

平成22年 5月12日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20700361  
 研究課題名 (和文) 生体におけるシグナル活性 in vivo イメージングマウスライブラリの樹立と応用  
 研究課題名 (英文) Establishment and application of the library for in vivo imaging in living mice.

研究代表者 築山 忠維 (TSUKIYAMA TADASUKE)  
 北海道大学・大学院医学研究科・助教  
 研究者番号：20399819

研究成果の概要 (和文)：我々はガン、免疫異常、炎症などの多くの疾患に重要な役割を果たしていると考えられる NF- $\kappa$ B シグナルに注目し、そのシグナル活性を検出するためのシステム、改良型 NF- $\kappa$ B レポーターシステム (NAT システム) を構築し、さらにそのレポータートランスジェニックマウスを作製した。また同様の手法でがんや発生、さらには神経形成にも重要な働きを Notch シグナルに対してもレポーターシステムとそのトランスジェニックマウスを作製し (cNotch mouse)、現在解析中である。

研究成果の概要 (英文)： We have established and reported for cNAT system, which can detect the activity of NF- $\kappa$ B signaling. Next, we generated cNAT reporter transgenic mice and cNotch reporter system/transgenic mice to detect NF- $\kappa$ B signaling and Notch signaling respectively, in living mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：動物実験技術

## 1. 研究開始当初の背景

全ての生物において、受精から形態形成に至るまでの発生過程から、個体としての成熟後の恒常性の維持、そして死に至るまで、様々なシグナル伝達によってコントロールされているといっても過言ではない。そしてこのシグナル伝達に異常が発生すると、発生初期に起こった場合は胚性致死や奇形個体

の発生が引き起こされる。また成熟後の恒常性維持の時期に異常が発生すると、例えば免疫系の異常が引き起こされ自己免疫疾患や白血病を発症し、細胞増殖シグナルに異常が起こった場合は多くの臓器でがんが引き起こされる。その結果、個体としての恒常性が破壊され、生物は死に至る。これらのことから、シグナル伝達システムの厳密な制御は、

生物の生命を維持することに決定的に重要であるといえる。そこで現在に至るまで、知られているほぼ全てのシグナル経路と疾病の関係を対象とする、膨大な研究がなされてきた。その大部分の研究は培養細胞における細胞生物学的研究に基づくものであり、個体レベルの研究は最近ようやくシグナル経路に関する遺伝子改変マウスの研究によって蓄積されつつある。しかしマウス個体レベルでの研究においても、遺伝子改変によって引き起こされた表現系とシグナル経路の活性変化の相関を検討する際に、犠牲化した個体から得られたサンプルを実験に使用しなければならないため、シグナルの活性変化と病態や表現系の変化を経時的に追跡することは不可能であった。

そこで申請者はこれまでに、生体内でのシグナル活性検出を目的とし、発生期の形態形成に加え、乳がん、大腸がんにも深く関わる事が知られているWntシグナルの活性を効果的に検出する事のできるBAT-LacZマウスを作製、報告した。その結果、発生中の胎児において特異性の高い強いシグナルを得ることが可能となり【Development. 132(24):5425 (2005)】、国内外の共同研究者に配布してきた。しかしこのBAT-LacZマウスにも、成体における非特異性など、いくつかの問題が見出された。そこで申請者はこの問題を解決するために、生体内でのシグナル活性を蛍光・発光によりイメージング・観察するためのシステム構築を目指し、まず初めに炎症やがん化に重要な役割を果たしていることが知られているNF- $\kappa$ Bシグナルの活性を、EGFPとルシフェラーゼで同時かつ効率的に検出することができるシステム (NAT system) を構築し、報告した【Immunol. Lett. 109:175 (2007)】。

