

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 15 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22791041

研究課題名(和文)新規PDAモデルマウスを用いた発症メカニズム解析と新たな治療法の開発

研究課題名(英文) Analysis of PDA pathogenesis and development of the therapy with novel PDA model mice.

研究代表者

矢嶋 伊知朗 (Yajima, Ichiro)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80469022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により樹立したTyr::Cre; b-catFloxedEx3マウスが、誕生時に動脈管閉鎖不全症(PDA)を発症し、ヒトのPDA疾患と非常に類似した表現型を示すことを明らかにした。本マウスではメラノサイトが異所的に動脈管に局在しており、この心臓メラノサイトがPDA発症に関与していることが示された。メラノサイトの分化、生存、増殖に関するMitf転写調節因子の欠損によって本モデルマウスにおいてメラノサイトを欠失させると、従来インドメタシンによる動脈管閉鎖不全が阻害されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Tyr::Cre; b-catFloxedEx3 mice showed PDA by enhanced activity of b-catenin after birth. In these mice, ectopic melanocytes were localized in the heart and they directly and/or indirectly affect formation of the PDA. Knockout of Mitf, a key molecule for melanocyte development, survival and proliferation, in these model mice inhibited closure of ductus arteriosus by indometacin.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・胎児・新生児医学

キーワード：先天異常学 PDA メラノサイト

### 1. 研究開始当初の背景

動脈管開存症は先天性心疾患の約 10%を占め、頻度の多い先天性心疾患の 1 つである。これまでに Cox-1, 2 や EP4 レセプター (Ep4r) 等の遺伝子の発現を制御する事により、いくつかの動脈管開存モデルマウスが報告されている (Loftin, et al. PNAS, 98, 2001; Segi, et al. BBRC, 246, 1998)。しかし、これら PDA を示すマウスは極めて短命であり、本マウスのように PDA を示しながら数週間から数ヶ月生存できるモデル動物は世界的にも極めて稀である。また、PDA を示すだけでなく、メラニン沈着を示すモデル動物もまた世界的にも極めて稀である。そして、この先天性疾患の分子機構を含めた発生機序は未だに不明の点が多い。また、インドメタシン等による薬物治療は行われているが、全ての症例には適用できず、腎機能障害や出血傾向、低血糖、敗血症などの副作用の問題から少量投与とモニタリングが必須である。外科的結紮術も可能であるが、PDA は未熟児で特に発症しやすいため、患者への負担も増大する。このような背景から、より安全で広範囲の症例に適用できる治療薬の開発は必須である。これまでの PDA モデルマウスは短命であるが故に、治療薬のスクリーニング等への応用が不可能であり、本 PDA モデルマウスのような、生存期間のより長いモデルマウスの作製が待たれている。

### 2. 研究の目的

研究代表者らが開発に携わった Tyrosinase::Cre トランスジェニックマウス (Tyr::Cre) と、Cre 発現下で  $\beta$ -catenin タンパク質を安定化するトランスジェニックマウス ( $\beta$ -cat<sup>FloxedEx3</sup>) の交配により、生後直後に動脈管開存症 (PDA) によって左心房・左心室肥大を呈し、4-18 週程度生存後に死亡するマウス (Tyr::Cre;  $\beta$ -cat<sup>FloxedEx3</sup>) を樹立した。本研究では、ヒト新生児に非常に多い動脈管開存症を生後直後に示し、且つこれまでのモデルマウスに比して長期間生存できる (4-18 週程度生存) Tyr::Cre;  $\beta$ -cat<sup>FloxedEx3</sup> マウスを用いてメラニン産生細胞 (メラノサイト) 及び神経冠細胞が動脈管の開閉に影響を与える作用機序を解明すると共に、 $\beta$ -catenin シグナルをターゲットとした新たな PDA 治療法の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

(1) 新規 PDA モデルマウス (Tyr::Cre;  $\beta$ -cat<sup>FloxedEx3</sup>) における PDA 発症機序を明らかにするため、メラノサイト系譜の細胞で LacZ を発現するマウス (Dct::LacZ) を本 PDA モデルマウスと交配した。メラノサイトを可視化し、動脈管におけるメラノサイトの分布、数、性質等を解析した。

(2) Cre による組換えが起きた細胞系譜をトレースするため、Rosa26R reporter マウス

との交配を行った。

(3) インドメタシンに対する反応性を解析するため、本マウスへのインドメタシン処理を行い、処理後の生存率についての解析を行った。また、Dct-LacZ マウスの交配後に同様の処理を行い、動脈管におけるメラノサイトの分布とインドメタシン処理の効果との関連性についても解析を行った。

(4) メラノサイトの分化・生存・増殖等に深く関与する Mitf 遺伝子の PDF 発症における機能を明らかにするため、本 PDA モデルマウスと Mitf-null マウスとの交配を行った。

### 4. 研究成果

(1) Dct-LacZ マウスと交配実験を行い、解析の際にはメラノサイト系譜の細胞を組織学的に特定するため、抗  $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体、抗 Dct 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。その際には動脈管構成細胞である平滑筋細胞との染め分けを行うために、抗 SMA 抗体を用いた多染染色を行った。抗体染色だけでなく、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性を用いた LacZ 発色を *in vivo* で行い、メラノサイト系譜の細胞を wholemount で可視化した。コントロールマウス (Dct-WT) では動脈管にメラノサイト系譜の細胞は観察されなかったが、モデルマウス (ctnnb1<sup>Dex3</sup>-Dct) では、多くのメラノサイトが動脈管で観察された (図 1)。

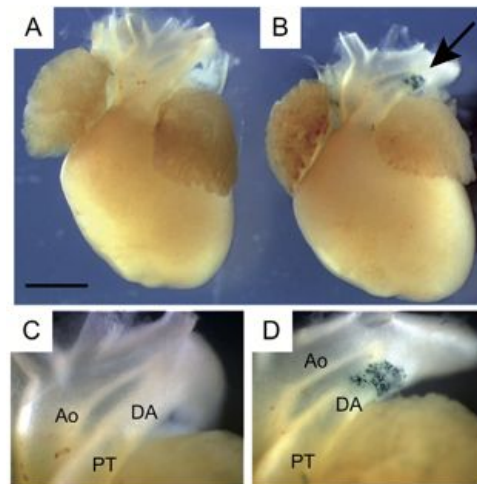


図 1: 動脈管の異所的メラノサイト。コントロールマウス (A, C) ではメラノサイト由来の LacZ 発色は観察されないが、モデルマウス (B, D) では動脈管内にメラノサイト系細胞の発色が観察された (B 矢印)。

動脈管の組織切片を作成したところ、メラノサイト系譜の細胞は動脈管を構成する平滑筋組織内に分布していることが明らかとなった。これらの細胞は平滑筋本来の形質を示す SMA を発現していないことから、メラノサイト細胞に分化した細胞であることが示された (図 2)。

(2) Rosa26R reporter マウスとの交配後、 $\beta$ -catenin シグナルが活性化した細胞を特定するため、Rosa26R reporter マウス由来の

$\beta$ -ガラクトシダーゼ発現領域を抗 $\beta$ -ガラクトシダーゼ抗体を用いて免疫染色することで可視化した。また、それらの細胞が SMA 細胞なのか、メラノサイト系細胞なのかを特定するため、抗 SMA 抗体及び抗 Dct 抗体との

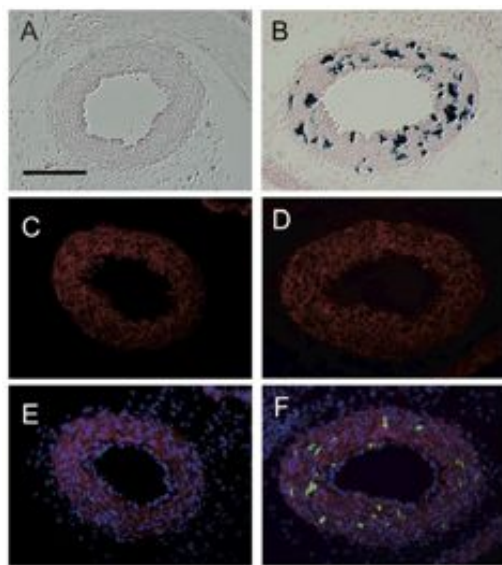


図 2：動脈管における細胞系譜マーカーの発現。コントロールマウス (A, C, E) では、平滑筋細胞マーカーである SMA のみが観察された (C, E red) が、モデルマウス (B, D, F) では、平滑筋由来の SMA とメラノサイト系細胞由来マーカーである LacZ 発現の両方が観察され、且つ、両者の発現は同一の細胞からは観察されなかった (F)。

多重染色を行った。それらによって可視化された細胞数を計測し、PDA モデルマウスでの細胞数の変化を解析した。Cre による組み換えによって引き起こされた  $\beta$ -catenin シグナルの活性化した細胞は、本来の平滑筋細胞マーカーである SMA を発現せず、メラノサイトへと分化していることが明らかとなった (図 3)。また、それぞれの細胞数を計測した結果、PDA モデルマウスでは野生型より SMA 陽性平滑筋細胞数が減少し、その分メラノサイトの数が上昇していることが明らかとなった (図 4)。この結果は、異所的なメラノサイトは本来平滑筋へと分化するはずが、 $\beta$ -catenin シグナルの活性化によってメラノサイトへ異所的に分化したことが明らかとなった。

(3) インドメタシン処理実験においては、インドメタシン未処理の PDA モデルマウス 12 匹と、インドメタシン処理した PDA モデルマウス 29 匹を比較検討した。インドメタシンによる動脈管閉鎖治療は、本 PDA モデルマウスに対して部分的な効果を示した。インドメタシン未処理の PDA モデルマウスは生後 100 日以内に全てが死亡したが、インドメタシン処理後の PDA モデルマウスは生後 250 日で約 2 割のマウスが生存した。インドメタシン処理後の動脈管を組織切片を作成

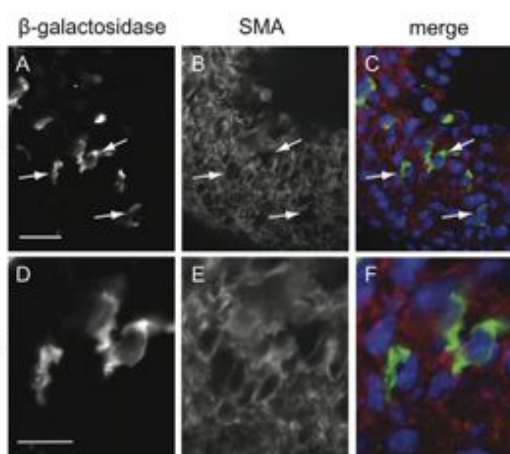


図 3：モデルマウスにおける遺伝子組み換え細胞と SMA 発現。Tyr-Cre によって  $\beta$ -catenin 安定化した細胞は、 $\beta$ -galactosidase が発現 (A, D) する。これらの細胞は SMA (B, E) を発現せず、平滑筋細胞以外の細胞系譜であることが明らかとなった (C, F)。

し、観察したところ、動脈管の閉鎖が観察された。しかし、完全な生存には至らず、インドメタシン単体での治療は十分な効果を挙げられないことが示された。また、PDA モデルマウスと Dct-LacZ マウスを交配し、同様のインドメタシン処理を行った。処理後 wholemount による LacZ 染色を行い、メラノサイト系細胞を可視化した。その結果、メラノサイト系細胞はインドメタシン処理の有無にかかわらず PDA モデルマウスの動脈管内に存在し、その数にも変化は観察されなかった。

(4) PDA モデルマウスではメラノサイト系細胞が異所的に動脈管内に存在しており、この細胞が動脈管の閉鎖を抑制している可能性が示唆された。この可能性を解析するため、PDA モデルマウスでのメラノサイト細胞を欠失させた場合にどのような表現形を呈するのかを解析することにした。この目的のため、PDA モデルマウスと、Mitf-null マウスを交配した。Mitf 遺伝子はメラノサイト系細胞の分化・生存・増殖に対して重要な働きを示す転写調節因子であり、Mitf-null マウスでは全てのメラノサイト系細胞が欠損することが知られている。PDA モデルマウスと Mitf-null マウスを交配することで樹立されるマウスはメラノサイト系細胞が失われるので、本モデルマウスにおける PDA 発症がメラノサイト系細胞の影響によるものかどうかを検証できる。これらの目的のために行った Mitf-null マウスとの交配実験で、Mitf 遺伝子の欠損によりメラノサイト系細胞を動脈管から取り除くことが可能となった。本 PDA モデルマウスと、Mitf-null マウスを交配させたマウス(mi)における PDA 発症による生存率を比較したところ、このマウスにおいても、PDA モデルマウスと同程度に PDA 症状を呈したことから、PDA 発症はメラノサイトの存在による影響よりも、メラノ

サイトの異所的な分化によって平滑筋細胞

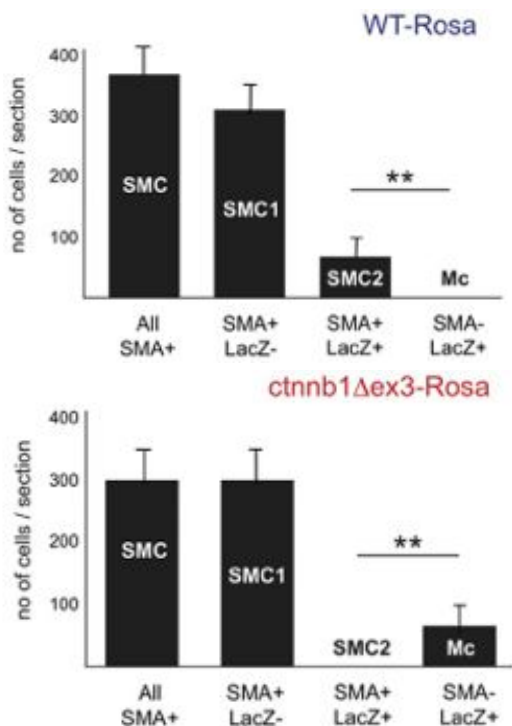


図 4: 動脈管における細胞集団。コントロールマウス(上段)では、Tyr-Cre 陽性平滑筋細胞 (SMC2) が少数存在し、yr-Cre 陽性非平滑筋細胞 (Mc) は存在しない。モデルマウス(下段)では、SMC細胞は観察されないが、Mc細胞がコントロールマウスの SMC2 細胞とほぼ同数出現する。モデルマウスでは Tyr-Cre による recombination により安定化した b-Catenin が、本来 SMA 陽性平滑筋細胞へと分化するはずが SMA 非陽性細胞(メラノサイト)へと異常分化したと考えられる。

の数が減少し、動脈管閉鎖メカニズムに必要な細胞が準備できなかったことが要因である可能性が示唆された(図5)。

本研究において、新たに樹立された PDA モデルマウスの解析により、PDA の発症は異所的な細胞の存在によるものではなく、結果として生じた動脈管内の平滑筋細胞数の減少が動脈管の閉鎖に十分な機能を果たすことができず、発症することが示唆された。また、動脈管を構成する平滑筋細胞はメラノサイト系細胞系譜と同じ細胞起源である neural crest 細胞から分化することが過去の報告から明らかとなっている。これらの知見は、ヒトにおける PDA 発症の原因が動脈管を構成する細胞の異常分化に起因することを強く示唆している。インドメタシンによる PDA 治療は開存した動脈管を強制的に閉鎖することで治療を行っているが、動脈管に閉鎖に十分な平滑筋細胞が揃っていない場合、インドメタシンによる閉鎖が十分に行われない可能性がある。より高率で閉鎖治療を行うためには、平滑筋細胞の増殖を促す治療薬の開発が必要であると考えられる。これら新たな治療薬とインドメタシンの併用を行うこと

