

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14598

研究課題名(和文)カドヘリンによる細胞接着欠損により引き起こされる病態モデル作出

研究課題名(英文) Establishment of an animal model for diseases induced by deficiency in cadherin-mediated cell adhesion.

研究代表者

小澤 政之(OZAWA, Masayuki)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：90136854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：DsRedとE-カドヘリンの細胞質ドメインのキメラ(DECT)を発現させると、カドヘリンの輸送が阻害されて、細胞接着が阻害された。そこで時期・組織特異的にDECTを発現するマウスを作れば、細胞接着ができない事により引き起こされる異常を持った変異マウスを作出することができる。1)DECTをCre-loxP系を使ってin vivoで時期・組織特異的に発現させるための発現カセット、「DECTカセット」発現ベクターを作製した。2)これをマウスES細胞に導入し、G418耐性細胞を得た。このES細胞を使用して、キメラマウスを作製して、トランスジェニックマウス(DECTカセットマウス)を作製する。

研究成果の概要(英文)：Expression of a chimeric molecule (DECT) composed of a red fluorescent protein (DsRed) and the cytoplasmic domain of E-cadherin (ECT) inhibits the cell surface transport of endogenous cadherins. Thus, establishment of mouse in which DECT expression can be induced time- and space-specific manner provides an animal model for diseases induced by deficiency in cadherin-mediated cell adhesion. We constructed an expression vector that expresses the lacZ reporter gene before Cre-mediated excision and expresses DECT following Cre excision, which removes the lacZ gene. This vector was introduced into ES cells by transfection. The lacZ gene was flanked by loxP sites. The DECT-coding sequence followed the loxP-flanked region. DECT was expected to not be expressed until after Cre excision of β -geo. These clones were found to be positive for β -galactosidase activity and negative for DsRed fluorescence. These ES cells will be used to establish transgenic mouse.

研究分野：細胞生物学

キーワード：細胞接着 カドヘリン Cre-loxP系 トランスジェニックマウス 病態モデル

1. 研究開始当初の背景

細胞間接着の重要性は培養細胞を用いた研究で示されているが、個体レベルでの証明は限定的であった。

2. 研究の目的

個体の発生、分化、成長は細胞間の接着が適切に機能して初めて稼働する。その主な機能を担う分子として細胞間接着分子カドヘリンが知られる。細胞間接着不全で引き起こされる様々な生物学的現象を個体レベル (in vivo) で観察する事を目的とする。

3. 研究の方法

申請者らは in vitro の系で赤色蛍光タンパク質と E-カドヘリンの細胞質ドメイン (ECT) のキメラ (DECT) を発現させると、内在性のカドヘリンの細胞表面への輸送が阻害されて、細胞接着が阻害されることを発見した [Ozawa M. E-cadherin cytoplasmic domain inhibits cell surface localization of endogenous cadherins and fusion of C2C12 myoblasts. *Biol Open*. 2015 Oct 9;4(11):1427-35. doi: 10.1242/bio.013938.]. そこで、Cre-loxP 系を使って、任意に DECT を発現できる transgenic (Tg) マウスを作ることができれば、細胞間接着不全で引き起こされる様々な生物学的現象を in vivo で観察できるのではないかと考えた。

そこで、以下の実験を行なう計画を策定した。

1) DECT カセット導入 ES 細胞の樹立

DECT カセットを ES 細胞に導入し、G418 耐性細胞を得る。上述の様に、導入された ES 細胞は G418 耐性を示すと同時に X-gal 染色陽性であるはずである。G418 耐性クローンに Cre ベクターを導入し、Cre を発現させ、DECT の発現が起こって、細胞が赤色蛍光で赤くなり、DECT の作用でバラバラになることを確認する。なお、ES 細胞で DECT を発現すると細胞がバラバラになる事は確認済みである。なお、DECT カセット導入 ES 細胞は、DECT 発現誘導前後で、ヌードマウス皮下に移植した際に形成される奇形種を精緻に調べる事により、特殊な状況下ではあるが、細胞分化への DECT 発現の効果を調べる事にも利用できる。

2) DECT カセットを内蔵する Tg マウス系統の作成

常法に従って、DECT カセットをマウス受精卵に注入し、生まれた子の耳組織における β -galactosidase 活性の組織化学的解析から、強発現を示す Tg 系統を選抜する。なお、この系統と Cre を全身で発現する Cre Tg マウスとを交配し、得られる double Tg 胚が、赤色蛍光を示すと同時に、桑実期胚 (E-カドヘリンの作用で compaction が起こる) において発生異常を示す事を観察することにより、このマウスでの DECT 発現が Cre 依存性である事を確認しておく。

3) DECT カセットを持つ ES 細胞のマウス胚盤胞への注入と Tg マウスの繁殖

2) で得られた DECT カセット ES 細胞クローンをマウス胚盤胞に注入し、キメラマウスを得る。なお、上述のようにキメラマウスにおけるキメラ性の判定は β -galactosidase 活性を使う。キメラ性が高いほど ES 細胞由来の生殖細胞が多いと期待されるからである。キメラマウスと野生型マウスとの交配により、DECT カセットを有する Tg マウス系統を樹立する。なお、この系統は β -geo を発現するが、DECT は発現しない。

