

200811004A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

: 生物資源・創薬モデル動物研究

血管病モデルマウスと血管新生
可視化マウスの資源化
(H19-生物資源-一般-004)

平成 20 年度 総括研究報告書

研究代表者 望月直樹

平成 21 (2009) 年 3 月

目 次

I 総括研究報告	
血管病モデルマウスと血管新生可視化マウスの資源化.....	1
望月 直樹	
II 分担研究報告	
1. FoxO 血管発現マウス血管可視化マウスの作製.....	5
望月 直樹	
2. ADAM ファミリー欠損マウスによる ADAM の機能解析に関する研究	
宮田 敏行	7
3. 遺伝子改変動物の作製と生物資源化.....	9
松田 潤一郎	
III 研究成果の刊行に関する一覧表.....	12
IV 研究成果の刊行物・別刷.....	13

血管病モデルマウスと血管新生可視化マウスの資源化

主任研究者 望月直樹 国立循環器病センター研究所 循環器形態部 部長

研究要旨 転写因子FoxOは強制発現では老化を誘導しなかった。血圧異常を示すマウスを作製し、生活習慣病の原因である高血圧の原因となる因子、治療の標的を見出すモデル動物を作製した。血小板減少性紫斑病の原因遺伝子ADAMTS13の機能が様々なドメインで調節されていることを突き止め、ずり応力依存性の抗血栓症の機能にはADAMTS13のカルボキシ末端が重要であることを明らかにした。公開資源総数(マウス)は94系統と昨年度に比べ倍増し、分譲を行うとともに保護預かりサービスなど利用者の多様な要望に応えたバンク運営を行った。

分担研究者

宮田 敏行 国立循環器病センター研究所
病因部 部長
松田潤一郎 医薬基盤研究所

A. 研究目的

国民病といっても過言ではない動脈硬化症、糖尿病、虚血性心疾患の臓器障害は、血管の生理的機能の破綻と考えられる。したがって、これらの血管病ともいえる状態の血管障害病態モデルを動物で作製し、新規薬剤の個体での薬効評価系として資することは今後の治療開発戦略として非常に重要である。特に血管可視化マウスでは、癌では血管新生の抑制効果の判定に、虚血性病変では血管新生促進効果を示す薬剤の判定に用いることも可能になる。本研究では、遺伝子改変マウスを作製し、これを資源化することを目指す。

医薬基盤研究所では、疾患研究や創薬研究に資するため実験動物研究資源バンクを設立し、疾患モデルマウスを中心に研究資源を収集し、高品質の資源として保存するとともに、研究者への提供を行っている。本研究では、国立循環器病センター研究所との共同研究により、血管病研究用モデルマウス等を医薬基盤研究所実験動物バンクにおいて生物資源として収集し、保存、品質管理を行い、研究者に迅速に安定的に供給する体制を構築することを目的とする。血管病モデル動物等を用いた研究が推進されることで、新規治療薬や予防法の開発に繋がり、国民の健康、福祉の一層の向上に寄与することが期待される。

B. 研究方法

血管内皮細胞特異的FoxO1発現マウスの寿命Rosa26に FoxO1-3A 変異(Aktによって燐酸化されるSer, Thrを Alaに置換し核外移行を阻害された変異体cDNAをloxP-neo-loxPの下流につなぐcDNAをもつ遺伝子改変マウスと血管内皮細胞特異的にCre recombinaseを発現するTie2-Creマウスを交配させた。

昨年このマウスを得たので本年度は、血管病変、寿命を検討した。

Ephxin1, Ephxin5 double KOマウスの作製

チロシンキナーゼEphA4受容体の下流でRhoファミリー分子を活性化化するEphxin ファミリーのノックアウトマウスを作製

Adamts13ノックアウトマウスによるAdamts13の個体での機能解明

Adamts13ノックアウトマウスは私達が作製した129型遺伝背景のものを用いた。C末端欠損ADAMTS13マウスは、B6マウスがC末端欠損ADAMTS13を発現しているため、B6マウスを129マウスに10世代掛けあわせ、遺伝背景が129型のマウスを作製して使用した。野生型マウスは129マウスを用いた。平板型フローチャンバーを用いた血小板血栓形成能、コラーゲン-エビネフリン静注による血小板数減少モデル、塩化鉄による微小血管傷害モデルは、既報にしたがって行った。

バンク機能の最適化

①血管病モデル動物等の収集と資源化及び分譲
国立循環器病センター研究所より昨年度寄託を受けたADAMTS13ノックアウトマウス(血栓性血小板減少性紫斑病モデル)、NDRG1ノックアウトマウス(Charcot-Marie-Tooth病モデル)、NDRG1floxedマウス(NDRG1コンディショナルノックアウト)の3系統、及び今年度新たに寄託を受けたADAMTS13ノックアウトマウスのC57BL/6コンジュニックマウスについて、医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクにて、EFS40による2細胞期胚凍結保存、及びR18S3による精子の凍結保存による資源化を引き続き行うとともに、研究者への分譲を行った。
②実験動物研究資源バンクの資源保存技術の改良
体外受精培地としてカルシウム5.1mMを含むHTFを用い、複数のBALB/c成熟雄から採取した精巣上体精子を用いて過排卵処理したBALB/c雌マウスから得た卵子と常法により体外受精した。さらにR18S3法による凍結・融解精子を用いた体外受精も行い、胚

移植により産仔を得た。

③実験動物研究資源バンクの運営と拡充

今年度はとくに凍結精子での保存、利用に力を入れるなど、効率良いバンクシステムの運用を進め、分譲可能な資源数の拡大に努めるとともに、利用者へのきめ細かな対応を行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は、それぞれ国立循環器病センター・医薬基盤研究所の動物実験委員会の承認を得た後に動物取り扱い規定を遵守して行った。また、動物愛護に配慮して、特に、実験中に動物に苦痛を与えないよう十分な麻酔薬を使用した。各施設の実験指針に従って適切な取り扱いを行った。

C. 研究結果

血管病モデル動物の作製

A. 血管内皮細胞特異的FoxO1発現マウスは血管・寿命の異常がおきない

昨年度の研究でCre+, FoxO1-3A+ のマウスがメンデルの法則に従い生まれることを報告した。このマウスを数ヶ月間飼育していても、野生型となら生存でも変化を生じなかった。組織学的にも血管病変の異常を示さなかったことから、ヘテロマウスの交配を行いメンデルの法則にしたがって、トランスジーンを持つマウスが生まれてきたことから、発生段階でのFoxO-3Aの発現は血管形成には異常を起ささないことがわかった。血管の形態学的検討でも大血管の走行や起始異常などは観察されず、肺血管も走行以上を認めなかった。また脳血管の分枝も正常であり、FoxO1の過剰発現による効果は発生・発育ともに大きな影響がないことがわかった。

B. Ephxin1 Ephxin5は血圧調節に重要

Ephxin1 KOマウスをHarvard Univ. Greenberg博士より、供与していただき我々のEphxin5 KOマウスと交配することによりEphxin1/5 ダブルKOマウスを作製した。Ephxin1, Ephxin5の単独欠損マウスでは血圧に異常を示さなかったが、ダブルKOマウスでは、野生型に比較して有意な血圧低下が観察できた。

C. ADAMTS13欠損マウスの血栓症における機能

ADAMTS13ノックアウトマウスのVWFマルチマーは、野生型マウスのマルチマーより高分子量で検出されたが、C末端欠損マウスのマルチマーは野生型マウスと同等の分子量分布を示した。またノックアウトマウスでは、細動脈のずり速度に相当する1000 s⁻¹にて測定した*in vitro*血小板血栓形成能が亢進していたが、C末端欠損マウスでは、野生型マウスとの違いは認められなかった。

C末端ドメイン欠損マウスの血栓形成能を、ずり速度5000 s⁻¹にて解析した。その結果、ADAMTS13ノック

アウトマウスだけでなくC末端欠損マウスにおいても血栓形成の亢進が観察された。また、塩化鉄血管傷害モデルを用いて、各マウスの*in vivo*血小板血栓形成能を解析した結果、ノックアウトマウスでは、傷害部位に直径30 μmの血栓が生じるまでの時間(血栓形成時間)および、血栓により血管が完全閉塞するまでの時間(血管閉塞時間)がいずれも顕著に短縮していた。一方、C末端欠損マウスの血栓形成時間は正常であったが、野生型マウスに比べて血栓成長が加速し、血管閉塞時間が短縮していた。

D. 血管病モデル動物等の収集と資源化及び分譲
ADAMTS13 KO マウス、NDRG1KO マウス、NDRG1floxed マウスのそれぞれについて凍結から、分譲を円滑に行えるようになった。(凍結胚の分譲については、海外(アメリカ)への分譲であり、ジャクソン研究所にドライシッパーにて凍結胚を送り、ジャクソン研究所が融解・移植し産仔を作出し、アメリカ国内の大学に輸送することで分譲依頼者に生体を渡すことが出来た。)

E. 実験動物研究資源バンクの資源保存技術の改良

Balb/cマウスでは複数の雄を用意して運動性の良い精子を選択して体外受精することにより受精率50-70%の安定した成績を得ることが出来た。また、BALB/cマウス凍結胚の融解-移植による生体への還元率は4-13%と低かったが、凍結精子を融解して体外受精に用いたところ、受精率は20%程度と低いものの、胚移植した場合は、産仔率が最大30%を示した。このことは、バンクとしての資源保存法として、BALB/cの場合は精子凍結が有効な手段となる可能性が示された。

D. 考察

FoxO1の過剰発現では、血管発生と血管の発育、さらには寿命に影響を与えないことがわかった。われわれは本研究を開始する時にFoxOにより制御される遺伝子が血管老化に促進的に作用すると仮説を立てたが、予想外の結果となった。Insulin抵抗性はまさしくInsulin--Insulin受容体によるAktの活性化に左右されるFoxOの核外移行の抑制が血管病変の根本原因ではないかと予想したが、FoxOが核内に恒常的に局在しても、血管病変が観察されないことから、Insulin抵抗性による血管病変はFoxO以外の分子による調節異常に起因すると考えるのが妥当と判断する結果となった。

Ephxin5が血管で発現することはノックアウト細胞でLacZが発現するようになったマウスを作製したために確認できた。Ephxin5はRhoの活性化能を持つことから、Rhoを介した血管平滑筋の収縮がephxin KOにより生じて、血圧が有意に低下したものと考えた。新たな血圧調節分子を見出すことができたので、低血圧モデルマウスとしての資源化できることになった。

ADAMTS13の血栓症における新たな機能を解明す

ることで本ノックアウトマウスの血栓症の病態解明に有用であることがわかった。ADAMTS13のC末端ドメインは生体内で起こる血栓形成を適切に抑制するために必要と考えられた。C末端ドメイン欠損ADAMTS13はVWF切断活性を有し、これを発現するマウスでも平常時のマルチマーサイズは正常に維持されると考えられた。C末端欠損マウスは、ずり速度 5000 s^{-1} にて高い血栓能を示し、塩化鉄血管傷害モデルでも血管閉塞時間が短縮していた。このことは、C末端欠損マウスでは、血栓が大きくなるにつれ血管内腔が狭まり、その結果生じる局所の超高速ずり速度の条件では、血小板血栓形成抑制機能が低下すると考えられた

国立循環器病センター研究所から血管病モデル動物等の収集と品質管理を含む資源化を行い、国内外に分譲することが出来た。今年度の分譲依頼の特徴として、国内外ともに凍結胚の提供が比較的多く(約3分の1)、その理由として微生物学的な清浄度を確実に保ちたいことや、動物輸送に伴う経費を削減出来ることなどがある。比較的多くの研究機関で胚操作が可能であることが背景として考えられる。今後、凍結胚あるいは凍結精子での分譲依頼が増大する可能性がある。

今年度、体外受精率が低く、胚凍結にも弱いBALB/cマウスの検討から、凍結精子が系統保存のためには有効であることを確認できた。動物資源バンクの安定的で効率良い運営のためには、精子凍結技術の向上とその動物資源バンクシステムにおける有効利用が期待される。

E. 結論

国立循環器病センター研究所より血栓性血小板減少性紫斑病のモデルマウスをはじめ、数種の血管病モデルマウスを寄託した。寄託したマウスも米国へ譲渡され使用された実績からもバンク機能が順調に機能していることを示した。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

研究業績「英文」

(1) Fukuhara S, Sako K, Minami T, Noda K, Kim HK, Kodam T, Shibuya M, Takakura N, Koh GY, and Mochizuki N. Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat. Cell Biol.* 10: 513-526, 2008

(2) Koyama T, Nakaoka Y, Fujio Y, Hirota H, Nishida K, Sugiyama S, Okamoto K, Yamauchi-Takahara K, Yoshimura M, Mochizuki S, Hori M, Hirano T, Mochizuki N. Interaction of scaffolding adaptor protein Gab1 with tyrosine phosphatase SHP2

negatively regulates IGF-I-dependent myogenic differentiation via the ERK1/2 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 283:24234-24244

(3) F. Banno, AK. Chauhan, K. Kokame, J. Yang, S. Miyata, DD. Wagner, T. Miyata: The distal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 are required for regulation of in vivo thrombus formation. *Blood*, 2008 Dec24. Epub ahead of print.

(4) F. Banno, T. Miyata: Biology of an antithrombotic factor-ADAMTS13. *Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis 2008*. K. Tanaka, E. W. Davie (Eds.) Y. Ikeda, S. Iwanaga, H. Saito, K. Sueishi (Associate Eds.) 162-176, Springer, Tokyo, 2008

(5) Sawada T, Tanaka A, Higaki K, Takamura A, Nanba E, Seto T, Maeda M, Yamaguchi E, Matsuda J, Yamano T. Intracerebral cell transplantation therapy for murine GM1 gangliosidosis. *Brain Dev* 2009 in press.

(6) Yamamoto Y, Ishino F, Kaneko-Ishino T, Shiura H, Uchio-Yamada K, Matsuda J, Suzuki O, and Sato K. Type 2 Diabetes Mellitus in a Non-Obese Mouse Model Induced by Meg1/Grb10 Overexpression. *Exp Anim* 57(4):385-395, 2008.

(7) Suzuki Y, Nanba E, Matsuda J, Higaki K, Oshima A. β -Galactosidase Deficiency (β -Galactosidosis): GM1 Gangliosidosis and Morquio B Disease. In *The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. eds. Valle D et al. Part 16: LYSOSOMAL DISORDERS Chapter 151 pp.1-101. Revised-July 2008. The McGraw-Hill Companies, 2008. <http://www.ommbid.com/>

学会発表

(1) 迫 圭輔, 福原 茂朋, 南 敬, 浜窪 隆雄, Haihua Song, 児玉 龍彦, 深水 昭吉, J. Silvio Gutkind, Gou Young Koh, 望月 直樹. Angiopoietin-1は、Phosphoinositide 3-Kinase/AKT/Myocyte Enhancer Factor 2経路を介してKrüppel-Like Factor 2の発現を誘導する 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会 (2008年 12月 神戸)

(2) 坂野史明、小亀浩市、奥田智彦、本田繁則、宮田茂樹、加藤恒、Anil K. Chauhan、富山佳昭、Denisa D. Wagner、宮田敏行、「血栓形成制御におけるADAMTS13とそのC末端ドメインの生理的意義」、第13回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会学術集会、平成20年8月22日-23日、豊中市

(3) 坂野史明、Anil K. Chauhan、小亀浩市、Denisa D. Wagner、宮田敏行、「生体内での血小板血栓形成制御におけるADAMTS13とそのC末端ドメインの重要性」、第70回日本血液学会総会、平成20年10月10日-12日、京都市

(4) 西尾健治、藤岡政行、福島英賢、坂野史明、小亀浩市、宮田敏行、奥地一夫、「ADAMTS13による脳虚血

再灌流障害抑制効果」、第36回日本救急医学会学術集会、平成20年10月13日～15日、札幌市

(5) K. Nishio, M. Fujioka, K. Hayakawa, K. Mishima, M. Fujiwara, F. Banno, K. Kokame, T. Miyata, Y. Shida, M. Sugimoto, H. Fukushima, and K. Okuchi:

ADAMTS13 gene deletion aggravates ischemic brain damage, Oral Session, Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), 112: 260, **51st ASH Annual Meeting and Exposition**, December 6-9, 2008, San Francisco, USA

(6) 松田潤一郎、小浦美奈子、野口洋子、中村和臣、鈴木治、「医薬基盤研究所 実験動物研究資源バンクの活動紹介」、関西実験動物研究会第100回記念大会、京都、2008年12月5日

(7) Suzuki O, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Comparison of ovarian luteinizing hormone receptors among mouse strains. 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Francisco, CA, USA (第48回アメリカ細胞生物学会年次総会、2008年12月13-17日)

(8) Suzuki O, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Differential solubility analysis of fractionated heart proteins in laboratory animals. Experimental Biology 2008, San Diego, CA, USA (実験生物学、2008年4月5-9日)

3. その他

- 1) 松田潤一郎、医薬基盤研究所の生物資源研究紹介「実験動物」、「循環器病の研究を支える生物資源」(平成20年度厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業 研究成果等普及啓発事業)、豊中、2008年11月19日

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

FoxO血管発現マウス血管可視化マウスの作製

分担研究者 望月直樹 国立循環器病センター研究所 循環器形態部 部長

研究要旨 恒常的核内移行型転写因子FoxOを血管内皮細胞に発現させても、血管の老化がおきないことがわかった。生活習慣病モデルマウスとして新たに血圧調節異常を呈するマウスを作製した。

A. 研究目的

国民病といっても過言ではない動脈硬化症、糖尿病、虚血性心疾患の臓器障害は、血管の生理的機能の破綻と考えられる。また、死因の第一位を占める癌の増殖、転移に重要な血管構築を可視化することで病態を理解することも重要であると考へ本研究を計画した。生活習慣病、癌いずれも血管病変がその病態のかなめとなっているために、血管障害病態モデルを動物で作製し、新規薬剤の個体での薬効評価系として資すること、血管に直接作用して血管新生の抑制を検討可能なマウスを作製することを目標としている。本研究では、血管老化を制御する転写因子FoxOを標的としてまず血管病のモデルとなりうるかを判定して、もし血管老化促進モデルとなるようならば、資源化する。さらに、ほかの生活習慣病モデルマウスの作製を試みる。

B. 研究方法

血管内皮細胞特異的FoxO1発現マウスの寿命
Rosa26に FoxO1-3A 変異 (Aktによって磷酸化されるSer, Thrを Alaに置換し核外移行を阻害された変異体cDNAをloxP-neo-loxPの下流につなぐcDNAをもつ遺伝子改変マウスと血管内皮細胞特異的にCre recombinaseを発現するTie2-Creマウスを交配させた。昨年このマウスを得たので本年度は、血管病変、寿命を検討した。

Ephexin1, Ephexin5 double KOマウスの作製

チロシンキナーゼEphA4受容体の下流でRhoファミリー分子を活性化するEphexin ファミリーのノックアウトマウスを作製

組織学的検討

血管病変の検討は、通常ホルマリン固定のパラフィン包埋により組織切片を作製して、control マウスとの比較を行った。FoxOの発現はFoxOにFLAG タグが付加してあるために、anti-FLAG抗体を用いて、蛋白質の発現をimmunoblotと組織染色で確認した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立循環器病センターの動物実験委員会の承認を得た後に動物取り扱い規定を遵守して行った。また、動物愛護に配慮して、特に、実験中に動物に苦痛を与えないよう十分な麻酔薬を使用した。

C. 研究結果

血管内皮細胞特異的FoxO1発現マウスは血管・寿命の異常がおきない

昨年度の研究でCre+, FoxO1-3A+ のマウスがメンデルの法則に従い生まれることを報告した。このマウスを数ヶ月間飼育していても、野生型となら生存でも変化を生じなかった。組織学的にも血管病変の異常を示さなかったことから、ヘテロマウスの交配を行いメンデルの法則にしたがって、トランスジーンを持つマウスが生まれてきたことから、発生段階でのFoxO-3Aの発現は血管形成には異常を起こさないことがわかった。血管の形態学的検討でも大血管の走行や起始異常などは観察されず、肺血管も走行以上を認めなかった。また脳血管の分枝も正常であり、FoxO1の過剰発現による効果は発生・発育ともに大きな影響がないことがわかった。

同時に並行していた心臓特異的発現FoxO1-3Aマウス(MHC-Cre との交配) で得た心臓組織ではanti-FLAG抗体によりFoxOの発現が確認できたことからFoxO1-3Aマウスのトランスジーンは正常に発現していることが確認できた。

Ephexin1 Ephexin5は血圧調節に重要

Ephexin1 KOマウスをHarvard Univ. Greenberg博士より、供与していただき我々のEphexin5 KOマウスと交配することによりEphexin1/5 ダブルKOマウスを作製した。Ephexin1, Ephexin5の単独欠損マウスでは血圧に異常を示さなかったが、ダブルKOマウスでは、野生型に比較して有意な血圧低下が観察できた。

D. 考察

FoxO1の過剰発現では、血管発生と血管の発育、さらには寿命に影響を与えないことがわかった。われわれは本研究を開始する時にFoxOにより制御される遺伝子が血管老化に促進的に作用すると仮説を立てたが、予想外の結果となった。

Insulin抵抗性はまさしくInsulin--Insulin受容体によるAktの活性化に左右されるFoxOの核外移行の抑制が血管病変の根本原因ではないかと予想したが、FoxOが核内に恒常的に局在しても、血管病変が観察されないことから、Insulin抵抗性による血管病変はFoxO以外の分子による調節異常に起因すると考えるのが妥当と判断する結果となった。

Insulinシグナルとは異なり、StressシグナルはFoxOの核内移行を促進してstressに対応するための分子の発現を誘導することが知られているが、これがFoxOの核内恒常的発現でつねに誘導されていた可能性もあり、詳細な検討が必要であった。しかし、表現型として異常を示さなかったのでさらなる分子機序の解明には着手せず、新たな生活習慣病モデルマウスの開発に着手した。

Ephexin5が血管で発現することはノックアウト細胞でLacZが発現するようになったマウスを作製したために確認できた。EphexinはRhoの活性化能を持つことから、Rhoを介した血管平滑筋の収縮がephexin KOにより生じて、血圧が有意に低下したものと考えた。新たな血圧調節分子を見出すことができたので、低血圧モデルマウスとしての資源化できることになった。

E. 結論

FoxO1の過剰発現では血管内皮細胞の老化促進作用はない。Ephexinは昇圧作用があることをノックアウトマウスで明かにした。低血圧マウスとしての資源化が可能となった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(研究業績「英文」)

【原著】

(1) Fukuhara S, Sako K, Minami T, Noda K, Kim HK, Kodam T, Shibuya M, Takakura N, Koh GY, and Mochizuki N. Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1. *Nat. Cell Biol.* 10: 513-526, 2008

(2) Koyama T, Nakaoka Y, Fujio Y, Hirota H,

Nishida K, Sugiyama S, Okamoto K, Yamauchi-Takahara K, Yoshimura M, Mochizuki S, Hori M, Hirano T, Mochizuki N. Interaction of scaffolding adaptor protein Gab1 with tyrosine phosphatase SHP2 negatively regulates IGF-I-dependent myogenic differentiation via the ERK1/2 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 283:24234-24244

【学会発表】

(1) 迫 圭輔, 福原 茂朋, 南 敬, 浜窪 隆雄, Haihua Song, 児玉 龍彦, 深水 昭吉, J. Silvio Gutkind, Gou Young Koh, 望月 直樹. Angiopoietin-1は、Phosphoinositide 3-Kinase/AKT/Myocyte Enhancer Factor 2経路を介してKrüppel-Like Factor 2の発現を誘導する 第31回日本分子生物学会年会 第81回日本生化学会大会 (2008年 12月 神戸)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

ADAM ファミリー欠損マウスによるADAMの機能解析に関する研究

分担研究者 宮田敏行 国立循環器病センター研究所 病因部 部長
研究協力者 小亀浩市 国立循環器病センター研究所 脈管生理部 室長
研究協力者 坂野史明 国立循環器病センター研究所 脈管生理部 室員

研究要旨 血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)の原因遺伝子であるADAMTS13はマルチドメイン構造を有するZn金属プロテアーゼであり、血中で超高分子量フォンビルブランド因子重合体(UL-VWF)を低分子量化することで血小板血栓を抑制している。私達はマウスモデルを用いて、C末端ドメインが欠損しているADAMTS13はUL-VWFを低分子量化する能力を保有しているものの、高ずり応力が生じる病的血栓状態では、抗血栓能が低下していることを明らかにした。このことは、TTPの治療目的で開発されている組み換えADAMTS13に対して、重要な知見と考えられた。

A. 研究目的

血栓症は国民の健康の大きな不安要因であり、安心・安全な生活を送るため、血栓症制圧に向けた研究を進めているところである。血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)は、先天性もしくは後天性にADAMTS13活性がゼロ近くにまで減少することにより、血小板凝集能が高い超高分子量フォンビルブランド因子重合体(UL-VWF)が血中に蓄積する結果、腎や脳の微小血管に血小板血栓が誘発され死に至る疾患である。私達はTTPのモデル動物としてAdamts13ノックアウトマウスを作製したが、予想に反して、ノックアウトマウスはTTPを発症せず、シガ毒素などの刺激が重なる場合だけTTPを発症した。私達はAdamts13ノックアウトマウスを作製する過程で、マウスでは系統特異的にC末端領域を欠いたADAMTS13を発現することを見出した。そこで、今年度はマウスの遺伝背景を129型にそろえ、野生型(全長ADAMTS13)、C末端欠損型、ノックアウトの3種のマウスの血栓能を評価した。

B. 研究方法

Adamts13ノックアウトマウスは私達が作製した129型遺伝背景のものを用いた。C末端欠損ADAMTS13マウスは、B6マウスがC末端欠損ADAMTS13を発現しているため、B6マウスを129マウスに10世代掛けあわせ、遺伝背景が129型のマウスを作製して使用した。野生型マウスは129マウスを用いた。平板型フローチャンバーを用いた血小板血栓形成能、コラーゲン-エビネフリン静注に

よる血小板数減少モデル、塩化鉄による微小血管傷害モデルは、既報にしたがって行った。

(倫理面への配慮)

動物実験は、国立循環器病センターの動物実験委員会の承認を得た後に動物取り扱い規定を遵守して行った。また、動物愛護に配慮して行った。特に、実験中に動物に苦痛を与えないよう十分な麻酔薬を使用した。動物の提供システムについては生物の多様性確保に関する法律を遵守して、遺伝子改変動物の取り扱いには厳重に注意した。

C. 研究結果

ADAMTS13ノックアウトマウスのVWFマルチマーは、野生型マウスのマルチマーより高分子量で検出されたが、C末端欠損マウスのマルチマーは野生型マウスと同等の分子量分布を示した。またノックアウトマウスでは、細動脈のずり速度に相当する1000 s^{-1} にて測定した*in vitro*血小板血栓形成能が亢進していたが、C末端欠損マウスでは、野生型マウスとの違いは認められなかった。

VWFは血流が速く、高ずり応力が発生する環境下での血小板血栓形成に不可欠な分子であり、VWFの血小板凝集活性は、ずり速度の上昇に伴って亢進することが知られている。またADAMTS13によるVWFマルチマーの切断も、ずり速度の上昇によって亢進する。そこで、C末端ドメイン欠損マウスの血栓形成能を、ずり速度5000 s^{-1} にて解析した。その結果、ADAMTS13ノックアウトマウスだけでなくC末端欠損マウスにおいても血栓形成の亢進が観察された。また、塩化鉄血管傷害モデルを用いて、

各マウスの *in vivo* 血小板血栓形成能を解析した結果、ノックアウトマウスでは、傷害部位に直径30 μm の血栓が生じるまでの時間(血栓形成時間)および、血栓により血管が完全閉塞するまでの時間(血管閉塞時間)がいずれも顕著に短縮していた。一方、C末端欠損マウスの血栓形成時間は正常であったが、野生型マウスに比べて血栓成長が加速し、血管閉塞時間が短縮していた。

さらに、コラーゲン-エピネフリン投与により全身性に血栓形成を惹起した場合、処置後に観察される消費性血小板減少はノックアウトマウスで最も顕著であり、C末端欠損マウスでも野生型マウスより顕著であった。

D. 考察

C末端欠損マウスのVWFマルチマーは、野生型マウスのVWFマルチマーと違いを認められなかった。このことは、C末端ドメイン欠損ADAMTS13はVWF切断活性を有し、これを発現するマウスでも平常時のマルチマーサイズは正常に維持されると考えられた。C末端欠損マウスは、ずり速度5000 s^{-1} にて高い血栓能を示し、塩化鉄血管傷害モデルでも血管閉塞時間が短縮していた。このことは、C末端欠損マウスでは、血栓が大きくなるにつれ血管内腔が狭まり、その結果生じる局所の超高ずり速度の条件では、血小板血栓形成抑制機能が低下すると考えられた。ADAMTS13のC末端ドメインは生体内で起こる血栓形成を適切に抑制するために必要と考えられた。

E. 結論

ADAMTS13のC末端ドメインは高ずり応力下でのVWFマルチマーの切断に寄与しており、特に血管障害部位での過剰血小板血栓形成を効率よく抑制する上で、重要な役割を担うと考えられた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

(研究業績「英文」)

【原著】

F. Banno, A.K. Chauhan, K. Kokame, J. Yang, S. Miyata, D.D. Wagner, T. Miyata: The distal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 are required for regulation of *in vivo* thrombus formation. **Blood**, 2008 Dec24. Epub ahead of print.

