

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460972

研究課題名(和文) CRISPR/Cas9系を用いた大腸炎自然発症マウスの原因遺伝子領域の同定と解析

研究課題名(英文) Identification and analyses of colitis-associated gene segment using colitis-model mice by CRISPR/Cas9 system.

研究代表者

入江 厚 (Irie, Atsushi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・講師

研究者番号：30250343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は申請者らが作製したHLA-DR4トランスジェニックマウスホモ接合体が発症する潰瘍性大腸炎の原因を突き止めることを目的とする。HLA-DR4トランスジェンは第3染色体のテロメア側に、約39kb塩基長の欠落を伴い挿入されていることがわかっていった。ホモ接合体のみが大腸炎を発症するため、当該領域の両染色体からの欠落か、HLA-DR4分子の過剰な発現が本疾患発症の原因に関係すると考えられた。

前者の可能性を検討するため、CRISPR/Cas9システムを用いて同領域を欠損するマウスを作製したがこれらは大腸炎を発症しなかった。いっぽうHLA-DR4の高発現が大腸炎発症に關与することが示された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to identify the cause of spontaneous colitis, which homozygotes of HLA-DR4 transgenic mice established by the investigators develop. At the start point, the transgenes were identified to be inserted in the chromosome 3 with the deletion of about 39kb segment. Since only homozygotes develop colitis, either deletion of the 39kb gene segment or higher expression of HLA-DR4 might be involved in the cause of the colitis.

Using CRISPR/Cas9 system, we have successfully established the mice without the 39kb segment, however, those mice did not develop colitis. Therefore, the 39kb segment may have nothing to do with the development of the colitis. On the other hand, the homozygotes of HLA-DR4 transgenic mice with MHC class II transactivator (CIITA) knockout background, which do not express MHC class II molecules including HLA-DR4, did not develop the colitis. Therefore, overexpression of HLA-DR4, not the lack of the 39kb, is involved in the cause of the colitis.

研究分野：免疫学

キーワード：潰瘍性大腸炎 HLA-DR CRISPR/Cas9システム トランスジェニックマウス 疾患モデル動物

1. 研究開始当初の背景

応募者らが樹立したヒト主要組織適合性抗原 HLA-DR4 トランスジェニックマウス (HLA-DR4tgm) のホモ接合体は、生後 2~4 ヶ月で下痢、脱肛、大腸の肥厚などを伴うヒト UC と似た所見の大腸炎を自然発症する (図 1)。

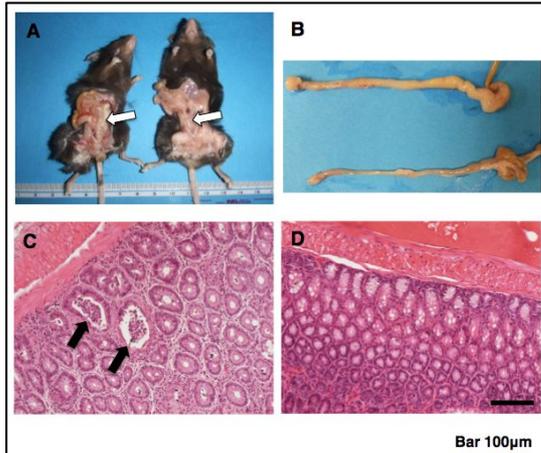


図 1 HLA-DR4tgm ホモ接合体は大腸炎を自然発症する。A、HLA-DR4tgm ホモ接合体 (左) とヘテロ接合体 (右)。矢印は大腸。B、HLA-DR4tgm ホモ接合体 (上) とヘテロ接合体の大腸。ホモ接合体の大腸は肥厚が認められる。C、ホモ接合体の大腸には多数の単核球細胞の浸潤と陰窩膿瘍 (矢印) が認められる。D、ヘテロ接合体の大腸組織。

FISH 法と全ゲノムシーケンス解析から、この tgm のトランスジーンは、複数コピーが約 39kb の欠損を伴い第 3 染色体に挿入されていることがわかった (図 2)。

