

網羅的ゲノム編集を用いた表皮基底細胞 XVII型コラーゲン発現制御機構の解析

北海道大学大学院医学研究院皮膚科学教室

西 江 渉

Collagen XVII (COL17) is one of the major components forming hemidesmosomes in basal keratinocytes, which functions adhesion between the epidermis and the dermis. Loss of function of COL17 due to gene mutations coding *COL17A1* or autoimmunity to COL17 both read to blistering diseases including epidermolysis bullosa and bullous pemphigoid. In addition, COL17 is known to play important roles for keeping stemness in keratinocytes. Therefore, identification of genes regulating COL17 expression must be helpful for developing new therapies for blistering diseases and elucidating regulation mechanisms of keratinocyte stemness. In this study, we tried to identify key genes upregulating COL17 expression by CRISPR/Cas9-mediated genome-wide screening. First, as a positive control study, collagen VII (COL7) promoter was introduced upstream of the destabilized GFP (dscGFP) gene in HaCaT immortalized keratinocytes. This method was able to visualize COL7-related GFP expression in HaCaT keratinocytes. However, COL17 gene expression was not high enough for performing FACS-sorting when COL17 promoter was introduced upstream of the dscGFP gene in HaCaT keratinocytes. Therefore, we are analyzing HaCaT keratinocytes in which COL17 promoter was introduced upstream of the hygromycin resistant gene.

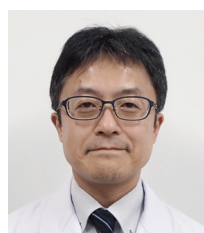
1. 緒 言

皮膚の表皮基底細胞ヘミデスモゾーム構成分子のひとつであるXVII型コラーゲン (COL17) は、表皮真皮間接合に重要な生理機能を担っている。先天的な遺伝子変異に伴うCOL17の機能障害によって容易に水疱を生じる接合部型表皮水疱症を発症し、COL17に対する後天的な自己免疫反応が生じると水疱性類天疱瘡を発症する。またCOL17は、色素幹細胞の維持や皮膚の老化にも関与する分子であり、皮膚におけるCOL17発現量を制御し増加できると水疱性皮膚疾患だけでなく皮膚の抗老化など様々な応用が期待できる。さらにCOL17は皮膚表皮細胞の幹細胞マーカーのひとつであるため、COL17発現量の増加は表皮幹細胞の効率的な培養法確立へ発展する可能性も予想される。遺伝子の発現量はプロモーター活性に依存するため、COL17プロモーター活性の制御分子の同定は様々な応用性と発展性が期待できる。そこで、COL17発現を亢進する分子を、ゲノム編集を応用した網羅的スクリーニング法¹⁾で同定する研究を計画した。

2. 実 験

網羅的ゲノム編集によって1細胞あたり1遺伝子(合計約20,000遺伝子)を網羅的にノックアウトした表皮角化細胞

集団を作製し、COL17プロモーター活性が増加した細胞集団を解析しノックアウトされた遺伝子を同定する手法を計画した。最初に、lentiCas9-Blastベクター(Addgene, Blasticidin 耐性)を293TN細胞へ遺伝子導入し作成したレンチウイルス粒子を不死化表皮角化細胞であるHaCaT細胞へ感染させ、Cas9タンパク安定発現HaCaT細胞株を作成する。次に、COL17プロモーター領域(-1251 to +379)をクローニング後pGreenFire lenti-reporterベクター(SBI, puromycin 耐性)へ導入し、COL17遺伝子プロモーター下でdestabilized GFP (dscGFP) とLuciferaseを発現するベクターを作成する。その際、VII型コラーゲン(COL7)遺伝子プロモーター領域(-1351 to +145)も同様にクローニングし、陽性コントロールとして作成した(図1、A)。さらに中間報告の結果を踏まえ、ヒグロマイシン耐性遺伝子(HygR)を同様にCOL17プロモーター下に導入したコンストラクトも作成した。網羅的ゲノム編集で用いる約20,000種の遺伝子を標的とするgRNA発現コンストラクトは、レンチウイルスで導入後puromycinによるセクションが必要のため¹⁾、作成したCOL17あるいはCOL7発現レポーターコンストラクトとCas9タンパクを同時発現するHaCaT細胞へ、puromycinを標的とするgRNA(5'-ATCCGGACCGCCACATCGAG-3')を遺伝子導入しpuromycin感受性株を得る。最後に、ノックアウトgRNAライブラリー(GeCKO v2, Addgene)を低濃度(MOI=0.2~0.4)のレンチウイルスで感染させ、puromycinでセクション後GFP蛍光が増強した細胞群をFACSソーティングする。HygRをCOL17プロモーター下に導入したコンストラクト導入細胞では、FACSソーティングではなくヒグロマイシンを培地へ添加し耐性株をセクション可能である。COL17プロモーター活性が上がった細胞群から抽出し



