

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26290030

研究課題名(和文)心血管系イメージングのためのモデルマウスリソース整備

研究課題名(英文)Generations of mice for imaging of cardiovascular system

研究代表者

依馬 正次(Ema, Masatsugu)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・教授

研究者番号：60359578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：Flk1-Nano-lantern BACトランスジェニックマウスを樹立したところ、内在性Flk1の発現を再現できていることが分かった。aortic ringを単離し、血管の発芽を発光イメージング法により観察したところ、長時間の観察が可能となった。また腫瘍血管を発光で検出することが可能となった。Lrrc33遺伝子についてノックアウトマウスを作製したところ、腫瘍血管の直径・密度が高いことが判明した。

研究成果の概要(英文)：We generated a novel transgenic (Tg) mouse that expresses a bioluminescent reporter protein, Nano-lantern, under the control of Fetal liver kinase 1 (Flk1). Flk1-Nano-lantern BAC Tg mice recapitulated endogenous Flk1 expression in endothelial cells and lymphatic endothelial cells during development and tumour growth. Importantly, bioluminescence imaging of endothelial cells from the aortic rings of Flk1-Nano-lantern BAC Tg mice enabled us to observe endothelial sprouting for 18 hr without any detectable phototoxicity. Furthermore, Flk1-Nano-lantern BAC Tg mice achieved time-lapse luminescence imaging of tumour angiogenesis in freely moving mice with implanted tumours. We also Lrrc33 KO mice and demonstrated that Lrrc33 is important for the function of tumour endothelial cells.

研究分野：発生工学

キーワード：血管内皮細胞 腫瘍 発生

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化の進む日本での死因の第1位は癌である。癌の治療法として、癌を栄養する血管系を標的とした腫瘍血管抑制法が有効な治療法として注目を集め、腫瘍血管を標的とする最初の分子薬剤であるペバシツマブ(組換え型抗 VEGF 抗体)が、大腸癌に対する治療薬として我が国に於いても臨床使用されている。また、日本人の死因の2位は心臓疾患、3位は脳虚血性疾患であるが、その治療には、虚血部位での速やかな血管系の新生や再構築を誘導する方法が求められている。さらに、糖尿病性網膜症においては、新生血管系を退縮させることが治療法となるのに対して、糖尿病性下肢大動脈閉塞症においては、虚血部位における新たな血管新生が求められる。これらの疾患の治療法に共通して見られるのは、如何にして血管新生を促進または抑制するかという点である。このように血管系は、がん治療、虚血性疾患、さらには糖尿病の合併症においても最も重要な治療ターゲットの一つであり、血管の新生と抑制のバランスの分子基盤を理解することは、学問的に価値あるばかりでなく、それらの疾患に対する新たな分子薬剤の創出に繋がるものであり、医学的にも産業的にも大変価値が高いと考えられる。しかしながら、血管新生のメカニズムは未だ不明なところが多く残されている。その原因として、血管新生を可視化する適切なモデルマウスが少ないこと、血管内皮細胞で発現している遺伝子についての個体レベルでの機能についての理解が不十分であることと、が挙げられる。そこで本研究では、正常および病的血管新生を可視化するモデルマウスを作製し、3大死因を研究する研究者が使用できるリソースとして整備することを目的として研究を行うものである。また、それらのモデルマウスを新規血管新生関連遺伝子の個体レベルの解析に使用し、使用方法を提示するための研究も行う。

## 2. 研究の目的

これまで様々なモデルマウスが、新たな生命現象の発見、疾患発症機序の細胞・分子レベルでの解明に導いてきた。本研究の目的は、日本人の3大死因に共通する「血管内皮細胞」の可視化を可能とする新規モデルマウスを作成・解析し、理研 BRC に寄託、モデルマウスリソースとして整備することで、3大死因を研究する研究者に広く配布することで

ある。日本での死因の第1位～3位は癌、心臓疾患、脳虚血性疾患であるが、これらの疾患の治療法に共通して求められるのは、如何にして血管新生を促進または抑制するかという点である。このように血管系は、がん治療、虚血性疾患において最も重要な治療ターゲットの一つであり、血管の新生と抑制のバランスの分子基盤を理解することは、学問的に価値あるばかりでなく、医学的にも産業的にも大変価値が高いと考えられる。しかしながら、血管新生のメカニズムは未だ不明なところが多く残されている。その原因として、血管新生を可視化する適切なモデルマウスが少ないことと、血管内皮細胞で発現している遺伝子についての個体レベルでの機能についての理解が不十分であることが挙げられる。そこで、血管新生を可視化するための遺伝子改変マウスを作製、理研バイオリソースセンターに寄託し、ヒト三大疾患を研究する研究者のためのモデルマウスリソースとして整備するとともに、新規血管新生関連遺伝子 *Lrrc33* 遺伝子機能を解明することを本研究の目的とする。

