

令和 3 年 4 月 30 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02363

研究課題名(和文)血管の階層性構造を制御する分子基盤とその破綻による腫瘍血管新生機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism to maintain hierarchical structure of vascular system and and tumour angiogenesis

研究代表者

依馬 正次 (Ema, Masatsugu)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・教授

研究者番号：60359578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：マウス発生期の血管内皮細胞に高度に発現する遺伝子を網羅的に探索する過程で、Exoc3L遺伝子ファミリーを同定していた。各遺伝子座に蛍光レポーターをノックインしたマウスを作製し、表現型を解析したところ、Exoc3L2-GFPノックインマウスは、GFPを血管内皮細胞において特異的に発現すること、KOマウスは胎生15日前後に出血により致死となることが分かった。Exoc3L4-GFPノックインマウスはGFPを主として血管内皮細胞および心筋において高発現し、KOマウスは胎生12～15日前後で致死となることが判明した。血管可視化マウスとしてVEGFR3受容体の発現を再現するBAC Tgマウスを作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Exoc3L遺伝子群の生理機能を体系的に明らかにし、その制御機構を解明することができれば、新たな腫瘍血管新生抑制療法の開発に繋がるものと期待される。

研究成果の概要(英文)：We have identified Exoc3-like family genes which are specifically expressed in developing endothelial cells. To investigate the physiological roles of Exoc3L genes, we have created Exoc3L2-GFP knock-in mouse and found that GFP (Exoc3L2) is expressed in endothelial cells and KO embryos die in utero due to bleeding. We also created Exoc3L4-GFP knock-in mouse and found GFP (Exoc3L4) is expressed in endothelial cells as well as cardiomyocytes. Exoc3L4 KO embryos die around E12.5, due to unknown mechanism.

We also created VEGFR3-Venus BAC Tg mouse useful for visualization of vascular and lymphatic endothelial cells.

研究分野：発生工学

キーワード：血管新生 血管内皮細胞 マウス 遺伝子改変

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

日本人の死因の第1位は癌、2位心臓疾患、3位脳虚血性疾患であるが、これらの疾患の治療法に共通して求められるのは、いかにして血管の新生を抑制あるいは促進するかという点である。血管は解剖学的に動静脈系、大・中・微小血管からなる階層状構造を呈しており、規則的な階層構造は効率的な血流に重要であるが、正常の血管の階層性構造を生み出したり、維持する制御機構は良く分かっていない。また、その制御機構の破綻による腫瘍血管新生のメカニズムも不明な点が多い。そこで本研究では、申請者が作製する血管可視化蛍光レポーターマウスを駆使することで、血管内皮細胞の階層状構造を特徴づける遺伝子群を体系的に明らかにし、その制御機構を解明することを目指した。また我々はマウス発生期の血管内皮細胞に高度に発現する遺伝子を網羅的に探索する過程で Exoc3L (Exocyst Complex Component 3-Like Protein) 遺伝子を同定し、血管形成に重要であること試験管内アッセイ系を用いて示していた (Takase, Ema et al., Blood, 2012)。これら Exoc3L 遺伝子群は、微小血管の維持に関わる可能性が高いと推測されたため、Exoc3L 遺伝子群の生理的、腫瘍血管新生における役割を、血管の階層性に焦点を当てながら解明する。

### 2. 研究の目的

本研究では、血管可視化蛍光レポーターマウスを新たに開発して用いることで、血管内皮細胞の階層状構造を特徴的な遺伝子群を体系的に明らかにし、その階層性確立機構を解明する。また微小血管の維持に関わる可能性のある Exoc 遺伝子群の生理的、腫瘍血管新生における役割を、血管の階層性に焦点を当て解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

遺伝子改変マウスの準備: Exoc3L、Exoc3L2、Exo3L3、Exoc3L4 遺伝子に関しては、エクソン部分を全て欠失させ、代わりに蛍光タンパク質をコードする cDNA (GFP もしくは tdTomato) をノックインしたマウスを作製した。さらに、各遺伝子の Sec6 ドメイン部分をコードするエクソンの両側に loxP を配置した floxed マウスを作製した。血管内皮細胞特異的に遺伝子を欠損させるために、Tie2-Cre マウスを用いた。時期特異的に血管内皮細胞において Cre 活性を誘導するマウスとして、Cdh5-CreER マウスを用い、出生後3日間タモキシフェンを腹腔注射により投与した。

胚における血管構造解析: 発生過程における血管構造を調べるために、胚や成獣皮下組織を PECAM1 (血管内皮細胞マーカー)、SMA (平滑筋マーカー) により全胚免疫染色を行い、可視化する。また、影響を受けている組織については、切片の免疫染色解析および電子顕微鏡観察により血管系構築異常の詳細を明らかにする。マイクロ CT 解析により、全身の血管構造と血液の漏れをくまなく調べる。

網膜における血管構造解析: 生後5日目の視神経乳頭からの距離、血管密度、血管分岐数、Tip 細胞当たりのフィロポディア数を定量化する。また、Flk1 や Flt1 の発現を可視化するマウスを用いて、血管内皮細胞中の各階層を比較する。

出血の表現型解析: 胎児に出血が見られた場合、赤血球マーカーである TER119 抗体を用いて免疫染色し、血管外に滲出した赤血球を可視化する。リンパ管マーカーである LYVE1 や VEGFR3 との共免疫染色法により、時々見られる血管内皮細胞からリンパ管内皮への赤血球の出血がどうか判断した。

### 4. 研究成果

我々は、マウス発生期の血管内皮細胞に高度に発現する遺伝子を網羅的に探索する過程で Exoc3L 遺伝子を同定し、血管形成に重要であること試験管内アッセイ系を用いて示したが (Takase, Ema et al., Blood, 2012)、個体レベルでの機能は全く報告がなかった。さらに、Exoc3L には Exoc3L2 と Exoc3L4 という類似遺伝子が存在し、ともに血管内皮細胞に高発現していた (依馬ら、未発表) が、同様に個体レベルでの機能は全く報告がなかった。そこで、Exoc3L ファミリー遺伝子のノックアウトマウスを作製するために、Exoc3L、Exoc3L2、Exo3L3、Exoc3L4 遺伝子に関しては、エクソン部分を全て欠失させ、代わりに蛍光タンパク質をコードする cDNA (GFP もしくは tdTomato) をノックインしたマウスを作製した。これらのヘテロマ

ウスの交配により、各ノックアウトマウスを作製したところ、Exoc3L2 ノックアウトマウスおよび Exoc3L4 ノックアウトマウスは胚致死であった。一方、試験管内アッセイ系で顕著な血管新生傷害を示した Exoc3L 遺伝子に関しては、ノックアウトマウスは生存可能であり、繁殖能力を有していた。またその後の生存曲線も変化は無かった。Exoc3L3 は TNF 誘導性遺伝子とも呼ばれているが、ノックアウトマウスは生存可能であり、繁殖能力を有していた。

Exoc3L2 ノックアウトマウスの表現型を解析するために、マウス胚における Exoc3L2 の発現を調べた。Exoc3L2 (GFP) は主として血管内皮細胞において発現するが、一部心神経堤細胞にも発現することを見出した。また、血管周囲の血管平滑筋細胞や心筋細胞には発現しないことを確認した。Exoc3L2 ノックアウトマウスは胎生 15 日前後に出血により致死となることが分かった。出血の原因が血管内皮細胞における Exoc3L2 遺伝子の機能によることを確認するために、血管内皮細胞特異的 Exoc3L2 ノックアウトマウスを作製・解析したところ、全身性ノックアウトと表現型は同一であったことから、血管内皮細胞における Exoc3L2 遺伝子の機能破綻が血管構造の維持に必須であることが分かった。生後の血管発生にも Exoc3L2 遺伝子が重要か見るために、タモキシフェン誘導型 Cre を血管内皮細胞に発現する Cdh5-CreER マウスと交配し、出生後にタモキシフェンを連続投与することで、生後 5 日目の血管内皮細胞特異的 Exoc3L2 ノックアウトマウスを作製し、網膜血管内皮細胞・平滑筋細胞のパターンおよびフィロポディアを計数した。結果として網膜血管新生には Exoc3L2 遺伝子の欠失は影響は与えなかったことから、網膜血管の階層性には役割を果たしていないことが分かった。

一方、Exoc3L4 GFP ノックインマウスは GFP を主として血管内皮細胞および心筋において高発現し、ノックアウトマウスは胎生 12~15 日前後で致死となることが判明した。血管内皮細胞特異的ノックアウトマウスを作製・解析したところ出生し、一見正常であることから、血管内皮細胞における Exoc3L4 の機能は胚発生には必須ではないことが示された。Exoc3L4 は心筋細胞にも高発現することから、今後、心筋細胞特異的に Exoc3L4 の機能を欠失させるノックアウトマウスを作製し、表現型解析を行い、胚発生における生理的役割を明らかにする。また、血管内皮細胞特異的ノックアウトマウスは出生することから、今後網膜血管内皮細胞・平滑筋細胞のパターンおよびフィロポディア形成における Exoc3L4 遺伝子の役割を評価していく予定である。

血管可視化マウスとして VEGF-C 受容体である VEGFR3 受容体遺伝子のゲノム領域を有する BAC クローンに、膜局在型の Venus をノックインした BAC (Bacterial artificial chromosome) DNA をマウス受精卵に導入し、VEGFR3 受容体遺伝子の発現を再現する BAC トランスジェニックマウスを作製した。

本研究により、これまで殆ど報告の無かった血管内皮細胞に特異的に発現する Exoc3L 遺伝子群の個体レベルでの役割が明らかになってきたが、同様な発現様式を呈するにも関わらず胚発生における役割は異なっていることが示唆される。このことから、アミノ酸レベルでの一次構造配列は極めて類似しているにも関わらず、分子機能的には異なっていることが窺え、その解明が今後の課題であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe C, Matsushita J, Azami T, Tsukiyama-Fujii S, Tsukiyama T, Mizuno S, Takahashi S, Ema M.	4. 巻 14(1)
2. 論文標題 Generating Vegfr3 Reporter Transgenic Mouse Expressing Membrane-Tagged Venus for Visualization of VEGFR3 Expression in Vascular and Lymphatic Endothelial Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0210060
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0210060. eCollection 2019.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究分担者	水野 聖哉  (Mizuno Seiya)  (10633141)	筑波大学・医学医療系・准教授   (12102)	
研究分担者	杉山 文博  (Sugiyama Fumihiro)  (90226481)	筑波大学・医学医療系・教授   (12102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------