

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590501

研究課題名（和文） 血管新生可視化マウスの作成と新規抗腫瘍血管剤評価系の確立

研究課題名（英文） Visualization of angiogenesis in a mouse for evaluation of anti-angiogenesis drugs

研究代表者

井上 博文（Inoue Hirofumi）

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：70321635

研究成果の概要（和文）：血管内皮細胞特異的 LUC2 発現マウスを作製し、腫瘍形成に伴う腫瘍血管新生の可視化を行った。その結果、腫瘍形成とともにルシフェラーゼ活性の増強が経時的に確認され、さらに肺転移部位でのルシフェラーゼ活性亢進も認められた。これによって腫瘍血管発達過程を可視化できるようになった。

研究成果の概要（英文）：We generated mice which expressed Cre in the endothelial cells to visualize tumor angiogenesis. We found that the luciferase activity increased in the tumor-forming region. Moreover, the activity was observed in the metastatic region of the lung. These findings indicate that development of tumor angiogenesis can be visualized by using these mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
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：境界医学、応用薬理学

キーワード：イメージング

1. 研究開始当初の背景

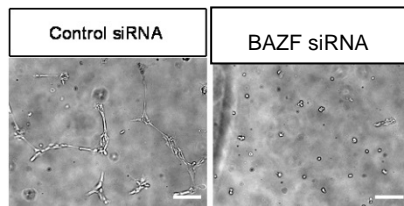
腫瘍血管などの病的血管新生には vascular endothelial growth factor (VEGF) を中心とする内皮の増殖・分化因子により新たな脈管形成が行われている。そのため、

VEGF 制御系を詳細に解析することは腫瘍血管新生などの病的血管形成を理解するにとどまらず、治療標的の探索にも大きく関わってくると考えられている。

我々の研究室では以前より VEGF シグナル

の下流にある Zn フィンガー型転写抑制因子の探索をしていたが、最近その中の因子のひとつである血管内皮特異的 BAZF50 遺伝子が血管内皮細胞への VEGF 刺激にて 2 時間をピークに発現が上昇することを明らかにした。そこで siRNA を導入した HUVEC をマトリゲル上で VEGF 存在下に培養を施行したところ、BAZF ノックダウン細胞ではネットワーク形成が行われなかった (図 1)。血管新生の過程において、tip 細胞といわれる細胞が既存血管より出芽することが必須であることが知られているが、BAZF 遺伝子ノックアウト新生児マウスでは、tip 細胞の出現が有意に減少していることで、網膜血管の発達が障害されていることも見出した。さらに野生型マウス網膜血管での BAZF 発現は、血管新生の盛んな領域に限局的に認められていることも明らかとなった。これによって、BAZF の発現制御が、生体内の血管新生でも重要な役割を果たしていることが明確にできた (Ohnuki et al., *Blood*, 2012)。

また最近新しく得られた知見として、BAZF の発現調整は、VEGF 刺激によって BAZF のメッセンジャーRNA (mRNA) が安定化することが重要で、その安定性の調節には BAZF の 3' 非翻訳領域が重要な役割を果たしていることを明らか



にしてい
る。以上
のことよ
り、BAZF
は血管新生活性の上昇し
図 1 p 細胞の誘
導に必須であり、この転写因子の発現調整には 3' 非翻訳領域 (UTR) が重要であることもわかった。よって BAZF は VEGF 刺激による血管形成に必須の遺伝子であることが明らかとなった (Miwa et al., *J. Ang.*, 2013)。

2. 研究の目的

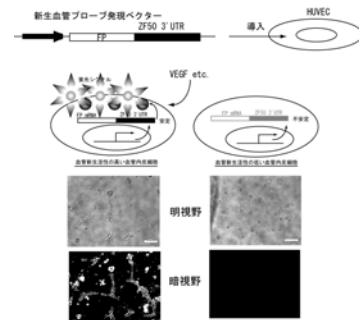
そこで今回、我々が独自に見出したきわめて重要な血管新生関連遺伝子の mRNA 調節機構を利用した蛍光プローブをデザインし、マウス個体において新生血管を可視化することを目指す。さらにこのマウスを用いて抗腫瘍血管剤の効果を判定できる系を確立する。

従来の血管新生解析では、組織切片を作成し血管内皮特異的マーカーで免疫染色した方法が行われている。しかしながら、この方法では血管新生というダイナミックな変化を同一個体サンプルで追跡することが困難である。一方、既存血管と新生血管を染め分けるような方法も現時点では確立しておらず、生体内で血管新生領域を同定することもできない。今回構築するシステムによって、今まで同定困難であった血管新生領域を可視化し、腫瘍血管のダイナミズムを捉える。

3. 研究の方法

① 新生血管プローブに用いる BAZF 3'UTR-LUC 遺伝子作成と血管内皮細胞への導入 (図 2)

BAZF の 3'UTR を下流につなげたルシフェラーゼ遺伝子を蛋白発現ベクター



に挿入し、新生血管プローブ発現ベクターを構築する。

一方、プローブとしてより適したものを作成するために、3'UTR をいくつかの断片にしてルシフェラーゼ遺伝子の下流に挿入し (BAZF 3'UTR-LUC)、VEGF 刺激に対してルシフェラーゼ活性が著明に増強するものを選択する。その結果に基づいて mRNA の

安定性に関わる領域を絞り込み、シグナル・ノイズ比の高いと予想されるプローブ発現ベクターも3-4種類同時に準備する。

デザインしたプローブからのシグナルが血管新生イベントに相関して認められるかを調べるために、HUVECに上記構築した蛍光プローブを一過性に導入し、マトリゲル上でのネットワーク形成およびフィブリングル内での三次元培養を行う。経時的観察し、血管新生と発光シグナルと相関しているプローブをスクリーニングしてゆく。

②血管内皮特異的 LUC 遺伝子発現マウスの作成

発光プローブ遺伝子上流に2つの loxP 配列で挟まれた領域を挿入したトランスジェニックマウスを作製する。血管内皮特異的発現遺伝子 Tie-2 遺伝子プロモーターで制御される Cre 遺伝子発現マウスと交配させて血管内皮特異的発光プローブ発現マウスを作製する。

③血管内皮特異的 LUC 遺伝子発現マウスを用いた腫瘍移植

上記作成したマウスに腫瘍株を移植し、腫瘍進展とともに変化する血管新生活性を発光シグナルで追跡する。さらに VEGF 受容体阻害剤投与による腫瘍血管抑制効果についても評価する。

4. 研究成果

①血管新生活性評価プローブ BAZF 3' UTR-LUC 作成とプローブ機能評価

ルシフェラーゼ遺伝子下流に BAZF 3' UTR を挿入し、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) に導入した。ルシフェラーゼ活性を確認したところ、非常に微弱ながらも確認できたが、VEGF 刺激によるルシフェラーゼ活性上昇は有意ながらも非常に弱いものであった。

そこで、より強いシグナル活性が期待できる

COX-2 遺伝子 3' UTR を用いて同様のことを行ったが、VEGF 刺激によるルシフェラーゼ活性の増強は見られなかった。

現時点では、血管新生関連遺伝子 3' UTR を用いた mRNA 安定化による血管新生可視化は困難であることが明らかとなった。プローブとして有効利用するには、さらなる詳細な mRNA 安定性に関する研究をすすめる必要がある。

②血管内皮特異的 LUC 遺伝子発現マウスの作成

次の戦略として、マウス個体で血管新生活性を可視化するために、血管内皮特異的にルシフェラーゼ (LUC2) 遺伝子を発現させることが有効であるかどうかについて検討した。LUC2 遺伝子上流に2つの loxP 配列で挟まれた領域を挿入したトランスジェニックマウス (Hara-Miyauchi et al., *BBRC*, 2012) を入手し、Tie2-Cre トランスジェニックマウスと交配させ、

血管内皮特異的 LUC2 発現マウスを作製した。このダブルトランスジェニック

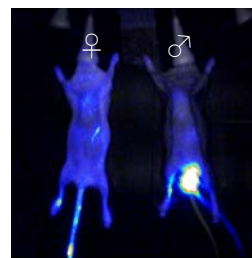


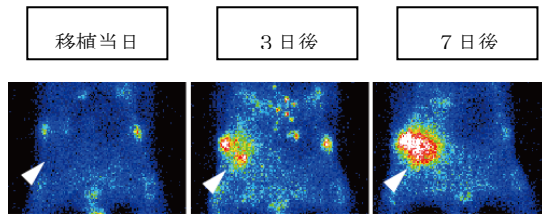
図3

マウスのうち約半数は全身に LUC2 を発現していた。また、血管特異的 LUC2 発現マウスでもオスは全例において睾丸部に非常に強いルシフェラーゼ活性が確認された (図3)。

③血管内皮特異的 LUC 遺伝子発現マウスを用いた腫瘍移植

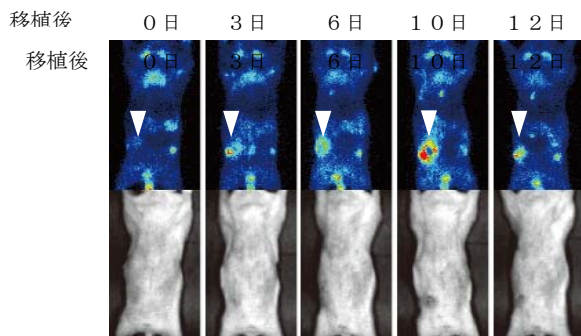
ダブルノックアウトマウスのうち、全身にルシフェラーゼの発現しているものやオスを除いて、血管特異的ルシフェラーゼ発現マウスを選別した。その選別したマウス腹部乳腺近傍にマウス乳癌細胞株 4T1 を移植して、経時的にルシフェラーゼ活性を観察した。その

結果、腫瘍の増大とともにルシフェラーゼ活性が上昇してくることを確認した（図4）。

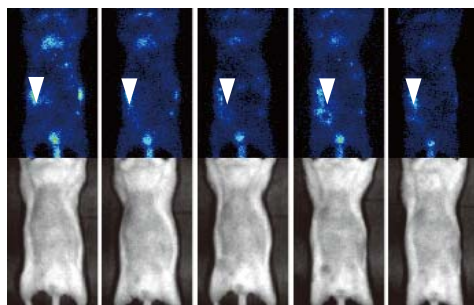


（図4）矢頭は移植部位

これよりルシフェラーゼ活性が腫瘍血管増勢と正の相関関係をとること、つまり腫瘍血管新生活性を示すことが明らかとなった。さらに VEGF 受容体阻害剤スニチニブ（40mg/kg）経口投与による血管新生阻害効果について検討した。移植後すぐにプラセボ投与したマウスは、腫瘍形成とともに移植部位でのルシフェラーゼ活性は経時的に上昇していった（図5）。



（図5）矢頭は移植部位

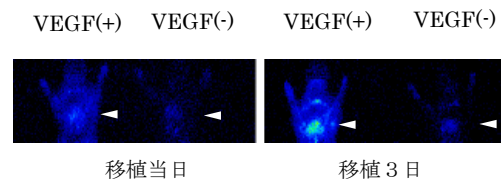


（図6）矢頭は移植部位

一方で、スニチニブ投与マウスでは、腫瘍形成抑制とともにルシフェラーゼ活性の上昇も乏しく、腫瘍血管新生抑制効果が経時的に可視化できることが分かった（図6）。

一方、VEGF 発現における遠隔転移の影響を検

討するために 4T1 細胞に VEGF 強制安定発現株を作製し、このマウスに移植した。通常 4T1 の乳腺移植では、移植後2週間以降から肺への遠隔転移が認められるのだが、VEGF 発現 4T1 では、移植後わずか3日より肺部での血管性生活性が認められ、肉眼的には通常よりも1週間早く肺部への転移が認められた（図7）。従来転移の機序として seed & soil 説がいられているが、今回血管特異的ルシフェラーゼ発現マウスを用いて腫瘍から分泌された VEGF が肺において血管新生活性を上昇させることで転移形成に優位な下地を整えているのではないかと示唆しうるデータが得られた。



（図7）矢頭は胸部

今回、血管内皮特異的ルシフェラーゼ発現マウスを用いて腫瘍血管のダイナミックな変化を可視化することができた。しかしながら、一般的に広く用いられている Tie2-Cre マウスでは、予想外にもその半数が全身に発現するものであり、またオスマウスの全例において睾丸に極めて強い発光シグナルが認められた。そのために腫瘍血管観察に適したマウスを確保するのに時間を要した。効率よく血管特異的に発現させるためには、Tie2-Cre マウス以外の使用を考慮する必要があると思われた。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者連携研究者には下線)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 博文 (Inoue Hirofumi)
愛媛大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：70321635