

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670454

研究課題名(和文) 2種の抗血栓因子を用いた血管内皮細胞の可視化と発現解析を可能とするマウスの作製

研究課題名(英文) Production and analysis of Bac-TRAP mice that express fluorescent proteins driven by thrombomodulin or endothelial cell protein C receptor promoter

研究代表者

宮田 敏行 (MIYATA, TOSHIYUKI)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：90183970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、血管内皮細胞に発現する2つの抗凝固蛋白質、トロンボモジュリン(TM)とプロテインC受容体(EPCR)に着目し、これらを発現する細胞を異なる蛍光色素で可視化すると共に、細胞内で翻訳中のmRNAのトランスクリプトーム解析を実施可能なTM-BacTRAPマウス(EGFP-L10aを発現)およびEPCR-BacTRAPマウス(mCherry-L10aを発現)を作製した。しかし、作製したBacTRAPマウスはEGFPおよびmCherryの発現量が予想に反して低かったため、詳細な解析は困難であると判断した。

研究成果の概要(英文)：Endothelia in the arterial and venous circulation are heterogeneous in nature. In order to understand their heterogeneity, we developed novel BAC transgenic mice with cDNA encoding fusion proteins of a fluorescent protein, EGFP or mCherry, and a ribosomal protein L10a under control of the endothelial cell-specific thrombomodulin (TM) or endothelial cell protein C receptor (EPCR) promoter. We compared the expression intensities of transcribing endothelial-specific markers before and after immunoprecipitation with anti-EGFP antibody or anti-mCherry antibody and found that those markers are increased merely 2-3 fold after immunoprecipitation. We further examined the immunofluorescence staining of the heart and lung of the transgenic mice using anti-EGFP antibody or anti-mCherry antibody but failed to detect the endothelia positive for the antibody staining. We concluded that novel BAC transgenic mice we established showed low expression of EGFP-L10a or mCherry-L10a in endothelia.

研究分野：医歯薬学

キーワード：血管内皮細胞 遺伝子発現 トロンボモジュリン プロテインC受容体 マウス トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

血管内皮細胞には動静脈や組織部位による不均一性が指摘されているが、その機能的意義や疾患との関係についてはほとんど明らかにされていない。申請者は血液凝固の研究に携わり、血管内皮細胞が持つ抗血栓性の重要性を認識している。血管内皮細胞は2つの抗凝固蛋白質、トロンボモジュリン(TM)とプロテインC受容体(EPCR)を発現している。そこで、この血管内皮細胞特異的なTMとEPCRの発現を使い、血管内皮細胞のみが蛍光標識され、同時に、血管内皮細胞のトランスクリプトーム解析(Translating ribosome affinity purification, TRAP)を可能とするマウスの作出を考えた。この目的を達成するため、ロックフェラー大学のHeintz教授らが各種の細胞が複雑に存在する脳組織をdissectする手法として開発したBAC-TRAP法(Cell, 135, 738-748, 2008)を用いることとした。すなわち、蛍光タンパク質Green fluorescent protein(GFP)とリボソームタンパク質L10aとの融合タンパク質(EGFP-L10a)をBacクローン上のTM遺伝子プロモーターおよびEPCR遺伝子プロモーターで発現するトランスジェニックマウス(TM-Bac-TrapマウスおよびEPCR-Bac-Trapマウス)を作製する。これにより、血管内皮細胞だけがGFPを発現し、これをモニターすることにより、血管内皮細胞の動態のイメージングが可能となる。また、このマウスの血管内皮細胞では、EGFP-L10aもしくはmCherry-L10aという融合タンパク質が発現する。L10aはリボソームの構成タンパク質なので、リボソームはEGFP-L10aもしくはmCherry-L10aを取り込み、その結果リボソームはEGFPもしくはmCherryで標識される。EGFPもしくはmCherry標識リボソームはEGFP抗体もしくはmCherry抗体を使って回収可能なので、翻訳中のmRNAを集めトランスクリプトーム解析が可能となる。

2. 研究の目的

2種の抗凝固蛋白質、TMとEPCR、は血管内皮細胞に発現する。種々の刺激による両因子の発現低下は、血栓傾向となる。本研究では、血栓症を考える上で重要な機能を保持する血管内皮細胞をEGFPで蛍光標識し、かつ細胞内で翻訳中のmRNAのトランスクリプトーム解析を行うことが可能なシステムの確立を目的とする。このため、蛍光タンパク質EGFPもしくはmCherryとリボソームタンパク質L10aとの融合タンパク質が、TM遺伝子プロモーターもしくはEPCR遺伝子プロモーターの制御で発現するトランスジェニックマウスを作製する。このマウスは各種の血栓病態時の解析に有用となる。

3. 研究の方法

(1) TM-BacTRAPマウス(EGFP-L10aを発現)およびEPCR-BacTRAPマウス(mCherry-L10a

を発現)の作製

TM遺伝子のプロモーターの下流に蛍光タンパク質EGFPとリボソームタンパク質L10aの融合タンパク質EGFP-L10aをコードするcDNAを組み入れたBacベクターを構築した。EPCR遺伝子のプロモーターの下流に蛍光タンパク質mCherryとリボソームタンパク質L10aの融合タンパク質mCherry-L10aをコードするcDNAを組み入れたBacベクターを構築した。ベクターの構築に必要なBac改変用プラスミドDNA(S296.EGFP-L10a, pSV1-RecA)はロックフェラー大学Heintz教授から恵を受けた。129/SvEvマウス由来TM遺伝子およびEPCR遺伝子を含むBacクローンを持つ大腸菌はダナファーム社より購入した。

シャトルベクターであるS296.EGFP-L10aのEGFP上流にマウスTMプロモーター領域を挿入しS296.TM-EGFP-L10aを作製した。同様に、S296.EPCR-mCherry-L10aを作製した。

Bacクローンの上にあるTM遺伝子に、pSV1-RecAを用いて、S296.TM-EGFP-L10aプラスミドのEGFP-L10a融合タンパク質コード領域を挿入し、TM-Bac-TRAPを作製した。同様に、EPCR-Bac-TRAPを作製した。

トランスジェニックマウスの作製は、専門の業者に依頼した。コピー数が多いとTMおよびEPCRプロモーターで発現するEGFP-L10aおよびmCherry-L10a融合タンパク質が増えて強い蛍光を発するので、多コピーが挿入されたトランスジェニックマウスの作製を目指した。TM-Bac-TRAP DNAおよびEPCR-Bac-TRAP DNAは約500個の受精卵に移植した。

(2) TM-Bac-TRAP トランスジェニックマウスおよびEPCR-Bac-TRAP トランスジェニックマウスの解析

2種類のトランスジェニックマウスの心臓および肺でのEGFPおよびmCherryとL10a融合タンパク質の発現をウエスタンブロットを用いて調べた。TM発現細胞およびEPCR発現細胞での翻訳中RNAの網羅的解析を行うために、マイクロアレイ解析を実施した。

4. 研究成果

(1) TM-Bac-TRAP トランスジェニックマウスおよびEPCR-Bac-TRAP トランスジェニックマウスの作製

本研究では、ロックフェラー大学のHeintz教授らが開発したBAC-TRAP法(Cell, 2008)を用いて、血管内皮細胞を蛍光標識し、かつ細胞で翻訳中のmRNAのトランスクリプトーム解析を行った。BacベクターにあるTM遺伝子およびEPCR遺伝子のATG直前の配列をPCRで増幅後、組換えベクターのEGFP-L10a融合タンパク質をコードするDNAの直前に挿入し、組換えベクター(S296.TM-EGFP-L10a, S296.EPCR-mCherry-L10a)を作製した。次いで、Bac含有大腸菌に組換え酵素RecA発現ベクターをCaCl₂法で導入し、この大腸菌に組

換えベクターをエレクトロポレーション法で導入した。5'側および3'側の組換え部位でPCRを行うなどの方法で、マウス TM 遺伝子直前に EGFP-L10a およびマウス EPCR 遺伝子の直前に mCherry-L10a が挿入された Bac DNA (TM-EGFP-Bac-TRAP, EPCR-mCherry-Bac-TRAP) をもつ大腸菌をスクリーニングし単離した。

約 500 個の受精卵に TM-Bac-TRAP DNA および EPCR-Bac-TRAP DNA をマイクロインジェクションした。F0 で PCR 法を用いて遺伝子が挿入されたことを確認後、F1 マウスを使ってサザン解析を行いコピー数を算定した。その結果、1 ラインの TM-EGFP-Bac-TRAP トランスジェニックマウス (6 コピー挿入) および 3 ラインの EPCR-mCherry-Bac-TRAP トランスジェニックマウス (15 コピー、2 コピー、1 コピー挿入) の作製に成功した。これらのマウスを Bac-TRAP マウスと呼ぶこととした。

