

機関番号：32622
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20591030
 研究課題名(和文) 血管内皮細胞へのアクアポリン1過剰発現による骨格筋再生能促進と筋疾患治療への応用
 研究課題名(英文) AQP1 overexpression in the capillary endothelial cells for the enhancement of muscle regeneration and its therapeutic application to myopathies
 研究代表者
 若山 吉弘 (WAKAYAMA YOSHIHIRO)
 昭和大学・医学部・教授
 研究者番号：40138467

研究成果の概要(和文)：正常と mdx のマウス後肢筋を壊死再生させ、そこへ実験群(AQP1)、対照群(Lac Z)のベクターを注入し、3日後に同部位を採取した。両群とも抗 AQP1 抗体染色陽性の血管は多数存在したが明らかな増加とは思われなかった。採取組織片の AQP1 mRNA レベルは正常マウスでは両群で有意差なし($P>0.1$)。mdx マウスでも実験群でやや多い傾向がみられたが有意差なし($0.2<P<0.3$)。更に AQP1 過剰発現 Tg マウスの発現系(LNL-AQP1)を作りこの DNA 断片を C57BL/6 マウスの受精卵の前核に計 13 回 188 匹のマウスに注入し、トランスジーンの入った 1 匹の雄マウスを得た。

研究成果の概要(英文)：Adenovirus vector with AQP1 (experimental group: EG) or that with Lac Z (control group: CG) was injected into the skeletal muscle necrotic tissue of normal or mdx mouse hind limb, respectively. The necrotic and regenerative skeletal muscle tissues after 3 days of injection showed that numerous blood vessels with anti-AQP1 antibody immunopositive staining were present, although their numbers appeared not to be different between EG and CG. The AQP1 mRNA levels of muscle regenerative tissues after 3 days of injection were not statistically different between two groups both in normal and mdx mice. Furthermore, AQP1 overexpressing transgenic mouse is now under generation by using LNL-AQP1 expression system. The DNA fragments were injected into the ova of 188 mice and finally we obtained one male mouse with transgene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：臨床神経形態学

1. 研究開始当初の背景

Duchenne muscular dystrophy (DMD) の原因遺伝子は Kunkel グループの Hoffman ら¹⁾により 1987 年クローニングされ、その 427kDa の遺伝子産物 dystrophin が発見され、Koenig

ら²⁾により dystrophin 遺伝子の全塩基配列が決定された。DMD の生検骨格筋について、筆者ら^{3), 4)}は以前、骨格筋再生のための筋芽細胞とされている myosatellite cell (筋衛星細胞) が正常対照筋と比べ増加しているこ

とを報告した。また筆者ら⁵⁾は、ヒト正常骨格筋を thymus がなく免疫寛容性のあるヌードマウスの皮下に異種移植し、移植されたヒト正常骨格筋が再生することを報告した。この際、移植されたヒト正常骨格筋の移植片は、線維性の被膜に覆われたすぐ内側の毛細血管の豊富に分布する移植片周辺部には筋再生も著明で、そのさらに内部の移植片中心部分には毛細血管も乏しく、最初に移植したヒト骨格筋の変性像を主体とした所見しかみられず、筋再生はほとんど認められなかった。従って、骨格筋の再生には毛細血管の増殖が必要であることが推測された。さらに、筆者ら⁶⁾は DMD 生検筋をヌードマウスの皮下へ異種移植したところ、筋再生はみられるものの、正常筋の移植片にみられる筋再生との間に差異を認めることは困難であった。2005 年、Saadoun ら⁷⁾は AQP1⁰-null mice を使い、皮下や頭蓋内へ腫瘍を移植すると毛細血管新生が低下し腫瘍増殖が抑えられることを報告した。このように、組織を栄養する毛細血管の多寡は組織の生長増殖を制御する。また上述の我々の研究からも、骨格筋の再生には再生骨格筋内の毛細血管内皮の増殖が重要であることが伺える。

2. 研究の目的

最近、AQP1 が血管内皮細胞の増殖を促進し、組織の再生、修復、腫瘍の増殖などに促進的に作用すると Saadoun ら⁷⁾により報告された。従って、本研究では AQP1 を筋内血管内皮に過剰発現させ、DMD をはじめとする筋萎縮性疾患の骨格筋再生を促進させ、治療に応用しうる可能性を検討する目的で実施した。