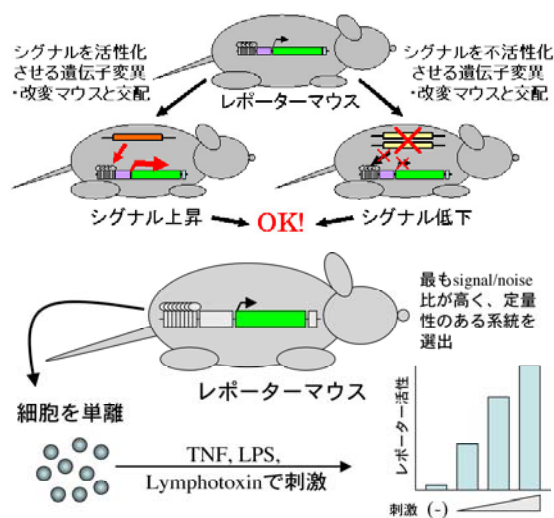
## 2. 研究の目的

本研究では、生命現象に関わるシグナル伝達の活性変化を、実験対象動物を犠牲化することなく即時・経時的に検出する手法の確立と蓄積を目的とした。培養細胞レベルの実験においては、シグナルの活性を定量化できる少数のレポーターシステムは存在するものの、個体レベルまで応用できる定量的なシグナルの *in vivo* イメージングシステムは、ほとんど存在していないのが現状である。シグナル伝達に関する研究を行う際にこのシステムが確立された場合、例えば形態形成の進行にともなうシグナルの活性変化や、疾患モデルマウスにおける疾患の発症から進行時における変化を蛍光、発光により、複数の異なる個体間の比較ではなく1個体内で追跡することができるようになるため、より正確でハイスループットなデータの取得が可能となる。また、現在までに作製されてきた遺伝

子改変動物の解析のみに限らず、これからの遺伝子改変動物の作製計画時に、事前に個体内でのシグナル解析手段の存在が周知であれば、それぞれの研究者の対象としているシグナルをより特異的に観察できるような遺伝子改変のデザインが可能となることが期待できる。これら様々なシグナルに対するレポーターマウスの作製、検定を蓄積することは、様々な疾患や遺伝子改変マウスの解析において強力なツールとなることが予想される。さらにこのライブラリを希望する共同研究者に公開し、分与・供給していく事で個体レベルでのシグナル研究、疾患モデルにおける病態の分子レベルでの追跡、ドラッグスクリーニングなど、医学生物学研究において幅広く応用できる事が期待される。

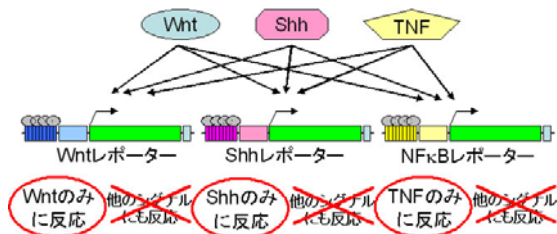
## 3. 研究の方法

- (1) これまでに作製したシグナル活性測定のためのマウスが、定量的にシグナル



活性の検出をできるかの検定を行う。以下の図に個体での機能確認法を示す。

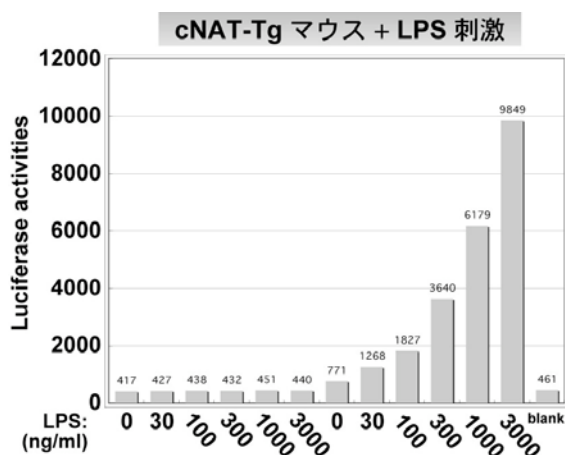
- (2) 現在までに作製済みである Wnt、NF- $\kappa$ B シグナル以外にも、発生・形態形成だけでなくがん、特に白血病においても重要であると考えられている Notch シグナルや、がん抑制機能とともにがんの転移にも関係すると考えられている non-canonical Wnt シグナル、消化器系のがんと関連している Shh シグナル等に対するレポーターシステムの開発と、そのレポーターマウスの作製を行う。
- (3) 新規作製した各シグナル活性検出用のレポーターに対しても、細胞レベルでの評価・検討を行う。この評価は、既に報告した NF- $\kappa$ B シグナルレポーターシステムで用いた手法【Immunol. Lett. 109:175 (2007)】を踏襲して行う (下に図示)。



さらに各レポーター遺伝子をマウス前核内へ顕微注入する事で、レポータートランスジェニックマウスの作製を行い、個体レベルでのシグナル活性の可視化(シグナル活性の *in vivo* イメージング) マウスライブラリの拡充を目指す。

#### 4. 研究成果

- (1) 生体内での NF-κB シグナルの活性の検出を目指し、以前に報告した NF-κB シグナルの活性を EGFP とルシフェラーゼで同時かつ効率的に検出することができるシステム (NAT system) 【Immunol. Lett. 109:175 (2007)】 のトランスジェニックマウスを作製した。その結果、15 系統の cNAT トランスジェニックマウスが得られたので、これらのトランスジェニックマウスについて、