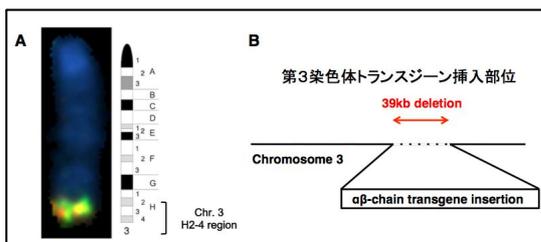


図 2 HLA-DR4 トランスジーンは第 3 染色体に約 39kb の欠落を伴い挿入されている。A、FISH 法によるトランスジーンの挿入部位の同定。B、全ゲノム解析によりトランスジーンの挿入部位を決定した。その結果、約 39kb の欠落を伴い挿入されていることが判明した。

データベース検索では、トランスジーン挿入による欠損部位には、既知の遺伝子、microRNA などは皆無である。また当該領域は、*Cdcs1* と呼ばれるマウス大腸炎感受性領域 (PNAS, 98: 13820, 2001) とも数 Mb 離れており、重ならない。また第 3 染色体の他の領域や他の染色体にも異常は認められない。

2. 研究の目的

HLA-DR4tgm のホモ接合体のみが大腸炎を発症することから、トランスジーンの挿入による第 3 染色体 39kb 領域の両染色体からの欠損、あるいは遺伝子量効果による HLA-DR4 分子の過剰な発現が大腸炎発症の原因として疑われた。そこで本研究では、まず前者の可能性を検証するため、CRISPR/Cas9 システムを用いて第 3 染色体 39kb 領域を欠損するマウスを作製し、大腸炎を発症するかどうかを確かめることを目的とした。

また後者の可能性の検討として、MHC クラス 分子 (HLA-DR4 を含む) の発現に必須の MHC クラス トランスアクチベーター (CIITA) ノックアウトマウスと HLA-DR4tgm との交配により、CIITA ノックアウト背景の HLA-DR4tgm ホモ接合体を作製し、HLA-DR4 の発現が大腸炎発症に関係するか検討することも検討する。

3. 研究の方法

第 3 染色体 39kb 領域の直前直後を標的とする CRISPR を設計し、Cas9 遺伝子とともにマウス ES 細胞に導入し、PCR 法により当該 39kb 領域の欠損を確認する。39kb 領域の欠損を持つ ES 細胞からマウス個体を作製し、当該遺伝型が生殖系列に伝わることを確認した。

これらのマウスを HLA-DR4tgm と交配し、CRISPR/Cas9 法により作製した 39kb 領域の欠損と HLA-DR4 トランスジーンを両方を持つマウス (当該マウスは 2 つの第 3 染色体のいずれも 39kb 領域を欠く) を作製し、大腸炎を自然発症するかどうか、およびデキストラン硫酸ナトリウム (DSS) 投与による人為的大腸炎発症誘導に対する感受性を検討した。

4. 研究成果

CRISPR/Cas9 を導入した 96 個の ES 細胞から、第 3 染色体 39kb 領域を欠損するもの 6 個が得られた。このうちの 2 つは両方の第 3 染色体で 39kb 領域の欠落が認められた。これらのうちから 6 系統の異なる第 3 染色体 39kb 領域欠損マウスを得た (図 3)。

6 系統のうち 1 系統は、当該改変染色体は仔に伝達されなかった。

残る 5 系統について、HLA-DR4tgm ヘテロ接合体と交配し、両第 3 染色体から 39kb 領域を欠損する HLA-DR4tgm ヘテロ接合体を樹立した。これらのマウスは見かけ上正常であり、大腸炎を自然発症することはなかった。また DSS 投与に対する感受性も HLA-DR4tgm ヘテロ接合体 (一方は野生型第 3 染色体) と有意差は見られなかった (図 4)。

