

平成 27 年度 共同研究報告書

研究区分		一般共同研究
研究課題		血管病変が関与する疾患での病的血管内皮細胞の同定と解析に向けた血管内皮細胞特異的レポーターマウスの樹立
新規・継続の別		新規・継続
研究代表者	所属	大阪市立大学・医学部・生理学第 2
	職名・氏名	講師・藤田 寿一
研究分担者 (適宜行を追加して下さい)	所属	
	職名・氏名	
	所属	
	職名・氏名	
受け入れ教員	職名・氏名	助教・森岡 裕香
研究目的 (300 字程度)		近年、がん微小環境下に存在する腫瘍内血管内皮細胞は、正常な血管内皮細胞とはその生物学的特性が異なっていることが明らかになってきている。しかしながら腫瘍内血管内皮細胞以外では糖尿病における網膜症や腎症など血管病変が関与する疾患に関連する内皮細胞の異常性については未知な点が多いと考えられる。本研究では血管内皮細胞で特異的に発現する VE-cadherin 遺伝子の発現制御下に選択マーカー遺伝子を組み込んだユニットをマウスに遺伝子導入し、トランスジェニック・マウスを樹立することで、病変血管内皮細胞を効率的に分離・培養する方法論を確立して、病的な血管内皮細胞を同定し、その異常性を規定する分子機構を明らかにすることを目的とする。
研究内容・成果 (1000 字程度)		血管内皮細胞で特異的に発現する細胞間接着タンパク質である VE-cadherin の遺伝子発現制御領域の PCR による増幅を試みたが、約 6.5kb におよぶプロモーター領域、およびイントロン配列であったことから、塩基の偏りや反復配列が存在しており、増幅した PCR 断片をサブクローニングして得られた複数のクローンをシーケンスし解析した結果、何か所かの塩基配列に変異が認められた。そこで PCR による増幅に依存しない大腸菌内での、λファージ由来の Red 遺伝子の発現 (Redα (エクソヌクレアーゼ) および Redβ (DNA 結合タンパク質)) による相同組み換え機構を利用した Red/ET 相同組み換え法を立ち上げて、この実験系を用いることで VE-cadherin 遺伝子の発現制御領域と考えられる DNA のクローニングに成功した。この VE-cadherin 遺伝子発現制御領域を選択マーカー遺伝子 RFP puro をレンチウイルスベクターに組み込み、レンチウイルスを得たが、トランスジェニック・マウス作製に適した、高力価ウイルス溶液を調製することはできなかった。約 6.5kb におよぶプロモーター領域、およびイントロン配列を含んだ選択マーカー遺伝子

	配列が長すぎることで、高力価ウイルス溶液を得られない原因と考えられたため、血管内皮細胞特異的な発現に重要な約2.5 kbのプロモーター領域を、選択マーカー遺伝子上流に組み込んだレンチウイルスベクターを作製した。その結果、トランスジェニック・マウス作製のために十分な高力価レンチウイルスを得た。マウス受精卵に前述のレンチウイルスを感染させトランスジェニック・マウス作製を行い、数匹の母獣から仔が産まれたが、すぐに食殺されてしまったために、現時点では目的のレポーターマウスは得られていない。今後、さらにトランスジェニック・マウス作製を続行し、血管病変が関与する疾患での病的血管内皮細胞の同定と解析を行う予定である。
成果	【学会報告】 参加者名、講演タイトル、学会名、開催場所、開催日時入力のことなし
	【論文発表】 著者、論文名、掲載誌名、号・年・ページ等、IF 入力のことなし
	【新聞報道】 なし