により、より効果的な PDA 治療が行うことができると考えられる。

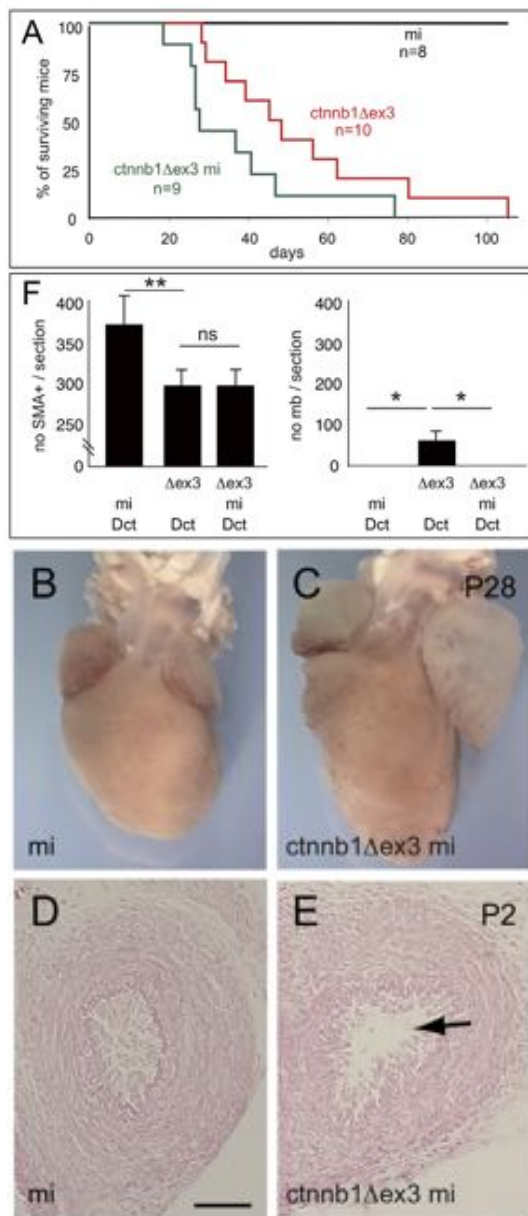


図 5: Mitf-null マウスの交配によるモデルマウス動脈管開存への影響。(A)モデルマウス(赤線)と Mitf-null マウス交配モデルマウス(緑線)では動脈管開存による死亡率に変化は認められなかった。(F)モデルマウス、Mitf-null 交配モデルマウス共に SMA 陽性平滑筋細胞の数に変化はなく、異所的メラノサイトの数のみが劇的に減少した。(B-E) Mitf-null 交配モデルマウスでも動脈管の開存が認められた。

### 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 9 件)

① Yajima I, Colombo S, Puig I, Champeval D, Kumasaka M, Belloir E, Bonaventure J, Mark M, Yamamoto H, Taketo MM, Choquet P, Etchevers HC, Beermann F, Delmas V, Monassier L, Larue L. A subpopulation of

smooth muscle cells, derived from melanocyte-competent precursors, prevents patent ductus arteriosus. PLoS One. 2013;8(1):e53183. 査読あり

② Yajima I, Kumasaka MY, Tamura H, Ohgami N, Kato M. Functional analysis of GNG2 in human malignant melanoma cells. J Dermatol Sci. 2012 Dec;68(3):172-8. 査読あり

③ Yajima I, Kumasaka MY, Naito Y, Yoshikawa T, Takahashi H, Funasaka Y, Suzuki T, Kato M. Reduced GNG2 expression levels in mouse malignant melanomas and human melanoma cell lines. Am J Cancer Res. 2012;2(3):322-9. 査読あり

④ Thang ND, Yajima I, Nakagawa K, Tsuzuki T, Kumasaka MY, Ohgami N, Ly TB, Iwamoto T, Watanabe D, Kato M. A novel hairless mouse model for malignant melanoma. J Dermatol Sci. 2012 Mar;65(3):207-12. 査読あり

⑤ Yajima I, Kumasaka MY, Thang ND, Goto Y, Takeda K, Yamanoshita O, Iida M, Ohgami N, Tamura H, Kawamoto Y, Kato M. RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/P TEN/AKT Signaling in Malignant Melanoma Progression and Therapy. Dermatol Res Pract. 2012;2012:354191. 査読あり

⑥ Yajima I, Kumasaka MY, Thang ND, Goto Y, Takeda K, Iida M, Ohgami N, Tamura H, Yamanoshita O, Kawamoto Y, Furukawa K, Kato M. Molecular Network Associated with MITF in Skin Melanoma Development and Progression. J Skin Cancer. 2011;2011:730170. 査読あり

⑦ Kato M, Iida M, Goto Y, Kondo T, Yajima I. Sunlight exposure-mediated DNA damage in young adults. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2011 Aug;20(8):1622-8. 査読あり

〔学会発表〕(計 1件)

① 矢嶋伊知朗、熊坂真由子、大神信孝、加藤昌志、メラノーマにおける GNG2 の機能、第 24 回 日本色素細胞学会学術大会、2012 年 11 月 24 日、25 日、長浜バイオ大学(長浜市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

矢嶋 伊知朗 (YAJIMA ICHIRO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：80469022

### (2) 研究分担者

なし