



TITLE:

Smooth muscle protein 22 α - Cre recombination in resting cardiac fibroblasts and hematopoietic precursors(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Ikeda, Shinya

CITATION:

Ikeda, Shinya. Smooth muscle protein 22 α - Cre recombination in resting cardiac fibroblasts and hematopoietic precursors. 京都大学, 2023, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2023-05-23

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k24782>

RIGHT:

Smooth muscle protein 22 α - Cre recombination in resting cardiac fibroblasts and hematopoietic precursors, Scientific Reports, 12巻, 11564項, DOI::<https://doi.org/10.1038/s41598-022-15957-2>

京都大学	博士 (医 学)	氏 名	池 田 真 也
論文題目	Smooth muscle protein 22 α - Cre recombination in resting cardiac fibroblasts and hematopoietic precursors (心臓線維芽細胞と骨髄前駆細胞における Smooth muscle protein 22 α - Cre 組み替えの検討)		
(論文内容の要旨)			
<p>Smooth muscle protein 22 α (以下 SM22 α) は血管平滑筋細胞、活性化線維芽細胞、胎生期心筋細胞において発現すると報告されており、そのためこれを promotor とした SM22 α-Cre は心臓における標的細胞に対する遺伝子編集手段として広く用いられている。一方、脂肪細胞や血小板、骨髄球系細胞における発現も報告されている。そのため、心臓における SM22 α-Cre による遺伝子組み換え細胞を検討することは、同マウスを用いて解析する上において非常に重要となるが、その報告はない。</p> <p>double - fluorescent Cre レポーターマウスを用いた免疫染色とフローサイトメトリー (FACS) による検討によると、心臓においては活性化線維芽細胞だけでなく、静止期線維芽細胞においても一部組み替えが認められた。また組織常在マクロファージやその他骨髄球系細胞においても既報と同様に一部組み替えが認められた。しかし既報と異なり、T 細胞や B 細胞などリンパ球系細胞においても一部組み替えが認められた。</p> <p>上記結果より、血球全般において一部組み替えが生じているため、血液および骨髄前駆細胞においても一部組み替えが生じていると予想された。FACS による解析を行ったところ、心臓における解析と同様、骨髄球系のみならず T 細胞や B 細胞などリンパ球系細胞においても一部組み替えが認められた。また骨髄における解析では、長期造血幹細胞 (lineage (-), Sca-1(+), c-Kit (+), CD48 (-), CD150 (+))、短期造血幹細胞 (lineage (-), Sca-1(+), c-Kit (+), CD48 (-), CD150 (-))、多能性前駆細胞(lineage (-), Sca-1(+), c-Kit (+), CD48 (+), CD150 (-))を含めた、全ての分画において一部組み替えが認められた。</p> <p>次に SM22 α-Cre による遺伝子組み替えがどの細胞において生じるのかを in vitro において検討したところ、心臓線維芽細胞においては培養皿に播種することによる組み替えを起こすことが確認された。これは線維芽細胞は培養皿に播種することにより活性化するという既報と一致していると考えられた。また骨髄由来マクロファージを用いた検討では SM22 α-Cre による更なる組み替えを起こすことは不可であった。SM22 α の発現を誘導する TGF-β を使用しても同様で、更なる組み替えは認められなかった。さらに分化時に生じる可能性も考慮し、骨髄前駆細胞を含めて検討したが、同様に更なる組み替えは認められなかった。これは血球系における Tagln (SM22 α の遺伝子名) の発現が低いことが原因と考えられた。</p> <p>最後になぜ SM22 α-Cre による遺伝子組み替えが骨髄前駆細胞において生じているのかの検討を行った。造血幹細胞は胎生中期に形成される Aorta-Gonad-Mesonephros 領域の大動脈血管内壁に存在する Hemogenic endothelial cell から出芽するようにして誕生する。同部位の Single cell RNA-seq を用いた検討では、Hemogenic endothelial cell より造血幹細胞への分化段階において Tagln の発現が認められ、これが SM22 α-Cre による遺伝子組み替えが骨髄前駆細胞において生じる原因と考えられた。</p> <p>以上より、SM22 α-Cre マウスの使用時には骨髄移植による造血幹細胞の置換が必要であり、また心臓においては静止期線維芽細胞においても組み替えを認めていることに注意を要すると考えられた。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

Cre-LoxP システムによる組み替え細胞を正確に把握することは、同システムを用いた実験結果を理解する際に重要である。Sm22 α のプロモーター下で Cre リコンビナーゼが機能するよう設計された Sm22 α -Cre は、血管平滑筋細胞と筋線維芽細胞を標的として開発されたものであるが、心筋細胞、脂肪細胞、血小板、骨髄球系細胞においても組み替えがおこることが報告されている。本研究では Sm22 α -Cre による組み替えがその他細胞でも起こりうる可能性について、Cre 発現により GFP を発現する flox マウスとのかけ合わせにより検討した。免疫染色とフローサイトメトリーを用いて成獣マウスを解析した結果、静止期線維芽細胞・マクロファージ(組織常在も含む)・リンパ球系・そして造血前駆細胞を含む血球系全般においても GFP が検出されたことから、これらの細胞においても組み替えがおこることが新たに確認された。また、既報の single cell sequence data を再解析した結果、造血幹細胞の発生源である胎生期 10.5 日の造血能をもつ血管内皮細胞において Sm22 α の発現が確認されたため、成獣マウスの全血球系に認められる組み換えは、発生初期の内皮細胞から造血幹細胞への転換時に組み換えが生じたことに起因している可能性が考えられた。

以上の研究は Sm22 α 発現細胞の解明に貢献し、Sm22 α -Cre マウスを用いた実験結果の正確な理解に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 5 年 3 月 16 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降