

サブテーマ名：新規血管構成細胞分化誘導因子を用いた血管再生療法の開発

小テーマ名：マウス長鎖 cDNA クローン及びそれがコードする蛋白質に対する抗体並びに情報を用いたマウス血管細胞分化関連遺伝子の研究

テーマリーダー：(財)先端医療振興財団、特別研究員、岡田 光浩

研究従事者：(財)先端医療振興財団、客員研究員、植村 明嘉

(財)千葉県産業振興センター、共同研究員、古閑比佐志

● 研究の概要

H14 年度末から千葉県地域結集型共同研究事業（かずさ DNA 研究所）と上記研究テーマについての共同研究を開始した。千葉県地域結集から提供されたマウス長鎖 cDNA データベースと当方の ES 細胞遺伝子発現データベースを利用したデータ解析システムは、千葉県地域結集所有の mKIAA 遺伝子群の中から、複数の mKIAA 遺伝子が血管分化過程に関与することを見出した (*in silico*)。

この研究テーマからは、両者所有のデータベース情報の共有により、mKIAA0620(遺伝子名)が血管増殖分化に関連することを見出し、新規遺伝子とした両者による特許出願を終了した(2003 - 371040)。

さらに、この遺伝子の全長 cDNA クローニング遺伝子配列解析とマウスを使った実験結果から、この分子は細胞膜結合タンパク質で、発生初期の血管形成時期において、新規血管内皮細胞特異的マーカーになることが判明した。

1. 研究の目標

- ・ mKIAA 遺伝子群の血管分化機能の解析

新規血管再生療法の確立を目的に、これまで蓄積した遺伝子発現情報データベースの中から、マウス ES 細胞実験モデルを使った血管細胞分化系譜データセットを利用して血管増殖・分化プロセスに関する機能分子の候補を同定した。数多くの候補分子から機能解析を進めるにあたり、候補リストを作成した。該当する分子の多くを所有するかずさ DNA 研究所の協力を受け、当プロジェクトの遺伝子発現データベースと先方が有する遺伝子ライブラリーおよびデータベース情報を共有することで研究推進を行うことを目的とする契約を行い、mKIAA 遺伝子群の血管増殖・分化に関する機能解析について共同研究を進める。

2. 実施内容

平成 14 年度末から千葉県地域結集共同事業（かずさ DNA 研究所）との上記研究テーマについて共同研究を開始した。神戸の ES 細胞遺伝子発現データベースと千葉県地域結集から提供されたマウス長鎖 cDNA データベースを利用した検索結果は、千葉県地域結集所有の mKIAA 遺伝子群のうち複数の mKIAA 遺伝子が血管分化過程に関与することが予測できた。

その内、mKIAA0620 (遺伝子名) が血管増殖分化に関連することを見出し、新規遺伝子として両者で特許出願 (AB03037) 準備を進めた。この分子の生体内での役割 (機能) については不明 (報告なし) であり、同分子の血管 (再生) 生物学的な意義付けを行うため、全長 cDNA のクローニングを試みた。かずさ DNA 研究所所有の mKIAA0620 遺伝子クローンは DNA 上流 5' 側 (転写開始部位から約 1,000 bp) 領域が不足している不完全長 cDNA であった。

完全長 cDNA 配列と予測される配列のうち、未取得の遺伝子配列部位の DNA をヒト・マウスゲノム情報を利用した *in Silico* クローニング法を駆使し、塩基配列情報を予測・取得した。その塩基配列情報をもとに PCR 法で目的の遺伝子断片をクローニングした。DNA シークエンシングの結果、予想配列とほぼ同一の遺伝子（一部に塩基置換がある）の取得に成功した。得られた全長 cDNA 塩基配列からその蛋白質構造予測 (*in Silico*) を行った結果、細胞膜タンパク質であった。今後、この mKIAA0620 遺伝子の全長 cDNA を利用して、同分子の機能解析を進めるとともに、その他の血管分化に関与すると予測される mKIAA 遺伝子群についても順次解析を行う予定である。

mKIAA0620 塩基配列をプローブとして用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法により、新生仔マウスに於ける網膜血管新生が惹起する際に、その血管新生の広がりを見出すがごとく新生血管にそって mKIAA0620 遺伝子発現、及び血管形成後には該遺伝子発現の消長が起こっていることを示し、mKIAA0620 遺伝子発現が網膜血管新生過程に関与する可能性を見出した。この遺伝子の機能解析のため、完全長 cDNA を以下の方法を駆使してクローニングした。

長鎖 cDNA といった対象テキスト配列が長い材料を哺乳動物のゲノム配列を高速検索できる超並列ゲノムコンパレータを使用し、公開済みのマウスゲノム配列からマウス mKIAA0620 に対する大規模・高速塩基配列検索を実施し、不完全長 mKIAA0620 cDNA 塩基配列（かずさ DNA 研究所より分与）に対し付加する配列に関わる情報を検索し、不完全長 mKIAA0620 アミノ酸配列に対し 5' に付加した 251 アミノ酸長のアミノ酸配列を取得するために必要なプライマー配列を設計した。設計した合成プライマーを用いることにより 5' 端塩基配列に対し付加する 753 塩基長の新規な塩基配列を、既存の分子生物学的手法を組み合わせることにより取得することに成功した。

取得した 753 塩基長の塩基配列を不完全長 mKIAA0620 cDNA に対し付加して作製した完全長 mKIAA0620 cDNA 塩基配列をもとに、遺伝子組換え法を用いて mKIAA0620 蛋白質の膜外部分をヒト IgG1Fc 断片と融合させ、融合蛋白質として培養細胞を用いて発現させた。

上記組換え培養細胞から精製した mKIAA0620-IgG1Fc 融合蛋白質を、網膜において血管新生が活発にみられる生後 1 週以内の新生仔マウス眼内部に注入したところ、数時間後には網膜新生血管内皮細胞の糸状足形成に変化が認められ、さらにその数日後には網膜血管網の正常な構築が著しく障害されていることを見いだした。これに対し、IgG1Fc 蛋白質のみの眼内注入では全く変化がみられなかった。これらの実験結果から、mKIAA0620 膜外可溶性蛋白質がそれと相互作用すると仮定されるリガンドと結合して、そのリガンドの働きを中和することにより正常な血管新生を阻害していることを示すことに成功した。また、この阻害実験の結果は、この分子が網膜血管新生において新生血管内皮細胞の糸状足形成過程に重要であることを示した。

この結果は、当プロジェクトが開発した「DNA マイクロアレイデータ解析システム」の有用性を示す証拠の 1 つとなった。

また、mKIAA0620 (遺伝子名) が血管増殖分化に関連することを見出し、新規遺伝子として両者で国内優先権主張特許出願を行っている。

mKIAA 0620 の全長 cDNA を利用して、この遺伝子がコードする蛋白質を哺乳類培養細胞 (HEK293 株) を使った強制発現系で合成することに成功した。組換え蛋白質は、ネイティブ蛋白質型と以下のタグ付き融合蛋白質ともに作製した。mKIAA0620-GFP-HisTag 融合蛋白質として強制発現可能な組換え培養細胞を作製することに成功した。また、mKIAA0620 蛋白質を mKIAA0620-V5 融合蛋白質可能な組換え培養細胞を作製することにも成功した。上記 安定的遺伝子導入細胞株を作製し、遺伝子導入した mKIAA0620 蛋白質が細胞膜分画に存在することウエスタンブロット法で確認した。これらは、研究用抗体作製を行

うため、抗体作製用材料または抗体の評価用に用いる予定である。

上記で述べた特許願 2003-371040 に於いては、新規ポリペプチド及びそれをコードするDNA配列、抗体、該DNA配列を使用した組換え細胞、動物、及びそれらを使用した測定キット、化合物のスクリーニング方法等についてクレームしてあるが、出願後に実施した研究によりDNA配列、遺伝子導入細胞、及び抗体について追加すべき新規な発見があり、また、本発明のポリペプチドを用いた網膜血管新生に関わる阻害実験から血管新生に関わる機能についても追加して実施例の記載が可能となったため、昨年度に引き続き国内優先権主張出願を行った。

mKIAA0620 分子に関しては、アミノ酸配列の 1,564 番目から 1,578 番目（アミノ酸配列：FLEEQAEEKRGISDPD）のペプチドを合成ペプチドとして作製し、その合成ペプチドを抗原としてウサギに免疫し、ウサギポリクローナル抗体を作製し評価した。すなわち、mKIAA0620 蛋白質を mKIAA0620-V5 融合蛋白質として強制発現させた組換え培養細胞から全蛋白質を抽出し、抽出した全蛋白質を電気泳動で分画し、作製したポリクローナル抗体を用いてウエスタンブロット法で抗体の反応性を調べた。その結果、mKIAA0620-V5 融合蛋白質の位置に明瞭なバンドが検出され、作製したポリクローナル抗体が目的とする mKIAA0620 蛋白質融合蛋白と反応し、本発明のポリクローナル抗体が mKIAA0620 蛋白質アミノ酸配列を検出するのに有用と判断された。当該ポリペプチドあるいはそれに対応する抗体は、予測される血管誘導因子を探索するためのツールとして有用である。

この遺伝子の全長 cDNA クローニング遺伝子配列解析とマウスを使った実験結果から、この分子は細胞膜結合タンパク質で、発生初期の血管形成時期において、新規血管内皮細胞特異的マーカーになるとともに新生マウス網膜血管新生評価モデルの結果、血管形成過程において、リガンド-受容体システムに関わる分子であることが判明した。

また、mKIAA 遺伝子群のうち mKIAA0620 遺伝子以外の候補クローンである mKIAA 1036 遺伝子も血管分化過程に関与する分子として予測し、その分子機能解析を進めた。マウス胎仔を使った *in situ* ハイブリダイゼーションの結果、E9.5、E10.5 日齢で branchial arch, apical ectodermal ridge area myotome, forelimb bud and hindlimb edge に強い発現シグナルが確認された。上記発現部位は、いずれも血管発生・新生が生じる部位であり、マウス発生ステージにおいても mKIAA 1036 分子が何らかの役割を果たしていることが推察された。実際、この遺伝子に関する論文が先日 他の研究グループによって報告され、血管内皮細胞由来の新規遺伝子”Vasohibin”と命名された。

学術的には遅れをとった形となり、非常に残念だが、この事例も当プロジェクトのデータベースとデータ解析システムの情報抽出精度の高さを証明する一例である。

3. 成 果

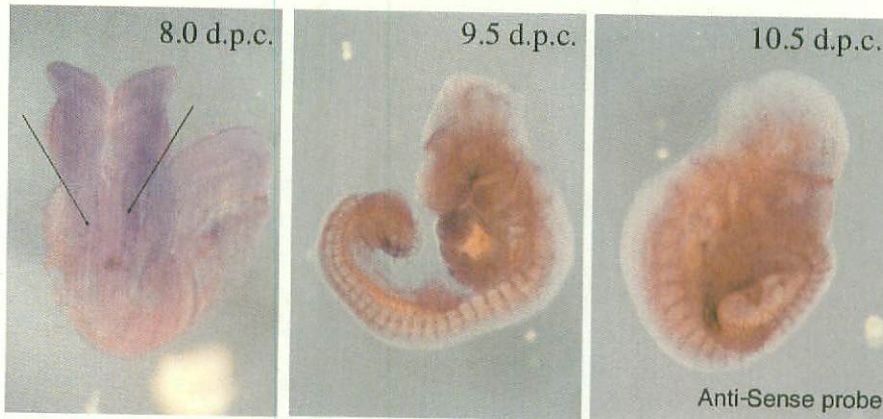
平成14年度末から千葉県地域結集型共同研究事業（かずさDNA研究所）と上記研究テーマについての共同研究を開始した。千葉県地域結集から提供されたマウス長鎖cDNAデータベースと当方のES細胞遺伝子発現データベースを利用した解析システムは、千葉県地域結集所有のmKIAA遺伝子群の中から、複数のmKIAA遺伝子が血管分化過程に関与することを見出した（*in silico*）。

昨年度は、そのうちのmKIAA0620（遺伝子名）が血管増殖分化に関連することを見出し、新規遺伝子とした両者によるPCT国際特許出願を終了した（特願2003-371040）。

4. 今後の展望

千葉県 CREATE ヘテーマの譲渡を行い、ヒトホモログ分子を使った研究へ移行し、この分子が新規血管再生療法のターゲット分子として適しているか否かの評価検討を行うとともに、その他 関連 想定疾患モデルの探索と動物モデルを使った治療薬開発・ツールとしての可能性を探る。

mKIAA 遺伝子のマウス胎仔発生過程における発現



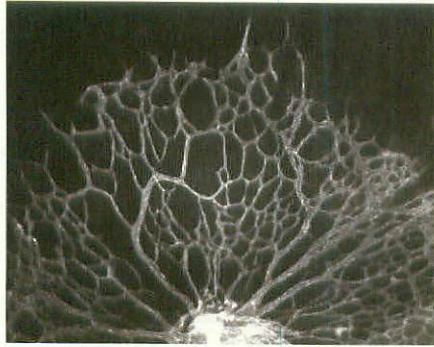
embryo (d.p.c.)	5.5	6.5	7.5	8.5	9.5
Flk1					
mKIAA遺伝子					
expression	-	+	+	+	+

RT-PCR
(35 cycles)

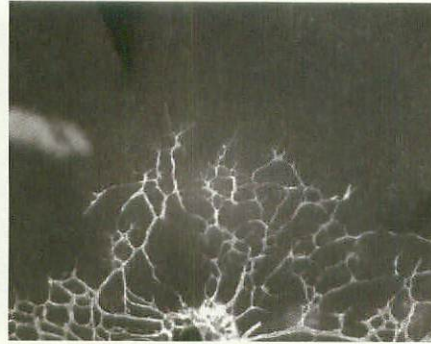
mK I A A分子の血管増殖・分化にかかわる機能解析
(機能新生仔マウス網膜血管新生モデルを用いた評価)

Retinal vessels at postnatal day 4 (PECAM staining)

intraocular injection at P1








Fc



mKIAA - Fc

血管発生・構築過程で働くリガンド/受容体システムと機能分子群

Stages of mouse embryo	Structure of vessel	Expression of Vascular markers (Receptor)	Expression of ligands
	 Egg		Activin FGF et.al
E8	 EC	Notch	Notch-L
		mKIAA Flk1	? VEGF
E9	 Primary vasculature	?	Egfl 7
		Flt 4 (VEGFR3)	VEGF-C (Ephrin-B2 / EphB4)
E11	 SMC	PDGFR β	PDGF-BB
		Tie2	Ang1
	Remodeling		
Birth	 Mature vasculature	TGF β R II	TGF- β I