【総説】

F. Banno, T. Miyata: Biology of an antithrombotic factor-ADAMTS13. **Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis 2008**. K. Tanaka, E. W. Davie (Eds.) Y. Ikeda, S. Iwanaga, H. Saito, K. Sueishi (Associate Eds.) 162-176, Springer, Tokyo, 2008

学会発表

(1) 坂野史明、小亀浩市、奥田智彦、本田繁則、宮田茂樹、加藤恒、Anil K. Chauhan、富山佳昭、Denisa D. Wagner、宮田敏行、「血栓形成制御におけるADAMTS13とそのC末端ドメインの生理的意義」、第13回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター学会学術集会、平成20年8月22日-23日、豊中市

(2) 坂野史明、Anil K. Chauhan、小亀浩市、Denisa D. Wagner、宮田敏行、「生体内での血小板血栓形成制御におけるADAMTS13とそのC末端ドメインの重要性」、第70回日本血液学会総会、平成20年10月10日-12日、京都市

(3) 西尾健治、藤岡政行、福島英賢、坂野史明、小亀浩市、宮田敏行、奥地一夫、「ADAMTS13による脳虚血再灌流障害抑制効果」、第36回日本救急医学会学術集会、平成20年10月13日-15日、札幌市

(4) K. Nishio, M. Fujioka, K. Hayakawa, K. Mishima, M. Fujiwara, F. Banno, K. Kokame, T. Miyata, Y. Shida, M. Sugimoto, H. Fukushima, and K. Okuchi:

ADAMTS13 gene deletion aggravates ischemic brain damage, Oral Session, Blood (ASH Annual Meeting Abstracts), 112: 260, **51st ASH Annual Meeting and Exposition**, December 6-9, 2008, San Francisco, USA

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他 なし

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）
分担研究報告書

血管病モデルマウスと血管新生可視化マウスの資源化
分担項目：遺伝子改変動物の作製と生物資源化

分担研究者 松田潤一郎 独立行政法人医薬基盤研究所 生物資源研究部 研究リーダー

研究要旨

医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクは、疾患研究・創薬研究用疾患モデルバンクとして整備を進め、血管病の研究、治療法開発等に資するため次のことを行った。（１）国立循環器病センター研究所より寄託を受けた４系統の血管病等の疾患モデルマウスの凍結胚及び凍結精子の作製と品質管理を行い資源化するとともに国内外に分譲した。（２）体外受精率が低く、胚凍結にも弱い BALB/c マウスの凍結精子利用について検討し、凍結精子が系統保存のためには有効であることを示した。（３）凍結精子保存等により効率良く資源化を行い、公開資源総数（マウス）は 94 系統と昨年度に比べ倍増し、分譲を行うとともに保護預かりサービスなど利用者の多様な要望に応えたバンク運営を行った。

A. 研究目的

医薬基盤研究所では、疾患研究や創薬研究に資するため実験動物研究資源バンクを設立し、疾患モデルマウスを中心に研究資源を収集し、高品質の資源として保存するとともに、研究者への提供を行っている。本研究では、国立循環器病センター研究所との共同研究により、血管病研究用モデルマウス等を医薬基盤研究所実験動物バンクにおいて生物資源として収集し、保存、品質管理を行い、研究者に迅速に安定的に供給する体制を構築することを目的とする。血管病モデル動物等を用いた開発が推進されることで、新規治療薬や予防法の開発に繋がり、国民の健康、福祉の一層の向上に寄与することが期待される。

今年度は、血管病モデル動物等の収集と資源化を引き続き行うとともに、実験動物研究資源バンクを拡充し、国内外への分譲を行った。さらに、実験動物研究資源バンクの資源保存技術の改良として、体外受精率が低く、胚が凍結操作にも弱い BALB/c マウスを例にして、体外受精率の向上や凍結融解精子を用いた産仔復元率の向上を目指した。

B. 研究方法

1) 血管病モデル動物等の収集と資源化及び分譲

国立循環器病センター研究所より昨年度寄託を受けた ADAMTS13 ノックアウトマウス（血栓性血小板減少性紫斑病モデル）、NDRG1 ノックアウトマウス（Charcot-Marie-Tooth 病モデル）、NDRG1 floxed マウス（NDRG1 コンディショナルノックアウト）の 3 系統、及び今年度新たに寄託を受けた ADAMTS13 ノックアウトマウスの C57BL/6 コンジェニックマウスについて、医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクにて、EFS40 による 2 細胞期胚凍結保存、及び R18S3 による精子の凍結保存による資源化を引き続き行うとともに、研究者への分譲を行った。

2) 実験動物研究資源バンクの資源保存技術の改良

体外受精培地としてカルシウム 5.1mM を含む HTF

を用い、複数の BALB/c 成熟雄から採取した精巣上体精子を用いて過排卵処理した BALB/c 雌マウスから得た卵子と常法により体外受精した。さらに R18S3 法による凍結・融解精子を用いた体外受精も行い、胚移植により産仔を得た。

3) 実験動物研究資源バンクの運営と拡充

2006 年 11 月に事業を開始した医薬基盤研究所実験動物研究資源バンクは、2 年が経過し、創薬・疾患研究への貢献を目指した厚生労働省のバンクとして、引き続き、有用なマウス系統の収集、保存、供給、情報発信、マウス資源の保護預かりなどを行っている。今年度はとくに凍結精子での保存、利用に力を入れるなど、効率良いバンクシステムの運用を進め、分譲可能な資源数の拡大に努めるとともに、利用者へのきめ細かな対応を行った。

（倫理面への配慮）

動物実験については、動物実験委員会の承認を得、適切な取り扱いを行った。

C. 研究結果

1) 血管病モデル動物等の収集と資源化及び分譲

① ADAMTS13 ノックアウトマウスについては、体外受精が困難であるので引き続き自然交配により 2 細胞期胚を得、凍結保存し、品質管理として一部は融解・移植し、目的の遺伝子を持つマウスを得ることができた（現在保存胚数：516 個）。② NDRG1 ノックアウトマウスについては、凍結胚分譲 2 件、生体分譲 1 件を実施した。凍結胚の分譲については、海外（アメリカ）への分譲であり、ジャクソン研究所にドライシッパーにて凍結胚を送り、ジャクソン研究所が融解・移植し産仔を作出し、アメリカ国内の大学に輸送することで分譲依頼者に生体を渡すことが出来た。③ NDRG1 floxed マウスについては、寄託を受けた凍結胚を融解・胚移植により得た雄マウスが成熟した時点で精巣上体精子を採取して体外受精を行い、2 細胞期胚を得て凍結し（398 個）、合わせて精子凍結も行った。④ 今年度の新規寄託である ADAMTS13 ノックアウト

マウス (C57BL/6 コンジェニックマウス) については、雄2匹の寄託を受け、体外受精にて536個の2細胞胚を得て、凍結保存し、品質管理としてその一部を融解-移植し目的の遺伝子を持つ産仔を得ることが出来た。さらに精子の凍結保存も行った。

2) 実験動物研究資源バンクの資源保存技術の改良

BALB/c マウスの体外受精成績は、個体毎のばらつきが大きい。今回、複数の雄を用意して運動性の良い精子を選択して体外受精することにより受精率50-70%の安定した成績を得ることが出来た。また、BALB/c マウス凍結胚の融解-移植による生体への復元率は4-13%と低かったが、凍結精子を融解して体外受精に用いたところ、受精率は20%程度と低いものの、胚移植した場合は、産仔率が最大30%を示した。このことは、バンクとしての資源保存法として、BALB/c の場合は精子凍結が有効な手段となる可能性が示された。

3) 実験動物研究資源バンクの運営と拡充

今年度はNDRG1 floxed マウスとADAMTS13 ノックアウトマウス (C57BL/6 コンジェニックマウス) を含む47系統について、ホームページ上に新たに分譲可能な系統として公開した。とくに凍結精子での資源の保存や凍結精子による体外受精系の利用等により、効率良く資源化を行った。公開資源総数は94系統となり、昨年度の47系統に比べ順調に増え、倍増した。また今年度は、疾患モデルを中心に24件の分譲を実施するとともに、現在さらに10件以上の分譲依頼を受け対応している。保護預かりなどのサポートサービスの件数も順調に増大し、多様なサービスで利用者の要望に応えることが出来た。今年度は海外からの依頼があり、NDRG1 ノックアウトマウスの2件を含む3件の海外 (アメリカ) 分譲を実施した。バンクのホームページには、既設の罹患臓器別、疾患別の動物リストに加えて、対象遺伝子を元にした動物モデルのリストを追加し利用者の利便性の向上を図った。バンクホームページへの月間訪問者数は昨年度末の3月(4736人)に比べ着実に増加し、本年度1月の時点で5955人であった。

D. 考察

医業基盤研究所実験動物研究資源バンクは、疾患研究・創薬研究用疾患モデルバンクとして整備を進め今年度、分譲可能な公開系統数や利用者数が順調に増大し事業の拡大を行った。今回、国立循環器病センター研究所から血管病モデル動物等の収集と品質管理を含む資源化を行い、国内外に分譲することが出来た。今年度の分譲依頼の特徴として、国内外ともに凍結胚の提供が比較的多く(約3分の1)、その理由として微生物学的な清浄度を確実に保ちたいことや、動物輸送に伴う経費を削減出来ることなどがある。また、比較的多くの研究機関などで胚操作が可能となってきたことが背景として考えられる。今後、凍結胚あるいは凍結精子での分譲依頼が増大する可能性が

ある。基盤研究動物資源バンクで凍結保存した胚を用い、他機関で生体作出に成功していることから、現在の我々の凍結胚の品質に問題はないが、今後、凍結胚の品質管理がより重要になってくると思われる。

今年度、体外受精率が低く、胚凍結にも弱いBALB/c マウスの検討から、凍結精子が系統保存のためには有効であることが示された。動物資源バンクの安定的で効率良い運営のためには、精子凍結技術の向上とその動物資源バンクシステムにおける有効利用が期待される。

今後、基盤研究実験動物研究資源バンク事業の安定的な運営と拡充により、研究者がより利用しやすいバンクを構築することで、血管病の研究を始めとして、疾患研究・治療薬開発などが進展するものと期待される。

E. 結論

医業基盤研究所実験動物研究資源バンクは、疾患研究・創薬研究用疾患モデルバンクとして整備を進め、血管病の研究、治療法開発等に資するため次のことを行った。(1) 国立循環器病センター研究所より寄託を受けた4系統の血管病等の疾患モデルマウスの凍結胚及び凍結精子の作製と品質管理を行い資源化するとともに国内外に分譲した。(2) 体外受精率が低く、胚凍結にも弱いBALB/c マウスの凍結精子利用について検討し、凍結精子が系統保存のためには有効であることを示した。(3) 凍結精子保存等により効率良く資源化を行い、公開資源総数(マウス)は94系統と昨年度に比べ倍増し、分譲を行うとともに保護預かりサービスなど利用者の多様な要望に応えたバンク運営を行った。

F. 健康危険情報

該当無し。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sawada T, Tanaka A, Higaki K, Takamura A, Nanba E, Seto T, Maeda M, Yamaguchi E, Matsuda J, Yamano T. Intracerebral cell transplantation therapy for murine GM1 gangliosidosis. *Brain Dev* 2009 in press.
- 2) Yamamoto Y, Ishino F, Kaneko-Ishino T, Shiura H, Uchio-Yamada K, Matsuda J, Suzuki O, and Sato K. Type 2 Diabetes Mellitus in a Non-Obese Mouse Model Induced by Meg1/Grb10 Overexpression. *Exp Anim* 57(4):385-395, 2008.
- 3) Suzuki Y, Nanba E, Matsuda J, Higaki K, Oshima A. β -Galactosidase Deficiency (β -Galactosidosis): GM1 Gangliosidosis and Morquio B Disease. In *The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease*. eds. Valle D et al. Part 16: LYSOSOMAL DISORDERS Chapter 151 pp.1-101. Revised-July 2008. The McGraw-Hill Companies, 2008. <http://www.ommbid.com/>

2. 学会発表

- 1) 松田潤一郎、小浦美奈子、野口洋子、中村和臣、鈴木治、「医薬基盤研究所 実験動物研究資源バンクの活動紹介」、関西実験動物研究会第100回記念大会、京都、2008年12月5日
- 2) Suzuki O, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Comparison of ovarian luteinizing hormone receptors among mouse strains. 48th Annual Meeting of the American Society for Cell Biology, San Francisco, CA, USA (第48回アメリカ細胞生物学会年次総会、2008年12月13-17日)
- 3) Suzuki O, Koura M, Takano K, Noguchi Y, Uchio-Yamada K, Matsuda J. Differential solubility analysis of fractionated heart proteins in laboratory animals. Experimental Biology 2008, San Diego, CA, USA (実験生物学、2008年4月5-9日)

3. その他

- 1) 松田潤一郎、医薬基盤研究所の生物資源研究紹介「実験動物」、「循環器病の研究を支える生物資源」(平成20年度厚生労働科学研究費補助金創薬基盤推進研究事業 研究成果等普及啓発事業)、豊中、2008年11月19日

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当無し

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Fukuhara S, Sako K, Minami T, Noda K, Kim HK, Kodam T, Shibuya M, Takakura N, Koh GY, and Mochizuki N.	Differential function of Tie2 at cell-cell contacts and cell-substratum contacts regulated by angiopoietin-1.	Nat. Cell Biol.	10	513-526	2008
Koyama T, Nakaoka Y, Fujio Y, Hirota H, Nishida K, Sugiyama S, Okamoto K, Yamauchi-Takahara K, Yoshimura M, Mochizuki S, Hori M, Hirano T, Mochizuki N.	Interaction of scaffolding adaptor protein Gab1 with tyrosine phosphatase SHP2 negatively regulates IGF-I-dependent myogenic differentiation via the ERK1/2 signaling pathway.	J. Biol. Chem.	283	24234-24244	2008
F. Banno, AK. Chauhan, K. Kokame, J. Yang, S. Miyata, DD. Wagner, T. Miyata: The distal	The distal carboxyl-terminal domains of ADAMTS13 are required for regulation of in vivo thrombus formation.	Blood	Epub ahead of print.		2009
F. Banno, T. Miyata	Biology of an antithrombotic factor-ADAMTS13.	Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis		162-176	2008
Sawada T, Tanaka A, Higaki K, Takamura A, Nanba E, Seto T, Maeda M, Yamaguchi E, Matsuda J, Yamano T.	Intracerebral cell transplantation therapy for murine GM1 gangliosidosis.	Brain Dev	In press		2009
Yamamoto Y, Ishino F, Kaneko-Ishino T, Shiura H, Uchio-Yamada K, Matsuda J, Suzuki O, and Sato K.	Type 2 Diabetes Mellitus in a Non-Obese Mouse Model Induced by Meg1/Grb10 Overexpression.	Exp Anim	57(4)	385-395	2008
Suzuki Y, Nanba E, Matsuda J, Higaki K, Oshima A.	β -Galactosidase Deficiency (β -Galactosidosis): GM1 Gangliosidosis and Morquio B Disease. In The Online Metabolic & Molecular Bases of Inherited Disease. eds. Valle D et al. Part 16: LYSOSOMAL DISORDERS Chapter 151 pp.1-101.	Revised-July	http://www.ommbid.com/		2008

Differential function of Tie2 at cell–cell contacts and cell–substratum contacts regulated by angiopoietin-1

Shigetomo Fukuhara^{1,6}, Keisuke Sako¹, Takashi Minami², Kazuomi Noda¹, Hak Zoo Kim³, Tatsuhiko Kodama², Masabumi Shibuya⁴, Nobuyuki Takakura⁵, Gou Young Koh³ and Naoki Mochizuki^{1,6}

Tie2 belongs to the receptor tyrosine kinase family and functions as a receptor for Angiopoietin-1 (Ang1). Gene-targeting analyses of either *Ang1* or *Tie2* in mice reveal a critical role of Ang1–Tie2 signalling in developmental vascular formation. It remains elusive how the Tie2 signalling pathway plays distinct roles in both vascular quiescence and angiogenesis. We demonstrate here that Ang1 bridges Tie2 at cell–cell contacts, resulting in *trans*-association of Tie2 in the presence of cell–cell contacts. In clear contrast, in isolated cells, extracellular matrix-bound Ang1 locates Tie2 at cell–substratum contacts. Furthermore, Tie2 activated at cell–cell or cell–substratum contacts leads to preferential activation of Akt and Erk, respectively. Microarray analyses and real-time PCR validation clearly show the differential gene expression profile in vascular endothelial cells upon Ang1 stimulation in the presence or absence of cell–cell contacts, implying downstream signalling is dependent upon the spatial localization of Tie2.

Vascular development is coordinated by endothelial-specific receptor tyrosine kinases and their ligands: vascular endothelial growth factor (VEGF)–VEGF-receptor (VEGFR), ephrin–Eph receptor, and angiopoietin (Ang)–Tie receptor¹. The Tie1 and Tie2 receptors constitute the Tie receptor family. Gene-targeting analyses have revealed the essentiality of these vascular endothelial receptor tyrosine kinases for vascular formation². Even after the establishment of vascular network, neovessel formation is observed in ischemic diseases and tumours.

Tie2 maintains the vascular integrity of mature vessels by enhancing endothelial barrier function^{3–6} and inhibiting apoptosis of endothelial cells^{7–9}. Tie2 functions as a receptor for Ang family proteins (Ang1–4). Mice overexpressing Ang1 develop vessels resistant to inflammatory agent-induced leakage^{10,11}. Thus, quiescence of blood vessels is thought to be mediated by Ang1–Tie2 signalling. Tie2 signalling is also suggested to promote cell migration and to be involved in VEGF-induced neovascularization and pathological angiogenesis, as opposed to the maintenance of cell quiescence^{12–18}. Consistently, Tie2 is not only tyrosine phosphorylated in the endothelium of normal adult tissues, but is also highly expressed in the endothelium of neovessels of regenerating organs and tumours^{19,20}.

In the quiescent vessels, the endothelial cells tightly contact each other and do not proliferate¹⁹. On the other hand, during angiogenesis, the cells that lose cell–cell contacts are allowed to proliferate and migrate, thereby resulting in sprouting and branching from the pre-existing

vessels to form neovasculature¹⁹. At present, it is unknown how Tie2 signalling is involved in both vascular quiescence and angiogenesis. Thus, we investigated Ang1–Tie2 signalling in the presence or absence of vascular endothelial cell–cell contacts.

RESULTS

Ang1 induces the translocation of Tie2 at cell–cell contacts

To first elucidate how Tie2 signalling controls vascular quiescence, we examined the localization of Tie2 in confluent human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). Tie2 was broadly expressed on the plasma membrane in unstimulated cells. After stimulation with either cartilage oligomeric matrix protein (COMP)–Ang1, a potent Ang1 variant¹⁴, or native Ang1, Tie2 was accumulated at the cell–cell contacts marked by vascular endothelial cadherin (VE-cadherin) (Fig. 1a and Supplementary Information, Fig. S1a). Similar relocation of Tie2 was observed in human arterial endothelial cells (Supplementary Information, Fig. S1b). The relocation of Tie2 was observed within 5 min after the stimulation, becoming more prominent during 15–45 min (Supplementary Information, Fig. S1c). Tie2 was then gradually endocytosed and disappeared from cell–cell contacts. Re-exposure to COMP–Ang1 6 h after the first stimulation re-induced accumulation of Tie2 at cell–cell contacts (Supplementary Information, Fig. S1d–f). These findings indicate that Ang1 induces relocation of Tie2 to cell–cell contacts, which is also supported by time-lapse imaging of cells expressing Tie2 carboxy-terminally

¹Department of Structural Analysis, National Cardiovascular Center Research Institute, 5-7-1 Fujishirodai, Suita, Osaka 565-8565, Japan. ²The Research Center for Advanced Science and Technology, University of Tokyo, Laboratory for System Biology and Medicine, 4-6-1, Komaba, Meguro, Tokyo, 153-8904, Japan. ³Biomedical Research Center and Department of Biological Sciences, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Guseong-dong, Daejeon, 305-701, Korea. ⁴Division of Genetics, Institute of Medical Science, University of Tokyo, 4-6-1 Shirokane-dai, Minato-ku, Tokyo 108-8639, Japan. ⁵Department of Signal Transduction, Research Institute of Microbial Diseases, Osaka University, 3-1 Yamada-oka, Suita, Osaka, 565-0871, Japan.

