

平成 22 年 4 月 26 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 年度～2009 年度
 課題番号：20790064
 研究課題名 (和文) ROB04 プロモーターの転写制御機構の解明とウイルスベクターへの応用
 研究課題名 (英文) The mechanism for endothelial cell-specific gene expression through the Robo4 promoter.
 研究代表者
 岡田 欣晃 (OKADA YOSHIKI)
 大阪大学・大学院薬学研究科・助教
 研究者番号：50444500

研究成果の概要 (和文)：血管内皮細胞特異的に Robo4 遺伝子が発現するメカニズムを解明するため、ROB04 プロモーター中に存在する転写制御配列の機能をトランスジェニックマウスを用いて解析した。その結果、上流、下流の転写制御配列 (REn, ETS) は両者ともプロモーターの活性化に寄与し、血管内皮細胞特異性は転写開始点上流 300bp の配列で生み出されていることが明らかとなった。また、ROB04 プロモーターを用いて作製したアデノウイルスを用いた検討から、ROB04 プロモーターはアデノウイルス中においても血管内皮細胞特異性を保っていることが明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：To investigate the mechanism for endothelial cell-specific gene expression, the function of regulatory elements in the ROBO4 promoter were analyzed using transgenic mice. The results indicated that both regulatory elements (REn and ETS) in the upstream and proximal promoter region were contributed to the promoter activity, and that 300bp proximal promoter region was responsible for endothelial cell-specific gene expression. In addition, the study on adenovirus vector containing ROBO4 promoter-luciferase sequence demonstrated that the ROBO4 promoter maintained endothelial cell -specificity in adenovirus.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：遺伝子発現制御, 血管内皮細胞, Robo4 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

血管内皮細胞は、血管の内腔を単層で覆う細胞である。全ての血管内皮細胞は隣り合い、一つのチューブを形成しているため性質が同じであると考えられていたが、近年、血管内皮細胞のヘテロジェネイティ（不均一性）が提唱されている。この考えは、「臓器、動脈・静脈、血管のサイズ等が異なれば、そこに存在する血管内皮細胞の性質は異なる」というものである。この性質の違いは、血圧、血流、サイトカインや一酸化窒素などが、血管内皮細胞にシグナルを伝え、遺伝子の発現量を変化させることによりもたらされると考えられる。これまで、これらのシグナルの下流に存在する遺伝子発現制御機構について精力的に研究が行われてきたが、未だ血管内皮細胞特異的に、また各臓器特異的に遺伝子を発現させるメカニズムは明らかになっていない。

2002年にクローニングされた Roundabout4 (ROBO4)は、血管内皮細胞に特異的に発現し、ガンや胎児の新生血管に強く発現することが示唆されていた。そこで著者は、ROBO4の発現調節機構の解析をすることで、血管内皮細胞特異性、及び臓器特異性を生み出すメカニズムを解明できるのではないかと考え、そのプロモーター領域の *in vivo* における解析を開始しようと考えた。

2. 研究の目的

(1) Robo4 の発現を調節する 3kb のプロモーター配列中に存在する転写制御領域が Robo4 の血管内皮細胞特異的な発現にどのように寄与しているかを *in vivo* で検討する。

(2) ROBO4 プロモーターを持つアデノウイルスをマウスに感染させ、外来の遺伝子を血管内皮細胞特異的に発現させることができるかを検討する。

3. 研究の方法

(1) これまでに同定した転写制御領域が、血管内皮細胞特異的な遺伝子発現に寄与するかを解析した。具体的には、上流を大きく欠失させた 300bp のプロモーター配列、ETS 配列に変異を導入したプロモーターに LacZ 遺伝子を連結した配列を持つトランスジェニックマウスを作製し、LacZ の発現パターンを解析した。

(2) Robo4 プロモーターに luciferase 遺伝子を連結した配列を持つアデノウイルスを作製し、これをヒトアデノウイルスレセプターを持つトランスジェニックマウスに感染させ、luciferase 遺伝子の発現組織を解析した。

4. 研究成果

(1) Robo4 プロモーター中の ETS サイトが *in vivo* においても Robo4 の発現制御に重要であるかを確認するため、プロモーターの ETS サイトに変異を加え、これに LacZ 遺伝子を連結した。次に、このトランスジーン 1 コピーを相同組換え法を用いて、マウス ES 細胞の Hprt 遺伝子座上流に挿入し、得られた ES 細胞を用いてトランスジェニックマウスを作製した。このマウスと、以前に作製した天然型 Robo4 プロモーターを持つマウスにおける LacZ の発現を比較したところ、天然型の Robo4 プロモーターを持つマウスでは、全ての臓器において血管内皮細胞特異的に LacZ が発現しているのに対し、ETS サイトに変異を持つマウスでは、LacZ の発現が大幅に減少していることが明らかとなった (図 1)。

