺伝子改変率は、R1が出産仔の70%超、R3が60%、ET1が45%程であった。この効率はgRNA設定個所の最適化を

含めまだ高率化できると考えられた。しかし現状において3遺伝子の変異は、各仔で0~3変異（ヘテロあるいはホモ変異）と保持されていることから、既にR3解析には適した材料と考えた。本研究での同時3遺伝子改変マウスの作製は、現条件で固定し実施した。

(3) R3(-/-)、R3全身過発現 (R3Tg) 3 遺伝子同時変およびR2(+/-)マウスを用いたDSS誘発炎症性腸疾患モデルによるR3の機能と腸のRAMP間機能連関

炎症性腸疾患モデルは、DSS(デキストラン硫酸ナトリウム)飲水により作製した。基本的には、1週間のDSS水自由飲、その後のTap water自由飲水を実施した。DSS濃度は約1週間前後で体重減少と下血が生じる症状を指標に調整した。実験マウスは、形態的、組織学のおよび分子生物学的に解析した。

* R3(-/-)およびR3Tgマウスについて
DDS実験的大腸炎のR3(-/-)マウスは、対象群の野生型マウスに比べDSS飲水量が常に多かった。にもかかわらず、対照群と比較すると、1週間後の生存率は高く、体重減少は少なく、下血・下痢症状は重篤でなく、盲腸から直腸間は長かった。R3(-/-)および野生型の大腸炎マウスの回腸、大腸(盲腸側、直腸側)で遺伝子発現解析を実施したところAM-R遺伝子群では、直腸側領域において、経時的にAM、CRLR遺伝子の発現亢進、R2,R3遺伝子の著しい発現亢進が認められた。一方でR1遺伝子発現は減少した。主な炎症系遺伝子では、R3(-/-)、野生型マウスの両者とも、例えばTNF、IL1b、IL6遺伝子等の強い発現亢進が認められた。注目すべき事に、これらの炎症マーカー発現はR3(-/-)よりも野生型マウスで高かった。加えて大腸の組織観察でも、R3(-/-)よりも野生型マウスで病態の重篤と炎症細胞(マクロファージ、好中球等)の浸潤が強い傾向を観察した。つまり想定外なことにR3(-/-)はDSS誘発による炎症性腸疾患が軽症であることを見出した。R3全身過発現(CAGプロモーターR3Tg)マウスでの同様の実験は、野生型間との大腸炎の病態間に大きな差異は認められなかった。

* R2(+/-)マウスについて(羨鮮、博士課程大学院生; 郝英杰、訪問研究員)

DDS実験的大腸炎によるR2(+/-)マウスの解析も実施した。分子生物学的解析は現在進行中であるが、形態的・組織学的解析から、興味深いことに、R3(-/-)とは真逆の結果となっ

た。つまり、R2(+/-)は野生群に比べ、1週間後の生存率は低く、体重減少は多く、下血・下痢症状は重篤で、腸長は短かった。

* 3 遺伝子同時改変マウス群について

最後にR3・R1・ET1同時遺伝子改変マウスにおいて同様の一連の解析を行った。これらマウス群は各個体それぞれが異なる遺伝子変異の組み合わせを持つ(例えば、R3だけ変異を持つ、またR1・R3に変異を持つ等々)。解析の結果から観えてきた傾向は、R3欠損でR1正常(発現量低下含)と思われるマウス群は、R3(-/-)系統での知見と同様に炎症性腸疾患が野生群に比べ軽症となった。R1欠損を持つと思われるマウス群は、R3欠損付加の有無にかかわらず、R2(+/-)同様に野生群より重篤となる傾向が見られた。ET1ヘテロ変異の有無は対象群とで大きな差異は認められなかった。ただ本実験の同時遺伝子改変マウスでは、ET1はヘテロ変異のみ(ホモ変異は生後致死)である。ET1ヘテロ変異(発現量低下)では表現型が観られない可能性が残されている。

