

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 8 日現在

機関番号：84404  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23659494  
 研究課題名（和文） 肝星細胞の可視化と発現解析を可能とする Bac-TRAP マウスを用いた血栓症の解析  
 研究課題名（英文） Production and analysis of Adamts13-Bac-TRAP mice that express fluorescent protein EGFP driven by Adamts13 promoter  
  
 研究代表者  
 宮田 敏行 (MIYATA TOSHIYUKI)  
 独立行政法人 国立循環器病研究センター・研究所・部長  
 研究者番号：90183970

研究成果の概要（和文）：私達は、肝星細胞で特異的に発現する ADAMTS13 のプロモーターの下流に、EGFP とリボソームタンパク質 L10a からなる融合タンパク質 cDNA を挿入し、ADAMTS13 発現細胞で EGFP-L10a が発現するマウスを作製した。EGFP-L10a が 8 コピー入っているマウスの肝臓のホモジネートをウエスタンブロットし、融合タンパク質 EGFP-L10a の発現を確認した。このマウスの肝臓切片を抗 GFP 抗体で染色し、類洞壁の星細胞と思われる細胞の染色を観察した。

研究成果の概要（英文）：We developed novel BAC transgenic mice with cDNA encoding a fusion protein of a fluorescent protein EGFP and a ribosomal protein L10a under control of the hepatic stellate cell-specific ADAMTS13 promoter. We detected EGFP-L10a fusion protein in the liver of the transgenic mice using Western blot and further observed fusion protein-expressing cells in sinusoid cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：血栓性血小板減少性紫斑病・ADAMTS13・抗血栓因子・肝星細胞・トランスジェニックマウス・Bac-TRAP

## 1. 研究開始当初の背景

肝星細胞は肝の実質細胞と類洞内皮細胞との間に存在する繊維芽細胞に属する細胞で、類洞の支持と微小循環の調節を果たす。血栓性血小板減少性紫斑病の原因遺伝子である ADAMTS13 は肝星細胞で特異的に発現する抗血栓タンパク質である。活性化した肝星細胞は肝繊維化の責任細胞であり、活性化の抑制は肝繊維化の進展を抑えることが期待される。

申請者は、これまで 10 年以上にわたり、ADAMTS13 研究の黎明期から本因子の研究を

行ってきた。ADAMTS13 は主に肝星細胞で発現する。そこで、この肝星細胞特異的な ADAMTS13 の発現を使い、肝星細胞のみが蛍光標識され、同時に、肝星細胞のトランスクリプトーム解析 (Translating ribosome affinity purification, TRAP) を可能とするマウスの作出を考えた。この目的を達成するため、ロックフェラー大学の Heintz 教授らが各種の細胞が複雑に存在する脳組織を dissect する新規な手法として開発した BAC-TRAP 法 (Cell, 135, 738-748, 2008) を用いることとした。すなわち、蛍光タンパク

質 Green fluorescent protein (GFP) とリボソームタンパク質 L10a との融合タンパク質 (EGFP-L10a) を Bac クローン上の ADAMTS13 遺伝子プロモーターで発現するトランスジェニックマウス (Adamts13-Bac-Trap マウス) を作製する。これにより、肝臓の肝星細胞だけが GFP を発現し、これをモニターすることにより、肝星細胞の動態のイメージングが可能となる。また、このマウスの肝星細胞では、EGFP-L10a という融合タンパク質が発現する。L10a はリボソームの構成タンパク質なので、リボソームは EGFP-L10a を取り込み、その結果リボソームは EGFP で標識される。EGFP 標識リボソームは EGFP 抗体を使って回収可能なので、翻訳中の mRNA を集めトランスクリプトーム解析が可能となる。

## 2. 研究の目的

血栓性血小板減少性紫斑病は ADAMTS13 活性の著減で発症する。ADAMTS13 は肝星細胞で発現する。ADAMTS13 活性の減少は各種の病態で知られているが不明の点が多い。肝星細胞は、肝繊維化の責任細胞として広く知られ、肝星細胞の活性化により肝の繊維化が進展する。本研究では、重要な機能を保持する肝星細胞を EGFP で蛍光標識し、かつ細胞内で翻訳中の mRNA のトランスクリプトーム解析を行うことが可能なシステムの確立を目的とする。このため、蛍光タンパク質 EGFP とリボソームタンパク質 L10a との融合タンパク質を、Bac クローンをを用いた ADAMTS13 遺伝子プロモーターの制御で発現するトランスジェニックマウスを作製する。このマウスは各種の血栓病態時の肝星細胞の解析、並びに肝炎から肝硬変への過程の肝星細胞の動態の解析に有用となる。

## 3. 研究の方法

(1) Adamts13-Bac-TRAP トランスジェニックマウスの作製

① ADAMTS13 遺伝子のプロモーターの下流に蛍光タンパク質 GFP とリボソームタンパク質 L10a の融合タンパク質 EGFP-L10a をコードする cDNA を組み入れた Bac ベクターを構築する。ベクターの構築に必要な Bac 改変用プラスミド DNA (S296, EGFP-L10a, pSV1-RecA) はロックフェラー大学 Heintz 教授から恵受を受けた。129/SvEv マウス由来の Adamts13 遺伝子 (第 2 染色体上に位置する) を持つ Bac クローン bMQ-108g14 は購入した。

② シャトルベクターである S296, EGFP-L10a の EGFP 上流にマウス ADAMTS13 プロモーター領域 (正確には開始 ATG 直前の 552 bp) を挿入し S296, Adamts13-EGFP-L10a を作製した。

③ Bac クローン bMQ-108g14 の上にある Adamts13 遺伝子に、pSV1-RecA を用いて、

S296, Adamts13-EGFP-L10a プラスミドの EGFP-L10a 融合タンパク質コード領域を挿入し、Adamts13-Bac-TRAP を作製した。

④ トランスジェニックマウスの作製は、専門の業者に依頼した。コピー数が多いと ADAMTS13 プロモーターで発現する EGFP-L10a 融合タンパク質が増えて強い蛍光を発するので、多コピーが挿入されたトランスジェニックマウスの作製を目指した。Adamts13-Bac-TRAP DNA は約 500 個の受精卵に移植した。

(2) Adamts13-Bac-TRAP トランスジェニックマウスの解析

Bac-TRAP マウスの肝臓などの組織のホモジネートをウエスタンブロットし、融合タンパク質 EGFP-L10a の発現を調べた。この Bac-TRAP マウスの肝臓切片を抗 GFP 抗体で染色し、類洞壁の星細胞と思われる細胞の GFP の発現を観察した。

## 4. 研究成果

(1) Adamts13-Bac-TRAP トランスジェニックマウスの作製

約 500 個の受精卵に Adamts13-Bac-TRAP DNA をマイクロインジェクションした。F0 で PCR 法を用いて遺伝子が挿入されたことを確認後、F1 マウスを使ってサザン解析を行いコピー数を算定した。その結果、6 ラインの Adamts13-Bac-TRAP トランスジェニックマウスの作製に成功した。これらのマウスに入った EGFP-L10a のコピー数は、1 コピーが 3 ライン、2 コピーが 2 ライン、8 コピーが 1 ラインであった。このマウスを Adamts13-Bac-TRAP マウスと呼ぶこととした。

(2) Adamts13-Bac-TRAP トランスジェニックマウスの解析

EGFP-L10a が 8 コピー入っている Adamts13-Bac-TRAP マウスの肝臓および腎臓のホモジネートをウエスタンブロットし、融合タンパク質 EGFP-L10a の発現を確認した。この Adamts13-Bac-TRAP マウスの肝臓切片を抗 GFP 抗体で染色し、類洞壁の星細胞と思われる細胞の染色を観察した。ADAMTS13 は肝星細胞に加え、腎臓足細胞、糸球体内皮細胞、脳グリア細胞でも発現すると報告されている。そこで、このマウスの脳と腎での EGFP の発現を調べたが、特異的な染色は得られなかった。

本研究により、世界で初めて肝星細胞で EGFP が発現するマウスを作製することに成功した。肝の免疫染色により、類洞壁の星細胞と思われる細胞での GFP の発現が観察された。今後、ここで作製した Adamts13-Bac-TRAP マウスの胎児ホルマウントの EGFP 蛍光観察により、ADAMTS13 産生細胞を特定したい。また、深部組織を観察可能な 2 光子励起共焦点顕微鏡を用いて、肝組織中の星細胞とその

ADAMTS13 発現量の変化を in vivo でライブイメージングする観察系を確立する。また、ポリソーム免疫沈降による翻訳遺伝子プロファイリングを行い、肝星細胞の翻訳遺伝子を網羅的に解析する系を確立したい。

Adamts13-Bac-TRAP マウスは、これまで肝星細胞の関与が示唆されているがその可視化は容易ではなかった病態下での肝星細胞の動態の解析を可能とし、かつトランスクリプトーム解析も可能とする。今後、このマウスを肝星細胞が関わる病態の解析に応用したい。

#### 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 39 件)

- ① Rybaltowski M, Suzuki Y, Mogami H, Chlebinska I, Brzoska T, Tanaka A, Banno F, Miyata T, Urano T: In vivo imaging analysis of the interaction between unusually large von Willebrand factor multimers and platelets on the surface of vascular wall. *Pflugers Arch*, 461, 623-633, 2011. 査読有  
DOI:10.1007/s00424-011-0958-x
- ② Kita T, Banno F, Yanamoto H, Nakajo Y, Iihara K, Miyata T: Large infarct and high mortality by cerebral ischemia in mice carrying the factor V Leiden mutation. *J Thromb Haemost*, 10, 1453-1455, 2012. 査読有  
DOI:10.1111/j.1538-7836.2012.04776.x
- ③ Fujioka M, Nakano T, Hayakawa K, Irie K, Akitake Y, Sakamoto Y, Mishima K, Muroi C, Yonekawa Y, Banno F, Kokame K, Miyata T, Nishio K, Okuchi K, Iwasaki K, Fujiwara M, Siesjö BK: ADAMTS13 gene deletion enhances plasma high-mobility group box1 elevation and neuroinflammation in brain ischemia-reperfusion injury. *Neurol Sci*, 33, 1107-1115, 2012. 査読有  
DOI:10.1007/s10072-011-0913-9
- ④ Doi M, Matsui H, Takeda Y, Saito Y, Takeda M, Matsunari Y, Nishio K, Shima M, Banno F, Akiyama M, Kokame K, Miyata T, Sugimoto M: ADAMTS13 safeguards the myocardium in a mouse model of acute myocardial infarction. *Thromb Haemost*, 108, 1236-1238, 2012. 査読有  
DOI:10.1160/TH12-09-0674
- ⑤ 杉本充彦、土井政明、松井英人、宮田敏行「マウス急性心筋梗塞モデルにおける ADAMTS13 の心筋保護作用」日本血栓止血学会誌、第 23 巻、590-593 頁(2012) 査

読有

[https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjsth/23/6/23\\_590/\\_article/-char/ja/](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjsth/23/6/23_590/_article/-char/ja/)

[学会発表] (計 52 件)

- ① Fumiaki Banno, Toshiyuki Kita, Hiroji Yanamoto, Koichi Kokame, Koji Iihara, Toshiyuki Miyata, Generation of knock-in mice carrying a K196E point mutation in protein S, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28, 2011
- ② Tomasz Brzoska, Mirosław Rybaltowski, Yuko Suzuki, Hideo Mogami, Iwona Chlebinska, Aki Tanaka, Fumiaki Banno, Toshiyuki Miyata, Tetsumei Urano, Imaging analysis of the interaction between unusually large von-Willebrand factor multimers and platelets on vascular endothelial cells in living animals, XXIII Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis, Kyoto, July 23-28, 2011
- ③ 宮田敏行、小亀浩市、秋山正志、武田壮一、坂野史明、シンポジウム 6、ADAMTS13 研究の最先端、血栓止血学・血管生物学の最近の進歩、第 73 回日本血液学会学術集会、2011 年 10 月 14-16 日、名古屋市
- ④ Toshiyuki Miyata, Thrombotic thrombocytopenic purpura and ADAMTS13, 3<sup>rd</sup> SIRIC-NCVC Joint Symposium, November 11, 2011, Seoul, Korea.
- ⑤ 坂野史明、喜多俊行、柳本広二、小亀浩市、宮田敏行、「プロテイン S 徳島 (K196E) 変異がマウスの肺塞栓症および虚血性脳梗塞に及ぼす影響」、第 74 回日本血液学会学術集会、2012 年 10 月 19-21 日、京都市
- ⑥ 宮田敏行、「血栓形成の分子機構」、日本バイオマテリアル学会シンポジウム 2012、シンポジウム：血液適合性バイオマテリアル、2012 年 11 月 27 日、仙台市
- ⑦ Masaaki Doi, Hideto Matsui, Yukiji Takeda, Yoshihiko Saito, Maiko Takeda, Yasunori Matsunari, Kenji Nishio, Midori Shima, Fumiaki Banno, Masashi Akiyama, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Mitsuhiko Sugimoto, Protective role of ADAMTS13 for myocardium in mouse model of experimental myocardial infarction, 54th American Society of Hematology, Annual Meeting and Exposition, December 8-11, 2012, Atlanta, USA

- ⑧ Hideto Matsui, Masaaki Doi, Yasunori Matsunari, Maiko Takeda, Kenji Nishio, Midori Shima, Kenji Soejima, Fumiaki Banno, Masashi Akiyama, Koichi Kokame, Toshiyuki Miyata, Mitsuhiko Sugimoto, ADAMTS13 improving the cell engraftment efficacy in mouse model of bone marrow transplantation, 54th American Society of Hematology, Annual Meeting and Exposition, December 8-11, 2012, Atlanta, USA

〔図書〕（計2件）

宮田敏行、喜多俊行、中外医学社、「VI.凝固線溶系 3.内因系凝固反応と血栓症」Annual Review 血液 2012、高久史磨・小澤敬也・坂田洋一・金倉 讓・小島勢二 編集、2012年、236-244頁

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮田 敏行 (MIYATA TOSHIYUKI)  
独立行政法人国立循環器病研究センター  
研究所・部長  
研究者番号：90183970

### (2) 研究分担者

坂野 史明 (BANNO FUMIAKI)  
独立行政法人国立循環器病研究センター  
研究所・研究員  
研究者番号：00373514