

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860162

研究課題名(和文) Scott症候群のモデル動物としてのTMEM16Fノックアウトマウスの評価と利用

研究課題名(英文) An analysis of TMEM16F KO mice as the model of Scott Syndrome

## 研究代表者

藤井 俊裕 (Fujii, Toshihiro)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30580104

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,300,000円

研究成果の概要(和文)：TMEM16FはCa<sup>2+</sup>依存性脂質スクランブラーゼとして同定された。またヒトの血液疾患であるスコット症候群の患者からはTMEM16Fに点変異が見つかっている。そこでTMEM16F欠損マウスを作製、解析をおこなった。TMEM16F欠損マウスの血小板は、ヒトスコット症候群の血小板と同様に、活性化しているにもかかわらず、ホスファチジルセリン(PS)が細胞膜の外へ露出しないことがわかった。さらにIn vivoイメージングでも、TMEM16F欠損マウスの血管内で血栓形成時を起こさせた時、集合する血小板の表面にPSが露出していないことが明らかになり、さらに、血栓の形成が遅延していることが示された。

研究成果の概要(英文)：TMEM16F was found a Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipid scramblase and a point mutation of TMEM16F from patient with Scott syndrome, a mild bleeding disorder. We investigated TMEM16F-deficient mice. Here we describe the phenotypes of platelet-specific TMEM16F-null mice, which resemble those of Scott syndrome patients. Platelets from these mice exhibit defects in PS exposure, microparticle release, and tissue factor-induced thrombin generation in vitro and in vivo.

研究分野：分子生物学

キーワード：TMEM16F 血小板 スコット症候群 in vivo イメージング phosphatidylserine

### 1. 研究開始当初の背景

すべての動物細胞の細胞膜は脂質二重層からなり、細胞膜を構成するリン脂質は外層と内層とで非対称的に分布している。しかし生物は様々な生理現象の場面で脂質二重膜の非対称性を破綻させている。破綻した結果、通常二重膜の内層に存在するホスファチジルセリン(PS)は外層へ暴露される。

これまで申請者の研究室は、PSの暴露を必要とする生命現象の解明とそれに関わる分子を同定してきた (Hanayama *et al.*, 2002 Nature、Miyaniishi *et al.*, 2007 Nature、Yoshida *et al.*, 2005 Nature)。しかしながら、PSが細胞表面に暴露する分子機構は解明されていない。一方、申請者の研究室の鈴木らは、Ca<sup>2+</sup>依存的にPSを暴露するために必要な分子をスクリーニングした結果、TMEM16Fを同定した。同定したTMEM16Fは脂質二重膜の様々なリン脂質を内側から外側、外側から内側の両方向へ移動させる活性、すなわちスクランブル活性を持っていた。さらにScott症候群と呼ばれる血液凝固に障害のある患者のTMEM16F遺伝子を調べた結果、点変異が生じておりTMEM16Fが途中でtruncationされていることが判明した (Suzuki *et al.*, 2010 Nature)。

このScott症候群の血小板はPSを細胞表面に暴露しない。そのためScott症候群の患者では、止血されにくい症状が報告されている。

### 研究開始当初までの研究成果

#### 『TMEM16Fノックアウトマウス』

C57BL/6J由来のES細胞を用いてTMEM16F遺伝子のエクソン2を欠損したES細胞を作成、そのES細胞よりヘテロマウスを樹立した。このヘテロマウスを掛け合わせたところTMEM16Fノックアウトマウスのほとんどは、出生直後に死亡した。出生直後で死亡したマウス胎仔では出血している形跡は観察されなかった。マウスの死亡の原因が出生に伴う急激な環境の変化であると考え、胎生18日目の胎仔を帝王切開で取り出し、人為的な環境変化を作り出した。帝王切開でとりだした野生型の胎仔はホットプレート上においておくと自発的に呼吸を始めるが、TMEM16Fノックアウトマウス胎仔はチアノーゼ様の青紫色になり呼吸することなく死亡した。肺を調べるとTMEM16Fノックアウトマウスは肺に空気が入っていないことがわかった。

一方、わずかに生き残ったTMEM16Fノックアウトマウスは野生型マウスと比べて何も異常がなく、生殖も可能であった。

#### 『TMEM16F欠損細胞株の作製』

TMEM16Fノックアウトマウスの胎仔から調製した胸腺細胞をRas<sup>V12</sup>とc-mycで不死化した細胞 (Immortalized Fetal Thymocytes : IFETs) を作製した。

