

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：33303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792017

研究課題名(和文) 眼内血管形成における可溶性 VEGF 受容体の役割：個体レベルでの解明

研究課題名(英文) Roles of soluble VEGF receptor on angiogenesis of eye in vivo

研究代表者

池田 崇之 (IKEDA, Takayuki)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：00374942

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：血管新生抑制作用をもつ可溶性Flt-1産生が特異的に抑制されるメカニズムを明らかにした。RNA結合タンパク質であるhnRNP DがFlt-1 pre-mRNAのイントロン13にある制御配列に結合することによって、可溶性Flt-1産生を抑制していることが明らかとなった。レンチウイルスを精巢に打ち、精原細胞に感染させてトランスジェニックマウスを作製する方法では、精原細胞にレンチウイルスが感染できないことから方法として難しいことが明らかとなったことから、従来の方法を用いて作製したトランスジェニックマウスを解析することで、最終的に眼内血管形成における可溶性Flt-1の生体での役割を明らかにする。

研究成果の概要(英文)：Here, we showed the mechanisms for regulating alternative 3'-end processing of soluble Flt-1, a potential antiangiogenic factor. We found that hnRNP D down-regulated soluble Flt-1 expression by binding to the regulatory sequence on intron 13 of Flt-1 pre-mRNA. Furthermore, we carried out the lentiviral mediated transgenesis by in vivo manipulation of spermatogonial stem cell. It was suggested that the method was not effective because lentiviral particle couldn't infect to spermatogonial stem cell. Therefore, we are going to create a transgenic mouse conventionally and show the roles of soluble Flt-1 on angiogenesis of eye in vivo.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：可溶性Flt-1 HMVEC RNA結合タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

血管新生の主要促進因子である VEGF は血管内皮細胞膜に結合した受容体(KDR)を介して血管新生を促進する。VEGF はさらに、もう1つの細胞膜受容体である Flt-1 にも結合するが、Flt-1 を介したシグナルは血管新生に対してあまり積極的に関与していないと考えられている。ところが、Flt-1 は膜型だけでなく、mRNA 選択的 3' 端プロセシングによって細胞外ドメインのみからなる可溶型(可溶型 Flt-1)も産生されており、この可溶型 Flt-1 が KDR 受容体と拮抗的に働くことによって血管新生を抑制する作用があることが知られている。

我々は、血管内皮細胞における可溶型 Flt-1 産生が、低酸素刺激によって選択的 3' 端プロセシングを介して抑制されることを明らかにした(発表論文)。さらに、選択的 3' 端プロセシングを制御する mRNA 前駆体上の制御配列(cis-element)を同定したことから、可溶型 Flt-1 の産生を特異的に抑制することが可能になった。

網膜では放射状の血管ネットワークが形成される一方、角膜、水晶体、硝子体が無血管であることは周知であるが、これまでの研究で、可溶型 Flt-1 が角膜の無血管状態を維持していることが示され、眼形成およびその機能維持における可溶型 Flt-1 の重要性が明らかになってきた。しかしながら、眼内血管形成および病的血管新生における可溶型 Flt-1 の役割はまだよくわかっていない。

## 2. 研究の目的

低酸素による可溶型 Flt-1 産生抑制の分子メカニズムを解明するとともに、レンチウイルスベクターによる受精卵感染法を用いることによって、可溶型 Flt-1 を選択的に過剰発現およびノックダウンしたマウスを作製し、眼内血管形成における可溶型 Flt-1 の役割を *in vivo* で解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1)可溶型 Flt-1 産生制御機構を明らかにするために以下の方法を用いて解析を行った。

### 可溶型 Flt-1 mRNA 安定性の解析

通常酸素濃度と低酸素濃度下で RNA 合成阻害剤であるアクチノマイシン D を含む培地でヒト微小血管内皮細胞(HMVEC)を6時間培養する。RNA を単離し、Flt-1 mRNA 量を qPCR で定量した。