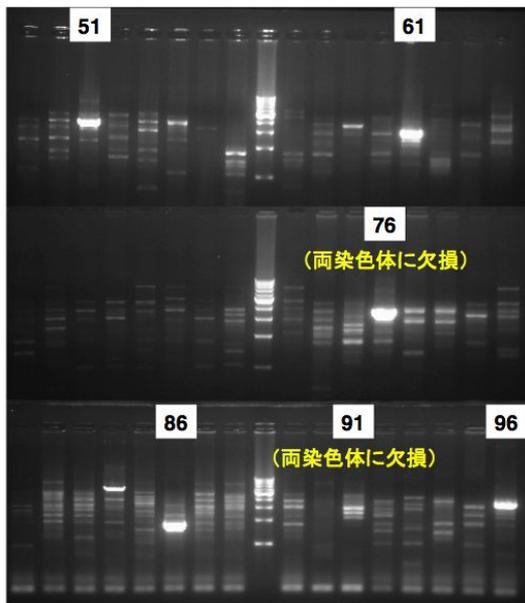


図3 96個中6個のES細胞に第3染色体39kbの欠損が認められた。このうち2つ(76と91)には、両染色体で欠損が導入されていた。

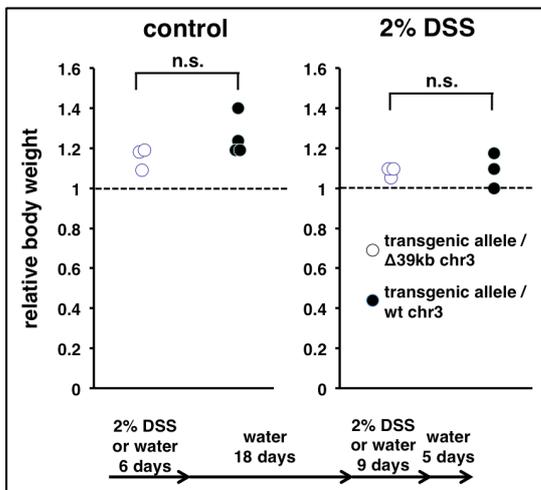


図4 第3染色体39kb領域の欠損は大腸炎発症に関与しない。左、CRISPR/Cas9法により39kb領域を欠損する第3染色体を持つHLA-DR4tgmヘテロ接合体(○)と野生型第3染色体を持つ同ヘテロ接合体(●)の体重差は認められず、また2%DSS投与による体重差も認められなかった(右)。下、DSSの投与方法。

いっぽう、CIITA欠損背景のHLA-DR4tgmホモ接合体は4月齢を過ぎても、体重変化、大腸の長さ、大腸組織像のいずれも同背景のヘテロ接合体と差は認められず、大腸炎は発症しなかった(図5)。

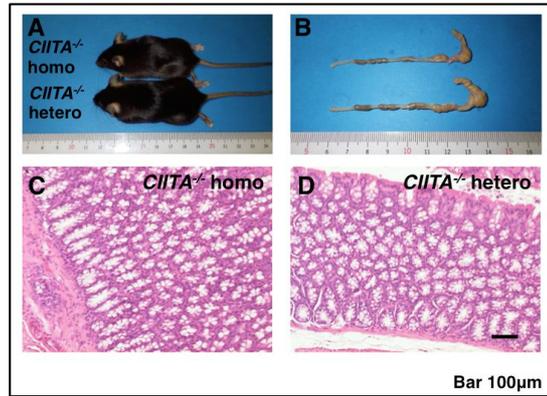


図5 HLA-DR4の発現は大腸炎発症に必要である。

A、4月齢のCIITAノックアウト背景のHLA-DR4tgmホモ接合体(上)とヘテロ接合体(下)。B、CIITAノックアウト背景のHLA-DR4tgmホモ接合体(上)とヘテロ接合体(下)の大腸。ホモ接合体の大腸に特段の肥厚は認められない。CIITAノックアウト背景のHLA-DR4tgmホモ接合体(C)とヘテロ接合体(D)の大腸組織。ホモ接合体の大腸に多数の単核球細胞の浸潤や陰窩膿瘍は認められなかった。

以上の結果から、HLA-DR4tgmホモ接合体が自然発症する大腸炎に、第3染色体の39kb領域の有無は特段の影響を及ぼさないことが示された。いっぽう、CIITAノックアウト背景にすることにより、HLA-DR4分子を発現しないHLA-DR4tgmホモ接合体では大腸炎の発症は見られず、HLA-DR4分子の発現が大腸炎発症に必要であることが明らかとなった。

今後はHLA-DR4分子の発現と大腸炎発症の関わりについて研究を行う予定である。また、わずか96個のES細胞中に意図した変異を持つものが6個も得られたことは、CRISPR/Cas9法によるゲノム編集が非常に有効な手段であることを示すものである。

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1件)

Atsushi Irie, Takahisa Imamura, Yayoi Michibata, Tatsuko Kubo, Naoki Takeda, Isao Shibuya, Shinji Sogo, Kimi Araki, Yasuharu Nishimura. Accumulation of HLA-DR4 in colonic epithelial cells causes severe colitis in homozygous HLA-DR4 transgenic mice. *Inflammatory Bowel Diseases*, 査読有、in revision

〔学会発表〕(計8件)

IRIE Atsushi, MICHIBATA Yayoi, KUBO Tatsuko, IMAMURA Takahisa TAKEDA Naoki,

ARAKI Kimi, SHIBUYA Isao, SOGO Shinji, NISHIMURA Yasuharu : Endoplasmic reticulum stress causes ulcerative colitis-like severe colitis in the homozygotes of HLA-DR4 transgenic mice. 第45回日本免疫学会学術集会、宜野湾、12月5~7日、2016年

入江厚、今村隆寿、道端弥生、久保多津子、竹田直樹、澁谷功、十河真司、荒木喜美、西村泰治：大腸上皮細胞の小胞体ストレスがHLA-DR4 トランスジェニックマウスホモ接合体に発症する大腸炎の病因である 第25回日本組織適合性学会大会、札幌、10月22~24日、2016年

IRIE Atsushi, IMAMURA Takahisa, MICHIBATA Yayoi, KUBO Tatsuko, TAKEDA Naoki, ARAKI Kimi, SHIBUYA Isao, SOGO Shinji, NISHIMURA Yasuharu.: Aberrant accumulation of HLA-DR and reduced mucin production in colonic epithelial cells of HLA-DR4 transgenic mice and ulcerative colitis patients. 16th International Congress of Immunology. Aug 21-26, 2016, Melbourne, Australia

入江厚、道端弥生、久保多津子、今村隆寿、竹田直樹、荒木喜美、澁谷功、十河真司、西村泰治、HLA-DR4 トランスジェニックマウスホモ接合体に発症するリンパ組織形成不全と大腸炎の解析、25th Kyoto T Cell Conference (KTCC)、5月15~16日、2015年、京都

入江厚、道端弥生、久保多津子、今村隆寿、竹田直樹、荒木喜美、澁谷功、十河真司、西村泰治、大腸上皮細胞の小胞体ストレスがHLA-DR4 トランスジェニックマウスホモ接合体に発症する大腸炎の病因である、第23回日本組織適合性学会大会、9月10~12日、2015年、水戸

Irie A, Michibata Y, Kubo T, Imamura T, Takeda N, Araki K, Shibuya I, Sogo S, Nishimura Y: Endoplasmic reticulum stress causes ulcerative colitis-like severe colitis in the homozygotes of HLA-DR4 transgenic mice. 第44回日本免疫学会学術集会、11月18~20日、2015年、札幌

入江厚、道端弥生、久保多津子、今村隆寿、矢津田旬二、竹田直樹、荒木喜美、江藤正俊、澁谷功、十河真司、西村泰治、HLA-DR4 トランスジェニックマウスホモ接合体のリンパ組織形成不全と大腸炎および肺炎の発症、第23回日本組織適合性学会大会、09月13~15日、2014年、長崎

Irie A, Michibata Y, Kubo T, Imamura T, Takeda N, Araki K, Sasaki G, Shibuya I, Sogo S,

Nishimura Y: Novel HLA-DR4 transgenic mice that develop severe colitis and pneumonia with serious defects in lymphoid organs. 第43回日本免疫学会学術集会、12月10~12日、2014年、京都

〔図書〕(計2件)

「第17章 がん免疫系の相互作用」(翻訳)、**エッセンシャル免疫学 第3版**(The Immune System, 4th ed.)、メディカルサイエンスインターナショナル、2016年

「第6章 T細胞に対する抗原提示」(翻訳)、Janeway's 免疫生物学 (Janeway's Immunobiology, 9th ed.)、南江堂、2017年

〔産業財産権〕

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
<http://www.immgenet.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

入江 厚 (IRIE, Atsushi)
熊本大学・大学院生命科学研究部・講師
研究者番号：30250343

(2) 研究分担者

今村 隆寿 (IMAMURA, Takahisa)
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号：20176499

竹田 直樹 (TAKEDA, Naoki)
研究者番号：90304998
熊本大学・生命資源研究支援センター・助教

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()