### 2. 研究の目的

TMEM16Fノックアウトマウスの表現型を解析する。解析した結果とScott症候群の症状を比べてTMEM16FノックアウトマウスがScott症候群のモデル動物として適当であるかどうか評価する。

### 3. 研究の方法

『TMEM16ファミリーのPS露出活性の有無』

IFETsにA23187 Ca<sup>2+</sup>イオノフォアを処理して、細胞表面にPSが露出されるかどうかをAnnexin Vを使って検出する。またTMEM16欠損IFET細胞株にTMEM16ファミリーを発現させて、各タンパク質にPS露出活性があるかどうかを評価した。

『TMEM16Fコンディショナルマウスの作成』

TMEM16F遺伝子のイントロン1と2にFRT配列を挿入した遺伝子改変マウスTMEM16F-floxマウスを作成し、巨核球/血小板特異的にCreリコンビナーゼを発現するPf4-CREトランスジェニックマウスと交配させ、TMEM16F-flox;Pf4-CREマウスを作成し、このマウスをin vivoで、またはこのマウスから調製した血小板を用いて解析を行った。

『TMEM16Fノックアウトマウスの血小板の解析』

これまでのScott症候群の論文で報告されている血小板の特徴がTMEM16F欠損の血小板に合致するかどうかを調べた。

(1) マウス血小板をトロンピンとコラーゲン処理するとPSが暴露されるが、TMEM16Fノックアウトマウスの血小板では、PSが暴露されなくなっているか確認した。

(2) トロンピンの活性化能を調べた。そのために血小板を含む血漿 (Platelet-Rich Plasma : PRP) とトロンピン活性によって蛍光を発する合成ペプチド zGGR-AMC を混ぜた溶液の中に、外因系凝固反応の起因となる組織因子とCaCl<sub>2</sub>を添加することで凝固反応を活性化させ、TMEM16Fノックアウトマウスの血小板によるトロンピンの活性化能を調べた。

(3) 活性化した血小板はPSを暴露すると同時にマイクロパーティクルと呼ばれる微小な小胞を放出する。TMEM16F欠損の血小板がマイクロパーティクルを放出するか、フローサイトメトリーを用いて調べた。

(4) 野生型の血小板は、活性化すると偽足を伸ばす事が知られているが、Scott症候群の血小板は偽足を伸ばさない。そこで活性化したTMEM16Fの血小板を走査型電子顕微鏡で観察し偽足が伸びているかを調べた。

(5) 生きたままの TMEM16F コンディショナルノックアウトマウスにおける血栓の形成を *in vivo* イメージングによってリアルタイムで観測した。

マウスの血管内に hematoporphyrin を投与し、レーザーの照射により ROS を発生させて、血栓形成を引き起こす。血栓が形成されていく過程をリアルタイムで計測した (Nishimura *et al.*, 2012 Blood)。かつ、AnnexinV-FITC を用いて、生体内で活性化した血小板が本当に PS を出しているかどうかを調べた。

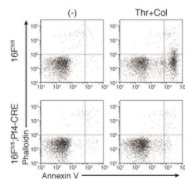
#### 4. 研究成果

『TMEM16 ファミリーの PS 露出活性の有無』  
TMEM16F が欠損した IFETs 細胞株がカルシウム依存性の PS 露出能が失っていることを確認した後に、TMEM16 ファミリーを発現させ、カルシウム依存性 PS 露出能を確認した。その結果、TMEM16D, F, G, J に PS 露出活性があることを見出した。

『TMEM16F ノックアウトマウスの血小板の解析』

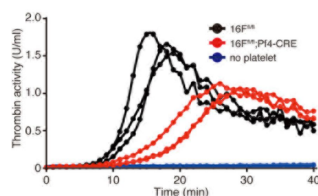
(1) 血小板の PS 露出は、これまで AnnexinV の単染色で解析されてきた。しかしこの方法では、PS が外側に露出している場合と細胞膜が崩壊して内側の PS に AnnexinV が結合している場合と区別することができない。有核細胞のアポトーシス現象では、AnnexinV と膜不透過 Propidium Iodide の二重染色することで、この二種類を区別している。本件では、本当に活性化した血小板が PS を露出しているかを調べるために、AnnexinV と膜不透過で F-アクチンと結合するファロイジンの二重染色法を確立した。

TMEM16F<sup>flx/flx</sup>; Pf4-CRE マウスの血小板を活性化させると、AnnexinV、ファロイジンともに陰性になり、PS が細胞膜の外側に PS が露出しないことがわかった。



図；TMEM16F 欠損した血小板は活性化時に PS を露出しない

また TMEM16F が欠損した血小板を使って、トロンビンの産生能を調べた結果、野生型に比べてトロンビンの産生能が落ちていることが明らかになった。これは活性化した血小板が PS を露出しないために、PS を足場にして促進するはずの一連の凝固因子が十分に



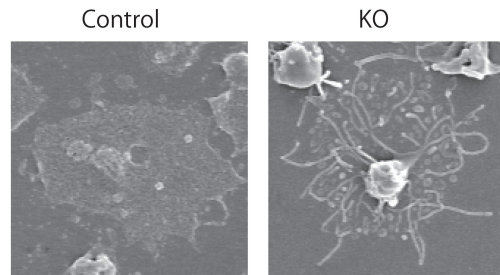
反応しないためであると考えられる。

図；TMEM16F 欠損した血小板はトロンビ

ン産生能が低下している。

(2) TMEM16F が欠損した血小板は、活性化時にマイクロパーティクルを放出していないことがわかった。

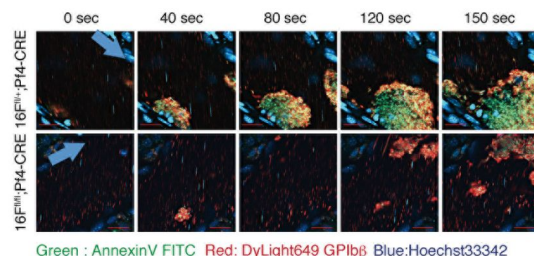
また、電子顕微鏡で観察すると、ヒト血小板の報告とことなり、TMEM16F 欠損血小板は野生型より多くの義足を伸ばしていることがわかった。



図；A23187 で活性化した血小板を電子顕微鏡で撮影。左図；コントロール血小板、右図；TMEM16F 欠損血小板

(3) *In vivo* イメージングを使って、血管内で血栓を形成する時に、血小板が PS を露出するのかを観察した。野生型の血小板に比べて TMEM16F 欠損血小板は、明らかに PS の露出が減少していた。

かつ、血栓形成が野生型に比べて遅れていることがわかった。血小板の PS 露出が減少しているため、トロンビンの産生能が落ちていると考えられる。トロンビンの産生能が落ちている結果、血栓が十分に出来てこないために、血栓の形成が遅くなると考えられる。



図；マウス血管内での血栓形成における、PS 露出の観察。上段；コントロール。下段；TMEM16F 欠損マウス

以上の結果より、TMEM16F が血小板の細胞外への PS 露出に必要であり、また TMEM16F の欠損マウスが血栓を形成しにくいことを観察した。これらの結果はヒトスコット症候群が中程度の出血症状が報告されていることも類似しており、TMEM16F 欠損マウスがスコット症候群のモデルマウスとして評価できると結論した。

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1件)

Calcium-dependent phospholipid scramblase activity of TMEM16 protein family members.

Jun Suzuki, Toshihiro Fujii, Takeshi Imao, Kenji Ishihara, Hiroshi Kuba, and Shigekazu Nagata  
The journal of Biological Chemistry 査読有 VOL.288, 2013, NO.19, pp.13305-13316 DOI; 10.1074/jbc.M113.457937.

〔学会発表〕(計1件)

Toshihiro Fujii, Satoshi Nishimura, Jun Suzuki, Koji Eto, Shigekazu Nagata

「In vivo and in vitro the analysis of mice bearing TMEM16F- deficient platelets, a defect of PS externalization on the platelet membrane」

第36回 日本止血学会学術集会 招待講演, 2014年5月29日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: Methods for screening a modulator of a tmem16 family member

発明者: Nagata S, Suzuki J, Fujii T

権利者: Kyoto University

種類:

番号: PCT/JP2013/061699

出願年月日: 2013/10/24

国内外の別: 国際特許出願

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www2.mfour.med.kyoto-u.ac.jp/~nagata/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

藤井 俊裕 (Toshihiro Fujii)

京都大学・大学院医学研究科・特任助教

研究者番号: 30580104

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: