

## 論文の内容の要旨

論文題目 Cre/loxP 遺伝子組換えにより SV40 tsA58 Large T 抗原が発現するトランスジェニックマウスの作成とその応用

指導教員 吉田進昭教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

病因病理学専攻

山口高志

## 背景と目的

組織の違いによる血管内皮細胞の性質の違いを明らかにするため、組織別の血管内皮細胞の簡便な培養システムが求められている。またリンパ管内皮細胞においては、その培養自体が非常に難しいことが知られている。

どの臓器のどんなに小さな組織からでも血管・リンパ管内皮細胞を簡便に培養するためには、不死化している事が有利であり、人工的な不死化の方法として SV40 由来の large T 抗原 (T Ag) および、その温度感受性変異体 tsA58 T Ag を発現させる方法が知られている。さらなる効率的な不死化細胞獲得をめざし、tsA58 T Ag を発現させるトランスジェニックマウスの作成の試みもなされたが、たとえ温度感受性変異体 tsA58 T Ag を使用したとしても、*in vivo* ではその機能が完全に抑制されることなく、腫瘍形成や発生異常が引き起こされるため、新たなトランスジェニックマウスラインの作成や維持に支障がある事が知られ

ている。

以上の背景から、単独では **tsA58 T Ag** 発現が完全に抑制され、必要に応じてその発現が誘導されるトランスジェニックマウスを作成する事、および、同トランスジェニックマウスを使用して、*in vivo*での性質をよく保存し、簡便かつ安定的な臓器・組織別の血管・リンパ管内皮細胞の供給・培養システムを確立することを目的とし、本研究を開始した。

## 方法と結果

まず、次のようなトランスジーンを作成した。ユビキタスに発現させることのできるプロモーターとして CAG プロモーターを使用し、その下流に、2 つの loxP 配列に挟まれた  $\beta$ geo cDNA および BGH polyA シグナル配列をスタッファーとして接続し、さらにその下流に **tsA58 T Ag** cDNA および PGK polyA シグナル配列を接続した。

このトランスジーンを用いてトランスジェニックマウスを作出した(名称 **T26** トランスジェニックマウス)。**T26** トランスジェニックマウスにおいては、スタッファーの  $\beta$ geo のみが発現し、**tsA58 T Ag** は発現しないため、発生および繁殖には問題がなかった。ここで血管・リンパ管内皮細胞特異的に Cre を発現するトランスジェニックマウスとして **Tie-2-Cre** トランスジェニックマウスを準備し (米国・ジャクソンラボラトリーより導入)、**T26** トランスジェニックマウスと交配した。このようにして作出された **T26/Tie-2-Cre** ダブルトランスジェニックマウスにおいては、全身の血管・リンパ管内皮細胞特異的に Cre/loxP 組換えが起き、それに伴う血管・リンパ管内皮細胞特異的 **tsA58 T Ag** の発現誘導が組織切片における免疫染色によって確認された。

**T26/Tie-2-Cre** ダブルトランスジェニックマウスの血管・リンパ管内皮細胞における **tsA58 T Ag** 発現の特異性が高かったため、組織を酵素処理し培養を続けるだけで、選択的に **tsA58 T Ag** 陽性の内皮細胞が増殖するものと考えた。そこで、組織を採取後、コラゲナーゼ処理を行い、33°C (**tsA58 T Ag** の活性化する温度) で 20-30 日培養を行ったところ、

tsA58 T Ag 陽性の細胞が選択的に増殖してきた。その後、これらの tsA58 T Ag 陽性の不死化細胞集団の中に多くの血管またはリンパ管内皮細胞が含まれることを、血管・リンパ管内皮細胞特異的に発現する遺伝子に対する RT-PCR と免疫染色によって確かめた。これらの不死化血管・リンパ管内皮細胞集団から、リンパ管内皮細胞を分離培養するべく Lyve-1 を対象とした MACS を行った。MACS による Lyve-1 陽性の細胞集団は、免疫染色及びウェスタンブロッティングによってリンパ管内皮細胞が濃縮されている事が確認された。同不死化リンパ管内皮細胞集団に発現する VEGFR-3 は VEGF-C に応答し、その細胞内チロシン残基がリン酸化され、細胞内にシグナル伝達が起きていることを MAPK のリン酸化をもって確認した。

**T26** トランスジェニックマウスの血管・リンパ管内皮細胞以外への応用の可能性を検討するため、CAG-Cre トランスジェニックマウスと交配し、全身で Cre/loxP 遺伝子組換えが起きた T26/CAG-Cre ダブルトランスジェニックマウスを作成した。同ダブルトランスジェニックマウス 16.5-18.5 日胚の組織切片を用い tsA58 T Ag に対する免疫染色をしたところ、広範囲の組織において tsA58 T Ag の発現が確認された。

## まとめ

- ① Cre/loxP 遺伝子組換えにより tsA58 T Ag が発現するトランスジェニックマウス (T26 トランスジェニックマウス) を作成した。
- ② T26/Tie-2-Cre ダブルトランスジェニックマウスにおいて、血管・リンパ管内皮細胞特異的な tsA58 T Ag の発現誘導に成功した。
- ③ T26/Tie-2-Cre ダブルトランスジェニックマウスの組織片から、*in vivo* の性質をよく保った不死化血管・リンパ管内皮細胞の簡便な培養法を確立した。
- ④ これらの不死化血管・リンパ管内皮細胞集団の両者を MACS を用いて分離することができた。また分離された不死化リンパ管内皮細胞に発現する VEGFR-3 は、VEGF-C に

応答し、細胞内チロシン残基がリン酸化された。

- ⑤ T26/CAG-Cre ダブルトランスジェニックマウスの広範囲の組織において、tsA58 T Ag の発現が確認された。このことから、さまざまな Cre 発現トランスジェニックマウスと組み合わせることで、さまざまな組織・細胞における特異的な tsA58 T Ag の発現を誘導し、さらにそれらを簡便に培養化できる可能性が考えられる。

### 結語

- ① 単独のトランスジェニックマウスラインにおいては tsA58 T Ag 発現が完全に抑制され、必要に応じて目的の組織・細胞で tsA58 T Ag の発現が誘導されるトランスジェニックマウスの作成に成功した。
- ② そのトランスジェニックマウスを使用して、*in vivo* での性質をよく保存し、かつ簡便で安定的な臓器・組織別の血管・リンパ管内皮細胞の供給・培養システムを確立した。