3. 研究の方法

(1)材料

①アデノウイルスベクターによる血管内皮 AQP1 発現促進実験：正常マウス (C57BL/6) 14 匹、Mdx マウス (C57BL/10-mdx) 17 匹

②AQP1 過剰発現 Tg マウス作製実験：正常マウス (C57BL/6) 188 匹

(2)方法

平成 20 年度は、骨格筋組織内の毛細血管内皮細胞膜へ AQP1 を過剰発現させるために AQP1 のアデノウイルス発現ベクターを構築した。その作製は Invitrogen 社へ業務委託し、Gateway システムに基づいて構築した。正常マウス骨格筋のプビバカイン壊死再生モデルを作製し、AQP1 (実験群)、Lac Z (対照群) をそれぞれ組み込んだアデノウイルスを投与し比較検討した。平成 21 年度以降には、平成 20 年度に作製した AQP1 過剰発現筋組織片と対照組織片を引き続き蛋白・RNA レベルで検討した。また dystrophin 欠損 mdx マウス骨格筋の塩酸プビバカインによる壊

死再生モデルで同様実験をし、更に AQP1 過剰発現変異マウスの作製を試みた。

①アデノウイルスベクターによる血管内皮 AQP1 発現促進実験

アデノウイルスベクターの構築

A. 目的遺伝子のPCRによる増幅

1. 購入したマウス AQP1 cDNA をテンプレートとして用いる。

2. 末端に attB 配列 (5' 用プライマーには attB1、3' 用プライマーには attB2) を付加したプライマーを用いて PCR を行う。

attB1: ggggacaagtttgtacaaaaagcaggctt

attB2: ggggaccactttgtacaagaagctgggtc

3. PCR 反応は変異を避けるために正確性の高い耐熱性酵素 (Pfx50) を使用し、上記のテンプレートから PCR 産物を増幅する。

4. PCR 産物をアガロース電気泳動にてサイズ、収量および単一バンドであるかどうかを確認する。

B. エントリークローン作製 (BP 反応)

1. クローニングベクター (pDONR221) を使用する。

2. 上記 A の PCR 産物を Gateway の方法でベクターにクローニングする。

3. PCR あるいは制限酵素処理によりインサートの長さを確認する。

4. インサートの長さを確認した最大 8 つの組換え体クローンについて、ベクター側からインサートの方向へ 1 反応ずつのシーケンス反応を行いインサート全長の DNA 配列を確認する。

5. 目的インサートの翻訳後アミノ酸配列がデータベース情報と一致しなかった場合、GeneTailor による部位特異的変異導入を実施する。

C. アデノウイルス発現ベクター作製 (LR 反応)

1. 上記で作製したエンタリークローンをを用いる。

2. エントリークローンを Gateway LR 反応により、pAd/CMV/V5-DEST ベクターにクローニングし、発現クローンを作製する。

3. PCR あるいは制限酵素処理によりインサートの長さを 8 クローンについて確認する。

4. 4 つの組換え体クローンを拾い、ベクター側からインサート側へ 1 反応ずつシーケンス反応を行いインサートの 3' および 5' 末端の DNA 配列を確認し、正しく組換えられたクローンを選別する。

5. この時点でインサートの 3' および 5' 末端の DNA 配列に変異が存在した場合、さらに 4 つの組換え体クローンを拾い、末端 DNA 配列を確認する。

D. プラスミド精製

1. 上記で得られた Gateway 発現クローンをを用いる。

2. クローンを培養し、トランスフェクショングレードの精製法により最低 50ug 精製する。
3. 上記クローングリセロールストックを作製する。

E. アデノウイルス作製

1. E1 遺伝子配列を持つ 293A 細胞に D にて抽出したプラスミドをトランスフェクションする。
2. 数日後、細胞を回収しクルードウイルスライセートを作製する。
3. 再度、クルードウイルスライセートを 293A 細胞に感染させ、アデノウイルスを増幅する。
4. 増幅したアデノウイルスストックのタイターを確認する。(予定タイター $10^8 \sim 10^9$ pfu/ml)