(4)RAMP群の発現部位および発現量
RAMP群の市販抗体には優れた物は現在も無い。我々自身での抗体作製も何度か試みたが成功していない。そのためWB解析やIHC解析は実施できなかった。またISHもRAMP間の塩基配列の相同性から困難であった。Real time PCR解析では、大腸におけるR1およびR2はおおよそ同程度の発現量を示したが、R3はこれらに比べ約30-60倍、低かった。我々は自然免疫細胞で、R3は高く発現し、一方でR2発現はかなり低いことを既に見出している(投稿準備中)ことからRAMP群の発現は臓器部位局在性があるかも知れない。

以上の結果から、我々は大腸の機能にAM-R2・R3システムが関与することを明らかとした。さらに、R3およびR2遺伝子変異マウスの大腸炎の重篤差と、我々が見出してきたR2は血管、各臓器の恒常性維持を、R3は自然免疫細胞の炎症刺激応答に関与する知見を合わせ考えると、大腸においてもR3の本来の機能は炎症細胞(自身で)の応答や動員能に関わり腸炎に促進的に、一方、R2のそれは腸炎に抑制的(血管機能や腸膜機能など)と異なる機能を担っていることが示唆された。最近、R1(-/-)マウスにおけるDSS誘発炎症性腸疾患モデル解析の結果が発表され、R1が炎症細胞および前炎

症性サイトカインの動員の減弱を介してDSS誘発大腸炎において粘膜保護を発揮することが示された (Kawashima et al., 2017)。我々の知見から、CGRP-R1システムによる大腸炎への作用は、R3機能の上位にあることが示唆された。また現在、同一細胞内でのR2・R3の同時機能の発動はないと考えているが、これらは解析を継続している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 18 件)

(1) Sakurai T, Kamiyoshi A, Kawate H, Mori C, Watanabe S, Tanaka M, Uetake R, Sato M, Shindo T. A non-inheritable maternal Cas9-based multiple-gene editing system in mice. *Scientific Reports*, 6, Article ID srep 20011, 2016 (査読有り)

(2) Uemura T, Mori T, Kurihara T, Kawase S, Koike R, Satoga M, Cao X, Li X, Yanagawa T, Sakurai T, Shindo T, Tabuchi K. Fluorescent protein tagging of endogenous protein in brain neurons using CRISPR/Cas9-mediated knock-in and in utero electroporation techniques, *Sci.Rep.* 6 Article ID srep35861, 2016 (査読有り)

(3) Sato M, Maeda K, Koriyama M, Inada E, Saitoh I, Miura H, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S, Miyoshi K, The piggyBac-Based Gene Delivery System Can Confer Successful Production of Cloned Porcine Blastocysts with Multigene Constructs, *Int.J.Mol.Sci.*, 17, Article ID 1424, 2016 (査読有り)

(4) Tanaka M, Koyama T, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa -Shindo Y, Kawate H, Liu T, Xian X, Imai A, Zhai L, Hirabayashi K, Igarashi K, Taniguchi S, Shindo T, The endothelial adrenomedullin-RAMP2 system regulates vascular integrity and suppresses tumour metastasis, *Cardiovasc.Res.*, 111, 398-409, 2016 (査読有り)

(5) Ayuzawa N, Nagase M, Ueda K, Nishimoto M, Kawarazaki W, Marumo T,

Aiba A, Sakurai T, Shindo T, Fujita T., Rac1-Mediated Activation of Mineralocorticoid Receptor in Pressure Overload-Induced Cardiac Injury. *Hypertension.*, 67, 99-106, 2016 (査読有り)

(6) 新藤優佳、桜井敬之、神吉昭子、河手久香、小山晃英、吉沢隆浩、新藤隆行、アドレノメデュリン-RAMP2系の病態生理学的意義, *お茶の水医学雑誌*, 63, 331-338, 2015 (査読有り)

(7) Sato M, Kagoshima A, Saitoh I, Inada E, Miyoshi K, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S. Generation of -1,3-Galactosyltransferase-Deficient Porcine Embryonic Fibroblasts by CRISPR/Cas9-Mediated Knock-in of a Small Mutated Sequence and a Targeted Toxin-Based Selection System. *Reprod Domest Anim.*, 50, 872-880, 2015 (査読有り)

(8) Sato M, Koriyama M, Watanabe S, Ohtsuka M, Sakurai T, Inada E, Saitoh I, Nakamura S, Miyoshi K. Direct Injection of CRISPR/Cas9-Related mRNA into Cytoplasm of Parthenogenetically Activated Porcine Oocytes Causes Frequent Mosaicism for Indel Mutations. *Int J Mol Sci.*, 16, 17838017856, 2015 (査読有り)

(9) Sato M, Inada E, Saitoh I, Matsumoto Y, Ohtsuka M, Miura H, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S. A combination of targeted toxin technology and the piggyBac-mediated gene transfer system enables efficient isolation of stable transfectants in nonhuman mammalian cells. *Biotechnol J.*, 10, 143-153, 2015 (査読有り)

(10) Koyama T, Sakurai T, Kamiyoshi A, Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Shindo T., Adrenomedullin-RAMP2 System in Vascular Endothelial Cells., *J Atheroscler Thromb.*, 22, 647-653, 2015 (査読有り)

(11) Sato M, Miyoshi K, Nagao Y, Nishi Y, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S: The combinational use of CRISPR/Cas9-based gene editing and targeted toxin technology enables efficient biallelic

knockout of the α -1,3-galactosyl transferase gene in porcine embryonic fibroblasts. Xenotransplantation, 21, 291-300, 2014 (査読有り)

(12) Sakurai T, Watanabe S, Kamiyoshi A, Sato M, Shindo T: A single blastocyst assay optimized for detecting CRISPR/Cas9 system-induced indel mutations in mice. BMC Biotechnology, 14, 69e, 2014 (査読有り)

〔学会発表〕(計 35 件)

(1) 2016年11月 39回日本分子生物学会 ランチョンセミナー 横浜、Cas9発現マウス樹立と、その母性Cas9活用による多遺伝子同時編集マウス作製の試み、桜井敬之

(2) 2016年11月 39回日本分子生物学会、横浜、piggyBacベクターシステムとin vivo gene transferを用いた新たな肝細胞株樹立の試み、渡部 聡、中村 伸吾、桜井 敬之、大塚 正人、佐藤 正宏

(3) 2016年11月 39回日本分子生物学会、横浜、マウスすい臓内へのpiggyBac系を介した直接生体内遺伝子導入は外来遺伝子の長期発現を可能とする、佐藤 正宏、稲田 絵美、齋藤 一誠、三浦 浩美、大塚 正人、中村 伸吾、桜井 敬之、渡部 聡

(4) 2016年9月第1回日本ゲノム編集学会 広島、A multiple-gene modified mouse production by using maternal Cas9 in the zygotes prepared from transgenic mice systemically expressing Cas9、桜井敬之、神吉昭子、河手久香、森智恵、渡部聡、佐藤正宏、新藤隆行

(5)2016年7月 第34回内分泌代謝学サマーマナーセミナー 福岡、急性および慢性脳虚血におけるカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)の病態生理学的意義、テキ留玉、五十嵐恭子、桜井敬之、神吉昭子、新藤優佳、河手久香、山内 啓弘、田中愛、劉甜、羨鮮、今

井章、平林一貴、載昆、崔南奇、劉騰、谷村圭哉、新藤隆行

(6)2016年4月 第89回日本内分泌学会 京都、カルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)は、白色脂肪組織の脂肪分解を抑制する、劉甜、桜井敬之、神吉昭子、新藤優佳、河手久香、田中愛、羨鮮、今井章、テキ留玉、平林一貴、大和慎治、載昆、崔南奇、劉騰、五十嵐恭子、山内啓弘、新藤隆行

(7) 2016年4月 第89回日本内分泌学会 京都、アドレノメデュリン-RAMP2システムは褐色脂肪細胞の細胞分化とエネルギー代謝を制御する、神吉昭子、桜井敬之、新藤優佳、河手久香、田中愛、劉甜、羨鮮、今井章、Liuyu Zhai、平林一貴、大和慎治、載昆、崔南奇、劉騰、五十嵐恭子、山内啓弘、新藤隆行

(8) 2015年12月 第38回日本分子生物学会 神戸 zygote injectionに依らない生殖細胞、胚を標的とした遺伝子導入によるCRISPR/Cas9 genome editingの可能性、佐藤 正宏、大塚正人、中村 伸吾、桜井 敬之、稲田 絵美、齋藤 一誠、渡部聡

(9) 2015年4月 第119回日本眼科学会総会 札幌、網膜血管透過性亢進に対するアドレノメデュリンの抑制作用 今井章、鳥山佑一、家里康弘、桜井敬之、神吉昭子、新藤優佳、河手久香、新藤隆行、村田敏規

(10) 2015年02月 第44回日本心臓血管作動物質学会 香川 アドレノメデュリン-RAMP2システムは、白色脂肪 褐色脂肪間の脂質、エネルギー代謝を制御する 神吉昭子、桜井敬之、新藤優佳、河手久香、山内啓弘、五十嵐恭子、鳥山佑一、田中愛、劉甜、羨鮮、今井章、テキ留玉、大和慎治、新藤隆行

(11)2014年11月 第18回日本心血管内分泌代謝学会 横浜 アドレノメデュリン-RAMP2システムは、白色脂肪 褐色脂肪間の脂質、エネルギー代謝バランスを制御する 神吉昭子、桜井敬之、新藤優佳、河手久香、劉甜、羨鮮、今井章、テキ留玉、大和慎治、新藤隆行

(12) 2014年10月 第35回日本肥満学会 宮崎 アドレノメデュリン-RAMP2システムによる白

色脂肪と褐色脂肪組織における脂質代謝制御
神吉昭子、桜井敬之、新藤優佳、河手久香、
山内啓弘、五十嵐恭子、鳥山佑一、田中愛、
劉甜、羨鮮、今井章、テキ留玉、大和慎治、
新藤隆行

(13)2014年04月 The 18th International
Vascular Biology Meeting, 京都
Adrenomedullin-RAMP2 system regulates
lipid and energy metabolism in white and
brown adipocytes, Kamiyoshi A, Sakurai T,
Ichikawa-Shindo Y, Kawate H, Uetake R,
Yamauchi A, Igarashi K, Toriyama Y, Tanaka
M, Imai A, Liu T, Xian X, Shindo T.

(14) 2014年04月 第87回日本内分泌学会 福
岡 アドレノメデュリン-RAMP2システムによ
る脂質、エネルギー代謝調節神吉昭子、桜井
敬之、河手久香、新藤優佳、植竹龍一、山内
啓弘、五十嵐恭子、鳥山佑一、田中愛、劉甜、
羨鮮、今井章、新藤隆行

〔図書〕(計 1 件)

(1) 新藤隆行、桜井敬之、神吉昭子、新藤優
佳、田中愛、劉甜、小山晃英、アドレノメデ
ュリン-RAMP2 シグナル, 秀潤社 細胞工学
第 35 巻第 1 号, pp33-38, 2016

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：遺伝子改変非ヒト動物、受精卵及び標
的遺伝子を選択的且つ部位特異的に改変す
るための方法

発明者：桜井敬之、新藤隆行

権利者：国立研究開発法人科学技術振興機構

種類：特許

番号：PCT/JP2016/085391

出願年月日：2016年11月29日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

信州大学大学院医学系研究科循環病態学教室

<http://www7a.biglobe.ne.jp/~shindo/>

信州大学大学院医学系博士課程 疾患予防医

科学系専攻 循環病態学

[http://www.shinshu-u.ac.jp/graduate/medi
cine/doctoral/m-science/saisei.html](http://www.shinshu-u.ac.jp/graduate/medicine/doctoral/m-science/saisei.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桜井 敬之 (SAKURAI, Takayuki)

信州大学・学術研究院医学系・准教授

研究者番号：80317825

(2) 研究分担者

新藤 隆行 (SHINDO, Takayuki)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：90345215