

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19500359  
 研究課題名（和文）SV40 tsA58 T 抗原を発現する遺伝子導入マウスを利用した動物実験技術の開発  
 研究課題名（英文）Development of an improved transgenic mouse line expressing temperature sensitive SV40 tsA58 T antigen  
 研究代表者  
 氏名（アルファベット）吉田 進昭（YOSHIDA NOBUAKI）  
 所属機関・所属部局名・職名 東京大学・医科学研究所・教授  
 研究者番号 10250341

研究成果の概要：本研究では、SV40tsA58T 抗原を発現する遺伝子導入マウスから不死化細胞を得る実験技術を利用して、血管・リンパ管新生を細胞培養系において解析するための安定した技術確立すること、また、遺伝子改変マウスの解析における効果的な細胞培養実験系を構築することを旨とした。研究期間内において、マウスの血管・リンパ管内皮細胞の分離・培養技術の開発、および当該方法を利用した遺伝子改変マウスの解析に関する成果を上げた。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

## 研究分野：発生工学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：(1)細胞・組織 (2)発生・分化 (3)実験動物学 (4)リンパ管

## 1. 研究開始当初の背景

生物学・医学領域において、遺伝子改変マウスの作成・解析は、遺伝子の機能やヒト疾患の理解のために欠かすことのできない研究手法である。しかし、多様な種類の細胞で構成されている遺伝子改変マウス個体に認められる異常や病態の発生機序を理解するためには、特定の種類の細胞に焦点を絞った、細胞レベルでの研究手法も不可欠である。不死化細胞株や初代細胞を用いた研究がその役割を担っているが、不死化細胞株の場合、

大量の細胞を実験に供することが可能であり、相同組換えによる標的遺伝子組換えの場合を除けば遺伝子改変も容易である半面、不死化によって本来の分化細胞としての性質が損なわれていることが多いという、質の問題を有している。一方、初代細胞の場合、本来の性質はよく保持されているが、そのソースや得られる細胞の量、細胞の分裂回数に制限があり、多様な実験での大量の使用、継続的な長期培養には適さない。

不死化細胞株と初代細胞の両方の長所を有する細胞培養の方法として、変異型 SV40T

抗原を発現するトランスジェニックマウス・ラットを利用する方法が 1990 年代初頭に国内外において開発されているが、広範囲の組織で発現しているため、特定の種類の細胞を得るためには限界希釈による単一コロニーの選択、あるいは抗体を用いたソーティングが必須であることが、技術上の大きな障害となっている。

## 2. 研究の目的

本研究では、変異型 SV40T 抗原を発現するトランスジェニックマウスを用いた先行研究(Yanai et al., 1991; Jat et al., 1991)を参考にし、Cre/loxP システムを利用して組織特異的に変異型 SV40T 抗原を発現する、「第二世代」のトランスジェニックマウスを作成することで、本来の性質を保持した、特定の種類の分化細胞を効率良く分離、培養する方法を確立することを目的とした。また、その方法によって遺伝子改変マウスから細胞を分離し、解析に供することを試みた。

## 3. 研究の方法

全身性に発現することが期待される CAG プロモーター支配下で、Cre リコンビナーゼによる遺伝子組換え前はレポーター遺伝子、かつ薬剤耐性遺伝子として機能する *-geo* を、組換え後は温度感受性変異を有する SV40T 抗原 (*tsA58T* 抗原) を発現するマウス (以下、T26 トランスジェニックマウス) を、ES 細胞への遺伝子導入法により作成した (図 1)。具体的な作成方法は以下の通りである。CAG プロモーター、*-geo* cDNA はそれぞれ宮崎 純一 博士 (大阪大学)、丹羽 仁史 博士 (理研 CDB) から供与を受けた。*tsA58T* 抗原 cDNA は、COS-7 細胞が発現する野生型 SV40T 抗原遺伝子転写産物を鋳型として得た RT-PCR 産物に変異を導入して作成した。構築した導入遺伝子をマウス ES 細胞 (E14.1) に導入し、G418 による薬剤選択後、胚様体形成時のレポーター遺伝子の発現が胚様体全体に認められるクローンを選別した。ES 細胞での Cre リコンビナーゼの一過性発現により、*tsA58T* 抗原の発現が誘導されることを確認した後、キメラマウスを経てトランスジェニックマウスを得た。

着床前胚での組換えを誘導する CAG-Cre トランスジェニックマウス (宮崎純一博士 (阪大) より供与) と T26 マウスの交配によって得られる 2 重トランスジェニックマウスでの免疫組織化学的検討により、様々な種類の細胞で変異型 SV40T 抗原の発現が誘導されることを確認した。次に、研究対象として内皮細胞に焦点を絞り、以降の研究を進めた。内皮での組換えを誘導するマウスとして、

Tie2-Cre マウス (米国ジャクソン研究所より供与) を使用した。T26; Tie2-Cre 2 重トランスジェニックマウスの組織を酵素処理した後、ディッシュに播種し、変異型 SV40T 抗原が機能を発揮する 33 度で培養、継代して、SV40T 抗原を発現する細胞のみを選択した (図 1)。

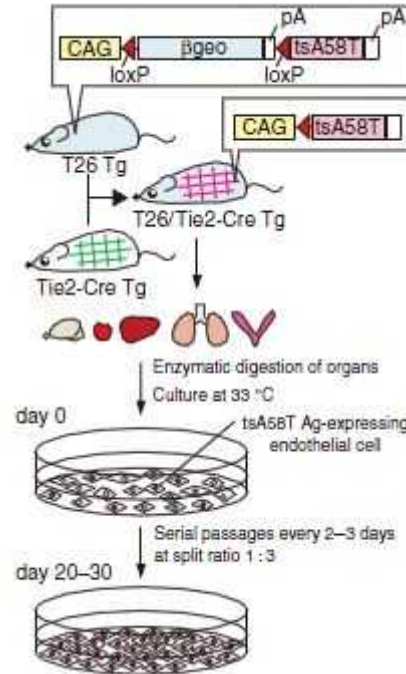


図 1  
tsA58T 抗原を内皮細胞で発現するマウスからの、33 度での選択的増殖を利用した内皮細胞の分離・培養 (雑誌論文 より転載)

得られた細胞について、内皮細胞に特徴的な発現を示すマーカー分子の発現を細胞免疫染色およびウェスタンブロット法により検討した。また、内皮細胞の増殖、分化や機能において重要な役割を果たす内皮細胞増殖因子、VEGF ファミリーとその受容体、VEGFR ファミリーのシグナル伝達が、既知の初代内皮細胞で観察されるのと同様に起こるか否かについて検討した。さらに、内皮細胞に特徴的な性質である、コラーゲンゲル上での管腔様構造の形成能を検討した。

さらに、血管内皮細胞と類似した性質を有する一方で固有の異なる性質をも有するリンパ管内皮細胞についての検討を行った。リンパ管内皮細胞の特異的マーカーである Lyve-1 に対する抗体を用いた磁気細胞分離によって、組織から得た内皮細胞集団を Lyve-1 陽性のリンパ管内皮細胞 (LEC) と Lyve-1 陰性の血管内皮細胞 (BEC) の 2 者に分離した。LEC について、Lyve-1 以外の他のリンパ管内皮細胞特異的マーカーの発現、VEGF/VEGFR シグナリング、管腔様構造の

形成能について検討した。

また、培養手技や方法の妥当性についての検討を進める一方で、研究対象とする遺伝子改変マウスと組み合わせた、多重トランスジェニックマウスからの内皮細胞の分離・培養とその解析を行った。

#### 4. 研究成果

T26; Tie2-Cre 2重トランスジェニックマウスの出生後個体や成体からの内皮細胞の分離・培養に成功した。また、得られた内皮細胞から、抗体を用いた細胞分離法による血管・リンパ管内皮細胞の2者の分離・培養に成功し(図2) その成果は論文として発表した(雑誌論文)。

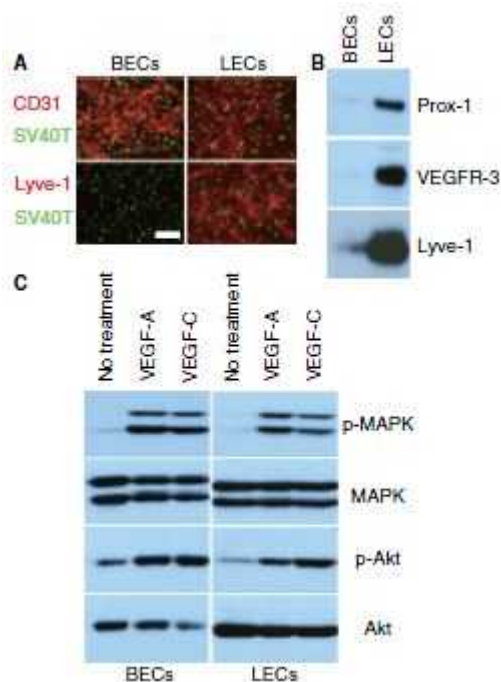


図2  
T26; Tie2-Cre 2重トランスジェニックマウスの腸間膜より得た血管・リンパ管内皮細胞におけるリンパ管内皮マーカーの発現および VEGF-A・C シグナル伝達の検討(雑誌論文より転載)

本方法によって得た内皮細胞は、CD31、VEGFR-2、VE-cadherin などの汎内皮マーカー分子を発現しており( CD31 以外の結果は未公表) リンパ管内皮細胞においては、図2に示したように、Prox-1、VEGFR-3、Lyve-1の発現が認められた。また、VEGF-Aや VEGF-Cの刺激による、VEGFR-2および VEGFR-3の細胞内ドメインのチロシン残基のリン酸化、その下流シグナルを担う MAPキナーゼや PI3キナーゼの活性化の誘導が確認された。加えて、管腔様構造の形成能を保

持していることも確認された。これらの結果から、本方法によって得られる不死化内皮細胞は、初代内皮細胞で認められる基本的な内皮細胞としての性質を十分に保持しており、初代内皮細胞で進められてきた生化学的解析や、細胞生物学的解析を、本方法で得た細胞によって進めることが可能であることが示唆された。

一方で、本課題において作成したトランスジェニックマウスとその利用方法を実際の研究に取り入れた成果も得た。血管・リンパ管の分離制御の異常を呈する遺伝子改変マウスの解析において、本研究課題で得た不死化血管・リンパ管内皮細胞、および不死化内皮細胞の培養方法の確立の過程で得た知見に基づいた、内皮細胞の初代培養を行った(雑誌論文) また、他の遺伝子改変マウスの内皮細胞の分離・培養において、本研究の培養方法が有効に活用できると判断される良好な結果を得た(学会発表)。

さらに、雑誌論文の公表を契機として、変異型 SV40T 抗原の組織特異的発現誘導とその細胞培養への利用を前提とした共同研究(国内2件、国外2件)を開始するに至った。

しかし、胎生期の内皮細胞の分離・培養については、SV40T 抗原陽性細胞の選択的培養には成功したが、内皮細胞としての性質の長期保持には成功しなかった。また、成体の血管内皮細胞の培養においても、長期培養の過程で内皮細胞の性質が損なわれる傾向が認められた。培地中の増殖因子の欠乏、細胞密度の低下が細胞の性質の不可逆的变化を誘導していることが示唆されたが、抜本的な解決方法を導き出すには至らなかった。出生後のマウスより得た内皮細胞については、内皮細胞マーカー、CD31 に対する抗体を用いた細胞分離による、性状変化を呈していない内皮細胞の再分離が効果的であるという知見を得たが、胎生期の細胞に対しては有効ではなかった。

本研究課題における、内皮細胞に焦点を置いた実験技術に関する成果を、より一般的かつ簡便なものとするためには、細胞特異的な tsA58T 抗原の発現誘導とその細胞増殖促進作用だけに依存せず、終末分化細胞の良好な培養方法の検討を注意深く試行し、最適化していく必要があると考えられた。

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2件)

Yamaguchi T, Ichise T, Iwata O, Hori A, Adachi T, Nakamura M, Yoshida N, Ichise H. Development of a new method for isolation and long-term culture of organ-specific blood vascular and lymphatic endothelial cells of the mouse. FEBS J. 275:1988-1998, 2008. (peer-reviewed)

Ichise H, Ichise T, Ohtani O, Yoshida N. Phospholipase Cgamma2 is necessary for separation of blood and lymphatic vasculature in mice. Development. 136:191-195, 2009. (peer-reviewed)

[学会発表](計1件)

市瀬 多恵子、山中 香織、中谷 容子、山口 高志、吉田 進昭、市瀬 広武「マウスリンパ管内皮細胞における Ras シグナリングの役割」ポスター発表、第30回日本分子生物学会年会、2007年12月13日、横浜

6 . 研究組織

(1)研究代表者

吉田 進昭 (YOSHIDA NOBUAKI)  
東京大学・医科学研究所・教授  
研究者番号：10250341

(2)研究分担者

市瀬 広武 (ICHISE HIROTAKE)  
東京大学・医科学研究所・助教  
研究者番号：10313090

(3)連携研究者

該当なし