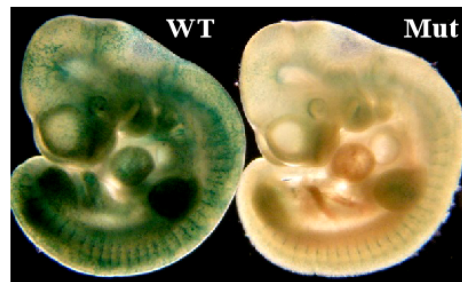
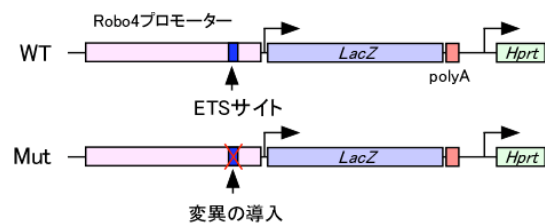


図 1. 天然型及び変異型プロモーターを持つマウスにおける LacZ 遺伝子の発現

さらに、マウス Robo4 遺伝子を LacZ に置換したノックインマウスと、このマウスの ETS サイトに変異を加えたマウスを用いた同様の実験においても、ETS サイトへの変異導入により血管内皮細胞特異的な LacZ 発現が大きく減少した。これら 2 種のトランスジェニックマウスを用いた結果から、Robo4 プロモーター中の ETS サイトは、*in vivo* においても転写活性に重要な配列であることが明らかとなった。

次に、2つのエンハンサー領域 REn1, REn2 が、血管内皮細胞特異性に寄与しているかどうかを評価するため、これらのエンハンサー領域を含まない 300bp の Robo4 プロモーターに LacZ 遺伝子を連結させた配列を持つマウス (Del) を作製し、解析を行った (図 2)。その結果、Del マウスでは LacZ 遺伝子の発現量は減少するものの、その発現は血管内皮細胞特異的であったことから、REn1,2 は血管内

皮細胞特異性を担う配列でないことが明らかとなった。以上全ての解析から、Robo4 プロモーターは、転写開始点上流 300bp の配列で血管内皮細胞特異性を生み出していることが明らかとなった。

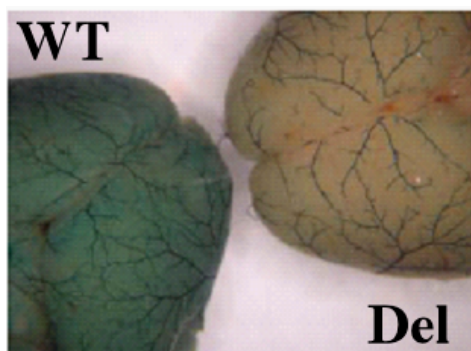


図2. 300bp の Robo4 プロモーターは *in vivo* で血管内皮細胞特異性を保っている。

(2) Robo4 プロモーターを持つアデノウイルスを用い、*in vivo* で外来遺伝子を血管内皮細胞特異的に発現させられるかどうかの検討を行った。3kb の Robo4 プロモーターの下流に luciferase 遺伝子を連結した配列を持つアデノウイルスを作製し、これをヒトアデノウイルスレセプター-hCAR を発現するトランスジェニックマウスに感染させ、luciferase 遺伝子の臓器分布と発現組織についての解析を行った。その結果、luciferase 遺伝子は、肺の血管内皮細胞に強く発現することが確認された。また、通常の遺伝子治療により問題となる、肝臓における遺伝子の過剰発現がみられなかったことから、Robo4 プロモーターは *in vivo* において血管内皮細胞特異的に遺伝子を発現させるためのツールとして用いることができることが証明された。

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 8 件)

- ① 岡田欣晃、土井健史、*in vitro* と *in vivo* で異なるレポータージーンアッセイの結果、*生産と技術*、査読無、62 巻、2010、51-56
- ② E.Jin, J.Liu, J.Suehiro, L.Yaun, Y.Okada, V.Nikolova-Krstevski, K.Yano, L.Janes, D.Beeler, K.C.Spokes, D.Li, E.Regan, S.C.Shih, P.Oettgen, T.Minami, W.C.Aird, Differential roles for ETS, CREB and EGR binding sites in mediating VEGF receptor 1 expression *in vivo*, *Blood*, 査読有, Vol.114, 2009, 5557-5566
- ③ J. Liu, Y. Kanki, Y. Okada, E. Jin, K. Yano,

S.-C. Shih, T. Minami, W. C. Aird, A +220 GATA motif mediates basal but not endotoxin-repressible expression of the von Willebrand factor promoter in Hprt-targeted transgenic mice, *J. Thromb.Haemost.*, 査読有, Vol.7, 2009, 1384-1392