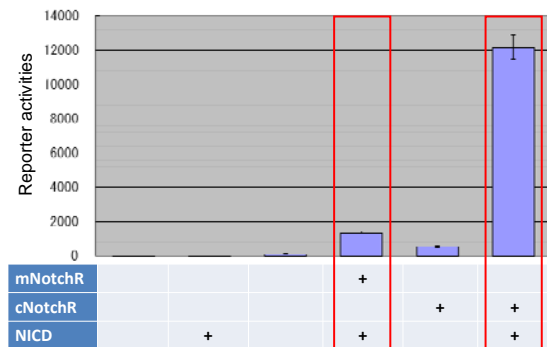
その NF-κB シグナルの活性の検出能力の検討を行った。手法としては、正常マウスと cNAT トランスジェニックマウスの脾臓細胞を LPS 刺激後、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、15 系統中の 1 系統のみにおいて NF-κB シグナルの活性を検出することに成功した (下図にその活性検出能を示す)。また、LPS の濃度依存的に検出シグナルの上昇が認められたことから、このシステムを NF-κB シグナルの活性の生体内におけるレポーターマウスとした。現在、この cNAT レポータートランスジェニックマウスと、我々が新規に同定した NF-κB シグナル抑制因子である Ymer の遺伝子改変マウスと交配することで、Ymer の NF-κB シグナル抑制機能に対

してアプローチを開始している。

- (2) 現在までに確立し、その応用によって様々な現象の解明に寄与して来た Wnt シグナルを検出する BAT システム 【Development 132:5425 (2005); Development 136:367 (2009)】、NF-κB シグナルの活性を検出することができる cNAT システムに加えて、発生・形態形成だけでなくがん、特に白血病においても重要であると考えられている Notch シグナルを生体内で検出するためのシステム、Notch システムの構築を行った。その構築は BAT, NAT システムを踏襲して行った (下図)。



Hes5 のミニマルプロモーターがマウスとニワトリ由来の配列でその検出感度に影響を与えるかを検討した結果、ニワトリ由来のミニマルプロモーターを使用した場合において検出感度の上昇が認められた (下図)。そこで我々は、



cNotch システムを生体内における Notch シグナル検出レポーターとした。

- (3) 生体内における Notch シグナル検出をめざし、cNotch トランスジェニックマウスを作製し、5 系統のマウスが得られている。現在はこれらのマウスが Notch シグナルを検出する能力を有しているかを検討中である。Notch シグナルを検出する能力を有する系統が得られた場合、Notch シグナルの異常が報告されている Fbw7 ノックアウトマウスと交配し、その検討を行う予定である。また同様の手法を用いて、Shh シグナルを検出するためのシステム構築を行っている。

#### 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 4 件)

1. Kikuchi M, Okumura F, Tsukiyama T, Watanabe M, Miyajima N, Tanaka J, Imamura M, Hatakeyama S., TRIM24 mediates ligand-dependent activation of androgen receptor and is repressed by a bromodomain-containing protein, BRD7, in prostate cancer cells., *Biochim Biophys Acta.* (査読有) 2009 Dec;1793(12):1828-36.
2. Watanabe M, Tsukiyama T, Hatakeyama S., TRIM31 interacts with p52(Shc) and inhibits Src-induced anchorage-independent growth., *Biochem Biophys Res Commun.* (査読有) 2009 Oct 16;388(2):422-7.
3. Maeda H, Miyajima N, Kano S, Tsukiyama T, Okumura F, Fukuda S, Hatakeyama S., Ubiquitin-conjugating enzyme UBE2Q2 suppresses cell proliferation and is down-regulated in recurrent head and neck cancer., *Mol Cancer Res.* (査読有) 2009 Sep;7(9):1553-62.
4. Goss AM, Tian Y, Tsukiyama T, Cohen ED, Zhou D, Lu MM, Yamaguchi TP, Morrisey EE., Wnt2/2b and beta-catenin signaling are necessary and sufficient to specify lung progenitors in the foregut. *Developmental Cell.*, (査読有) 2009 Aug;17(2):290-8.

[学会発表] (計2件)

1. 築山忠維・坊垣幸・畠山鎮次、NF- $\kappa$ Bシグナルを抑制するYmerトランスジェニックマウスの解析、平成21年度・特定領域研究「タンパク質分解」班会議、2009年12月21日、滋賀・長浜ロイヤルホテル
2. 築山忠維・坊垣幸・畠山鎮次、NF- $\kappa$ B抑制分子Ymerトランスジェニックマウスの解析、日本分子生物学会・第32回年会、2009年12月11日、横浜・パシフィコ横浜

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

築山 忠維 (TSUKIYAMA TADASUKE)  
北海道大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号：20399819

### (2) 研究分担者

( )

なし

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

なし

研究者番号：