

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14591

研究課題名(和文) CRISPR/hCas9法による抗原特異的T細胞欠損マウスの作製と評価

研究課題名(英文) Generation and Analysis of Antigen-specific T cell-deficient mice by CRISPR/Cas9.

研究代表者

渡会 浩志 (Watarai, Hiroshi)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：70415339

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：新しいゲノム編集技術であるCRISPR/Cas9法を用いて、Traj18欠損マウス(CRISPR-Traj18^{-/-})の樹立に成功した。CRISPR-Traj18^{-/-}のT細胞レパトアは正常で、抗原提示分子CD1d拘束性のインバリアント・ナチュラルキラーT(iNKT)細胞特異的欠損マウスの樹立に成功した。iNKT細胞の肥満における影響を明らかにするため、高脂肪食負荷試験を行った。その結果、CRISPR-Traj18^{-/-}マウスでは野生型マウスと比べて体重の増加、インスリン抵抗性、グルコース応答性の減弱が認められ、iNKT細胞が肥満やそれに伴う型糖尿病の増悪に寄与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Here we have successfully generated new Traj18^{-/-} mouse lines by using the Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR)/Cas9 technology. The CRISPR-Traj18^{-/-} mice lacked iNKT cells and harbored an undisturbed TCR repertoire, fulfilling the criteria of iNKT cell-deficient mice.

Divergent findings for the metabolic role of iNKT cells have been reported in studies using the previously generated Traj18^{-/-} mouse strain. Therefore, we re-investigated the contribution of iNKT cells to the development of obesity induced by a high-fat diet (HFD) using our novel Traj18^{-/-} mouse strain on the B6 background. Among the experimental groups on HFD, CRISPR-Traj18^{-/-} (1-1L) mice gained less weight than WT B6 mice. The CRISPR-Traj18^{-/-} mouse strain on HFD also exhibited ameliorated metabolic phenotypes, which is consistent with a pathogenic role of iNKT cells in the development of obesity and insulin-resistance.

研究分野：免疫学

キーワード：ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

iNKT細胞はTrav11-Traj18から成るTCR鎖を発現するT細胞亜群でCD1dに提示される糖脂質をリガンドとする。Traj18領域の欠損はiNKT細胞特異的欠損となるが、これまで幅広く用いられてきたTraj18欠損マウスはTraj18よりも上流のTraj領域が不活化していることが明らかとなり、T細胞のレパトア異常がある(T細胞の種類が40%に減少)ことが報告された(Bedel et al. Nat Immunol 2012)。

2. 研究の目的

新しく開発されたゲノム編集技術CRISPR/Cas9法によって、Traj18領域のみを欠損させたマウス(CRISPR-Traj18^{-/-}マウス)を創出することで、iNKT特異的細胞欠損マウスを創出する。樹立されたマウスを用いて様々な病態モデルにおいて、iNKT細胞の関与の有無について再検証する。

3. 研究の方法

Traj18領域にsingle guide RNA (sgRNA)を設計し、in vitroにおいてCas9によって切断が認められることを確認した。sgRNAとCas9 mRNAをC57BL/6マウスの受精卵に前核注入し、仮親に移植して産仔を得た。得られた産仔は80%以上の高効率でTraj18領域に欠失あるいは挿入が認められた。最終的に(戻し)交配によってC57BL/6背景およびBALB/c背景のTraj18特異的欠損マウスを系統として樹立した。C57BL/6背景の雄マウスを用いて高脂肪食負荷試験を行った。

4. 研究成果

TCR領域のレパトア解析をRNA-Seqにより行ったところ、Traj18以外にバイアスはかかっていないことが明らかとなり、樹立したCRISPR-Traj18^{-/-}マウスがTCRレパトアに異常がないことを明らかにした。糖脂質リガンドKRN7000をロードしたCD1d組換え体に反応性を有する細胞が存在しないことから、CRISPR-Traj18^{-/-}マウスがiNKT細胞欠損マウスであることを明らかとした。iNKT細胞の肥満における影響を明らかにするため、高脂肪食負荷試験を行った。その結果、CRISPR-Traj18^{-/-}マウスでは野生型のC57BL/6マウスと比べて体重の増加、インスリン抵抗性、グルコース応答性の減弱が認められた。この結果からiNKT細胞が肥満やそれに伴う型糖尿病の増悪に寄与していることが明らかとなった。これまでiNKT細胞ではないCD1d拘束性のtype II NKTが増悪に寄与している、とされてきたが、この結果は従来のiNKT細胞欠損マウスのTCRレパトア異常によって誤った結果が導かれたものと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計9件)

1. Mikami H, Harmon J, Kobayashi H, Hamada S, Wang Y, Iwata O, Suzuki K, Ito T, Aisaka Y, Kutsuna N, Nagasawa K, Watarai H, Ozeki Y, Goda K. Ultrafast confocal fluorescence microscopy beyond the fluorescence lifetime limit. *Optica* 5(2):117-126 (2018).

2. Ren Y, Sekine-Kondo E, Shibata R, Kato-Itoh M, Umino A, Yanagida A, Satoh M, Inoue K, Yamaguchi T, Mochida K, Nakae S, Van Kaer L, Iwabuchi K, Nakauchi H, Watarai H. A novel mouse model of iNKT cell-deficiency generated by CRISPR/Cas9 reveals a pathogenic role of iNKT cells in metabolic disease. *Sci Rep* 7(1):12765 (2017).

3. Hayatsu N, Miyao T, Tachibana M, Murakami R, Kimura A, Kato T, Kawakami E, Endo TA, Setoguchi R, Watarai H, Nishikawa T, Yasuda T, Yoshida H, Hori S. Analyses of a mutant Foxp3 allele reveal BATF as a critical transcription factor in the differentiation and accumulation of tissue regulatory T cells. *Immunity* 47(2):268-283 (2017).

4. Jinnohara T, Kanaya T, Hase K, Sakakibara S, Tachibana N, Hashimoto Y, Sato T, Watarai H, Kunisawa J, Shibata N, Williams IR, Kiyono H, Ohno H. IL-22BP dictates characteristics of Peyer's patch follicle-associated epithelium for antigen uptake. *J Exp Med* 214(6):1607-1618 (2017).

5. Eiamboonsert S*, Salama Y, Watarai H, Dahari D, Tsuda T, Okada Y, Hattori K, Heissig B**. The role of plasm in the pathogenesis of murine multiple myeloma. *Biochem Biophys Res Commun* 488(2):387-392 (2017).

6. Taya Y, Ota Y, Wilkinson AC, Kanazawa A, Watarai H, Kasai M, Nakauchi H, Yamazaki S. Depleting dietary valine permits mouse hematopoietic stem cell transplantation. *Science* 354(6316):1152-1155 (2016).

7. Ohashi W, Kimura S, Iwanaga T, Furusawa Y, Irie T, Izumi H, Watanabe T, Hijikata A, Hara T, Ohara O, Koseki H, Sato T, Robine S, Mori H, Hattori Y, Watarai H, Mishima K, Ohno H, Hase K, Fukada T. Zinc transporter SLC39A7/ZIP7 promotes intestinal epithelial self-renewal by resolving ER stress. *PLoS Genet* 12(10):e1006349 (2016).

8. Satoh M, Namba K, Kitaichi N, Endo N, Kitamei H, Iwata D, Ohno S, Ishida S, Onoé K, Watarai H, Taniguchi M, Ishibashi T, Stein-Streilein J, Sonoda K, Van Kaer L, Iwabuchi K. Protective role of invariant natural killer T cells in the development of experimental autoimmune uveoretinitis. *Exp Eye Res* 153:79-89 (2016).

9. Wakisaka Y, Suzuki Y, Iwata O, Nakashima A, Ito T, Hirose M, Domon R, Sugawara M, Tsumura N, Watarai H, Shimobaba T, Suzuki K, Goda K, Ozeki Y. Probing the metabolic heterogeneity of live *Euglena gracilis* with label-free microscopy. *Nat Microbiol* 1(8):16124 (2016).

〔学会発表〕(計 16 件)

1. Watarai H, A novel mouse model of iNKT cell deficiency generated by CRISPR/Cas9 reveals a pathogenic role of iNKT cells in metabolic disease. International Symposium on CD1-MR1 2017. Napa, USA; Nov 2017.

2. 任月、近藤悦子、柴田理沙、**渡会浩志**; A Novel Mouse Model of iNKT Cell-deficiency Generated by CRISPR/Cas9 Technology Reveals a Pathogenic Role of iNKT Cells in Metabolic Disease. 第 10 回セラミド研究会 学術集会、2017 年 10 月 20 日、札幌

3. Yue Ren, Etsuko Sekine-Kondo, Risa Shibata, Hiroshi Watarai. A Novel Mouse Model of iNKT Cell-deficiency Generated by CRISPR/Cas9 Technology Reveals a Pathogenic Role of iNKT Cells in Metabolic Disease. 第 46 回日本免疫学会学術集会、2017 年 12 月 14 日、仙台

4. 中島綾香、永澤和道、任月、大湖菜央子、鈴木健吾、**渡会浩志**; *Euglena gracilis* の貯蔵多糖パラミロンの免疫制御の機序の検討; 第 71 回日本栄養・食糧学会大会、2017 年 5 月 19 日、宜野湾

5. 齊藤菜津子、嶋本良則、小林純子、永野昌志、**渡会浩志**、北村浩; 抗ウシ CD163 モノクローナル抗体の樹立; 第 150 回日本獣医学会学術集会、2017 年 9 月 13 日、鹿児島

6. 山田裕貴、長谷耕二、**渡会浩志**; CRISPR/Cas9 技術を用いたモノ及びジカルボン酸トランスポーター欠損マウスの作製とその疫学的・生化学的解析; ConBio2017、2017 年 12 月 7 日、神戸

7. Hiroshi Watarai. Differential role of CD1d in the development and functional acquisition of invariant natural killer T cell subtypes. 7th International Workshop of Kyoto T Cell Conference. 2017 年 3 月 13-17 日(京都、日本)

8. Yue Ren, Hiroshi Watarai. Obesity Study by Using a Novel Mouse Model of Invariant Natural Killer T Cell-deficiency Generated by CRISPR/Cas9. International Symposium of the Institute Network 2017 年 1 月 26-28 日(徳島、日本)

9. Yuta Suzuki, Yoshifumi Wakisaka, Osamu Iwata, Ayaka Nakashima, Takuro Ito, Misa Hirose, Ryota Domon, Mai Sugawara, Norimichi Tsumura, Hiroshi Watarai, Tomoyoshi Shimobaba, Kengo Suzuki, Keisuke Goda, Yasuyuki Ozeki. High-speed stimulated Raman scattering microscopy for

studying the metabolic diversity of motile *Euglena gracilis*. SPIE BiOS 2017 年 1 月 28-2 月 2 日(サンフランシスコ、米国)

10. 永澤和道、立山緑、近藤悦子、岩淵和也、**渡会浩志**; Evaluation of TREM-3 function in murine neutrophil responses to TLR stimulation. 第 78 回日本血液学会学術集会 2016 年 10 月 13-15 日(横浜)

11. 鈴木祐太、脇坂佳史、岩田修、中島綾香、鈴木健吾、伊藤卓朗、廣瀬未紗、土門亮太、菅原麻衣、津村徳道、**渡会浩志**、下馬場朋祿、合田圭介、小関泰之; 誘導ラマン散乱顕微鏡による生きたユーグレナの代謝物イメージングと統計解析、日本光学会年次学術講演会(OPJ2016)2016 年 10 月 31-11 月 2 日(東京)

12. Yue Ren, Risa Shibata, Etsuko Sekine-Kondo, Hiroshi Watarai. Obesity Study by Using a Novel Mouse Model of Invariant Natural Killer T Cell-deficiency Generated by CRISPR/hCas9. 第 45 回日本免疫学会学術集会 2016 年 12 月 5-7 日(沖縄)

13. Midori Tateyama, Etsuko Sekine-Kondo, Kazuya Iwabuchi, Hiroshi Watarai. Role of CD1d in the development of invariant natural killer T cells. 第 45 回日本免疫学会学術集会 2016 年 12 月 5-7 日(沖縄)

14. 立山緑、永澤和道、岩淵和也、**渡会浩志**; Identification and functional analysis of TREM-3, a new marker for immature neutrophils. 第 39 回日本分子生物学会 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日(横浜)

15. 柴田理沙、任月、**渡会浩志**; CRISPR/hCas9 による iNKT 細胞欠損マウスの創出と生体機能評価、第 39 回日本分子生物学会 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日(横浜)

16. 大森深雪、**渡会浩志**、八木淳二; Thymic stromal lymphopoietin 応答性樹状細胞サブセットの同定と機能解析、第 39 回日本分子生物学会 2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日(横浜)

〔図書〕(計 3 件)

1. Watarai H. Elucidation and control of the mechanisms underlying chronic inflammation mediated by invariant natural killer T cells. Springer, *Chronic Inflammation*, 345-356 (2016).

2. 永澤和道、**渡会浩志**; Q52 細胞増殖している細胞としていない細胞は、区別することはできますか? 羊土社、実験医学別冊「フローサイトメトリーQ&A100」pp172-174 (2017)。

3. 永澤和道、**渡会浩志**; Q30 生きたまま細胞核、細胞質、細胞膜などを染色するのに適した試薬にはどのようなものがありますか? 細胞周期の解析もできますか? 羊土社、実験医学別冊「フローサイトメトリーQ&A100」pp100-102 (2017)。

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕
ホームページ
<http://stemcell-u-tokyo.org/scc/>

6．研究組織

(1)研究代表者

渡会 浩志 (WATARAI, Hiroshi)
東京大学・医科学研究所・特任准教授
研究者番号：70415339