⁶Correspondence should be addressed to S.F. or N.M. (e-mails: fuku@ri.ncvc.go.jp; nmochizu@ri.ncvc.go.jp)

Received 3 December 2007; accepted 29 February 2008; published online 20 April 2008; DOI: 10.1038/ncb1714

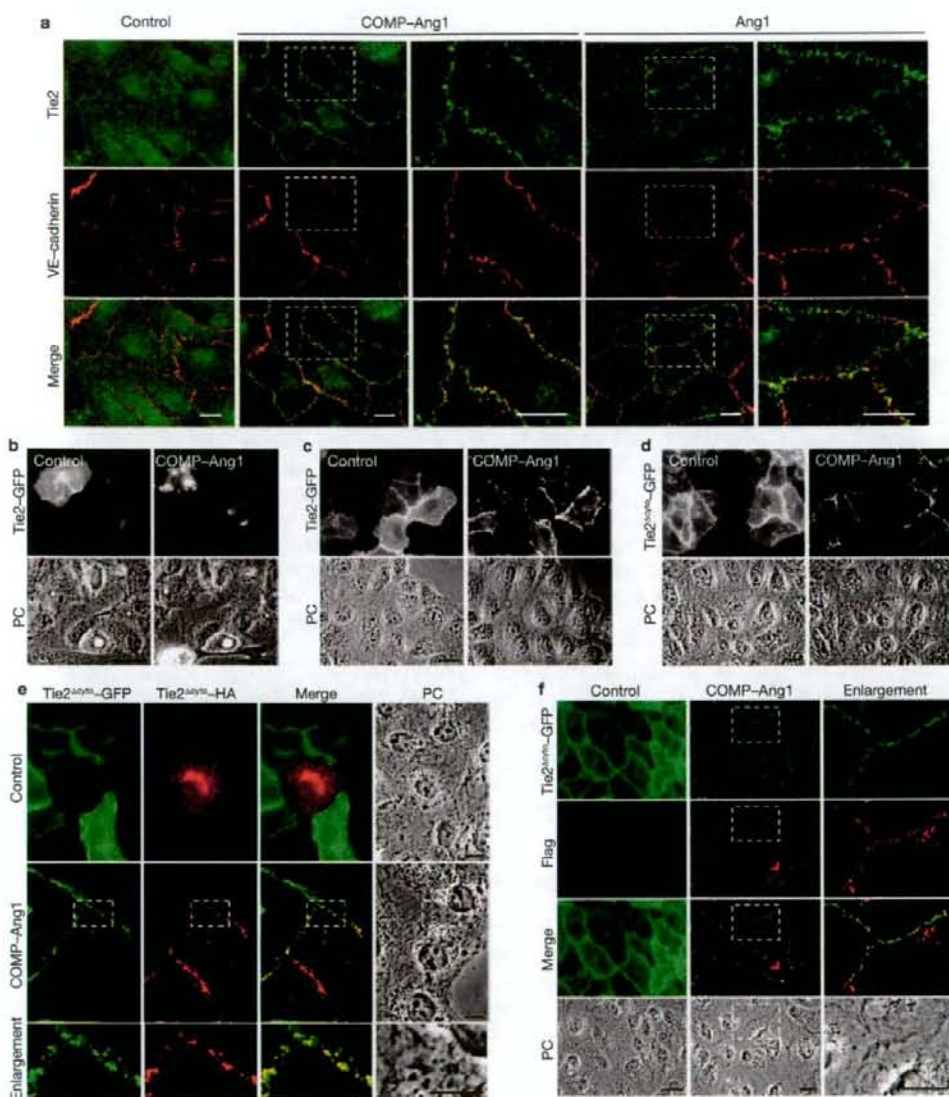


Figure 1 Tie2 is recruited to cell-cell contacts upon Ang1 stimulation in vascular endothelial cells. **(a)** Confluent HUVECs plated on a collagen-coated dish (cells were plated on a collagen-coated dish for the following experiments unless otherwise indicated) were stimulated in medium 199 containing 0.5% BSA for 3 h and stimulated with vehicle (control), 200 ng ml⁻¹ COMP-Ang1, or 600 ng ml⁻¹ Ang1 for 20 min (COMP-Ang1 and native Ang1 were used at these concentrations throughout the following experiments unless otherwise indicated). After stimulation, the cells were fixed, immunostained with anti-Tie2 (top) and anti-VE-cadherin (middle) antibodies. Fluorescence images were obtained using an Olympus IX-81 inverted microscope. The boxed areas are enlarged on the right. **(b)** CHO cells transfected with the plasmid expressing Tie2-GFP were stimulated for 3 h and stimulated with COMP-Ang1. Tie2-GFP (top) and phase-contrast (PC, bottom) images of the Tie2-GFP-expressing cells surrounded by those that do not express Tie2-GFP were time-lapse imaged and analysed by MetaMorph 6.1 software. The images before (left) and 1 h after (right) stimulation are

shown. **(c)** Tie2-GFP-expressing cells contacting each other were stimulated with COMP-Ang1 and time-lapse imaged. **(d)** CHO cells transfected with the plasmid expressing Tie2Δcyto-GFP were stimulated with COMP-Ang1 and time-lapse imaged. **(e)** CHO cells were transfected with either the plasmid expressing Tie2Δcyto-GFP or that expressing Tie2Δcyto-HA. The next day, the cells expressing Tie2Δcyto-GFP and those expressing Tie2Δcyto-HA were co-plated and stimulated with either vehicle (control) or COMP-Ang1 for 1 h. After stimulation, the cells were stained with anti-HA antibody. GFP (green), HA (red), the merged images, and the phase-contrast images (PC) are shown. The boxed areas are enlarged at the bottom of each image. **(f)** CHO cells transfected with the vector encoding Tie2Δcyto-GFP were stimulated as described in **e**. To visualize Flag-tagged COMP-Ang1, the stimulated cells were stained with anti-Flag antibody. GFP (green), Flag (red), the merged images (merge), and the phase-contrast images (PC) are shown as labelled on the left. The boxed areas are enlarged in the right panels. The scale bars represent 20 μm (**a**, **b**, **c**, **d**, **f**), and 10 μm (**e**), respectively.

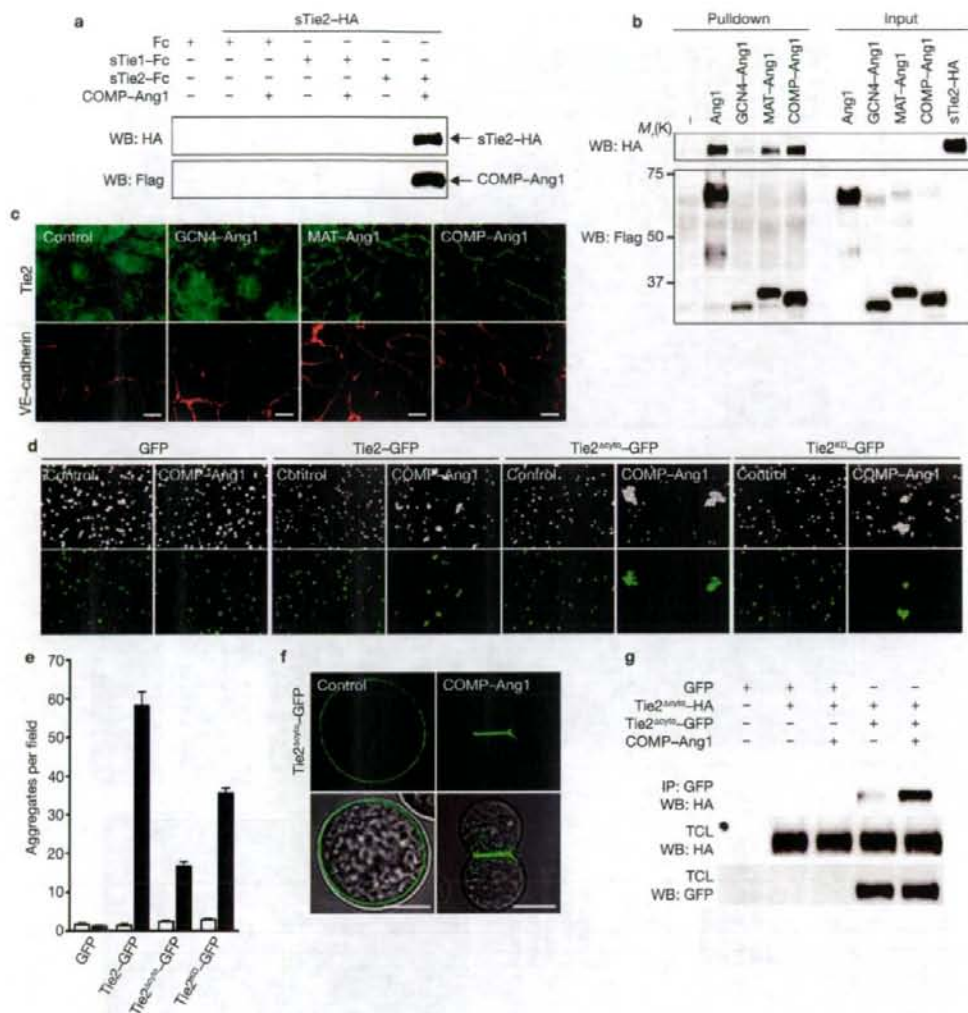


Figure 2 Ang1 induces *trans*-association of Tie2 at cell-cell contacts. **(a)** *In vitro* binding of sTie2-HA to sTie1-Fc or sTie2-Fc. Binding in the presence or absence of COMP-Ang1 was examined as described in Methods. Arrows indicate co-precipitated sTie2-HA and COMP-Ang1 proteins. **(b)** The association of sTie2-HA to sTie2-Fc by Ang1, GCN4-Ang1, MAT-Ang1, or COMP-Ang1 was similarly examined as in **a**. **(c)** Confluent HUVECs were stimulated with vehicle (control), 200 ng ml⁻¹ GCN4-Ang1, MAT-Ang1 or COMP-Ang1 for 20 min, and stained with anti-Tie2 (upper panels) and anti-VE-cadherin (lower panels) antibodies. The scale bars represent 20 μ m. **(d)** Aggregation of 293F cells in suspension expressing GFP, Tie2-GFP, Tie2^{myc}-GFP and Tie2^{HL}-GFP was induced by vehicle (control; left of each panel) and COMP-Ang1 (right of each panel), as described in Methods. Upper and lower images of each panel show the phase-contrast and GFP images. **(e)** To quantify the cell aggregation observed in **d**, the number of cell aggregates per

field of view was counted. An aggregate was defined as cell mass consisting of more than 4 cells. The number of aggregates for cells stimulated with vehicle and COMP-Ang1 is shown as white and black columns, respectively. Data are expressed as mean number \pm s.d. of, at least, 10 different fields. **(f)** 293F cells expressing Tie2^{myc}-GFP were incubated with vehicle (control; left column) and COMP-Ang1 (right column). Upper and lower panels show the confocal GFP images merged without or with the DIC images, respectively. The scale bars represent 10 μ m. **(g)** 293F cells expressing Tie2^{myc}-HA were suspended with either those expressing Tie2^{myc}-GFP or those expressing GFP, and stimulated with 400 ng ml⁻¹ of COMP-Ang1 for 1 h. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-GFP antibody. Immunoprecipitates (IP) and aliquots of cell lysate (TCL) were subjected to Western blot analysis (WB) with anti-HA and anti-GFP antibodies. Uncropped images of **a**, **b**, and **g** are shown in Supplementary Information, Fig. S8.

fused with green fluorescent protein (GFP) (Tie2-GFP) (Supplementary Information, Fig. S1g, h and Movie 1).

VEGFR2 is known to associate with VE-cadherin at cell-cell contacts^{21,22}. Thus, we assumed that VE-cadherin might be involved in

Tie2 relocation to cell-cell contacts. However, Tie2 relocation at cell-cell contacts was still observed in VE-cadherin-depleted HUVECs, while β -catenin disappeared from cell-cell contacts (Supplementary Information, Fig. S2a, c). Tie2 staining at cell-cell contacts was slightly

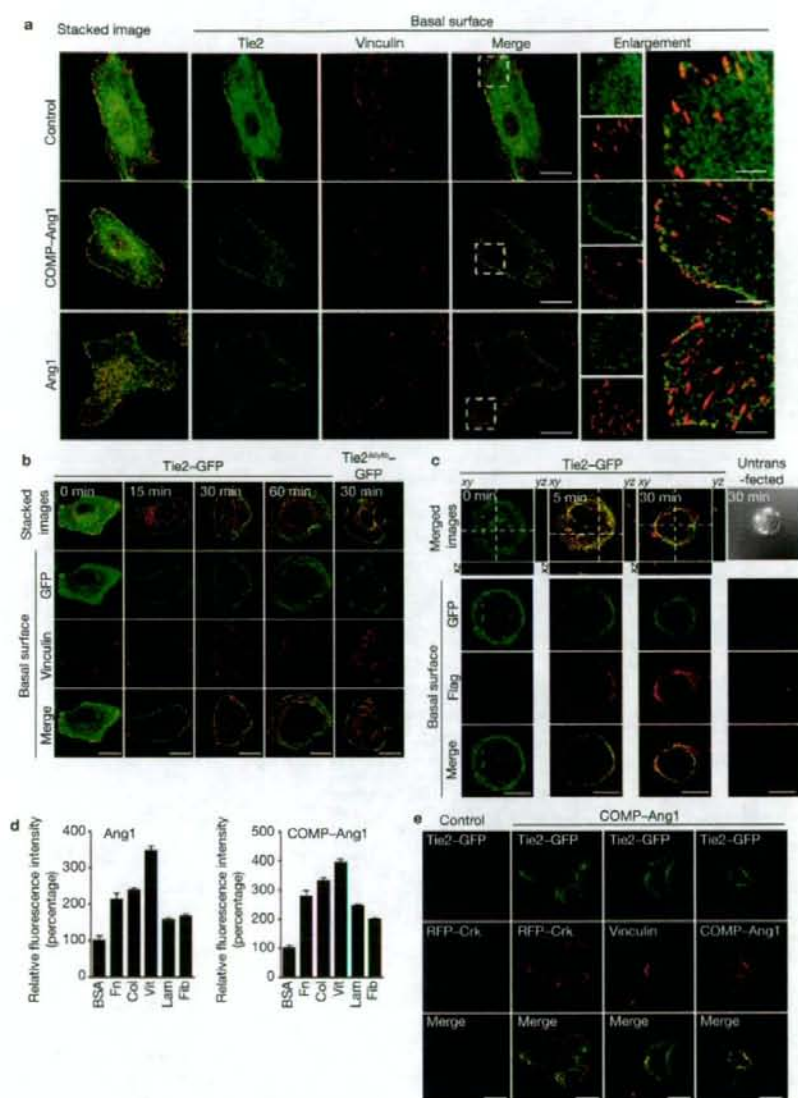


Figure 3 ECM-bound Ang1 anchors Tie2 to cell-substratum contacts in the absence of cell-cell adhesions. **(a)** Sparse HUVECs were stimulated with vehicle (control), COMP-Ang1 or Ang1, and then immunostained with anti-Tie2 and anti-vinculin antibodies. Images were obtained using a confocal microscope. Stacked *xy* images (left), Tie2 (green), vinculin (red) and merged (merge) images of the cell-substratum interface (basal surface) are shown. The boxed areas in the merged images are enlarged (right panels). **(b)** Time course (for the time indicated) of localization of Tie2-GFP and vinculin in CHO cells expressing Tie2-GFP was examined similarly to **a**. Localization of Tie2 Δ cyto-GFP after stimulation for 30 min was also examined (left column). **(c)** Localization of COMP-Ang1 (Flag, red) and Tie2-GFP (green) after stimulation with COMP-Ang1 in CHO cells expressing Tie2-GFP was examined similarly to **a**. Untransfected CHO cells were also stimulated with COMP-Ang1, and immunostained with anti-Flag antibody (right column). A DIC image (top) is displayed at the top. **(d)** Binding of Ang1 and COMP-Ang1 to ECM was examined by immunofluorescence analysis as described in

Supplementary Methods. Glass-base dishes were coated with BSA (BSA), fibronectin (Fn), collagen (Col), vitronectin (Vit), laminin (Lam), and fibrinogen (Fib), and incubated with Ang1 (left panel) or COMP-Ang1 (right panel). ECM-bound Ang1 and COMP-Ang1 were detected by staining with anti-Flag antibody. Relative immunofluorescence intensity was expressed as a percentage of that detected in a BSA-coated dish. Data are expressed as mean \pm s.d. of the fluorescence intensity of 6 different fields. **(e)** Sparse HUVECs expressing both Tie2-GFP and RFP-Crk and those expressing Tie2-GFP were stimulated with COMP-Ang1 or vehicle (control). After stimulation for 20 min, the cells were washed and treated with cytoskeleton stabilizing buffer as described in Methods. The cells expressing Tie2-GFP were immunostained with either anti-vinculin or anti-Flag antibody. GFP (Tie2-GFP), and RFP (RFP-Crk) or Alexa 546 (vinculin or COMP-Ang1) confocal images of the cell-substratum interface, and merged images (bottom) are shown. The scale bars in merged (**a**, **b**, **c**, and **e**) and enlarged images (**a**) represent 20 μ m and 5 μ m, respectively.

diminished compared to the control cells. Consistently, we found that Tie2 did not co-immunoprecipitate with VE-cadherin in the COMP-Ang1-stimulated HUVECs, although VEGFR2 co-immunoprecipitated with VE-cadherin in those stimulated by VEGF (Supplementary Information, Fig. S2d, e). Furthermore, depletion of platelet and endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) did not affect the relocation of Tie2 to cell-cell contacts (Supplementary Information, Fig. S2b, c). These results indicate that VE-cadherin and PECAM-1 are not essential for Tie2 localization at cell-cell contacts, although cell adhesions by these molecules may affect the localization of Tie2 by stabilizing cell-cell contacts.

We hypothesized that the interaction of Tie2 expressed in adjoining cells might be required for the accumulation of Tie2 at cell-cell contacts. We employed Chinese hamster ovary (CHO) cells that do not express endogenous Tie2 and CHO cells expressing Tie2-GFP. By monitoring Tie2-GFP upon COMP-Ang1 stimulation, we could distinguish the dynamics of Tie2-GFP in the presence or absence of Tie2 expression between adjoining CHO cells. Tie2-GFP was internalized upon stimulation with COMP-Ang1 when a Tie2-GFP-expressing cell was surrounded by wild-type CHO cells (Fig. 1b and Supplementary Information, Movie2). In contrast, COMP-Ang1 stimulation induced Tie2-GFP translocation to the cell-cell borders between adjacent cells expressing Tie2-GFP, although Tie2-GFP was homogeneously expressed on the plasma membrane before the stimulation (Fig. 1c and Supplementary Information, Fig. S2f and Movie3). Notably, Tie2-GFP lacking the cytoplasmic domain of Tie2 (Tie2Δcyto-GFP) relocated to the borders between adjacent cells expressing Tie2Δcyto-GFP (Fig. 1d and Supplementary Information, Movie 4). To further test the effect of the extracellular domain of Tie2 between adjoining cells on the accumulation of Tie2 at cell-cell contacts, CHO cells expressing Tie2Δcyto-GFP and those expressing Tie2Δcyto-HA (a mutant Tie2 lacking the cytoplasmic domain tagged with HA) were co-plated and stimulated with COMP-Ang1. In the unstimulated cells, both Tie2Δcyto-GFP and Tie2Δcyto-HA were broadly expressed on the plasma membrane without any colocalization. Once stimulated with COMP-Ang1, Tie2Δcyto-GFP and Tie2Δcyto-HA colocalized at the cell-cell borders between cells expressing Tie2Δcyto-GFP and cells expressing Tie2Δcyto-HA (Fig. 1e). Interestingly, COMP-Ang1 was also detected at the cell-cell borders where Tie2Δcyto-GFP localized (Fig. 1f). Collectively, these findings suggest that Ang1 induces *trans*-association of Tie2 at cell-cell contacts independently of its intracellular signalling.

Internalization was further analysed by a confocal microscope. In Tie2-GFP-expressing CHO cells surrounded by wild-type CHO cells, Tie2-GFP was clearly internalized upon COMP-Ang1 stimulation, while in either Tie2Δcyto-GFP-expressing CHO cells or kinase-negative Tie2-GFP (Tie2KD-GFP)-expressing CHO cells, Tie2 was not internalized (Supplementary Information, Fig. S2g). These data indicate that endocytosis of Tie2 is triggered by its intracellular signalling, and suggest that Ang1-induced localization of Tie2 at cell-cell contacts depends upon the balance between *trans*-association of activated Tie2 and the internalization of Tie2.

Trans-association of Tie2 induced by oligomerized Ang1

To explore whether the *trans*-association of Tie2 is provoked by oligomerized Ang1, we first biochemically analysed the association of Tie2 using recombinant Tie2 proteins. We tested the association of immunoglobulin

Fc-domain tagged extracellular domain of either Tie1 or Tie2 with the HA-tagged extracellular domain of Tie2, as explained in Supplementary Fig. 3a and 3b. HA-tagged Tie2 bound to sTie2-Fc but not sTie1-Fc in the presence of COMP-Ang1 (Fig. 2a). We then tested the association of sTie2-HA with sTie2-Fc in the presence of various forms of Ang1 (GCN4-Ang1, dimer; native Ang1 and MAT-Ang1, tetramer; COMP-Ang1, pentamer)¹⁴. The association of sTie2-HA with sTie2-Fc was induced by native Ang1, MAT-Ang1, and COMP-Ang1, which can form multimers of Ang1, but not by GCN4-Ang1 (Fig. 2b). Consistently, multimerized Ang1 induced the relocation of Tie2 at cell-cell contacts (Fig. 2c).

We further tested the possibility of Ang1-mediated bridging of Tie2 by using 293 cells in suspension (293F). Tie2-GFP-expressing 293F cells but not GFP-expressing 293F cells aggregated upon COMP-Ang1 and native Ang1 stimulation (Fig. 2d, e and Supplementary Information, Fig. S3c, d). The number of aggregates in Tie2-GFP-expressing cells increased more than in Tie2Δcyto-GFP-expressing cells and Tie2KD-GFP-expressing cells that were resistant to internalization of Tie2 (Fig. 2e and Supplementary Information, Fig. S2g). In contrast, the size of the aggregates was increased in Tie2Δcyto-GFP-expressing cells and Tie2KD-GFP-expressing cells compared to Tie2-GFP-expressing cells (Supplementary Information, Fig. S3e), suggesting that intracellular signalling may affect Ang1-mediated Tie2 *trans*-association probably through Tie2 internalization.

In the aggregated cells, Tie2Δcyto-GFP clearly localized at the sites of cell-cell contacts (Fig. 2f). Similar localization of Tie2Δcyto-GFP at cell-cell contacts was observed in a murine pro-B cell line, BaF3 cells, stably expressing Tie2Δcyto-GFP (BaF-Tie2ΔcytoGFP) upon COMP-Ang1 stimulation (Supplementary Information, Fig. S3h). VEGF did not induce aggregation of 293F cells expressing VEGFR2, although VEGFR2 is reported to localize to cell-cell contacts^{21,23} (Supplementary Information, Fig. S3f, g). When 293F cells expressing Tie2Δcyto-GFP and those expressing Tie2Δcyto-HA were co-cultured in suspension and stimulated with COMP-Ang1, both Tie2 were co-immunoprecipitated (Fig. 2g). Furthermore, when BaF-Tie2ΔcytoGFP cells and BaF3 cells stably expressing Tie2Δcyto-HA (BaF-Tie2ΔcytoHA) were mixed and stimulated with COMP-Ang1 in suspension, both truncated forms of Tie2 were also co-immunoprecipitated (Supplementary Information, Fig. S3i). These results together with biochemical data and the co-localization of Tie2 lacking its cytoplasmic domain (Fig. 1e) indicate the *trans*-association of Tie2 occurs at cell-cell contacts upon oligomerized Ang1 stimulation.

Tie2 localizes to cell-substratum contacts in the absence of cell-cell contacts

We next examined Ang1-induced localization of Tie2 in sparse HUVECs. In subconfluent HUVECs, Tie2 was preferentially recruited to cell-cell contacts upon COMP-Ang1 stimulation (Supplementary Information, Fig. S4a). However, when stimulated in the absence of cell-cell contacts, Tie2 localized to the periphery of the extended membrane that was close to but different from vinculin- and paxillin-positive focal complexes (FCs) (Fig. 3a and Supplementary Information, Fig. S4b). We further investigated COMP-Ang1-induced localization of Tie2-GFP in CHO cells. Tie2-GFP was localized to the periphery at 15, 30 and 60 min after stimulation. We noticed additional GFP-positive lines at cell-substratum contacts in the cells stimulated for 30 min and 60 min, reflecting the footprints of membrane extension during cell movement (Fig. 3b).

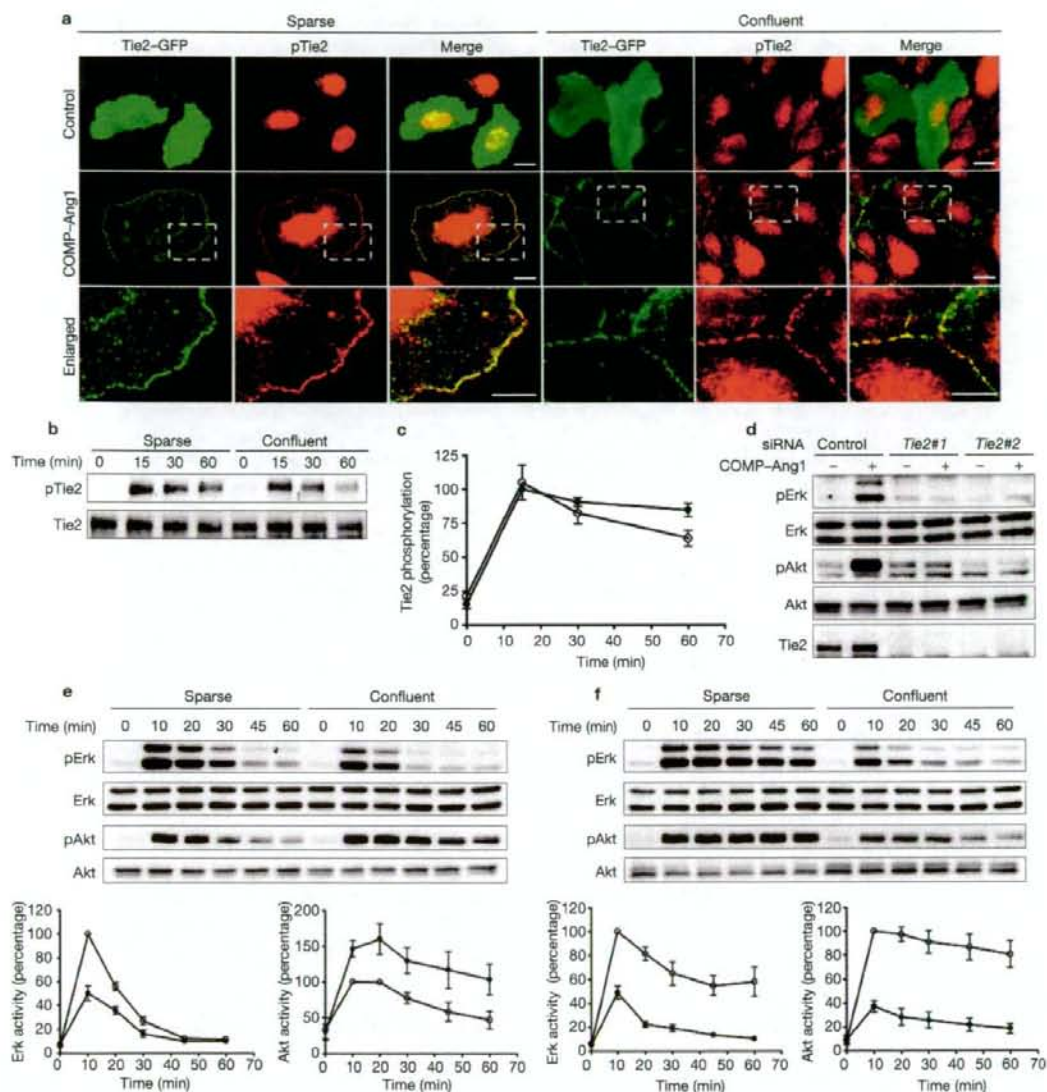


Figure 4 Trans-association of Tie2 leads to the preferential activation of Akt. **(a)** Sparse and confluent HUVECs were transfected with the plasmid encoding Tie2-GFP, stimulated with either vehicle (control) or COMP-Ang1, and immunostained with an anti-phospho Tie2 (pTie2) antibody. Images of Tie2-GFP (green), pTie2 (red), and the merged images (merge) are shown. The boxed areas in the panels are enlarged at the bottom of each image. The scale bars in the merged and the enlarged images represent 20 and 5 μ m, respectively. **(b)** Sparse and confluent HUVECs were starved and stimulated with COMP-Ang1 for the time (min) indicated at the top. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-Tie2 antibody. Immunoprecipitates and aliquots of cell lysate were subjected to western blot analysis with anti-phosphotyrosine (pTie2) and anti-Tie2 (Tie2) antibodies. **(c)** Phosphorylated Tie2 observed in **b** was quantified. Tie2 phosphorylation represents the ratio of phosphorylated Tie2 to total Tie2 as a percentage of the ratio in the sparse cells stimulated for 15 min. Values are expressed as means \pm s.d. from five independent

experiments. **(d)** HUVECs transfected with control siRNA (control) or with two independent siRNAs targeting different sequences of *Tie2* (Tie2 No.1 and Tie2 No.2) were starved and stimulated with vehicle (-) and COMP-Ang1 (+) for 15 min. Cell lysates were subjected to immunoblot analysis for analysing Erk and Akt phosphorylation. **(e)** Sparse and confluent HUVECs were stimulated with COMP-Ang1 for the time (min) indicated at the top. Activation of Erk and Akt was analysed. Graphs at the bottom left and right panels show time course of Erk and Akt activation of the sparse cells (open circle) and the confluent cells (filled circle) in response to COMP-Ang1. Erk or Akt activity represents the ratio of phospho-Erk or phospho-Akt to total Erk or total Akt as a percentage of the ratio observed in sparse cells stimulated for 10 min, respectively. Values are expressed as means \pm s.d. from five independent experiments. **(f)** Sparse (open circle) and confluent (filled circle) HUVECs were stimulated with growth media and analysed. Uncropped images of **b**, **d**, **e**, **f** are shown in Supplementary Information, Fig. S8.