### DNA マイクロアレイ解析

通常酸素濃度と低酸素濃度下で培養した HMVEC 細胞から RNA を単離し、Affymetrix DNA microarray により発現変動を解析した。

レンチウイルスを用いたタンパク質過剰発現およびノックダウン

HMVEC 細胞に効率的に遺伝子を導入するため、SBI 社のレンチウイルス過剰発現系(pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP vector)および shRNA ノックダウン系(pSIH-H1-copGFP

vector)を用いた。目的の遺伝子を HMVEC cDNA からクローニングし pCDH ベクターに挿入して過剰発現ベクターとした。目的の遺伝子に結合する shRNA を設計し、pSIH に挿入してノックダウンベクターとした。

RNA immunoprecipitation 法によるタンパク質-PNA 相互作用の解析

通常酸素濃度と低酸素濃度下で培養した HMVEC 細胞から核タンパク質を抽出し、抗 hnRNP D 抗体(CST)を用いた免疫沈降法により hnRNP D タンパク質を濃縮した。hnRNP D に結合している RNA を精製し、共沈してきた Flt-1 pre-mRNA 量を qPCR を用いて定量した。

### リン酸化 hnRNP D の解析

通常酸素濃度と低酸素濃度下で培養した HMVEC 細胞からタンパク質を抽出し、リン酸化タンパク質をゲル中で検出できる Phos-Tag(Wako)と抗リン酸化 hnRNP D 抗体(Sigma)を用いてリン酸化を解析した。

### 部位特異的突然変異誘発

hnRNP D のメチル化部位であるアルギニンをアラニン、ヒスチジン、リジンに変異させた発現ベクターを作製した。変異 hnRNP D と Flt-1 minigene を HMVEC 細胞に導入し、minigene の可溶型と膜型の割合を解析した。

(2)レンチウイルスを用いたトランスジェニックマウスの作製

Sehgal ら(PLoS ONE 6(7):e21975)の方法によりレンチウイルスをマウスの精巣に感染させた。正常マウスと交配させ生まれてきたマウスがトランスジェニックマウスであることを PCR で確認した。

## 4. 研究成果

(1)可溶型 Flt-1 産生制御機構の解明

低酸素刺激によって可溶型 Flt-1 の発現が特異的に抑制されることを明らかにしたが、可溶型 Flt-1 mRNA 分解の亢進によるものかどうか不明であった。そこで、アクチノマイシン D により RNA 合成を阻害した状態で HMVEC 細胞を低酸素下で培養し、膜型および可溶型 Flt-1 mRNA の量を定量したところ、両者とも通常酸素濃度と低酸素濃度下での分解速度に違いは見られなかった。したがって、低酸素濃度下で可溶型 Flt-1 が特異的に分解されているわけではないことから、可溶型 Flt-1 量は選択的 3' 端プロセシングによって積極的に調節されていることが明らかとなった。

Flt-1 選択的 3' 端プロセシングメカニズムを明らかにするために、通常酸素濃度と低酸素濃度で発現量に違いのある遺伝子を Affymetrix DNA microarray により網羅的に解析した。RNA 結合タンパク質に注目し、低酸素濃度で発現上昇していた 5 遺伝子を HMVEC 細胞に過剰発現させ、Flt-1 の発現を定量したが、全ての遺伝子で可溶型 Flt-1 の特異的な抑制は認められなかった。

選択的 3' 端プロセシングを制御する mRNA

前駆体上の制御配列 (*cis*-element) を同定していることから、制御配列および 3' 端切断部位周辺に結合しうるタンパク質から制御タンパク質を同定することを試みた。9 種類のタンパク質をそれぞれ HMVEC 細胞に過剰発現させ、Flt-1 の発現を解析したところ、RNA 結合タンパク質である hnRNP D を過剰発現させた時にのみ可溶性 Flt-1 の抑制が観察された (図 1)。さらに、hnRNP D 遺伝子の shRNA をデザインし HMVEC 細胞でノックダウンしたところ、可溶性 Flt-1 の発現は増加し過剰発現とは逆の結果が得られた (図 1) ことから、hnRNP D が可溶性 Flt-1 産生を制御しているタンパク質である可能性が示唆された。

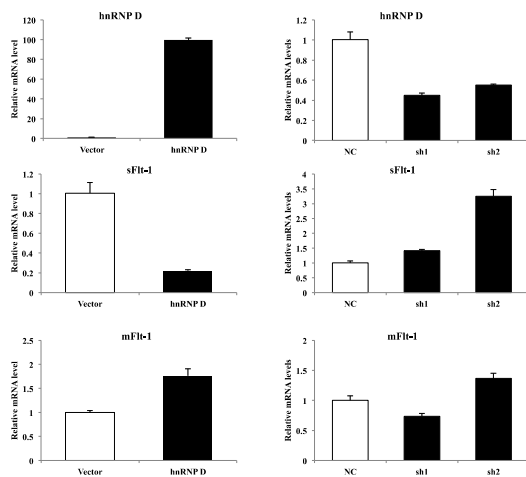


図1

hnRNP D が可溶性 Flt-1 の発現を制御していることが示唆されたことから、hnRNP D が Flt-1 pre-mRNA に結合しているかどうかを明らかにするため、RNA immunoprecipitation を行った。HMVEC 細胞の核抽出液から抗 hnRNP D 抗体を用いて免疫沈降すると、Flt-1 pre-mRNA の共沈が認められた (図 2)。

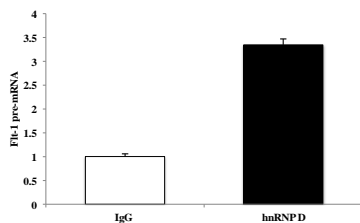


図2

以上の結果から、RNA 結合タンパク質である hnRNP D が Flt-1 pre-mRNA に結合することによって特異的に可溶性 Flt-1 の発現を抑制していると考えられた。

DNA マイクロアレイと qPCR の結果から、通常酸素濃度と低酸素濃度で hnRNP D の発現量は変わらないことが明らかとなっていた。そこで、翻訳後修飾によって hnRNP D の活性が制御されている可能性が考えられることから、hnRNP D のリン酸化とメチル化について検討した。通常酸素濃度と低酸素濃度で培養した HMVEC 細胞からタンパク質を抽出し

Phos-Tag ゲルで電気泳動したところ、タンパク質がリン酸化していることを示す移動度変化は確認されなかった。また、抗リン酸化 hnRNP D 抗体で検出しても、通常酸素濃度と低酸素濃度で違いは認められなかったことから、リン酸化による制御ではないことが明らかとなった。次に、hnRNP D は特徴的なアミノ酸配列 RGG のアルギニン残基がメチル化されることが知られていることから、アルギニン残基をアラニン、ヒスチジン、リジンに変異させた hnRNP D タンパク質を発現するベクターを作製した。Flt-1 minigene と一緒に HMVEC 細胞に導入し、minigene の発現パターンを比較すると、hnRNP D によって減少した可溶性が、変異 hnRNP D では減少しないことが明らかとなった (図 3)。したがって、hnRNP D はメチル化されることによって、可溶性 Flt-1 産生を制御していることが示唆された。

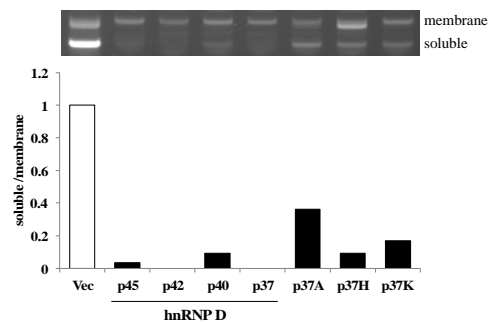


図3

## (2) レンチウイルスによるトランスジェニックマウスの作製

レンチウイルスを用いたトランスジェニックマウスの作製は、受精卵に感染させる方法 (Singer et al. Nature Protocols 1, 286-292, 2006) と、精原細胞に感染させる方法 (Sehgal et al. PLoS ONE 6(7): e21975) の二種類が報告されている。後者のほうがより簡便に、より安全に作製することが可能なことから、精原細胞感染法によって可溶性 Flt-1 を特異的にノックダウンしたトランスジェニックマウスの作製を試みた。Sehgal らの方法に従い、4 週齢のオスマウスの精巣にレンチウイルスを感染させ、生まれてきたマウスのゲノミック DNA にウイルス由来の DNA が挿入されているかどうかを調べた。合計 165 匹のマウスを調べたところ、ウイルス DNA が検出されたマウスは 0 匹であった。Sehgal らの報告では約 6 割のマウスがトランスジェニックマウスとして生まれていたが、我々の実験ではトランスジェニックマウスは 1 匹も得られなかった。次に、4 週齢より若い方が精巣も小さく、より効率的にウイルスが感染できるのではないかと考え、生後 2 日のマウスを用いて同様の実験を行った。150 匹のマウスを調べたが、トランスジェニックマウスを得ることはできなかった。レンチウイルスを感染させたマウスの精巣を観察すると、レンチウイルスが感染したことを示す

GFP 陽性の精原細胞の存在を確認することができなかったことから、ウイルスは精細管内に進入することができない可能性が示唆された。したがって、Sehgal らの方法ではトランスジェニックマウスを作製することは難しいことが明らかとなった。現在、従来の方法でトランスジェニックマウスの作製にとりかかっており、眼内血管形成における可溶性 Flt-1 の役割を明らかにしていきたい。

#### 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4件)

Ikeda, T., Takasawa, S., Noguchi, N., Nata, K., Yamauchi, A., Takahashi, I., Yoshikawa, T., Sugawara, A., Yonekura, H. and Okamoto, H., Identification of a major enzyme for the synthesis and hydrolysis of cyclic ADP-ribose in amphibian cells and evolutionary conservation of the enzyme from human to invertebrate., *Molecular and Cellular Biochemistry*, 366(1-2), 69-80, 2012, 査読有

DOI: 10.1007/s11010-012-1284-0

Ikeda, T., Sun, L., Tsuruoka, N., Ishigaki, Y., Yoshitomi, Y., Yoshitake, Y. and Yonekura, H., Hypoxia down-regulates sFlt-1 (sVEGFR-1) expression in human microvascular endothelial cells by a mechanism involving mRNA alternative processing., *Biochemical Journal*, 366(1-2), 69-80, 2011, 査読有

DOI: 10.1042/BJ20101490

Yaguchi, H., Ikeda, T., Osada, H., Yoshitake, Y., Sasaki, H. and Yonekura, H., Identification of the *COL2A1* mutation in type I Stickler syndrome patients using RNA from freshly isolated peripheral white blood cells., *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*, 15(4), 231-237, 2011, 査読有

DOI: 10.1089/gtmb.2010.0138

Osada, H., Yoshitake, Y., Ikeda, T., Ishigaki, Y., Takata, T., Tomosugi, N., Sasaki, H. and Yonekura, H., Ultraviolet B-induced expression of amphiregulin and growth differentiation factor 15 in human lens epithelial cells., *Molecular Vision*, 17(17-20), 159-169, 2011, 査読有

DOI: 10.3892/ijo\_00000707

##### [学会発表](計4件)

吉富泰央、池田崇之、吉竹佳の、八田稔久、加藤伸郎、米倉秀人、神経-血管相互作用

を介した血管ネットワーク形成における JunB の機能、金沢医科大学医学会第 47 回学術集会、2013.7.6、石川県内灘

吉竹佳の、池田崇之、吉富泰央、田中一美、米倉秀人、毛細血管内皮細胞のマトリゲル上での管腔形成過程では Epac2 の発現が上昇する。第 85 回日本生化学会大会、2012.12.16、福岡

