

令和 3 年 5 月 21 日現在

機関番号：13802

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17737

研究課題名（和文）in vivoイメージングによる虚血腎障害後の腎臓・肺内NETs動態の解明

研究課題名（英文）Elucidation of NETs dynamics in the kidney and the lung after ischemic kidney injury.

研究代表者

藤倉 知行 (Fujikura, Tomoyuki)

浜松医科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00444349

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）：好中球細胞外トラップ(NETs)形成時に、主要な働きをしているペプチジルアルギニンデアミナーゼ4(PAD4)遺伝子の下流に、CRISPR/Cas9システムを用いて緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子をノックインし、PAD4-GFPノックインマウスを作成した。作成したマウスの形質確認のため、ノックインマウスより採取した好中球を用いてin vitroでNETsを誘導し、NETs形成時のGFP発現亢進を確認できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細菌などによる感染性病態のみならず、非感染性病態である自己免疫性疾患や血栓症など様々な病態への関与が報告されている好中球細胞外トラップ(NETs)の動態を解明することは、種々の病態解明や治療介入に向けた創薬においても重要である。その点において、本研究においてNETs形成をGFP発現を用いることにより同定出来るモデルを確立した意義は大きい。今後本モデルを用いて、in vivoにおける経時的な動態・クリアランスを解明することが出来れば、より臨床応用に繋げる研究へと導ける。

研究成果の概要（英文）：To detect neutrophil extracellular traps (NETs) easily and precisely, we focused on PAD4 (peptidyl arginine deminase-4) gene that is key molecule for NETs formation. We established PAD4-GFP knock-in mouse using CRISPR/Cas9 system. In order to confirm the phenotype of those knock-in mice, we induced NETs in vitro using neutrophils extracted from the knock-in mice. Then, it confirmed that GFP expressions increased after NETs formation.

研究分野：腎臓病学

キーワード：好中球細胞外トラップ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

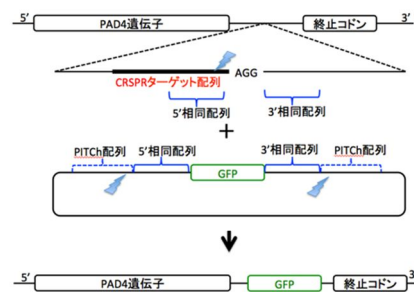
NETs は活性化した好中球からクロマチンが細胞外に放出される現象のことで、感染症においては放出したクロマチンネット上に細菌をトラップして殺菌的に働き、生体保護的作用を有する。一方で自己免疫疾患や血管炎、血栓形成、痛風発作などへの関与も指摘されており、このような非感染性病態において NETs は過剰な炎症を惹起し、生体・臓器障害を増悪させると考えられている。腎臓分野においては、虚血再灌流障害後や半月体形成性腎炎などにおいて NETs が形成され、それらの病態に関与していることが分かっている。しかし、NETs の(1)詳細な形成部位や(2)動態・クリアランスの詳細は解明されておらず、また NETs 同定のためのより(3)特異的な手法は未確立であった。そのためには(1)-(3)を解決する必要があった。

2. 研究の目的

腎臓において NETs を特異的に同定し、in vivo における動態やクリアランスを解明することにより、NETs 制御による腎障害改善への第一歩の研究になると考えた。一般的に NETs の同定方法は、組織固定後に NETs 構成成分である DNA・ヒストン・好中球エラスターゼなどの多重染色を行う。しかしながら、この方法では in vivo で経時的に NETs を同定できない。そこで NETs 形成の key molecule とされている PAD4 蛋白に注目し、PAD4-GFP ノックインマウスの作製を試み、NETs 形成時における GFP 発現を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

CRISPR/Cas9 技術を用い、PAD4 遺伝子下流終止コドン直前に GFP 導入ベクターを用いて GFP をノックインする(右図)。GFP 遺伝子は 700bp を越す長い塩基配列のためノックイン効率を向上させるため CRISPR/Cas9 と PITCh システムを用いる。CRISPR/Cas9 においては、off target 現象(意図しない遺伝子配列切断)が問題となり得る。CRISPR design tool(COSMID)を用いて off target 配列候補をピックアップし、それぞれにおいてシーケンスにより切断されていないことを確認する。

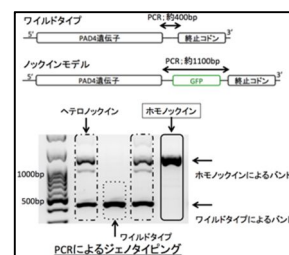


in vitro で NETs を誘導する。マウス骨髄または末梢血より好中球を単離し、PMA(phorbol myristate acetate)で Suicidal NETs を誘導し、核染色(DAPI)・シトルリン化ヒストン(ch3)・MPO(Myeloperoxidase)の多重染色により NETs 形成の定性的・定量的評価を行う。次に、黄色ブドウ球菌を好中球と共培養し Vital NETs を誘導し、上記と同様に定性的・定量的評価を行う。最後に LPS と GM-CSF を好中球と共培養し Mitochondrial NETs を誘導し、上記と同様に定性的・定量的評価を行う。

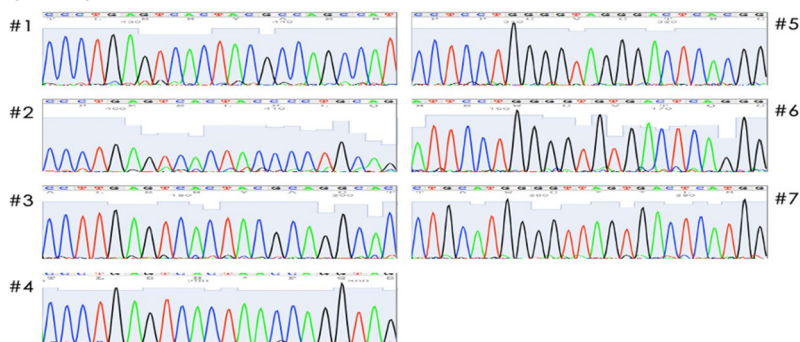
上記の方法で in vitro で NETs を誘導し、GFP の発現を確認する。具体的には Suicidal NETs を誘導し、GFP 発現を ELISA にて評価し、ノックインマウスのフェノタイプを確認する。

4. 研究成果

CRISPR/Cas9 と PITCh システムを用い、受精卵にマイクロインジェクション法にて GFP ベクターをノックインした。ヘテロノックアウトマウス作成し、ブリーディングによりホモノックインマウスの作製した(右図)。



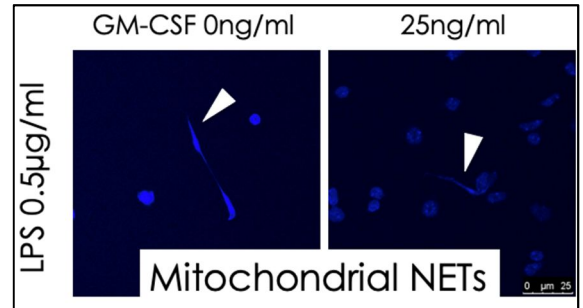
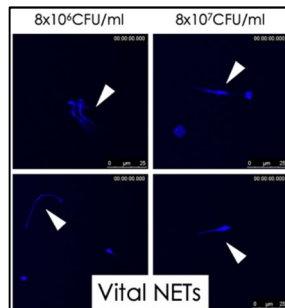
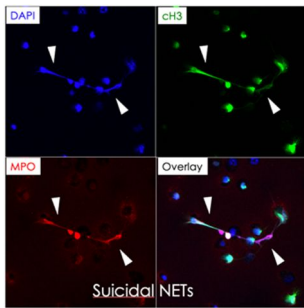
次に、COSMID によって同定した sgRNA のオフターゲット候補サイトの上位 7 箇所をリストアップし、それぞれのシーケンスを確認し、ワイルドタイプと相違がなく、切断されていないことを確認した(下図)。



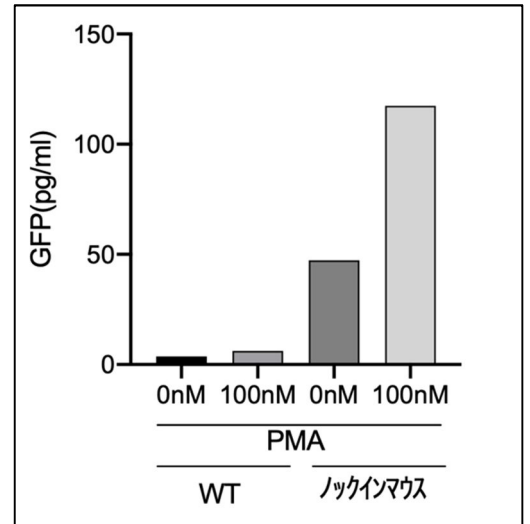
MACS Cell Separation システムおよび Neutrophil isolation kit を用いてマウス骨髄および末梢血より好中球を単離した。単離後の好中球の比率が 95-98%であることをフローサイトメーターで確認した。

PMA 刺激により Suicidal NETs が誘導されることが報告されており、PMA 刺激による Suicidal NETs 形成を核染色(DAPI)・シトルリン化ヒストン(ch3)・MPO(Myeloperoxidase)の多重染色により確認した。

同様に黄色ブドウ球菌との共培養で Vital NETs が、LPS と GM-CSF との共培養で Mitochondrial NETs が誘導されることが報告されており、それぞれの NETs を誘導した。これらの評価においては DAPI 染色による核形態で NETs 形成を評価した。



PMA 刺激により in Vitro において Suicidal NETs が誘導し、ワイルドタイプ(WT)における NETs 誘導では GFP が検出されず、ノックインマウスにおいては NETs 誘導により GFP 発現の亢進(ELISA)を確認した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takeshi Tashiro, Tomoyuki Fujikura, Yoshiko Nakagawa, Tetsushi Sakuma, Yoshitaka Naito, Takashi Yamamoto, Hiroaki Miyajima and Hideo Yasuda
2. 発表標題 Establishment of PAD4 (peptidyl arginine deminase-4)-GFP knock-in mice with CRISP/Cas9 system
3. 学会等名 慶北セミナー
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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