

令和元年6月11日現在

機関番号：34605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11120

研究課題名(和文) ヒト胎盤由来細胞を利用したNLRP7の機能解析

研究課題名(英文) The analysis of roles of NLRP7 in molar pregnancies using NLRP7-deleted HTR-8/SVneo cells.

研究代表者

前原 佳代子 (Maehara, Kayoko)

畿央大学・健康科学部・教授

研究者番号：80421311

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：NLRP7遺伝子変異は反復胞状奇胎の原因と考えられているが、どのように病態を形成するか不明である。ゲノム編集CRISPER/Casシステムを利用しNLRP7遺伝子を破壊した反復胞状奇胎の疾患モデルヒト細胞を作成し、NLRP7遺伝子の機能の一端を明らかにすることを試みた。遺伝子破壊に必要なベクターを設計、作成し、エレクトロポレーション法で一時的にtrophoblast cell lineのHTR-8/SVneoに導入した。標的遺伝子に改変が生じ、改変のパターンから遺伝子破壊ができていた細胞株が2つ得られた。研究期間内に疾患モデル細胞を作成することができた。機能解析は今後行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子の機能を解析には、細胞やモデル生物(個体)を利用する方法があり、マウスなどのげっ歯類が利用されている。しかしNLRP7遺伝子はげっ歯類に保存されておらず、ノックアウトマウスを用いた解析などができない。近年開発されたゲノム編集を利用することで、NLRP7遺伝子の破壊をヒトの細胞で行い、疾患モデル細胞を作成できた。反復胞状奇胎の病態形成を研究するための有用なツールになると考える。

研究成果の概要(英文)：Hydatidiform moles (HMs) are abnormal pregnancies with trophoblastic hyperplasia. Recent studies have shown that mutations of NLRP7 gene are associated with recurrent hydatidiform moles (RHMs), although the mechanism underlying molar pregnancies affected by the mutations of NLRP7 remains unknown. To investigate the effects of NLRP7 on cell growth in trophoblasts, we deleted NLRP7 from HTR-8/SVneo cells, a trophoblast cell line, by the CRISPR/Cas9 system. To minimize the off-target effect, D10A mutant nickase version of Cas9 (Cas9D10A) combined with guide RNA (gRNA) pairs having high sequence-specificity evaluated by our developing tool (fcrisprt) was applied. Of 50 clones screened, NLRP7 was successfully disrupted in two clones; clone 1 and clone 2 obtained biallelic 20 bp-deletion and 2 bp-insertion within exon 4 of NLRP7 gene, respectively.

研究分野：産婦人科学

キーワード：反復胞状奇胎 NLRP7遺伝子 ゲノム編集

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 胞状奇胎の原因

産婦人科領域の絨毛性疾患である胞状奇胎の多くは、雄核発生（ゲノム欠損卵子に1精子受精あるいは2精子受精）や正常卵子に2精子受精が原因で発症すると考えられている。一方、海外の複数のグループから、レバノン、ドイツ、パキスタン、インド、中国、エジプト、欧州と世界の多岐にわたる人種で、家族性・孤発性の反復胞状奇胎の報告がされている (Hum. Mol. Genet. 1999; 8: 667-671, Nat. genet. 2006; 36: 300-302)。これらの反復胞状奇胎の組織では、通常の雄核発生による胞状奇胎とは異なり、父母に由来するゲノムを1セットずつ継承していること、母親の染色体19番にコードされている *NLRP7* (*NLR family, pyrin domain containing 7*) 遺伝子に変異があることが示されており、*NLRP7* の機能異常が胞状奇胎の発症に関与することを示唆している (図1)。私達のグループでは、日本人の胞状奇胎症例を収集し、解析を進めている。複数の日本人症例のゲノム解析の過程で、*NLRP7* 遺伝子変異をもつ本邦初の症例が見つかった (Gynecol. Obstet. Invest. 2016; 81:353-358)。この症例では、*NLRP7* 遺伝子の変異は母親のゲノムにあること、母親のゲノムでは *NLRP7* 遺伝子を含む周辺領域はヘテロ接合性を欠いているため、結果としてホモ変異になること、変異により、アミノ酸のトリプトファンをコードするコドンが終始コドンに変わるため、全長1037アミノ酸で構成される *NLRP7* タンパク質が194アミノ酸までしか翻訳されず、不完全なタンパク質が産生されていることがわかった。海外からの複数の報告や日本人症例の解析結果は、人種によらず、反復胞状奇胎の病態形成に特定の遺伝子変異の関与を示唆する。しかし、*NLRP7* 遺伝子の機能は未知であり、胎盤や胎児発育における役割は不明である。

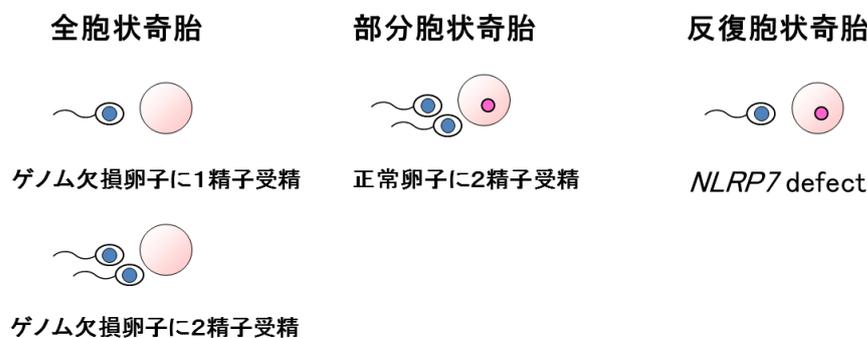


図1 胞状奇胎で観察される核型

### (2) ゲノム編集

遺伝子の機能を解析する方法のひとつに、モデル生物を使って遺伝子を破壊してどのような変化が生じるかを調べる方法がある。ヒト NLRPs には *NLRP1*~*NLRP14* があり、それらの遺伝子の多くは、哺乳類で比較的保存されているが、*NLRP7* 遺伝子はげっ歯類には存在せず (BMC Evolutionary Biol. 2009; 9: 202)、ノックアウトマウスを利用した機能解析が難しい。近年開発されたゲノム編集は、人工ヌクレアーゼの Zinc Finger Nucleases (ZFN)、Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs) や、細菌の免疫システムである CRISPR/Cas を用いて、ゲノムの塩基配列を書きかえる (編集する) 技術である (Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2013; 14: 49-55, Science, 2013; 339: 819-823, Science, 2013; 339: 823-826)。ゲノム編集は、一塩基置換や微細な塩基の欠失や挿入による遺伝子の変異を、細胞で忠実に模倣できること、ヒト細胞での組み換え効率がよいこと、モデル開発にかかる時間の大幅な短縮や、労力と費用の軽減ができることなど、疾患モデル作成に多くの利点がある。

## 2. 研究の目的

*NLRP7* 遺伝子の変異は反復胞状奇胎の原因と考えられているが、どのように胞状奇胎の病態を形成するか不明である。ゲノム編集 CRISPR/Cas システムを利用し *NLRP7* 遺伝子を破壊した反復胞状奇胎の疾患モデルヒト細胞を作成し、*NLRP7* 遺伝子の機能の一端を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 反復胞状奇胎の疾患モデル細胞の作成

ゲノム編集を利用して、反復胞状奇胎のヒト疾患モデル細胞を作成する。研究で使用する胎盤由来のヒト細胞は、Charles H. Graham 博士らが樹立した trophoblast cell line の HTR-8/SVneo である (Exp. Cell Res. 1993; 206: 204-211)。ゲノム編集で使用する CRISPR/Cas システムに必要なベクター等は addgene から入手する。CRISPR/Cas によるゲノムの改変は、DNA 切断とそれに続く相同組み換え修復を利用するが、CRISPR/Cas は、標的配列以外を切断する

off-target effect がある。本研究では、CRISPR/Cas の改良法である off-target effect が少ないダブルニッキング法 (Ran F.A. et al., Cell, 154, 1380-1389, 2013) (図 2) を使用し、疾患モデル細胞の開発を行う。標的配列の選択には、連携研究者が開発したプログラム fcrisprt (標的塩基配列の特異性をヒト全ゲノム配列と比較して選択する) を利用する。配列特異性の高い標的配列を複数選び、ベクターを作成する。作成したベクターをエレクトロポレーション法で一時的に HTR-8/SVneo に導入して、クローンを拾い、それらの細胞からゲノム DNA を抽出する。

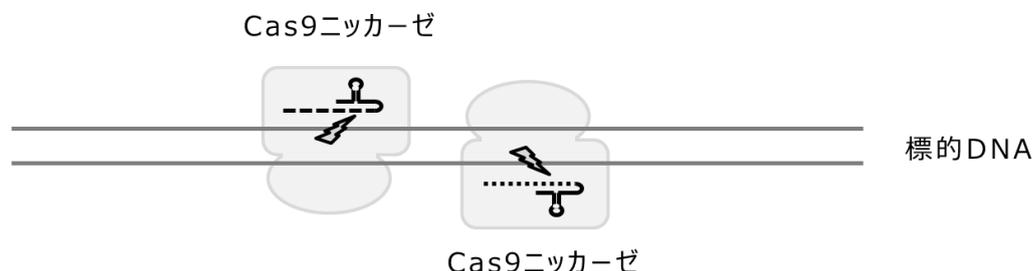


図 2 Cas9 ニッカーゼ (D10A 変異体) を利用したダブルニッキング法

#### (2) 開発した疾患モデルヒト細胞の検証

*NLRP7* 遺伝子が破壊されているかどうかの確認に、ゲノム配列のシーケンシングを行う。定量的PCRやウエスタンブロッティングで *NLRP7* の発現レベルや遺伝子産物の有無を確認する。次に、開発した細胞が、胞状奇胎の疾患モデル細胞として適切であるか検証する。具体的には、*NLRP7* 遺伝子破壊により、胞状奇胎に特徴的な絨毛の嚢胞状変化など細胞の形態変化の有無、ヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) の産生増加、他のグループから報告された *NLRP7* のノックダウンによる IL-1 ベータの合成の増加 (J. Biol. Chem. 2011; 286: 43313-43323) を調べて、開発した細胞が胞状奇胎で報告される特徴を備えているか検討する。

#### (3) *NLRP7* が細胞増殖に与える影響

*NLRP7* 遺伝子を破壊した細胞とコントロールの親細胞を材料として、細胞の増殖能の違いと、細胞周期を制御する因子やシグナル経路の活性化の違いについて比較評価を行う。具体的には、継代培養における増殖曲線の作製により求める倍加速度で、細胞増殖能を評価する。また、細胞周期を制御する因子の解析では、増殖を促進する因子と抑制する因子について、p57kip2 と ki-67 を中心に調べる。

#### (4) *NLRP7* と相互作用する因子の解析

*NLRP7* を消失させた細胞とその親細胞を材料として、*NLRP7* に対する抗体を用いて免疫沈降を行い、沈降物に含まれる *NLRP7* と相互作用する因子を同定する。

### 4. 研究成果

#### (1) 反復胞状奇胎の疾患モデル細胞の作成

##### ① ベクターの設計

UCSC genome browser から *NLRP7* 遺伝子の塩基配列情報を入手して、double nicking 用のベクターの設計に必要なターゲット配列を探した。*NLRP7* 遺伝子のエキソン領域を中心にターゲット配列候補 15 カ所について、その塩基配列の特異性をヒト全ゲノム配列と比較して最終的に特異性の高いターゲット配列 4 カ所を選択した。それぞれのターゲット配列に対するベクターを作成した。

##### ② HTR-8/SVneo への遺伝子導入

HTR-8/SVneo へのベクターの導入は Neon<sup>TM</sup> Transfection System (Invitrogen) を使用した。まず遺伝子導入効率がよい最適化条件について EGFP 発現ベクターを用いて検討した。得られた最適化条件で、ガイド RNA を発現する double nicking 用のペアのベクターと Cas9 ニッカーゼ (D10A 変異体) を発現するベクターを HTR-8/SVneo に導入した。

##### ③ クローンの収集

それぞれのターゲット配列から合計 50 個のクローンを収集した。

#### (2) 開発した疾患モデルヒト細胞の検証

##### ① クローンからのゲノム DNA の抽出およびゲノム配列の確認

収集したクローンから、DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を使用してゲノム DNA を抽出した。*NLRP7* 遺伝子のターゲット配列を含む領域を抽出したゲノム DNA を使用して PCR によって増幅した。ゲノム改変を行っていないコントロールの細胞からもゲノム DNA を抽出し PCR に

よる増幅を行った。PCR 増幅産物をアガロースゲルで電気泳動をして、バンドパターンを確認した。精製した PCR 増幅産物を材料として BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) でシーケンシング反応を行い、*NLRP7* 遺伝子のターゲット配列が破壊されているか塩基配列を確認した。2つのクローンで *NLRP7* 遺伝子の破壊が起きた (図 3)。タンパク質をコードしているエキソン 4 に、クローン 1 では 20 bp の欠失、クローン 2 では 2 bp の挿入が生じ (図 3A)、その結果、2つのクローンでは、読み枠がずれて別のアミノ酸に置き換わり、さらに終止コドンが出現して翻訳が終了した (図 3B)。

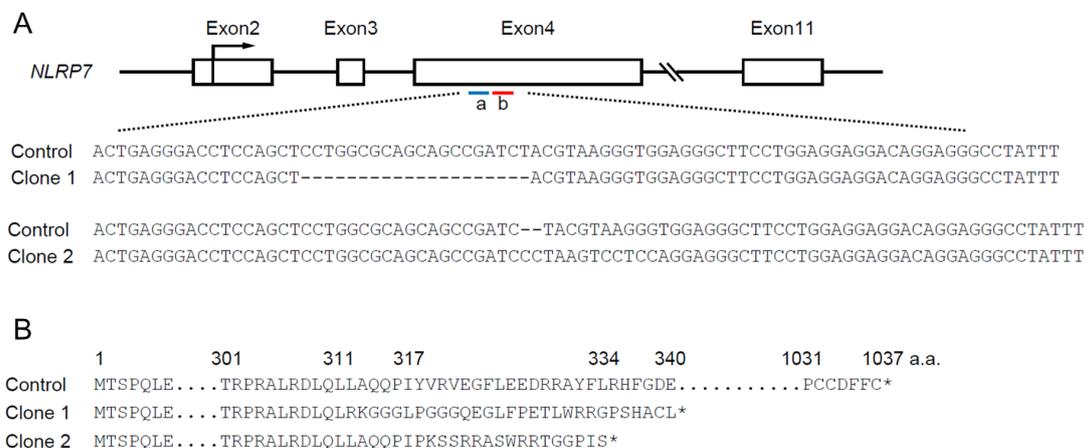


図 3 CRISPR/Cas システムによる *NLRP7* 遺伝子の破壊 A. コントロール細胞と 2つのクローンの *NLRP7* 遺伝子の塩基配列 a と b はペアのガイド RNA のターゲット部位 B. コントロール細胞と 2つのクローンの *NLRP7* のアミノ酸配列 asterisk は終止コドンによる翻訳終了を示す。

## ② ウェスタンブロッティングによる遺伝子産物の有無の確認

塩基配列の確認から *NLRP7* 遺伝子破壊ができた 2つのクローンおよびコントロール細胞から、タンパク質を抽出した。2種類の *NLRP7* の抗体を利用して、それぞれの細胞での遺伝子産物の有無を確認した。非特異的なバンドが複数検出されるなど、抗体の特異性に問題があった。タグ付き *NLRP7* を過剰発現させるベクターを作成して、タグに対する抗体を併用しながら、*NLRP7* 抗体の特異性を検証する必要がある。

研究期間内には、*NLRP7* 遺伝子を破壊した 2クローンを得ることができた。現所属大学に移動した 2015 年度から遺伝子組換え実験を行うために必要な委員会の設置や規定の整備を行い、本研究課題により分子生物学の手法を用いた研究を進めて、ヒト細胞を使った疾患モデル細胞を作成できた。しかし機能解析には至らなかったため、今後、疾患モデル細胞の検証の続きと *NLRP7* の機能解析を進め、研究成果を論文にして発表する。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

- ① Usui H., Nakabayashi K., Kaku H., Maehara K., Hata K., Shozu M. Elucidation of the developmental mechanism of ovarian mature cystic teratomas using B allele - frequency plots of single nucleotide polymorphism array data. *Genes Chromosomes Cancer*, 57, 409-419, 2018, doi: 10.1002/gcc.1. 査読有
- ② 前原佳代子, 未来を変えるゲノム編集、畿央大学紀要、第 14 巻 第 1 号 1-8, 2017, doi:10.24482/00000009 査読有
- ③ Ito Y., Maehara K., Kaneki E., Matsuoka K., Sugahara N., Miyata T., Kamura H., Yamaguchi Y., Kono A., Nakabayashi K., Migita O., Higashimoto K., Soejima H., Okamoto A., Nakamura H., Kimura T., Wake N., d Taniguchi T., and Hata K. Novel nonsense mutation in the *NLRP7* gene associated with recurrent hydatidiform mole. *Gynecol. Obstet. Invest.* 81, 353-358, 2016, doi:10.1159/000441780 査読有

〔学会発表〕 (計 1 件)

- ① 前原佳代子, ヒト早老症モデル細胞の開発、第 36 回日本ヒト細胞学会学術集会、2018

〔図書〕 (計 1 件)

- ① 金子章道、堀江尚子、島恒生、藤澤弘枝、前原佳代子、福本貴彦、金内雅夫、山本隆、河野由美、森岡周、西井康恵、訓覇秋磨、細越寛樹、小野尚香、安井義和、ナカニシヤ出版、学生と考える生命倫理 第 2 版、2018、42-50

〔その他〕

ホームページ等

畿央大学教員紹介データベース 前原佳代子

[http://webinfo.kio.ac.jp/kiol/view2.asp?msg\\_no=275](http://webinfo.kio.ac.jp/kiol/view2.asp?msg_no=275)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：祐實 泰子

ローマ字氏名：(SUKEZANE, taiko)

所属研究機関名：畿央大学

部局名：健康科学部

職名：講師

研究者番号（8桁）：80425454

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。