

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19397

研究課題名(和文)統合失調症関連遺伝子Tspan18欠損による血管形成異常のメカニズムとその意義

研究課題名(英文)Tetraspanins regulate the formation of mature blood vessels

研究代表者

田井 育江(Tai, Ikue)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・特別研究員(RPD)

研究者番号：90749508

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Tetraspanin(Tspan)は4回膜貫通ドメインと2つの細胞外ループを持つ膜タンパク質であり、Tspanを介して様々な膜タンパク質が細胞膜上に集積し、膜タンパク質の輸送やシグナル伝達を調節している。我々は、網膜で発現している新規のTspanを見出し、生後6日目のマウス網膜においてTspan18が動静脈および神経節細胞で発現していること、Tspan18lacZ/lacZマウスではコントロールマウスよりも網膜血管の伸びが悪く、動静脈の本数が減少していることを見出した。Tspan18の結合候補因子を同定し、この因子のシグナル伝達をTspan18が調節していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Tetraspanins (Tspans) are membrane-anchored molecules with 4 transmembrane regions, which promote clustering of other membranous proteins by forming "tetraspanin-enriched microdomain". Integrins and Immunoglobulin superfamily proteins have been identified as their binding proteins, and thus Tspans are thought to modulate the signal transduction associated with these molecules. However, the function of tetraspanins in vascular development has not been understood well. Here, we found some Tspans are expressed in endothelial cells, especially those in mature (arterial and venous) vessels. Conventional or endothelial-specific knockout of Tspan showed a significant reduction in the number of arterioles and venules and reduced radial vascular growth. In vitro data suggest that Tspan directly interacts with other membrane proteins involved in angiogenesis. Overall, Tspan might regulate the formation of arterioles and venules by clustering other membrane proteins.

研究分野：血管生物学

キーワード：網膜血管 血管新生 血管形成 テトラスパニン

1. 研究開始当初の背景

脳の微小血管異常と統合失調症の関連は古くから指摘されている。例を挙げると、統合失調症患者では脳血流を反映する光トポグラフィー波形に異常があること、心血管系疾患のリスクが2倍以上高いこと、疾患関連遺伝子の多くが血管で発現することなどからも、認知機能の異常に血管系が関与していることが想定される。さらに、2013年に Meier らが、統合失調症発症患者に網膜血管形成異常があることを見出し、統合失調症の診断における網膜眼底検査の有用性を報告した。この報告により、統合失調症と微小血管異常の関連性が実証的に示された。

またこれと同時期に Jianmin Yuan らによって、統合失調症発症に関連する遺伝子の SNP 解析により、新規リスク因子の1つとして Tspan18 の変異が見出された。Tspan18 はテトラスパニンスーパーファミリーに属する4回膜貫通タンパク質であり、ゼブラフィッシュにおける Tspan18 機能低下は体節間の血管形成に異常を呈することが報告されている。

2. 研究の目的

本研究は、Tspan18 の LacZ ノックインマウス(Tspan18^{lacZ/lacZ})を用いて Tspan18 の行動解析を行うと共に、網膜を用いた血管形成における表現型を明らかにし、それらの因果関係を考察した。

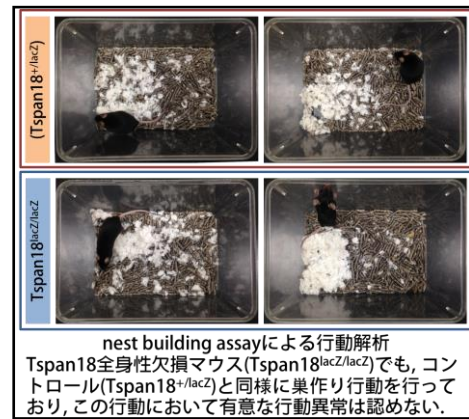
Tspan18 による血管異常の表現型が見出された場合、血管形成に重要な内皮細胞分化を司るシグナル伝達機構の変化を評価し、血管形成における Tspan18 の機能メカニズムの解明を試みた。

3. 研究の方法

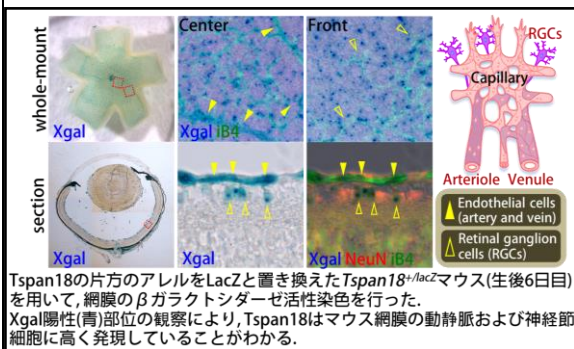
仔マウス網膜を用いて、組織ホールマウント血管染色技術による血管網形成過程の観察を行った。行動学的解析には、nest building assay 法を用いた。また、解析対象となった遺伝子改変マウスは全身性 Tspan18 欠損マウス、血管内皮細胞特異的 Tspan18 欠損マウス、神経特異的 Tspan18 欠損マウスなどである。

4. 研究成果

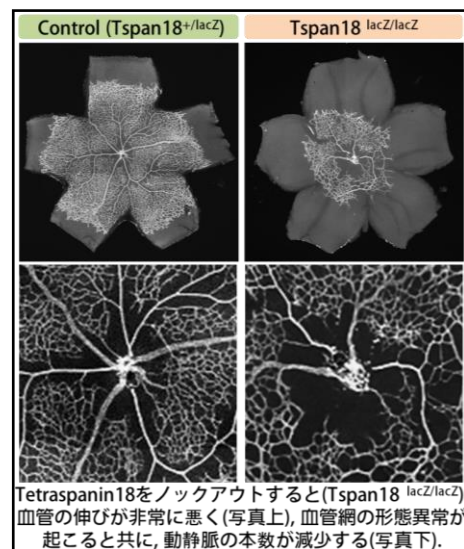
(1). まず、Tspan18 全身性欠損マウス(Tspan18^{lacZ/lacZ})を準備し、6週齢の Tspan18^{lacZ/lacZ} マウスについて行動異常の有無を nest building assay 法を用いて解析した。なお、コントロールには Tspan18^{+/lacZ} マウスを用いた。Tspan18^{lacZ/lacZ} マウスは生まれにくい傾向があり、何らかの原因で胎仔期に死亡していることが示唆されたものの、出生後の Tspan18^{lacZ/lacZ} マウスにおいて明らかな行動異常は認めなかった。



(2). 網膜における Tspan18 の発現部位を LacZ ノックインマウス(Tspan18^{lacZ/lacZ})の X-gal 染色によって確認したところ、動静脈血管内皮細胞および網膜神経節細胞において強い発現が見られた。



(3). Tspan18^{lacZ/lacZ} マウスにおける血管異常の表現型があるかを網膜血管を用いて解析した。その結果、生後6日目における網膜の動静脈数が減少し、血管網が二次元的に伸長する radial growth の過程が遅延していた。



(4). Tspan18 の発現が認められる血管内皮および神経節細胞で特異的に Tspan18 を欠損するコンディショナル KO マウスを作製し、解析を行った。その結果、血管内皮細胞特異的 Tspan18 KO マウスにおいてのみ、全身性の Tspan18 KO マウスと同様の表現型が認

められた。

(5). 上記(1)~(3)の結果から、血管形成機構における Tspan18 を介したメカニズムを解明するために、Tspan18 結合因子の同定に向けての準備に取り組んだ。内在性 Tspan18 タンパク質を検出するための市販の良い抗体がないことから、Tspan18 抗体の作製を試みたものの、免疫細胞染色およびウエスタンブロットで Tspan18 を検出するに至らなかった。そのため、Flag タグ付加 Tspan18 過剰発現ベクター (Tspan18-Flag) を作製した。Tspan18-Flag と VEGFR2 コンストラクトを HEK293T 細胞に co-transfect して免疫沈降を行ったところ、Tspan18 と結合を示唆する膜タンパク質を見出した。今後は、HUVEC 細胞を用いて、これらの結合関係を確かめ、Tspan18 の制御標的となるタンパク質の同定を試みる予定である。

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 5 件)

1.

Tai-Nagara I, Yusuke Yoshikawa, Naoko Numata, Tomofumi Ando, Keisuke Okabe, Yuki Sugiura, Masaki Ieda, Nobuyuki Takakura, Osamu Nakagawa, Bin Zhou, Koji Okabayashi, Makoto Suematsu, Yuko Kitagawa, Martin Bastmeyer, Kohji Sato, Rüdiger Klein, Sutip Navankasattusas, Dean Y. Li, Satoru Yamagishi, Yoshiaki Kubota
Placental labyrinth formation requires inter-endothelial repulsion mediated by FLRT2/UNC5B signaling. *Development*, in press (2017)

2.

Yoshikawa Y, Yamada T, Tai-Nagara I, Okabe K, Kitagawa Y, Ema M and Kubota Y.
Developmental regression of hyaloid vasculature is triggered by neurons. *J Exp Med*, 213(7), pp1175-83, (2016)

3.

Okabe K, Kobayashi S, Yamada T, Kurihara T, Tai-Nagara I, Miyamoto T, Mukouyama YS, Sato TN, Suda T, Ema M, Kubota Y.
“Neurons limit angiogenesis by titrating VEGF in retina.” *Cell*, 159, pp584-596, (2014)

4.

Tai-Nagara I, Matsuoka S, Ariga H, Suda T

“Mortalin and DJ-1 coordinately regulate hematopoietic stem cell function through the control of oxidative stress.” *Blood*, 123(1), pp41-50, (2014)

Zou P, Yoshihara H, Hosokawa K, Tai I, Shinmyozu K, Tsukahara F, Maru Y, Nakayama K, Nakayama IK, Suda T
“p57^{Kip2} and p27^{Kip1} Cooperate to Maintain Hematopoietic Stem Cell Quiescence through Interactions with Hsc70.” *Cell Stem Cell*, 9(3), pp247-61, (2011)

5.

Nakada S, Tai I, Panier S, Hakim-AIA, Iemura S, Juang Y, O'Donnell L, Kumakubo A, Munro M, Sicheri F, Gingras A, Natsume T, Suda T, Durocher D
“Non-canonical inhibition of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB1.” *Nature*, 466, pp941-946, (2010)

[学会発表] (計 3 件) (2015 年度以降)

1. 田井育江, 久保田義顕

Tetraspanins regulate the formation of mature blood vessels.

第24回 日本血管生物医学会学術集会 (2016年12月8-10日 長崎ブリックホール (長崎))

2. Nagara-Ikue Tai, Yoshiaki Kubota
Tspan18 contributes to the formation of the high-ordered vascular architecture in the retina. 13th Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology (2015年10月15日 サムジュアートホール(韓国釜山))

3. Nagara-Ikue Tai, Yoshiaki Kubota
Tspan18 contributes to the formation of the high-order architecture in retinal vascular development. *The 9th Aso International Meeting* (2015年3月14-16日 ホテルグリーンピア南阿蘇(熊本))

[図書] (計 0 件)

[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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田井 育江 (TAI IKUE)
慶應義塾大学・医学部・特別研究員(RPD)
研究者番号：90749508

(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

()