池田崇之、吉富泰央、吉竹佳の、米倉秀人、Flt-1(VEGF 受容体-1)mRNA 選択的 3' 端プロセシング機構の解析、第 85 回日本生化学会大会、2012.12.15、福岡

Yoshitake, Y., Ikeda, T., Yoshitomi, Y. and Yonekura, H., Increased expression of Epac2 during in vitro tube formation in human microvascular endothelial cells, 37th FEBS Congress, 2012.9.4-9, Seville, Spain

池田崇之、吉富泰央、石垣靖人、吉竹佳の、米倉秀人、血管内皮細胞における可溶性 Flt-1(可溶性 VEGF 受容体-1)mRNA 選択的 3' 端プロセシング機構の解析、第 14 回日本 RNA 学会、2012.7.18-20、仙台

池田崇之、吉富泰央、石垣靖人、吉竹佳の、米倉秀人、低酸素状態は mRNA 選択的 3' 端プロセシングを介して微小血管内皮細胞の可溶性 VEGF 受容体(可溶性 Flt-1)産生を抑制する、日本生化学会北陸支部第 30 回記念大会、2012.5.26、金沢  
Osada, H., Yoshitake, Y., Ikeda, T., Ishigaki, Y., Takata, T., Tomosugi, N., Kubo, E., Sasaki, H. and Yonekura, H., Ultraviolet B-induced expression of amphiregulin and growth differentiation factor 15 in human lens epithelial cells, International Conference on The Lens, 2012.1.15-20, Hawaii

吉富泰央、池田崇之、吉竹佳の、加藤伸郎、米倉秀人、神経-血管相互作用により血管で活性化される遺伝子群の同定とその機能解析、第 84 回日本生化学会大会、2011.9.21-24、京都

池田崇之、吉富泰央、石垣靖人、吉竹佳の、米倉秀人、低酸素刺激による微小血管内皮細胞の可溶性 VEGF 受容体(可溶性 Flt-1)産生の抑制、RNA フロンティアミーティング、2011.8.31、愛知県大府

池田崇之、吉富泰央、石垣靖人、吉竹佳の、米倉秀人、低酸素刺激による微小血管内皮細胞の可溶性 VEGF 受容体(可溶性 Flt-1)産生の抑制、金沢医科大学医学会第 47 回学術集会、2011.7.9、石川県内灘

Ikeda, T., Yoshitomi, Y., Ishigaki, Y., Yoshitake, Y. and Yonekura, H., Hypoxia down-regulates sFlt-1 (sVEGFR-1) expression in human microvascular endothelial cells by a mechanism involving mRNA alternative processing,

36th FEBS Congress, 2011.6.25-30,  
Torino, Italy

Yoshitake, Y., Osada, H., Ikeda, T.,  
Yoshitomi, Y., Ishigaki, Y., Sasaki, H.  
and Yonekura, H., Ultraviolet B-induced  
expression of amphiregulin and growth  
differentiation factor 15 in human lens  
epithelial cells, 36th FEBS Congress,  
2011.6.25-30, Torino, Italy

池田崇之、低酸素刺激による微小血管内皮  
細胞の可溶性 VEGF 受容体(可溶性 Flt-1)  
産生の抑制、日本生化学会北陸支部第 29  
回大会、2011.5.28、金沢

Ikeda, T., Yoshitomi, Y., Ishigaki, Y.,  
Yoshitake, Y. and Yonekura, H., Soluble  
VEGFR-1 production is down-regulated  
under hypoxia in human microvascular  
endothelial cells by a mechanism  
involving alternative mRNA 3'-end  
processing, The Molecular Biology  
Society of Japan The 11th Spring  
Symposium International Symposium on  
Tumor Biology in Kanazawa, 2011.5.25,  
金沢

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kanazawa-med.ac.jp/~biochem/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

池田 崇之 (IKEDA, Takayuki)

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：00374942

### (2) 研究協力者

八田 稔久 (HATTA, Toshihisa)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：20238025