F. 正常マウス骨格筋の壊死再生モデルの作製と AQP1 過剰発現実験

1. 正常マウスをネンプタルで麻酔し、塩酸プビバカインを両側大腿四頭筋に注入し、壊死させる。
2. 1 の処置に続き、ほぼ同時に E で作製した AQP1 遺伝子を組み込んだアデノウイルスを 1 側の大腿四頭筋に、そして対照として対側の大腿四頭筋に、AQP1 遺伝子を組み込んでいないアデノウイルスをそれぞれの大腿四頭筋の骨格筋壊死部位に注入する。
3. 骨格筋は壊死に続き速やかに再生が始まり、数日後には myotube (筋管) が形成され、それらが筋線維にまで分化する。また毛細血管も速やかに増殖する。さらにこの部に AQP1 遺伝子を組み込んだアデノウイルスを感染させると、1 日後には細胞膜に AQP1 蛋白が発現すると予想される。従って 1、2 の処置後 3 日目に、操作部位を含む骨格筋を対照群も含め切除した。
4. RNA レベルでの検討

対象となる筋組織片の total RNA を抽出し、AQP1 mRNA と house keeping gene として G3PDH mRNA の real time RT-PCR を行い、AQP1 過剰発現筋組織群と対照筋組織群の AQP1 mRNA のコピー数を比較検討した。

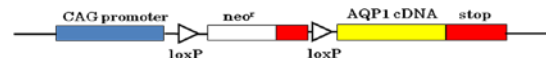
5. 蛋白レベル (組織学的) 検討

アデノウイルスに組み込んだ AQP1 遺伝子では C 端に組み込まれた V5tag 遺伝子の蛋白が発現するが、本来組織細胞にある AQP1 分子では発現していないので、この V5tag 蛋白に対する抗 V5tag 抗体で染色すると、アデノウイルスに組み込んだ AQP1 遺伝子の蛋白産物が発現しているかどうか明らかとなる。従って、AQP1 過剰発現が予想される部位の組織切片を抗 V5tag 抗体で染色した。アデノウイルスに組み込んだ AQP1 の過剰発現部位のマウス大腿四頭筋を組織学的に詳細に検討し、対照処置群のものと比較検討した。

G. Dystrophin の欠損する mdx マウスでも正常マウスと同様に筋の壊死再生組織を作り、AQP1 遺伝子を組み込んだアデノウイルスと AQP1 遺伝子を持たないアデノウイルスを感染させ、AQP1 過剰発現筋組織片と対照筋組織片をアデノウイルス感染後 3 日目に上記 F1、2 と同様に作製する。そしてこれら筋組織片について、正常マウスのものと同じく F3、4、5 の操作を加えて検討した。

②AQP1 過剰発現 Tg マウス作製実験

AQP1 の機能解析のため、組織時期特異的に AQP1 を発現させるトランスジェニックマウスの作製を試みた。CAG プロモーターの下流に loxP-neor-loxP (LNL) のストッパー、AQP1cDNA、ポリ A シグナル配列を繋げた AQP1 の発現系 (LNL-AQP1) を作製した。この DNA 断片を C57BL/6 マウスの受精卵の前核に注入して申請者ら⁹⁾の方法で Tg マウスの作製を行った。



4. 研究成果

(1) アデノウイルスベクターによる血管内皮 AQP1 発現促進実験

①RNA レベルの結果

マウス後肢プビバカイン壊死再生部位に AQP1 cDNA を組み込んだアデノウイルスベクターと空のベクターをそれぞれ注入した組織片の AQP1 mRNA の検討結果は以下のようであった。

正常マウス

AQP1 (-) 群	AQP1 (+) 群
0.385761	0.223593
0.256443	0.237117
0.2182	0.425815
0.474966	0.290796
0.582188	0.195321
0.219089	0.226888
	0.295623
	0.510277

t 検定 0.4

AQP1 (+) 群 n=8
 平均値 0.30
 標準偏差 0.11
 SE 0.04

AQP1 (-) 群 n=6
 平均値 0.36
 標準偏差 0.15

SE

0.06

mdx マウス

AQP1 (-) 群	AQP1 (+) 群
0.135238	0.212406
0.130219	0.113048
0.194419	0.180263
0.235065	0.094934
0.079389	0.08007
0.122852	0.225451
0.106089	0.231864
0.157882	0.34884
	0.190268

t 検定 0.2

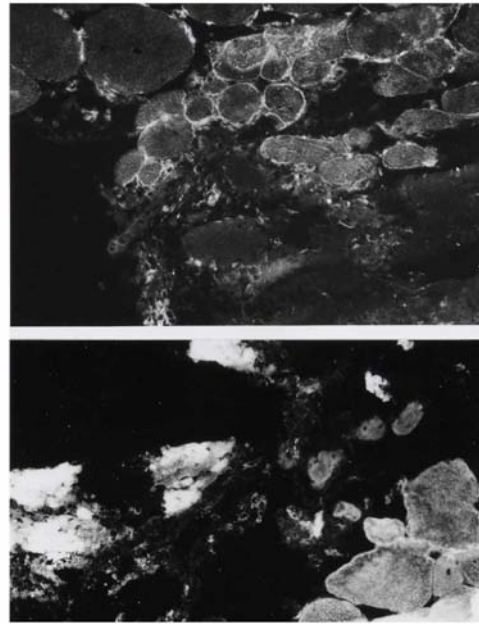
AQP1 (+) 群 n=9
 平均値 0.19
 標準偏差 0.08
 SE 0.03

