

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861111

研究課題名(和文)細胞周期関連遺伝子ShugoshinのCKOマウスにおける血管病変の分子機能解析

研究課題名(英文)The analysis of biomolecular functions in Shugoshin conditional knock-out mouse

研究代表者

森崎 浩一 (MORISAKI, Koichi)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：30625801

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)：多くの血管病変は、加齢とともにその罹患率が増加し、年齢そのものが重要な危険因子となっている。細胞周期関連遺伝子であり有糸分裂時に染色体の適切な分配を制御する因子であるSgo1 (Shugoshin-like 1) が血管内皮細胞、血管平滑筋細胞の老化において果たす役割をコンディショナルノックアウトマウス(以下CKOマウス)を用いて解析することを目的とした。20頭以上のマウスでtypingを行ったが、胎生致死のためか血管内皮特異的もしくは血管平滑筋特異的shugoshin CKOマウスを得ることができなかった。ヘテロマウスで大動脈の表現系を検討したが有意な所見は認めなかった。

研究成果の概要(英文)：Shugoshin is an essential protein in mitosis and meiosis, and it has an important role to protect chromosome cohesion at centromeres. Without Shugoshin, chromosome separations would be failed, and it would be lethal or develop cancers. Therefore, we hypothesized chromosomal instabilities because of lack of Shugoshin in vascular cells would lead to vascular diseases, and we tried to create vascular endothelial cells and smooth muscle cells specific Shugoshin conditional knock-out mice. We got more than 20 mice births, however, vascular cells specific Shugoshin conditional knock-out mouse was not gained. Vascular cells specific Shugoshin conditional knock-out mice may be embryonic lethal. Then, we investigated vascular phenotypes of vascular cells specific Shugoshin conditional hetero knock-out mice, however, there were not significant phenotypes. The current study revealed vascular cells specific Shugoshin knock-out mice were embryonic lethal.

研究分野：血管外科学

キーワード：shugoshin 動脈硬化 老化

1. 研究開始当初の背景

多くの血管病変は、加齢とともにその罹患率が増加し、年齢そのものが重要な危険因子となっている。細胞周期関連遺伝子であり細胞周期 M 期 (有糸分裂時) に染色体の適切な分配を制御する因子である Sgoll (Shugoshin-like 1) は、その機能異常により姉妹染色体分配時の中心体の接着不全を起こし、有糸分裂後の染色体が異数性を示すタイプの CIN (Chromosomal Instability; 染色体不安定性) を引き起こすことが分かっている (文献 1)。また臨床病態との関連については、一部の大腸癌の cell line で mutation が認められ機能が低下していること、Sgoll の発現が低下したマウスでは AOM 暴露による大腸がん発癌モデルにおいてがんの進展スピードが亢進することが分かっている (文献 2) が、その他の臨床病態との関わりは全く解明されていない。ここで、同じく細胞周期関連遺伝子であり有糸分裂を制御する紡錘体チェックポイント蛋白 BubR1 (Budding uninhibited by benzimidazole) についても、一部の大腸がんの cell line で mutation が認められているほか、BubR1 の発現を低下させたマウスでは、若年より平滑筋細胞の減少や活性酸素 (ROS) の産生増加といった老年期に起こる血管異常が認められることが分かっている。また当科ではこれまでに、Matsumoto らによる解析により、平滑筋細胞の減少は BubR1 の発現量に依存すること (文献 3) や Guntani らによる解析により、ヒト大動脈動脈硬化巣では正常大動脈に比べ BubR1 は低下していること (文献 4) など、BubR1 の血管系に対する影響を見出してきた。以上の経緯から、in vitro, in vivo の両面で BubR1 と類似した役割をもつことが想定される Sgoll について、CKO マウスを用いて血管系に対する影響を検討することを本研究の目的とした。

2. 研究の目的

多くの血管病変は、加齢とともにその罹患率が増加し、年齢そのものが重要な危険因子となっている。本研究の目的は、細胞周期関連遺伝子であり有糸分裂時に染色体の適切な分配を制御する因子である Sgoll (Shugoshin-like 1) が血管内皮細胞、血管平滑筋細胞の老化において果たす役割をコンディショナルノックアウトマウス (以下 CKO マウス) を用いて解析することで、血管の老化予防や、動脈硬化による血管イベントの発生の抑制に関する研究を強力に推進することにある。

3. 研究の方法

Sgoll CKO マウスの作製

現時点で、EMMA (The European Mouse Mutant Archive) よりマウスの凍結胚 (B6Brd; B6N-Tyrc-Brd Sgoll^{tm1a}(EUCOMM)Wtsi/WtsiCnbc ; 以下

Sgoll floxFRTneoFRT/+と表記) を購入後、熊本大学の CARD (Center for Animal Resources and Development) にて産仔を得、PCR によるジェノタイピングにより当該遺伝子改変マウスの妥当性を確認している。本学にて The Jackson Laboratory より購入した B6.129S4-Gt(ROSA)26Sor.^{tm1}(FLP1)^{Dym}/J マウス (全身性に F1p を発現) と交配させることで、薬剤耐性遺伝子 neo を除去した Sgoll flox/+ マウスを得る。その後、本マウスを The Jackson Laboratory より購入した B6.Cg-Tg(Tek-cre)12Flv/J マウス (血管内皮細胞特異的に Cre を発現するマウス) または B6.Cg-Tg(Tagln-cre)1Her/J マウス (血管平滑筋細胞特異的に Cre を発現するマウス) と交配させることで、Sgoll flox/+・Tek-Cre+ マウス (または Sgoll flox/+・Tagln-Cre+ マウス) を得る。本マウスを Sgoll flox/+ マウスと交配させることで、Sgoll flox/flox Tek-Cre+ マウス (血管内皮細胞特異的に Sgoll を欠損するマウス) または Sgoll flox/flox・Tagln-Cre+ マウス (血管平滑筋細胞特異的に Sgoll を欠損するマウス) を得る。その後、上記 2 種のマウスにおいてそれぞれの組織特異的に Sgoll が欠損しているか否か、mRNA および蛋白レベルで確認を行う。なお、組織の形成不全等の理由により血管系での解析が困難な場合にはその理由を詳細に探るとともに、Sgoll の成体における役割については Sgoll flox/+・Tek-Cre+ マウスまたは Sgoll flox/+・Tagln-Cre+ マウス (血管内皮細胞または血管平滑筋細胞特異的に Sgoll の発現がおよそ半分に減少したマウス) を用いて解析を行うことも視野に入れる。

二種の Sgoll conditional knockout mouse を用いた種々の血管病変に対する Sgoll の寄与に関する病理学的・分子生物学的解析

・ワイヤー傷害または頸動脈結紮による内膜肥厚モデルに対する Sgoll の寄与の検討

WT マウスおよび Sgoll CKO マウスの左右総頸動脈および内・外頸動脈分岐部を露出後、ワイヤー傷害モデルでは右総頸動脈のみをフレキシブルワイヤーにて内皮細胞を擦過する。頸動脈結紮モデルでは右総頸動脈を内外頸動脈分岐部の 2mm 近位部にて結紮し、左頸動脈は露出のみ行う。術後は経時的に犠牲死および組織の固定を行い、免疫染色等の手段により内膜肥厚の程度を比較検討する。

・大動脈内皮細胞、大動脈平滑筋細胞の細胞増殖能、遊走能に対する Sgoll の寄与の検討

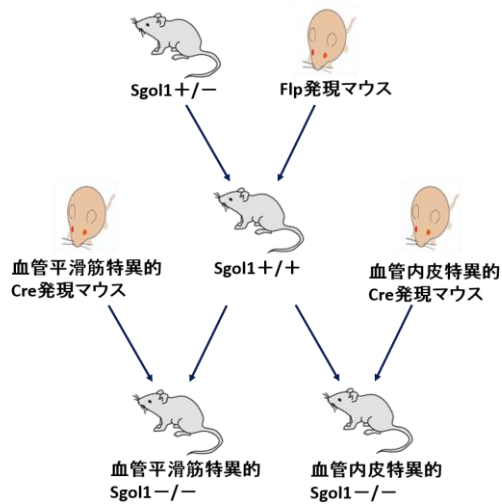
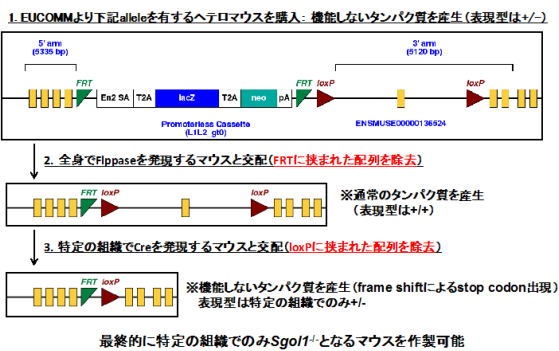
血管平滑筋細胞、内皮細胞の増殖性を比較検討する。WT マウスおよび Sgoll CKO マウスを頸椎脱臼後、大動脈を摘出。コラゲナーゼ処理後、遠心分離にて内皮細胞および血管平滑筋細胞を分離、培養し、これらの細胞の増殖性を比較検討する。また ex vivo での新生血管を定量する大動脈リングアッセイも同時

に行く。

4. 研究成果

Sgoll CKO マウスの作製

The Jackson Laboratory より購入した B6.129S4-Gt(ROSA)26Sor^{tm1(FLP1)Dym/J} マウス (全身性に Flp を発現) と交配させることで、薬剤耐性遺伝子 neo を除去した Sgoll flox/+ マウスを得る。その後、本マウスを The Jackson Laboratory より購入した B6.Cg-Tg(Tek-cre)12Flv/J マウス (血管内皮細胞特異的に Cre を発現するマウス) または B6.Cg-Tg(Tagln-cre)1Her/J マウス (血管平滑筋細胞特異的に Cre を発現するマウス) と交配させることで、Sgoll flox/+・Tek-Cre+ マウス (または Sgoll flox/+・Tagln-Cre+ マウス) を得る。本マウスを Sgoll flox/+ マウスと交配させることで、Sgoll flox/flox Tek-Cre+ マウス (血管内皮細胞特異的に Sgoll を欠損するマウス) または Sgoll flox/flox・Tagln-Cre+ マウス (血管平滑筋細胞特異的に Sgoll を欠損するマウス) を得る。



PCRによる genotype の確認

A. Promoterless cassette が除去されているのを確認するために LacZ の検出を施行した。108bpm のバンドが LacZ で、No. 2, 5, 7, 8, 9 で Promoterless cassette が除去されている。

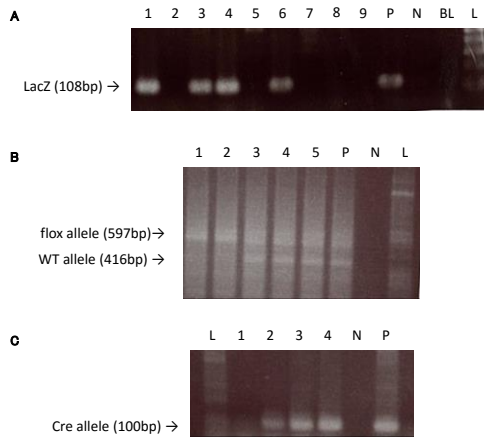
B. loxP transgenic (flox) allele の検出 597bpm のバンドが flox を、416bpm のバンド

が wild type の allele を示す。

No. 1, 2 が flox/flox を、その他は flox/+ を示していた。

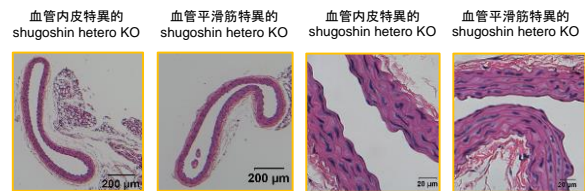
C. Cre の検出

No. 2-4 が Cre (+) を示す。



20 頭以上のマウスで typing を行ったが、血管内皮特異的 shugoshin ノックアウトマウス (flox/flox-Tek-cre)、血管平滑筋特異的 ノックアウトマウス (flox/flox-Tagln-cre) を得ることができなかった。

Shugoshin ヘテロノックアウトマウスでの表現系の解析



Shugoshinヘテロノックアウトマウスでは血管の表現系に差がない。

以上のように血管内皮特異的 shugoshin ノックアウトマウス、血管平滑筋特異的 ノックアウトマウスは胎生致死のためか得ることができなかった。

血管内皮特異的、もしくは血管平滑筋特異的 shugoshin ヘテロノックアウトマウスにて大動脈の表現系について解析したがヘテロノックアウトマウスでは有意な所見を得ることができなかった。

参考文献

1. Kahyo T. et al. Oncogene 2011;30(44):4453-63.
2. Yamada HY. Et al. Cell Cycle 2012;11(3):479-88.
3. Matsumoto T. et al. Stroke 2007;38(3):1050-6.
4. Gutani A. et al. J Surg Res 2011;170(1):143-9.

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森崎 浩一 (MORISAKI, Koichi)
九州大学・医学研究院・共同研究員
研究者番号：30625801

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()