- ④ K.H.Baek, A.Zaslavsky, R.C.Lynch, C.Britt, Y.Okada, R.J.Siarey, M.W.Lensch, I.H.Park, S.S.Yoon, T.Minami, J.R.Korenberg, J.Folkman, G.Q.Daley, W.C.Aird, Z.Galdzicki, S.Ryeom, Down's syndrome suppression of tumour growth and the role of the calcineurin inhibitor DSCR1, *Nature*, 査読有, Vol.459, 2009, 1126-1130
- ⑤ 岡田欣晃、土井健史、血管内皮細胞の遺伝子発現制御研究からみた *in vivo* プロモーター解析の重要性、*生化学*、査読無、81 巻、2009、117-121
- ⑥ K.Yano, Y.Okada, G.Beldi, S.C.Shih, N.Bodyak, H.Okada, P.M.Kang, W.Luscinskas, S.C.Robson, P.Carmeliet, S.A.Karumanchi, W.C.Aird, Elevated levels of placental growth factor represent an adaptive host response in sepsis, *J Exp Med.*, 査読有, Vol.205, 2008, 2623-2631
- ⑦ Y.Okada, E.Jin, V.Nikolova-Krstevski, K.Yano, J.Liu, D.Beeler, K.Spokes, M.Kitayama, N.Funahashi, T.Do, L.Janes, T.Minami, P.Oettgen, W.C. Aird, A GABP-binding element in the Robo4 promoter is necessary for endothelial expression *in vivo*, *Blood*, 査読有, Vol.112, 2008, 2336-2339
- ⑧ M.Yoshikawa, Y.Mukai, Y.Okada, Y.Yoshioka, S.Tsunoda, Y.Tsutsumi, N.Okada, W.C. Aird, T.Do, S.Nakagawa, Ligand-independent assembly of purified soluble magic roundabout (Robo4), a tumor-specific endothelial marker, *Protein Expr Purif.*, 査読有, Vol.61, 2008, 78-82

[学会発表] (計 10 件)

- ① 加納義浩、舟橋伸昭、成瀬啓樹、蔣志侠、鈴木綾乃、岡田欣晃、土井健史、ROBO4 の血管内皮細胞特異的発現制御と DNA メチル化の関連性の解析、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 30 日、岡山桃太郎アリーナ(岡山県)
- ② 蔣志侠、鈴木綾乃、舟橋伸昭、加納義浩、成瀬啓樹、岡田欣晃、土井健史、血管内皮細胞特異的に発現するレセプター ROBO4 と SLIT の相互作用解析、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 30 日、岡山桃太郎アリーナ(岡山県)
- ③ 舟橋伸昭、成瀬啓樹、加納義浩、Jiang Zhixia、鈴木綾乃、岡田欣晃、土井健史、Robo4 遺伝子の血管内皮細胞特異的な

発現とDNAメチル化との関連、第8回次世代を担う若手ファーマバイオフォーラム2009、2009年11月14日、名古屋市立大学田辺通キャンパス(愛知県)

- ④ 成瀬啓樹、蔣 志侠、舟橋伸昭、加納義浩、鈴木綾乃、William Aird、岡田欣晃、土井健史、血管内皮細胞に特異的に発現するRobo4遺伝子の新規転写調節配列の同定と解析、第82回日本生化学会大会、2009年10月23日、神戸ポートアイランド(兵庫県)
- ⑤ 岡田欣晃、金恩京、北山美絵、舟橋伸昭、矢野喜一郎、William Aird、土井健史、Robo4 プロモーターに存在するGABP 結合配列のin vivo における重要性、第10回Pharmac-Hematologyシンポジウム、2009年6月20日、日本薬学会長井記念ホール (東京都)
- ⑥ 蔣 志侠、舟橋伸昭、加納義浩、成瀬啓樹、岡田欣晃、土井健史、血管内皮細胞に発現するレセプターROB04のリガンドの同定、日本薬学会 第129年会、2009年3月27日、京都
- ⑦ 加納義浩、舟橋伸昭、成瀬啓樹、蔣 志侠、岡田欣晃、土井健史、血管内皮細胞と非血管内皮細胞におけるROB04プロモーターのメチル化パターンの相違、日本薬学会 第129年会、2009年3月26日、京都
- ⑧ 舟橋伸昭、成瀬啓樹、加納義浩、Zhixia Jiang、岡田欣晃、土井健史、血管内皮細胞と非血管内皮細胞におけるROB04プロモーターのDNAメチル化状態の相違、第81回日本生化学会大会 第31回日本分子生物学会年会合同大会 (BMB2008)、2008年12月11日、神戸
- ⑨ 岡田欣晃、金 恩京、北山美絵、舟橋伸昭、矢野喜一郎、William Aird、土井健史、新規血管内皮細胞マーカーRobo4のin vivo発現制御機構解析、第81回日本生化学会大会 第31回日本分子生物学会年会合同大会 (BMB2008)、2008年12月11日、神戸
- ⑩ Yoshiaki Okada, Nobuaki Funahashi, Yoshihiro Kano, Hiroki Naruse, Zhixia Jiang, Enjing Jin, Kiichiro Yano, William Aird, Takefumi Doi, Difference of the methylation pattern of the Robo4 promoter between endothelial cell and non-endothelial cell, The 6th Korea-Japan Joint Symposium on Vascular Biology and The 16th Annual Meeting of the Japan Vascular Biology and Medicine Organization JOINTMEETING, 2008年12月3-5日, 金沢

[その他]

ホームページ等

<http://www.phs.osaka-u.ac.jp/homepage/b018/>

<http://www.dma.jim.osaka-u.ac.jp/kg-portal/aspi/RX0011D.asp?UNO=15111&page=>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 欣晃 (OKADA YOSHIAKI)

大阪大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号：5 0 4 4 4 5 0 0