

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790775
 研究課題名（和文）新規モデルマウスを用いた動脈管開存症（PDA）発症メカニズムの解析

研究課題名（英文）Analysis of PDA pathogenesis with novel PDA model mice.

研究代表者

矢嶋 伊知朗（YAJIMA ICHIRO）
 中部大学・生命健康科学研究所・研究員
 研究者番号：80469022

研究成果の概要（和文）：本研究において、Tyrosinase::Cre マウス(Tyr::Cre)と、Cre 発現下で β -catenin タンパク質を安定化する β -catFloxEx3 マウスの交配により Tyr::Cre; β -catFloxEx3 マウスを樹立した。このマウスでは、 β -catenin の活性化により、誕生時に動脈管開存症(PDA)を発症することが示され、ヒトの PDA 疾患と非常に類似した表現型を示すことを明らかにした。本マウスではメラノサイトが異所的に動脈管に局在しており、この心臓メラノサイトが PDA 発症に関与していることが示された。

研究成果の概要（英文）：Tyr::Cre; β -catFloxEx3 mice were generated by crossing Tyr::Cre transgenic mice with β -catFloxEx3 mice. These mice showed PDA by enhanced activity of β -catenin after birth. In these mice, ectopic melanocytes were localized in the heart and they directly and/or indirectly affect formation of the PDA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：色素細胞学・循環器学・発生学・腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

動脈管開存症(PDA)は先天性心疾患の10%を占め、頻度の多い先天性心疾患の1つである。PDAの治療は新生児医学において、重要な項目の1つである。治療法としてインドメタシンによる治療が一般化されているが、副作用が強く、治癒率も高くない。より安全で確率の高い治療法及び予防法が求められている。いくつかの動脈管開存モデルマウスが報告

されているが、いずれも短命であり、長期の病体解析には利用できない。そのため、よりヒトの疾患病態に近く、予防法、治療法研究に有用なモデルマウスの開発が求められている。

2. 研究の目的

研究代表者らが開発に携わった Tyrosinase::Cre トランスジェニックマウス

(Tyr::Cre)と、Cre発現下でβ-cateninタンパク質を安定化するトランスジェニックマウス(β-catFloxEx3)の交配により、生後直後に動脈管開存症(PDA)によって左心房・左心室肥大を呈し、4-18週程度生存後に死亡するマウス(Tyr::Cre; β-catFloxEx3)を樹立した。本研究では、ヒト新生児に非常に多い動脈管開存症を生後直後に示し、且つ4-18週程度生存できるTyr::Cre; β-catFloxEx3マウスが、新規の「ヒトのPDAモデルマウス」として有用である事を証明するとともに、メラニン産生細胞(メラノサイト)及び神経冠細胞が動脈管の開閉に影響を与える作用機序を解明する。

3. 研究の方法

(1) PDAモデルマウスTyr::Cre;

β-catFloxEx3; Dct::LacZ動脈管におけるメラノサイトの分化時期、分布領域の解析: Dct::LacZトランスジェニックマウスは、メラニン合成酵素の1つであるDct (dopachrome tautomerase) をコードする遺伝子のプロモーターとLacZをコードする遺伝子を融合したtrans geneを持つマウスである。このマウスはメラノサイト系細胞でのみLacZ遺伝子を発現するため、X-gal発色によってメラノサイトを青色に可視化することができる。本研究では、PDAモデルマウス(Tyr::Cre; β-catFloxEx3)とDct::LacZマウスを交配することによりTyr::Cre; β-catFloxEx3; Dct::LacZマウスを樹立した。このマウスを利用して心臓内を含む体内メラノサイト系細胞の分布を明らかにした。

(2) PDA発症とメラニン産生及びメラノサイトとの関連性の解析: 本モデルマウスのgenetic backgroundは、C57BL/6系統であるため、a/a; C/Cタイプのユーメラニン産生能力を持っている。本モデルマウスでは心臓に異所的に存在するメラニン産生細胞(メラノサイト)がPDA発症に関与する可能性が示唆されたが、「メラニン色素そのものがPDA発症に関与する」のか、「メラノサイトそのものの存在が関与する」のかは不明である。この問題を明らかにするためにはメラニン合成に必要なチロシナーゼ遺伝子に変異があるc/c(アルビノ)タイプのgenetic backgroundでの解析が不可欠と考え、Tyr::Cre; β-catFloxEx3マウスと、と交配を行うことで、メラニンを産生しないPDAマウス(Tyr::Cre; β-catFloxEx3; c/c)を樹立した。このマウスを解析することにより、メラニン色素そのものがPDA発症に関与するかどうかを検証した。

(3) Tyr::Creを交配した動脈管の特定の細胞集団特異的コンディショナルノックアウトマウスの解析: Endothelin receptor type B

(Ednrb)遺伝子は色素細胞の発生、移動、分化、生存等に深い関わりを持つ遺伝子である。心臓内に異所的に存在するメラノサイトによるPDA発症はEdnrb遺伝子の機能が関与している可能性が考えられる。そこで、Tyr::CreマウスとEdnrb-FloxEx3マウスとの交配実験を行い、Tyr::Cre; Ednrb-FloxEx3マウスの樹立を目指した。その後、出生数、生存期間、心臓の形態、心臓機能等をコントロールマウス(°/°; Ednrb-FloxEx3)と共に解析した。

(4) PDAモデルマウスTyr::Cre;

β-catFloxEx3マウスにおける、動脈管開閉因子についての発現解析: Cox-1, Cox-2, Epr4等は、動脈管開存に関与する事が報告されている遺伝子である。これらのノックアウトマウスはPDAを発症するが、いずれも短命であり、長期の病体解析には利用できない。本研究では、Cox-1, Cox-2, Epr4遺伝子等の発現量をTyr::Cre; β-catFloxEx3マウスにおいてPCR法等で解析した。解析においては、コントロールマウス(°/°; β-catFloxEx3)とPDAモデルマウス(Tyr::Cre; β-catFloxEx3)の動脈管を含む心臓の各部位を個別に摘出し、RNAを抽出、逆転写酵素によるcDNA合成を行い、これらを鋳型としたReal time PCR法により各遺伝子の発現量を定量した。

(5) タモキシフェン誘導性コンディショナルノックアウトマウスTyr::Cre-ERT2;

β-catFloxEx3を作成及び解析: 研究代表者が開発したTyr::Cre-ERT2マウスは、Cre recombinaseとタモキシフェン結合能を持つERT2ドメインが融合したタンパク質を発現するトランスジェニックマウスである。このマウスを用いると、タモキシフェンの投与を変えることにより時間的、空間的にCreタンパク質の発現をコントロールできる。このコントロールを行えば、defloxのタイミングをコントロールできるようになる。研究代表者らは、β-catenin遺伝子の活性化がどのようなタイミングで生じるとPDA発症に作用するのかを明らかにするため、Tyr::Cre-ERT2マウスとβ-catFloxEx3マウスを交配することにより、タモキシフェン誘導性コンディショナルノックアウトマウス(Tyr::Cre-ERT2; β-catFloxEx3)を作成した。タモキシフェンはcorn oilに融解し、生後直後、生後6時間、12時間、24時間の個体への腹腔注射を行った。生存期間、心臓の形態、心臓機能等をコントロールマウス(°/°; β-catFloxEx3)と共に解析した。

(6) ドップラーエコー画像解析法を用いた解析: 心臓機能は血流の維持であり、その機能を検証するためには心拍を維持したままの

解析が不可欠である。PDAモデルマウス (Tyr::Cre; β -catFloxEx3) のPDA発症時における血流をリアルタイムで測定するために、ドップラーエコー画像解析法を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) コントロールマウス (\emptyset/\emptyset ; β -catFloxEx3; Dct::LacZ)では、Dct::LacZによるLacZ発色は、動脈管内に全く認められなかった。一方 Tyr::Cre; β -catFloxEx3; Dct::LacZ マウスでは、異所的なメラノサイトからの発色が心臓内に多数認められ、特に動脈管内に多くのメラノサイトが点在していることが判明した。これら LacZ-positiveメラノサイト細胞が、動脈管内に本来数多く存在する平滑筋細胞ではなく、メラノサイトであることを確認するために、メラノサイトマーカーである Dct 抗体と平滑筋細胞マーカーである平滑筋抗体を用いて多重蛍光染色を行った。その結果、Dct 抗体 positive 細胞は平滑筋抗体 negative であり、平滑筋抗体 positive 細胞は Dct 抗体 negative であることが判明した。この結果は、異所的に存在する Dct::LacZ positive 細胞が遺伝子発現レベルでもメラノサイトであることを強く示唆している。以上の結果から、本マウスのPDA発症の原因が心臓内に異所的に存在するメラノサイトに起因している可能性が示唆された。

(2) c/c マウスを交配した Tyr::Cre; β -catFloxEx3: c/c の場合でも PDA が確認された。また、このマウスは計画通り全身でメラニン合成が起こらないアルビノ系マウスであった。また、メラニン色素が存在しない個体でも、メラノサイト細胞自身が存在することを確認するため、メラノサイトマーカーである Dct 抗体を用いて組織免疫染色を行った。その結果、Tyr::Cre; β -catFloxEx3: c/c マウスの動脈管には Tyr::Cre; β -catFloxEx3 マウスと同様、動脈管に異所的なメラノサイトの分布が観察された。この結果は、PDA の発症はメラニン色素が原因となって引き起こされるものではないことを示唆している。このマウスはメラニン色素は産生しないが、メラノサイトそのものは失われていない。つまり、PDA の発症はメラニンそのものではなく、メラニンを産生するメラノサイトによって引き起こされている可能性を示唆している。

(3) 色素細胞関連遺伝子である Ednrb 遺伝子が関与していることが考えられたため、Ednrb-Floxed マウスとの交配実験を行い、Tyr::Cre; Ednrb-Floxed マウスを樹立した。出生数、生存期間、心臓の形態、機能等を解

析したところ、大きな変化は認められなかった。この結果は、Ednrb 遺伝子の PDA 発症への関与が低い可能性を示唆している。

(4) 既知の動脈管開閉に関する因子、Cox-1、Cox-2、Epr4 等の発現量を定量するため、Real time PCR 法による遺伝子発現の定量化を行った。コントロールマウス (\emptyset/\emptyset ; β -catFloxEx3) と PDA モデルマウス (Tyr::Cre; β -catFloxEx3) の動脈管を含む心臓の各部位における各遺伝子発現量を比較したところ、Cox-2 及び Epr4 遺伝子の発現量も増大していた。この結果は、本 PDA モデルマウスでは、動脈管開閉因子の発現量の変化が PDA を発症させる原因であることを示唆している。

(5) β -catenin 遺伝子の作用がどのようなタイミングで作用するのかを明らかにするため、タモキシフェン誘導性コンディショナルノックアウトマウス Tyr::Cre-ERT2; β -catFloxEx3 を作成した。生後直後、生後6時間、12時間、24時間のマウスへタモキシフェンを投与し解析したところ、少なくとも生後に β -catenin の機能を活性化しても PDA の発症は観察されなかった。この結果は、 β -catenin による作用が胎児期に大きく作用している可能性を示唆している。

(6) ドップラーエコー画像解析法を用いた解析から、本モデルマウスは動脈管開存だけでなく、右心房から左心房へのシャントが観察された。さらには、PDA 発症後の本モデルマウスでは、このシャントは、動脈管開存-左心房血圧増大-肺内血圧増大-右心房内圧増大-右左シャントという順序で引き起こされたと考えられる。また、左心房に血栓を持つ個体が多く観察され、これらの血栓も本モデルマウスの寿命を短くする一因である可能性が示唆された。

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6件)

- ① Kumasaka M, Yajima I, Hossain K, Iida M, Tsuzuki T, Ohno T, Takahashi M, Yanagisawa, M, Kato M. A novel mouse model for de novo melanoma. Cancer Res. 70(1): 24-9, 2010. 査読有
- ② Ohshima Y, Yajima I, Kumasaka MY, Yanagishita T, Watanabe D, Takahashi M, Inoue Y, Ihn H, Matsumoto Y, Kato M. CD109 expression levels in malignant melanoma. J Dermatol Sci. 2010 Feb;57(2):140-2. 査読有

なし

- ③ Yajima I, Kumasaka M, Thang ND, Yanagishita T, Ohgami N, Kallenberg D, Naito Y, Yoshikawa T, Sakashita N, Kato M. Zinc finger protein 28 as a novel melanoma-related molecule. J Dermatol Sci. 55(1):68-70 2009. 査読有
- ④ Puig I, Yajima I, Bonaventure J, Delmas V, Larue L. The tyrosinase promoter is active in a subset of vagal neural crest cells during early development in mice. Pigment Cell Melanoma Res. 22(3):331-4, 2009. 査読有
- ⑤ Tsukiji N, Nishihara D, Yajima I, Takeda K, Shibahara S, Yamamoto H. Mitf functions as an in ovo regulator for cell differentiation and proliferation during development of the chick RPE. Dev Biol. 15;326(2):335-46, 2009. 査読有
- ⑥ Yajima I, Larue L. The location of heart melanocytes is specified and the level of pigmentation in the heart may correlate with coat color. Pigment Cell Melanoma Res. Aug;21(4):471-6, 2008. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

- ① 矢嶋伊知朗、モデルマウスを用いた、紫外線による悪性黒色腫の発症リスク解析とリスクファクター遺伝子の探索、日本衛生学会第78回大会、2009年3月30日、東京（北里大学）
- ② 矢嶋伊知朗、「Classical melanocyte と non-classical melanocyte の役割 — 心臓メラノサイトと心疾患の関連性—」、日本動物学会第79回大会、2008年9月5日、福岡（福岡大学）

[図書] (計 1 件)

- ① 矢嶋伊知朗、熊坂真由子 株式会社エヌ・ティー・エス 『生物の科学 遺伝 ヒトの皮膚・眼の色の遺伝学』 2009年 66-71

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢嶋 伊知朗 (YAJIMA ICHIRO)
中部大学・生命健康科学研究所・研究員
研究者番号：80469022

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者