AQP1 (-) 群 n=8
 平均値 0.15
 標準偏差 0.05
 SE 0.02

以上より、採取組織片から total RNA を抽出し、real-time RT-PCR 法にて AQP1 mRNA レベルを測定した結果は、正常マウスでは (1) AQP1 cDNA を組み込んだベクターを投与した群 8 匹と (2) 空のベクターを投与した群 6 匹で mean±SE がそれぞれ 0.30±0.04、0.36±0.06 で有意差なし (P>0.1)。mdx マウスでは (1)、(2) のベクターを投与した群がそれぞれ 9 匹、8 匹で mean±SE がそれぞれ 0.19±0.03、0.15±0.02 で、AQP1 遺伝子を組み込んだベクターを投与した方が AQP1 mRNA はやや多い傾向がみられたが統計的に有意ではなかった (0.2<P<0.3)。

②蛋白レベル (免疫組織化学) の結果

正常マウス骨格筋・mdx マウス骨格筋とも壊死 3 日後の AQP1 アデノウイルスベクターを注入した再生筋組織には V5tag 陽性血管内皮の増殖は明らかではなかった。



図上・下とも正常対照マウス大腿四頭筋へのブピバカイン注射時に AQP1cDNA を組み込んだアデノウイルスを注射し 3 日後の摘出筋組織である。図上・下はそれぞれ抗 AQP1 抗体抗 V5tag 抗体での間接蛍光抗体法による染色標本である。図上の中央部分に AQP1 を発現した再生骨格筋線維群がみられ、その近辺の結合組織には抗 AQP1 抗体染色陽性の血管内皮と考えられる構造物は少ない。図下の中央部分は再生筋組織の間質と思われるが、この部分には抗 V5tag 抗体陽性と考えられる血管内皮細胞と思われる構造物は少ない。この写真の左半側には非特異的に V5tag に染まった変性筋線維が数本存在する。(図上・下とも ×400)

(2) AQP1 過剰発現 Tg マウス作製実験

この Tg マウスはなかなか得ることができなかった。計 13 回のインジェクションを行い 188 匹のマウスを得たが、そのうち 1 匹の雄マウスにトランスジーンが入っていることが分かった。このマウスを C57BL/6 野生型マウスと交配した結果、トランスジーンを持った子孫が得られることが分かった。現在、Cre マウスと交配することで遺伝子の組換えにより AQP1 が発現できるかについて検討している。従ってこの Tg マウスを用いての筋壊死再生実験は、平成 22 年度には Tg マウスの作製に時間がかかり実施する時間が得られなかった。

参考文献

- 1) Hoffman et al. Cell 51:919-928, 1987
- 2) Koenig et al. Cell 53:219-228, 1988
- 3) Wakayama et al. J Neuropathol Exp Neurol

- 35:532-540, 1976
- 4) Wakayama et al. Neurology 29:401-407, 1979
 - 5) Wakayama et al. Neurology 30:740-748, 1980
 - 6) Wakayama et al. J Neurol Sci 55:59-77, 1982
 - 7) Saadoun et al. Nature 434: 786-792, 2005
 - 8) Denker et al. J Biol Chem 263:15634-15642, 1988
 - 9) Wakayama et al. Micron 38: 257-267, 2007

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] (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若山 吉弘 (WAKAYAMA YOSHIHIRO)

昭和大学・医学部・教授

研究者番号：40138467

(2) 研究分担者

荒田 悟 (ARATA SATORU)

昭和大学・遺伝子組換え実験室・准教授

研究者番号：20159502

(3) 連携研究者

自見 隆弘 (JIMI TAKAHIRO)

昭和大学・医学部・兼任講師

研究者番号：30196654

井上 昌彦 (INOUE MASAHIKO)

昭和大学・医学部・兼任講師

研究者番号：50286770

澁谷 誠二 (SHIBUYA SELJI)

昭和大学・医学部・兼任講師

研究者番号：80167444