4) in vivo エレクトロポレーションによる Cre 発現ベクター導入と解析

in vivo エレクトロポレーションにより、DECT カセットマウスの成体 (生後 8 ~ 10 週目) あるいは幼体 (生後 2 週目) 組織へ Cre 発現ベクターの導入を行う。筋肉あるいは皮膚表皮で Cre を発現させ、DECT の発現を誘導する。DECT 発現部位では、DsRed 由来の赤色蛍光が認められ、発現のない正常組織とは容易に区別できる。Cre 遺伝子導入後、導入部位の状況を経時的に観察し、異常を示した部位をサンプリングし、免疫組織化学的、生化学的に調べる。対照としては、遺伝子導入を行わなかった近傍の部位をサンプリングする。

5) DECT カセットマウスと部位特異的 Cre 発現マウスの交配マウスの解析

Cre を組織特異的に発現する Tg マウス系統 (例えば、ヒトケラチン 14 プロモーターにより Cre が発現する keratin 14-Cre recombinase mice) を米国 Jackson 研究所より入手する。これらの Cre マウスと DECT カセットマウスとの交配で得られる double Tg マウス子孫について、1) で述べた方法で調べる。

4. 研究成果

本研究で使用した ES 細胞の培養が困難を極めた為、完遂できなかった。すなわち、DECT カセットを導入した ES 細胞の樹立には成功したが、Cre ベクターを導入し、Cre を発現させて DECT を発現させると細胞が増殖しなかった。DECT の発現自体は ES 細胞の増殖を阻害しないので、入手した血清が適合しないと思われる。

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 10 件)

1. Ozawa M. Nonmuscle myosin IIA is involved in recruitment of apical junction components through activation of α -catenin. *Biol Open*. (査読有) 2018 Apr 30;7(5). pii: bio031369. doi: 10.1242/bio.031369.

2. Kobayashi W, Ozawa M. The epithelial-mesenchymal transition induced by transcription factor LEF-1 is independent of β -catenin. *Biochem Biophys Rep.* (査読有) 2018, in press
3. Watanabe S, Sakurai T, Nakamura S, Miyoshi K, Sato M. The Combinational Use of CRISPR/Cas9 and Targeted Toxin Technology Enables Efficient Isolation of Bi-Allelic Knockout Non-Human Mammalian Clones. *Int J Mol Sci.* (査読有) 2018 Apr 4;19(4). pii: E1075. doi: 10.3390/ijms19041075.
4. Kobayashi T, Namba M, Koyano T, Fukushima M, Sato M, Ohtsuka M, Matsuyama M. Successful production of genome-edited rats by the rGONAD method. *BMC Biotechnol.* (査読有) 2018 Apr 2;18(1):19. doi: 10.1186/s12896-018-0430-5.
5. Ohtsuka M, Sato M, Miura H, Takabayashi S, Matsuyama M, Koyano T, Arifin N, Nakamura S, Wada K, Gurumurthy CB. i-GONAD: a robust method for in situ germline genome engineering using CRISPR nucleases. *Genome Biol.* (査読有) 2018 Feb 26;19(1):25. doi: 10.1186/s13059-018-1400-x.
6. Sato M, Kosuke M, Koriyama M, Inada E, Saitoh I, Ohtsuka M, Nakamura S, Sakurai T, Watanabe S, Miyoshi K. Timing of CRISPR/Cas9-related mRNA microinjection after activation as an important factor affecting genome editing efficiency in porcine oocytes. *Theriogenology.* (査読有) 2018 Mar 1;108:29-38. doi: 10.1016/j.theriogenology.2017.11.030.
7. Sato M, Miyoshi K, Nakamura S, Ohtsuka M, Sakurai T, Watanabe S, Kawaguchi H, Tanimoto A. Efficient Generation of Somatic Cell Nuclear Transfer-Competent Porcine Cells with Mutated Alleles at Multiple Target Loci by Using CRISPR/Cas9 Combined with Targeted Toxin-Based Selection System. *Int J Mol Sci.* (査読有) 2017 Dec 4;18(12). pii: E2610. doi: 10.3390/ijms18122610.
8. Sakurai T, Shindo T, Sato M. Noninheritable Maternal Factors Useful for Genetic Manipulation in Mammals. *Results Probl Cell Differ.* (査読有) 2017;63:495-510. doi: 10.1007/978-3-319-60855-6_21.
9. Murakami T, Saitoh I, Sato M, Inada E, Soda M, Oda M, Domon H, Iwase Y, Sawami T, Matsueda K, Terao Y, Ohshima H, Noguchi H, Hayasaki H. Isolation and characterization of lymphoid enhancer factor-1-positive deciduous dental pulp stem-like cells after transfection with a piggyBac vector containing LEF1 promoter-driven selection markers. *Arch Oral Biol.* (査読有) 2017 Sep;81:110-120. doi: 10.1016/j.archoralbio.2017.04.033.
10. Sato M, Saitoh I, Murakami T, Kubota N, Nakamura S, Watanabe S, Inada E. Intrapancreatic Parenchymal Injection of Cells as a Useful Tool for Allowing a Small Number of Proliferative Cells to Grow In Vivo. *Int J Mol Sci.* (査読有) 2017 Aug 2;18(8). pii: E1678. doi: 10.3390/ijms18081678.

[学会発表](計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
なし

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小澤政之(OZAWA, Masayuki)
鹿児島大学・大学院医歯学域医学系・教授
研究者番号：90136854

(2) 研究分担者

佐藤正宏(SATO, Masahiro)
鹿児島大学・医用ミニブタ・先端医療開発
研究センター・教授
研究者番号：30287099

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし