

多細胞間での時空間的相互作用の理解を目指した定量的解析基盤の創出
2020年度採択研究代表者

2022年度
年次報告書

豊島 文子

京都大学 医生物学研究所
教授

生理的組織リモデリング機構の解明と臓器操作技術の開発

主たる共同研究者:

岩城 光宏 (理化学研究所 生命機能科学研究センター 上級研究員)

牧 功一郎 (京都大学 医生物学研究所 助教)

山本 拓也 (京都大学 iPS 細胞研究所 准教授)

研究成果の概要

皮膚リモデリングと組織剛性の関連について、老齢マウスの足底部皮膚をモデルとしてメカノバイオロジーの観点から解析した。老齢マウスの皮膚では真皮が硬くなっており、その結果、表皮幹細胞に存在するメカノチャネル *Piezo1* が持続的に活性化して幹細胞の加齢変容が誘導されることを示した。また、体表血管の退縮が加齢にともなう真皮の硬化の原因であり、血管退縮を誘導する分泌因子 *Ptx3* を特定した。

Hybridization-based in situ sequencing (HybISS) による空間トランスクリプトーム解析に関して、各実験プロセスにおける最適化すべき条件を検討し、対象とするサンプルの特性を考慮しながら、さまざまな実験系に適した実験条件を探索した。特に、体節形成を模倣するヒトオルガノイドサンプル (axioloid) に対して HybISS を実施し、axioloid の前後軸における HOX 遺伝子群の空間的発現パターンを解析し、axioloid の評価に貢献した。

新たな遺伝子改変マウス作出技術を開発した。これまでの研究で、マウスとヒトのゲノム上でのオフターゲットを最小化した人工 CRISPR/Cas9 切断配列 (Syn-crRNA-TS (Synthetic crRNA target sequence)) をデザインし、これをマルチクローニングサイトの両端に配した汎用性の高いドナープラスミド pCriMGET (plasmid of synthetic CRISPR coded RNA target sequence-equipped donor plasmid mediated gene targeting) を開発した。これをさらに改良し、pCriMGET を CRISPR-Cas12a による切断にも対応できる新たな高汎用型ドナープラスミド pCriMGET_9-12a を開発した。pCriMGET_9-12a と CRISPR-Cas9 の併用により *Rosa26* 領域への 5.5kbp 長鎖レポーターカセット挿入、および CRISPR-Cas12a との併用により *Hipp11* 領域への 4kbp 長鎖レポーターカセット挿入が確認されたノックインマウスの作出に成功した。

【代表的な原著論文情報】

- 1) “Vasculature atrophy causes a stiffened microenvironment that augments epidermal stem cell differentiation in aged skin” Ichijo, R., **Maki, K.**, Kabata, M., Murata, T., Nagasaka, A., Ishihara, S., Haga, H., Honda, T., Adachi, T., **Yamamoto, T.**, **Toyoshima, F.** *Nat. Aging* 2, pp.592-600, 2022
- 2) “Development of an in vivo cleavable donor plasmid for targeted transgene integration by CRISPR-Cas9 and CRISPR-Cas12a” Ishibashi, R., Ritsuko, M., Kitano, S., Miyachi, H., Toyoshima, F. *Sci. Rep.* 12, pp.17775, 2022
- 3) “Reconstituting human somitogenesis in vitro” Yamanaka, Y., Hamidi, S., Yoshioka-Kobayashi, K., Munira, S., Sunadome, K., Zhang, Y., Kurokawa, Y., Ericsson, R., Mieda, A., Thompson, J.L., Kerwin, J., Lisgo, L., **Yamamoto, T.**, Moris, N., Martinez-Arias, A., Tsujimura, T. and Alev, C. *Nature* 614, pp.509–520, 2023
- 4) “Endoderm-derived islet1-expressing cells differentiate into endothelial cells to function as the vascular HSPC niche in zebrafish” Nakajima, H., Ishikawa, H., **Yamamoto, T.**, Chiba, A., Fukui, H., Sako, K., Fukumoto, M., Mattonet, K., Kwon, H.B., Hui, S.P., Dobreva, G.D., Kikuchi, K., Helker, C.S.M., Stainier, D.Y.R. and Mochizuki N. *Dev Cell* 58, pp.224–238, 2023