(2) TM-Bac-TRAP トランスジェニックマウスおよび EPCR-Bac-TRAP トランスジェニックマウスの解析

2 種類のトランスジェニックマウスの心臓および肺での EGFP および mCherry と L10a 融合タンパク質の発現をウエスタンブロットにて確認した。融合タンパクの発現が確認できた系統のマウスを用い、EGFP 抗体もしくは mCherry 抗体を用いた免疫沈降を行い、心臓および肺から翻訳中の RNA を抽出した。抽出した RNA を用いて、目的分子のコピー数濃度を直接算出できるデジタル PCR を行い、EGFP、mCherry、TM および EPCR の発現量を確認した。その結果、予想に反して、EGFP および mCherry の発現量が少ないことが分かった。

次に、TM と EPCR 発現細胞での翻訳中 RNA の網羅的解析を行うために、マイクロアレイ解析を実施した。免疫沈降前(組織全体)に比べて、免疫沈降後サンプルでの内皮細胞特異的マーカー発現は約 2-3 倍しか増加していなかった。組織学的に EGFP および mCherry 発現細胞を観察するため、免疫組織化学染色を試みたが、陽性染色像を確認することができなかった。今回作製した BacTRAP マウスは EGFP および mCherry の発現量が予想に反して低かったため、詳細な解析は困難であると判断した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Tashima Y, Banno F, Akiyama M, Miyata T: Influence of ADAMTS13 deficiency on venous thrombosis in mice. *Thromb Haemost*, 2015 July issue, in press. 査読有.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1160/TH14-08-0656>

Matsui H, Takeda M, Soejima K,

Matsunari Y, Kasuda S, Ono S, Nishio K, Shima M, Banno F, Miyata T, Sugimoto M: Contribution of ADAMTS13 to the better cell engraftment efficacy in mouse model of bone marrow transplantation. *Haematologica*, 99(10), e211-213, 2014 Oct. 査読有.

DOI: 10.3324/haematol.2014.109512

[学会発表](計5件)

田嶋優子、坂野史明、喜多俊行、松田泰幸、柳本広二、宮田敏行、「日本人に高頻度に見られるプラスミノーゲン栃木変異をもつ遺伝子改変マウスの血栓傾向の解析」、第19回日本病態プロテアーゼ学会学術集会、2014年8月8-9日、千里ライフサイエンスセンター、大阪府、豊中市

粕田承吾、松井英人、大野史郎、西尾健治、坂野史朗、秋山正志、宮田敏行、羽竹勝彦、杉本充彦、「マウス敗血症モデルによる von Willebrand 因子: ADAMTS13 軸の炎症制御機構」、第36回日本血栓止血学会学術集会、2014年5月29日-31日、大阪国際交流センター、大阪府、大阪市

田嶋優子、坂野史明、小亀浩市、宮田敏行、「ADAMTS13 遺伝子欠損マウスの静脈血栓塞栓症状の解析」、第36回日本血栓止血学会学術集会、2014年5月29日-31日、大阪国際交流センター、大阪府、大阪市

Fumiaki Banno, Yuko Tashima, Toshiyuki Kita, Yasuyuki Matsuda, Hiroji Yanamoto, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Poster, Analysis of mice carrying northeast Asian-specific genetic mutations in thrombosis, The 18th *International Vascular Biology Meeting*, April 14-17, 2014, 都メッセ、京都府、京都市

Yuko Tashima, Fumiaki Banno, Toshiyuki Kita, Yasuyuki Matsuda, Hiroji Yanamoto, Toshiyuki Miyata, Flash talk, Generation and Characterization of Homozygous Plasminogen-Tochigi Mutant Mice Bearing Reduced Fibrinolytic Activity, Plasminogen Activation & Extracellular Proteolysis, Gordon Research Conferences, February 9-14, 2014, Ventura, CA, USA.

[図書](計1件)

宮田敏行 他、中山書店、よくわかる血栓・止血異常の診療、2014、297(4-13)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:
発明者:

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ncvc.go.jp/res/divisions/etiology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮田 敏行 (MIYATA, Toshiyuki)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・部長

研究者番号：90183970

(2) 研究分担者

坂野 史明 (BANNO, Fumiaki)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・研究員

研究者番号：00373514

田嶋 優子 (TASHIMA, Yuko)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：10423104

丸山 慶子 (MARUYAMA, Keiko)

独立行政法人国立循環器病研究センター・研究所・流動研究員

研究者番号：30712624

(3) 連携研究者

()

研究者番号：