## 3. 研究の方法

これまでに、Flk1-GFP BAC トランスジェニックマウス(Ishitobi et al., *Exp. Animals*, 2010)を作製し、Flk1-GFP ノックインマウスと同様に、内在性 Flk1 の発現を再現できることを明らかにした。その後、別の VEGF 受容体の1つである Flt1 (VEGF-R1)を可視化する Flt1-tdsRed BAC トランスジェニックマウス(Matsumoto et al., *Genesis*, 2012)を作製したところ、驚くべきことに Flk1 とは異なる一群の血管内皮細胞を標識することが分かった(Matsumoto et al., *Genesis*, 2012)。近年血管内皮細胞のライブイメージングに対する要望が大きい、GFP や dsRed に対して励起光を当てることで、光毒性が生じ、12 時間以上のライブイメージングが困難な状況である。そこで、より良いモデルマウスを作製するために、大阪大の永井教授によって開発された Luciferase-Venus 融合遺伝子(NanoLantern)を用いる。このレポーター遺伝子はルシフェリンの投与によって Luciferase が発光し Venus を励起するため、光励起を必要とせず光毒性が生じない。H26 年度は、NanoLantern を発現する Flk1-NanoLantern (Venus) BAC トランスジーンを構築し、受精卵へ導入し、ラインを

樹立する。Flk1-NanoLantern (Venus) BAC トランスジェニックマウス、Flt1-NanoLantern (RFP) BAC トランスジェニックマウスを用いて、胎子や新生児 Retina、成獣腫瘍血管新生時の組織(あるいは全胚)を用いて、PECAM1 など免疫染色後に、血管内皮細胞のイメージングを行い、既存血管内皮細胞や Tip 細胞、Stalk 細胞のイメージングに十分蛍光の強いラインを選定する。

これまでの研究から、マウス発生期の血管内皮細胞のトランスクリプトームが明らかにされ、ヒト血管新生に寄与する一群の遺伝子が報告されている (Takase et al., Blood, 2012)。これらの遺伝子は、試験管内アッセイ系により血管内皮細胞の管腔形成能に寄与することを明らかにしているが、個体レベルでの機能は不明である。Lrrc33 遺伝子改変 ES 細胞を KOMP から入手し、キメラマウスの作製、ヘテロマウスの作製を行う。生後の網膜血管新生系を用いて血管新生能の定量化を行う。血管新生が生後から P8 にかけて 2 次元平面的に進行する網膜血管新生をモデルとして、生理的血管新生における Lrrc33 遺伝子の役割を明らかにする。具体的には、P5 の網膜をフラットマウントし、Isolectin-B4 を反応させることで、血管内皮細胞を可視化する。視神経乳頭からの距離、血管密度、血管分岐数、Tip 細胞当たりのフィロポディア数を定量化することで、詳細な表現型を検討する。分子レベルでの機序を明らかにする方法としては、以下のようなアプローチを考えている。血管新生に関与する遺伝子の分子機序としては、VEGF 経路、Notch 経路に関わる場合が殆どであるため、両経路に関わる遺伝子の発現レベルを評価することで、分子レベルでのメカニズムを明らかにすることが出来る場合が多い。具体的には HUVEC 細胞を Lrrc33 siRNA または control siRNA で処理し、cDNA を調製する。その後、VEGF、Flk1、Flt1 (以上、VEGF 経路)、Dll4、Jagged-1、Notch1-4、Nrap (以上、Notch 経路) などの遺伝子発現を評価し、Lrrc33 の遺伝子発現が、VEGF、Notch 経路の遺伝子発現に影響するかどうか検討する。逆に、VEGF または Dll4、Jagged-1 で処理した HUVEC 細胞から cDNA を調製し、Lrrc33 の発現レベルを評価する。以上の解析から、Lrrc33 と VEGF、Notch 経路の相互作用が解明できると考えられる。

病的血管新生における Lrrc33 遺伝子の機能を解析するために、Lrrc33 ノックアウト

マウスおよび野生型マウスの背部皮下に、LLC 細胞を背部皮下に接種後、10 日間腫瘍径を連日測定し、12 日目に腫瘍組織の重量を測定する。また、得られた腫瘍組織における血管密度、血管平滑筋の被覆率を PECAM1/SMA 抗体を用いた免疫染色法、血流を超音波、血管透過性をエバンスブルーの移入により数値化する。