Regulation mechanism of collagen XVII: elucidation by CRISPR/Cas9-mediated genome-wide screening

Wataru Nishie

Department of Dermatology, Hokkaido University Graduate School of Medicine

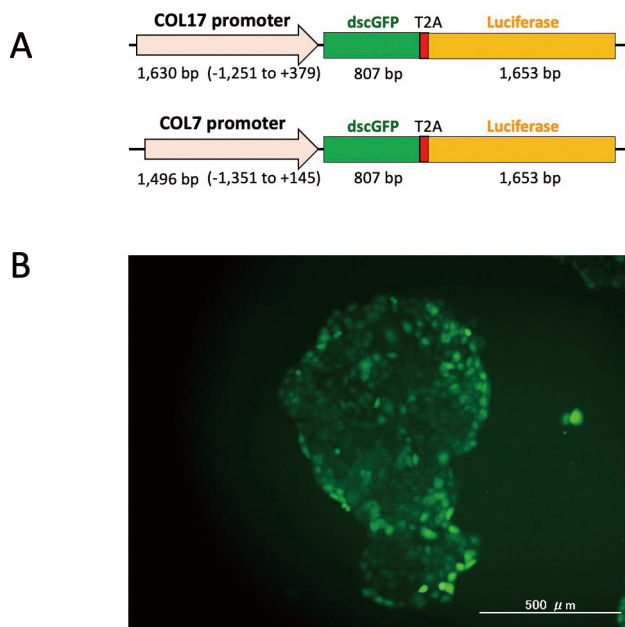


Fig. 1 GFP 蛍光下で COL17 および COL7 プロモーター活性を可視化するコンストラクト(A)。COL7 プロモーター活性を可視化した HaCaT 細胞。細胞辺縁で発現量が増加している(B)。

たDNAをテンプレートに用い、導入されたGeCKO v2のgRNA配列領域をPCR法で増幅後、次世代シーケンサー(Miseq)でアンプリコンシーケンスを行う。シーケンスデータ(FASTQファイル)をMAGeCKFlute²⁾で解析し、COL17あるいはCOL7発現増強に関与する遺伝子を同定する。

3. 結果

コントロールとしてCOL7レポーターコンストラクトをレンチウイルスで導入したCas9発現HaCaT細胞では、コロニーの辺縁にdscGFP発現が増強した細胞群が確認された(図1、B)。一方、COL17レポーターコンストラクトを導入したCas9発現HaCaT細胞では、予想に反し明瞭なGFP蛍光を発する細胞は認めなかった。作成したCOL17レポーターコンストラクトを293細胞へ一過性にトランスフェクションしたところGFP蛍光を確認したため、可視下で確認可能な発現量ではない可能性を考えた。FACSソーティングでの細胞分離が困難と判断し、抗生剤でのセレクションを考えた。そこでCOL17プロモーター下にHygRを発現する系を新たに作成し(図2、A) lentiCas9-Blast発現HaCaT細胞へレンチウイルスで導入したところ、比較的高濃度のヒグロマイシン下でも耐性となるクローンを複数認め薬剤でのセレクションが可能と判断した(図2、B)。

4. 考察

今回クローニングしたCOL17プロモーター領域は、HaCaT細胞ではGFP蛍光を目視できない程度の低レベルであると予想された。そこで薬剤耐性遺伝子(ヒグロマイシン耐性遺伝子)を用い、COL17プロモーター活性が増強した細胞を採取する新たな手法を検討したところ、複数の薬剤耐性クローンの樹立に成功した。薬剤耐性遺伝子を用いるとセレクション濃度を最適化が容易なため、COL17

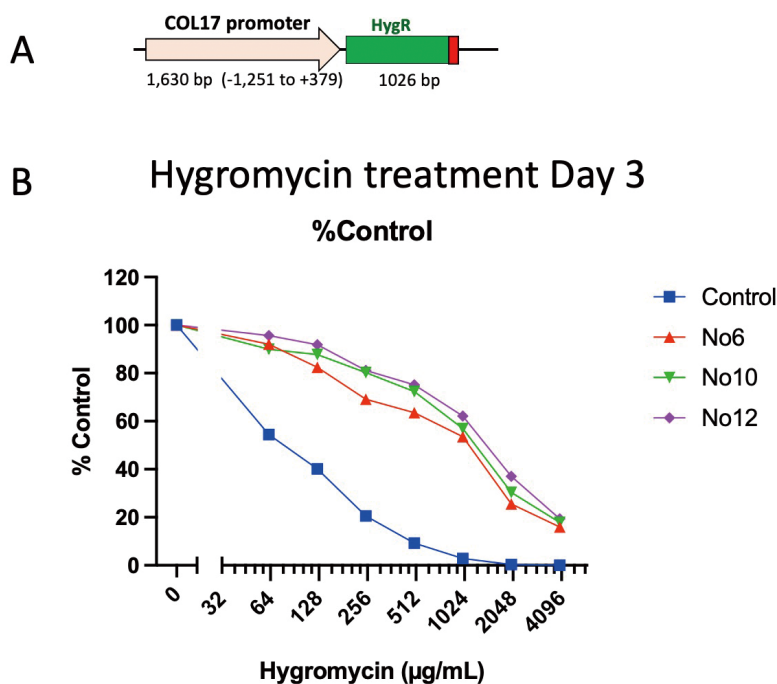


Fig. 2 COL17 プロモーター下でヒグロマイシン耐性遺伝子(HygR)を発現するコンストラクト(A)。ヒグロマイシン耐性クローンを複数確認した(No.6, 10, 12、B)。

プロモーター活性が上がった細胞群をFACSソーティングより簡便に分離できることが期待できる。本研究期間内では細胞群の採取まで至らなかったが、今後機会があれば実験を継続したいと考えている。一方、COL7レポーターコンストラクトを導入したHaCaT細胞ではコロニー辺縁の細胞群で発現が増強していた(図1、B)。本所見はCOL7遺伝子発現がTGF- β で制御されるという過去の報告に矛盾せず³⁾、培養下でCOL7の発現量を間接的に可視化可能な画期的な実験系である。今後、細胞の遊走や創傷治癒におけるCOL7の機能解析など、様々な研究に応用されることが期待される。

5. まとめ

今回作成した遺伝子改変HaCaT細胞は、遺伝子の発現

量を蛍光で確認できるため非常に有用と思われる。既にCas9タンパクを発現しているため、標的となる遺伝子のgRNAを導入するだけで網羅的ゲノム編集が可能である。予想に反してCOL17プロモーター活性はGFP蛍光を可視化可能なほど十分ではなかったが、抗生物質耐性遺伝子が発現することは可能であった。今後、ヒグロマイシン濃度を最適化した後にCOL17発現を制御する新規遺伝子が同定されることを期待している。

(引用文献)

- 1) Joung J, et al. Nat Protoc 12: 828-863, 2017.
- 2) Wang B, et al. Nat Protoc 14: 756-780, 2019.
- 3) Akasaka E, et al. J Invest Dermatol 141: 1450-1460, 2021.