#### 4 . 研究成果

Nano-lantern を Flk1 BAC 中に導入した Flk1-Nano-lantern (Venus) BAC トランスジェーンを構築し、受精卵へ導入したところ、Venus を発現する 2 ラインを樹立することが出来た。胎児における Venus の発現を内在性 Flk1 と比較検討したところ、ほぼ内在性 Flk1 の発現を再現できていることが分かった。血管内皮細胞マーカーの PECAM1 と比較することで、血管内皮細胞における発現を再現できることも分かった。一方、Flk1-Nano-lantern (Venus) BAC トランスジェニックマウス成獣皮下に LLC 腫瘍細胞を移植し、腫瘍を作出した。腫瘍血管新生時の Venus の発現を検討したところ、内在性 Flk1 の発現を再現できていることも分かった。

これまでに我々が作製してきた Flk1-GFP BAC Tg レポーターマウスでは、光毒性のために長時間の蛍光イメージングが困難だった。今回作出した Flk1-Nano-lantern (Venus) BAC トランスジェニックマウスから aortic ring を単離し、血管の発芽を蛍光イメージング法により観察したところ、長時間の観察が可能となった。また腫瘍に発光基質をインジェクトすることで、腫瘍血管を蛍光で検出することが可能となった。以上のことから、非侵襲的に血管をイメージングする方法が確立された。

新規遺伝子 Lrrc33 遺伝子についてノックアウトマウスを作製した。生後の網膜血管新生系を用いて血管新生能の定量化を行ったところ、有意差は認められなかった。皮下に腫瘍細胞を移植し、経時的に腫瘍サイズを測定したが差は認められなかった。しかし、腫瘍血管の直径が大きいととも、密度が高いことが判明したことから、血管機能に何らかの役割を果たしていることが示唆された。

#### 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3件)

Matsushita J, Inagaki S, Nishie T, Sakasai T, Tanaka J, Watanabe C, Mizutani KI, **Miwa Y**, Matsumoto K, Takara K, Naito H, Kidoya H, Takakura N, Nagai T, Takahashi S, **Emma M**. Fluorescence and Bioluminescence Imaging of Angiogenesis in Flk1-Nano-lantern Transgenic Mice. *Sci Rep*. 7:46597. (2017) doi: 10.1038/srep46597. 査読有り

Yamazaki T, Nalbandsian A, Uchida Y, Li W, Arnold TD, Kubota Y, Yamamoto S, **Emma M**, MukoyamaYS. Tissue Myeloid Progenitors Differentiate into Pericytes through TGF- $\beta$  Signaling in Developing Skin Vasculature. *Cell Rep*. 18:2991-3004. (2017) doi:10.1016/j.celrep.2017.02.069. 査読有り

Ogura S, Kurata K, Hattori Y, Takase H, Ishiguro-Oonuma T, Hwang Y, Ahn S, Park I, Ikeda W, Kusuhara S, Fukushima Y, Nara H, Sakai H, Fujiwara T, Matsushita J, **Emma M**, Hirashima M, Minami T, Shibuya M, Takakura N, Kim P, Miyata T, Ogura Y, Uemura A. Sustained inflammation after pericyte depletion induces irreversible blood-retina barrier breakdown. *JCI Insight*. 2(3):e90905. (2017) doi: 10.1172/jci.insight.90905. 査読有り

〔学会発表〕(計1件)

**Masatsugu Emma**, Shigenori Inagaki, Tomomi Nishie, Tomoki Sakasai, Junko Tanaka, Yoshihiro Miwa, Ken Matsumoto, Kazuhiro Takara, Hisamichi Naito, Hiroyasu Kidoya, Nobuyuki Takakura, Takeharu Nagai, Satoru Takahashi, Jun Matsushita、Fluorescence and Bioluminescence Imaging of Angiogenesis in *Flk1-Nano-lantern* Transgenic Mice、血

管生物医学会 2016年12月8日～2015年12月10日、長崎

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
<http://lab.rcals.jp/front>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

依馬 正次 (EMA, Masatsugu)  
滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・教授  
研究者番号：60359578

(2) 研究分担者

三輪 佳宏 (MIWA, Yoshihiro)  
筑波大学・医学医療系・講師  
研究者番号：70263845

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )