

2009J6265A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

未熟児網膜症の原因と治療に関する研究

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 萩原 正敏

平成22年 5月

目 次

I. 総括研究報告	
未熟児網膜症の原因と治療に関する研究	1
萩原 正敏	
研究総括および低分子化合物による選択的スプライシング制御	
II. 分担研究報告	
1. 未熟児網膜症モデル動物実験系の確立に関する研究	5
石田 晋	
2. RPK阻害剤の未熟児網膜症モデル動物における評価に関する研究	9
吉田 和彦	
3. HIF3 \cdot の網膜における選択的スプライシング制御機構の解析に関する研究	12
片岡 直行	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	13
IV. 研究成果の刊行物・別刷	
◇ Splicing reporter mice revealed the evolutionally conserved switching mechanism of tissue-specific alternative splicing.	
◇ Visualization and genetic analysis of alternative splicing regulation <i>in vivo</i> using fluorescence reporters in transgenic <i>Caenorhabditis elegans</i> .	
◇ Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoforms - a novel therapeutic strategy for angiogenesis.	
◇ Herpesvirus protein ICP27 switches PML isoform by altering mRNA splicing.	
◇ Akt2 regulation of Cdc2-like kinases (Clk/Sty), serine/arginine-rich (SR) protein phosphorylation, and insulin-induced alternative splicing of PKC β II mRNA.	
◇ ウイルスによるスプライシング暗号の利用と攪乱	

未熟児網膜症の原因と治療に関する研究

研究代表者 萩原 正敏 東京医科歯科大学 教授

未熟児網膜症は網膜血管の未熟性に関連して網膜周辺部に無血管野が生じる疾患であり、血管内皮増殖因子（VEGF）、特にVEGF-Aがその病態に大きな役割を果たすことが知られている。近年、VEGF-Aは選択的スプライシングによって血管新生を抑制するアイソフォームを有することが判明し、VEGF-Aの選択的スプライシングはRNA結合蛋白リン酸化酵素SRPKで制御されていることが報告された。このSRPKに対する選択的阻害剤SRPIN340は、VEGF-Aのスプライシング制御によって未熟児網膜症における血管新生の活動を低下させ、本疾患の治療に新展開をもたらす可能性のある薬剤である。しかしながら、SRPIN340は血中での安定性に問題があり、さらに強力にSRPKを阻害し体内での安定な化合物の取得を目指して、SRPK結晶構造解析データをもとに化合物ライブラリーから検索を進めるとともに、酸素分圧低下に反応して変化するスプライシングレポーター系の開発を行った。また眼内血管新生におけるSRPK阻害剤の血管新生抑制効果を検討するために、その動物モデルとしてレーザー誘発脈絡膜血管新生モデルの安定した作製法および血管新生の評価法の確立をおこなった。

石田 晋（北海道大学医学研究科・眼科学・教授）

吉田 和彦（北海道大学病院・眼科・講師）

片岡 直行（東京医科歯科大学難疾患研究所 MTT
プログラム・特任講師）

A. 研究目的

未熟児網膜症の病態において重要な役割を果たす血管新生因子 VEGF-A とその制御因子 HIF3 α の mRNA の低酸素応答性選択的スプライシング制御機構を解明し、未熟児網膜症の新規治療薬開発の可能性を調査研究することである。

未熟児網膜症の病態において、VEGF-A による血管新生は大きな役割を果たすが、VEGF-A は選択的スプライシングにより、血管新生を抑制するアイソフォームを産生することが最近判明した (Harper and Bates, 2008)。VEGF-A の選択的スプライシングは RNA 結合蛋白リン酸化酵素 SRPK で制御されていると目され、我々の開発した SRPK 選択的阻害剤 SRPIN340 は、VEGF-A の選択的スプライシングパターンを制御してドミナントネガティブフォームに誘導し、血管新生を抑制できることを見出している。

血管新生因子 VEGF-A は転写レベルでも制御され、低酸素応答遺伝子の転写因子 HIF が関わっている。HIF は α と β のサブユニットからなる転写因子で、HIF α をコードする遺伝子は3つが知られており、それぞれ HIF-1 α , 2 α , 3 α と呼ばれている。HIF-1 α や HIF-2 α に比べて、HIF-3 α は未だあまり解析が進んでいないが、IPAS という

スプライシングバリエーションが存在することが明らかになっている。IPAS は低酸素状態で特的に産生され、HIF-1 β の代わりに HIF-1 α に結合し、HIF による転写を阻害する。それゆえ選択的スプライシングの制御により IPAS の発現を誘導できれば、VEGF の発現を抑えられるのではないかと期待される。しかしながら、HIF-3 α の mRNA 前駆体から IPAS が産生される機構は全く明らかにされていない。

上記のように本研究は、VEGF-A およびその制御因子の HIF-3 α をコードする mRNA の選択的スプライシングの視点から未熟児網膜症の病態を解明し治療に応用しようとの独創的試みである。また独自に開発した RNA 結合蛋白リン酸化酵素阻害剤選択的阻害剤 SRPIN340 もしくはその合成展開化合物で、VEGF-A のスプライシングパターンを制御することで未熟児網膜症の新規治療法を開発できる可能性について検討する。

B. 研究方法

1) 未熟児網膜症モデル動物実験系の確立

血管新生因子 VEGF-A とその制御因子 HIF3 α mRNA の網膜における低酸素応答性選択的スプライシング制御機構を解明し、SRPK の選択的阻害剤 SRPIN340 およびその合成展開化合物の未熟児網膜症に対する治療効果を検討するために、未熟児網膜症モデル動物実験系をマウスで樹立を検討した。未熟児網膜症の動物モデルとして「酸素誘導虚

血網膜症モデル (Oxygen-induced Ischemic Retinopathy)」を用いた。同モデルの作成方法は、過去の報告に記載された方法 (Smith LE, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1994) に準じた。すなわち、マウスの新生仔を生後7日目 (P7) の時点で母親マウス (Nursing mother) とともに高濃度酸素 (80% O₂) に暴露し、5日後 (P12) に通常酸素分圧へ戻す方法を用いた。動物実験施設に常設されたガス供給装置 (酸素) を酸素インキュベーターに接続し、高濃度酸素条件でマウス飼育をおこなった。マウス飼育ケージ内の状態をモニターするために、高濃度酸素インキュベーター内には吸湿材、酸素濃度計および湿度計を設置した。

2) レーザー誘発脈絡膜血管新生モデル動物実験系の確立

レーザー照射施行後1週間の時点で動物に深麻酔を施した後に開胸し、PBSで心臓灌流をおこなって血液を循環系から除去した後にFITC-dextran (分子量200万) の1% gelatin 溶液を心臓灌流した。その後、眼球摘出をおこない、2% PFA で組織固定し、脈絡膜フラットマウントを作成した。脈絡膜血管新生の形成は、倒立型蛍光顕微鏡 (BIOREVO、キーエンス社) を用いて観察した。

3) SRPKの選択的阻害剤の検索と未熟児網膜症の新規治療法の検討

VEGF-Aの選択的スプライシングはRNA結合蛋白リン酸化酵素SRPKで制御されていることが判明しつつあり、我々が独自に開発したSRPKの選択的阻害剤SRPIN340が (Fukuhara et al., 2006) をマウス眼球内に直接投与して、SRPIN340がVEGF-Aの選択的スプライシングパターンを制御してドミナントネガティブフォームに誘導し血管新生を抑制できることを見出している。本研究では、SRPK結晶構造解析データをもとに10万化合物ライブラリーをin silico検索を進め1万化合物に絞り込んだ後、SRPKに対する阻害活性を実測するとともに、その血中安定性を検討した。

4) HIF-3 α の網膜における低酸素応答性選択的スプライシング制御機構の解明

我々はこれまで、選択的スプライシングを可視化する独自技術を確立しているため

(Kuroyanagi et al. Nature Methods 2006)、低酸素応答によりHIF-3 α のmRNA前駆体からIPASのmRNAが選択的スプライシングにより産生される機構を、mRNA前駆体上のシス配列および細胞内に存在するトランス因子を含めて解明するため、本研究ではこの技術を応用しスプライシングレポーターを構築した。

(倫理面への配慮)

組換えDNA実験や動物実験等は、それぞれの研究者が所属する大学の実験指針やガイドラインに準拠して行った。

C. 研究結果

1) 未熟児網膜症マウスモデルの作成

実験開始時の問題点として、P17時点での個体間の成長差があった。この問題は、生後直後の時点で母親マウス (Nursing mother) 1匹に対する新生仔数を6匹と一定化することで解決できた。

2) レーザー誘発脈絡膜血管新生モデル作成と網膜血管新生に対する評価法の確立

実験開始時の問題点として、レーザー照射による網膜内および網膜下出血、あるいは脈絡膜血管新生の非誘導などがあった。この問題は、レーザー照射が的確にBruch膜におこなわれているかに依存しており、網膜側におこなわれると網膜下出血、強膜側におこなわれると脈絡膜組織が欠損するために血管新生が誘導されないという結果となることがわかった。ブルッフ膜にレーザーがおこなわれた場合には網膜下に気泡が生じるため、その気泡が生じた場合にのみ実験に用いる事にした。脈絡膜フラットマウント作成はやや習練度を要したが、複数回の施行および手技の改良によって安定した作成が可能となった。

3) SRPKの選択的阻害剤の検索

SRPK結晶構造解析データをもとに10万化合物ライブラリーをin silico検索を進めた結果、有望な1万化合物に絞り込むことができた。それらの化合物のSRPKに対する阻害活性を実測した後、構造のことなる4種の化合物にSRPIN340と同等かそれ以上のSRPK阻害活性を認めた。さらに、それら化合物の構造類似体SRPK阻害活性を検索し、一層強い阻害活性を示す化合物を取得した。その血中安定性を検討した結果、未熟児網膜症治療薬候補化合物として有望であることが判明した。

4) HIF3 α の網膜低酸素応答性スプライシングレポーターの構築

マウスHIF3 α 遺伝子のエクソン3から4までの領域をクローニングし、スプライシングパターンによってGFPまたはRFPが産生されるレポータープラスミドを構築した。

D. 考察

今年度の実験目的である眼内血管新生モデル「レーザー誘発脈絡膜血管新生モデル」の確立は達成され、未熟児網膜症マウスモデルの作成もほぼ達成されたと考える。過去に報告された方法に準じてモデル作成をおこなったが、レーザー照射マウスでは全ての動物

で脈絡膜血管新生が観察されるようになった。この結果を受けて、次年度は同一の方法で作成したモデル「レーザー誘発脈絡膜血管新生マウス」に対して SRPK 選択的阻害剤 SRPIN340 を投与し、その血管新生抑制効果を検討する予定である。よって、次年度における SRPK 選択的阻害剤 SRPIN340 の投与方法は硝子体注射を選択する事ができ、その場合は局所投与をおこなった場合の全身的な薬剤動態や副作用発現などを検討する事ができるであろう。さらに、眼内血管新生モデルにおいて SRPK 選択的阻害剤 SRPIN340 を投与した場合、VEGF のスプライシング制御が生じて種々のサイトカインなども動態変化を来すと考えられる。次年度の研究において SRPK 選択的阻害剤の血管新生抑制効果を考察していく上で、それらの検討もおこなっていく必要があると考えられた。

また細胞内で蛍光観察できるレポーター系ができたため、今後は各種マウス培養細胞で HIF3 α 型と IPAS 型 mRNA の比を比較し、最適な細胞を選択する。次年度はこのレポーター系を用いて、新たに見出した SRPK 阻害剤の評価を行い、低酸素依存的スプライシングに最も影響を与え、VEGF-A のドミナントネガティブフォーム産生を促す効果の高いと考えられる化合物を選択し、「レーザー誘発脈絡膜血管新生マウス」にて薬効評価を行う予定である。

E. 結論

安定したレーザー誘発脈絡膜血管新生モデルの作製法および脈絡膜血管新生の評価手技の確立は達成された。またスプライシングレポータープラスミドが作成できたため、細胞株や初代培養細胞を用いてスプライシング機構を解析する系が構築できた。さらに強力な SRPK 阻害剤を化合物ライブラリーより見出している。次年度は本結果を元にして、スプライシングレポーター系で最適化合物を選択した後、レーザー誘発脈絡膜血管新生モデルにおいて、その SRPK 阻害化合物による網膜血管新生抑制効果を検討する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takeuchi A, Hosokawa M, Nojima T,

Hagiwara M (2010) Splicing reporter mice revealed the evolutionally conserved switching mechanism of tissue-specific alternative splicing. PLOS One (in press).

2. Kuroyanagi H, Ohno G, Sakane, H, Maruoka, H, and Hagiwara M (2010) Visualization and genetic analysis of alternative splicing regulation in vivo using fluorescence reporters in transgenic *Caenorhabditis elegans*. Nature Protocols (in press).
 3. Nowak DG, Amin EM, Rennel ES, Hoareau-Aveilla C, Gammons M, Damodoran G, Hagiwara M, Harper SJ, Woolard J, Lodomery MR, and Bates DO. (2010) Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoforms - a novel therapeutic strategy for angiogenesis. J. Biol. Chem. 285, 5532-5540.
 4. Nojima T, Oshiro-Ideue T, Nakanoya H, Kawamura H, Morimoto M, Kawaguchi Y, Kataoka N and Hagiwara M (2009) Herpesvirus protein ICP27 switches PML isoform by altering mRNA splicing. Nucleic. Acids Res. 37, 6515-6527.
 5. Jiang K, Patel NA, Watson JE, Apostolatos H, Kleiman E, Hanson O, Hagiwara M, Cooper DR. (2009) Akt2 regulation of Cdc2-like kinases (Clk/Sty), serine/arginine-rich (SR) protein phosphorylation, and insulin-induced alternative splicing of PKC β II mRNA. Endocrinology, 150, 2087-2097.
2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得 (予定)

発明の名称: **DYRK** を阻害するピチアゾール誘導体を含む医薬組成物

発明者: 萩原 正敏、野中 洋介、土橋 圭子、吉田 実代、平松 俊行

基礎出願日: 2009年2月20日 (特願2009-038327)

出願人: 株式会社 キノファーマ

発明の内容の概略: **DYRK** 阻害能を有するピチアゾール誘導体に関する特許。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

未熟児網膜症の原因と治療に関する研究

分担研究者 石田 晋 北海道大学大学院医学研究科 教授

未熟児網膜症は網膜血管の未熟性に関連して網膜周辺部に無血管野が生じる疾患であり、血管内皮増殖因子（VEGF）、特にVEGF-Aがその病態に大きな役割を果たすことが知られている。近年、VEGF-Aは選択的スプライシングによって血管新生を抑制するアイソフォームを有することが判明し、VEGF-Aの選択的スプライシングはRNA結合蛋白リン酸化酵素SRPKで制御されていることが報告された。このSRPKに対する選択的阻害剤は、VEGF-Aのスプライシング制御によって未熟児網膜症における血管新生の活動を低下させ、本疾患の治療に新展開をもたらす可能性のある薬剤である。しかしながら、眼内血管新生における同薬剤の効果は未だ確立されていない部分があり、十分にその治療効果ならびに副作用の詳細を検討する必要がある。眼内血管新生におけるSRPK阻害剤の血管新生抑制効果を検討するために、その動物モデルとしてレーザー誘発脈絡膜血管新生モデルの安定した作製法および血管新生の評価法の確立をおこなった。

B. 研究目的

未熟児網膜症は、網膜血管の未熟性に関連して網膜周辺部に無血管野が生じる疾患である。出生時における患児の未熟性に基づく疾患と考えられており、在胎週数34週未満、出生体重が1800g未満の低出生体重児に起こり易く、生後3-6週ごろ発症することが多い。未熟児網膜症は、その網膜血管が進展した部分と無血管野との境界部より血管新生・線維性増殖が生じて網膜剥離に進展する失明疾患であり、その病態メカニズムのさらなる解明と新規治療法の開発は眼科領域における現在の急務である。

未熟児網膜症を失明疾患として位置づける要因となっている網膜血管新生は低酸素誘導血管新生がその本態であり、血管内皮増殖因子（Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF）、特にVEGF-Aがその病態に大きな役割を果たすことが知られている。VEGFが関与する眼内血管新生疾患には糖尿病網膜症や加齢黄斑変性などがあるが、これらの疾患に対する基礎研究の成果は近年目覚ましく、すでにVEGF阻害薬は臨床の場で用いられるようになってきている。同様の眼内血管新生疾患である未熟児網膜症においてもVEGF阻害薬をoff labelで硝子体内投与に用いている施設が散見されるようになり、またその治療効果もVEGF阻害薬投与によって新生血管の活動性は殆どの症例で低下すると報告され始めた。しかしながら、VEGF阻害薬投与後に線維性増殖組織の収縮が生じるため、網膜剥離はむしろ進行する場合があるとその危険性を指摘する意見もある。また、未熟児網膜症を

呈する患者は論じるまでもなく出生直後の新生児であり、発育期におけるVEGF阻害薬投与の安全性は未だ確立されていない。そのため、未熟児網膜症に対する安全かつ有効な新規治療薬の開発は多くの研究者のみならず、臨床眼科医の注目をも集めている。

近年、VEGF-Aは選択的スプライシングによって血管新生を抑制するアイソフォームを産生することが判明し、VEGF-Aの選択的スプライシングはRNA結合蛋白リン酸化酵素SRPKで制御されていると考えられている。研究代表者のグループが開発したSRPK選択的阻害剤SRPIN340は、VEGF-Aの選択的スプライシングパターンを制御してドミナントネガティブフォームに誘導し、血管新生を抑制する作用がある。すなわち、SRPIN340の同作用はVEGF-Aのスプライシング制御によって未熟児網膜症における血管新生の活動を低下させ、本疾患の治療に新展開をもたらす可能性のある薬剤である。

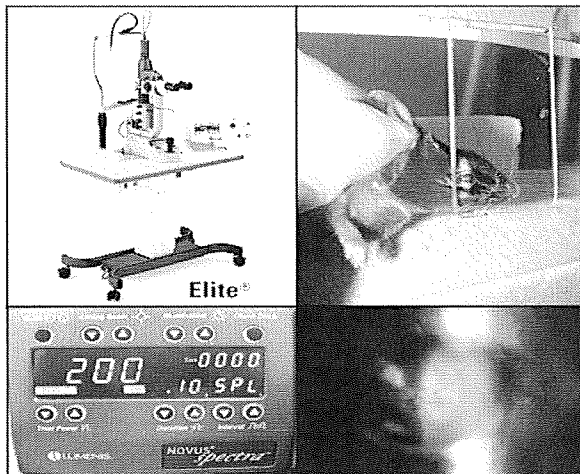
しかしながら、眼内血管新生における同薬剤の効果は未だ確立されていない部分があり、十分にその治療効果ならびに副作用の詳細を検討してから臨床応用に持ち込む必要がある。そのため、本研究課題における研究指針としては、本研究分担者の石田が眼内血管新生疾患動物モデルにおけるSRPK阻害剤の治療効果の検討をおこない、研究分担者吉田が未熟児網膜症モデルの確立と同モデルにおけるSRPK阻害剤の治療効果および新生児期における副作用の検討をおこなうこととした。

本年度における研究目的は、眼内血管新生モデルであるレーザー誘発脈絡膜血管新生の確立をおこなうこととした。

B. 研究方法

1) レーザー誘発脈絡膜血管新生モデル作成

眼内血管新生の動物モデルとして「レーザー誘発脈絡膜血管新生モデル」を用いる。このモデルは成体マウスの眼底に強度のレーザー光凝固を行ってBruch膜を断裂させることにより、Bruch膜断裂部を通して脈絡膜血管新生が網膜下へ進展する実験動物モデルである。眼内血管新生の研究に用いられることの多い動物モデルであり、本研究課題に適したモデルと考えられた。同モデルの作成方法は、過去の報告に記載された方法 (Nagai, et al. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006) に準じた。すなわち、レーザー光凝固装置 (NOVUS spectra, 日本ルミナス、図1) を用いて波長 532 nm laserのレーザーを照射した (照射条件150mW, 100 μ m, 100ms)。レーザー照射1週間後の血管新生の状態を検討した。



<図1 レーザー光凝固装置(左)とレーザー照射(右)>

2) 脈絡膜血管新生に対する評価法の確立

レーザー照射施行後1週間の時点で動物に深麻酔を施した後に開胸し、PBSで心臓灌流をおこなって血液を循環系から除去した後にFITC-dextran (分子量200万)の1%gelatin溶液を心臓灌流した。その後、眼球摘出をおこない、2%PFAで組織固定し、脈絡膜フラットマウントを作成した。脈絡膜血管新生の形成は、倒立型蛍光顕微鏡 (BIOREVO、キーエンス社) を用いて観察した。

(倫理面への配慮)

本実験は、北海道大学動物実験委員会の動物実験倫理審査における実験承認を受けており、その承認されたプロトコルを用いて施行されている。

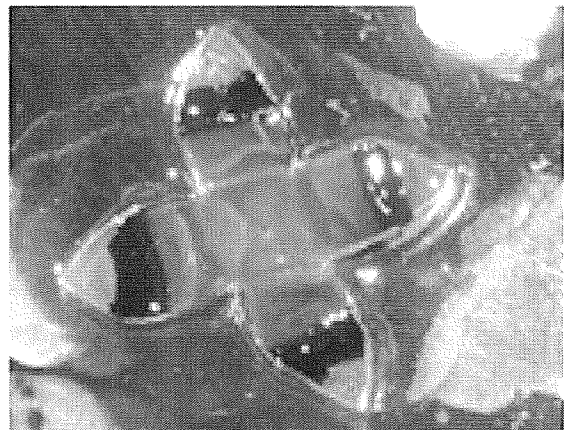
C. 研究結果

1) レーザー誘発脈絡膜血管新生モデル作成

実験開始時の問題点として、レーザー照射による網膜内および網膜下出血、あるいは脈絡膜血管新生の非誘導などがあった。この問題は、レーザー照射が的確にBruch膜におこなわれているかに依存しており、網膜側におこなわれると網膜下出血、強膜側におこなわれると脈絡膜組織が欠損するために血管新生が誘導されないという結果となることがわかった。ブルッフ膜にレーザーがおこなわれた場合には網膜下に気泡が生じるため、その気泡が生じた場合にのみ実験に用いる事にした。

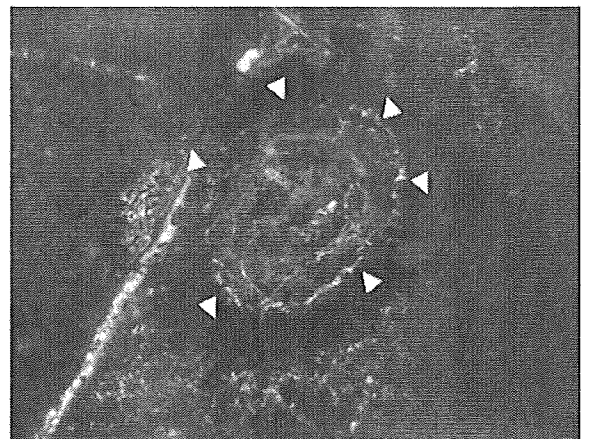
2) 網膜血管新生に対する評価法の確立

脈絡膜フラットマウント作成はやや習練度を要したが、複数回の施行および手技の改良によって安定した作成が可能となった (図2)。



<図2 脈絡膜フラットマウントの作成過程>

蛍光顕微鏡による観察では、脈絡膜血管新生を認めることができた (図3)。



<図3 脈絡膜血管新生>

D. 考察

今年度の実験目的である眼内血管新生モデル「レーザー誘発脈絡膜血管新生モデル」の確立は達成されたと考える。過去に報告された方法に準じてモデル作成をおこなったが、レーザー照射マウスでは全ての動物で脈絡膜血管新生が観察されるようになった。この結果を受けて、次年度は同一の方法で作成したモデル「レーザー誘発脈絡膜血管新生マウス」に対してSRPK 選択的阻害剤 SRPIN340 を投与し、その血管新生抑制効果を検討する予定である。

マウスの眼球サイズは小さいが、成体マウスにおける硝子体注射は手技的に可能と考えられる。よって、次年度におけるSRPK選択的阻害剤SRPIN340の投与方法は硝子体注射を選択する事ができ、その場合は局所投与をおこなった場合の全身的な薬剤動態や副作用発現などを検討する事ができるであろう。さらに、眼内血管新生モデルにおいてSRPK選択的阻害剤SRPIN340を投与した場合、VEGFのスパライジング制御が生じて種々のサイトカインなども動態変化を来すと考えられる。次年度の研究においてSRPK選択的阻害剤の血管新生抑制効果を考察していく上で、それらの検討もおこなっていく必要があると考えられた。

E. 結論

安定したレーザー誘発脈絡膜血管新生モデルの作製法および脈絡膜血管新生の評価手技の確立は達成された。次年度は本結果を元にして、レーザー誘発脈絡膜血管新生モデルにおけるSRPK 選択的阻害剤の抑制効果を検討する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

2. 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 (難治性疾患克服研究事業)
(分担) 研究報告書

未熟児網膜症の原因と治療に関する研究

分担研究者 吉田 和彦 北海道大学病院 講師

研究要旨

未熟児網膜症に対する治療法として現在用いられている網膜光凝固術は有効な治療法である。しかしながら、本治療法はあくまで破壊的治療であり、光凝固術を施行した部位の感覚網膜は機能喪失をきたすため、次世代の未熟児網膜症治療法開発が期待されている。未熟児網膜症におけるSRPK阻害剤の血管新生抑制効果を検討するために、その動物モデルとして虚血網膜症マウスモデルの安定した作製法および網膜血管新生の評価法の確立をおこなった。

A. 研究目的

未熟児網膜症に対する治療法として現在確立しているものは、無血管野に対する網膜光凝固術のみである。網膜無血管野から産生される血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) が本症の責任分子であることは明らかであるため、その産生抑制のために網膜無血管野に対する光凝固術を施行することは合理性があり、事実、本治療法によって未熟児網膜症の視力予後は著しく改善してきたという歴史的経緯がある。しかしながら、本治療法はあくまで破壊的治療であり、光凝固術を施行した部位の感覚網膜は機能喪失をきたすことになる。そのため、次世代の未熟児網膜症治療法として感覚網膜破壊を施行せずにすむ治療法が開発が期待されている。

本研究事業の目的は、SRPK 阻害剤を用いた未熟児網膜症に対する治療法開発にある。未熟児網膜症の病態においては血管内皮増殖因子 (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)、特に VEGF-A が大きな役割を果たすことが知られている。近年、VEGF-A は選択的スプライシングによって血管新生を抑制するアイソフォームを産生することが判明しており、その選択的スプライシングはRNA結合蛋白リン酸化酵素 SRPK で制御されていると目されている。研究代表者のグループが開発した SRPK 選択的阻害剤

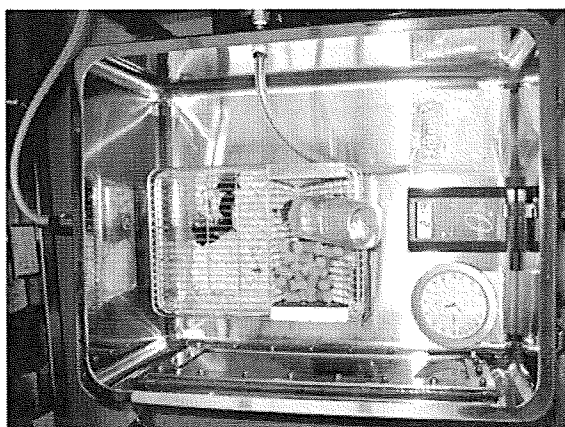
SRPIN340 は、VEGF-A の選択的スプライシングパターンを制御してドミナントネガティブフォームに誘導し、血管新生を抑制できることが報告されている。

SRPIN340 の上記作用は、未熟児網膜症の治療に新しい展開をもたらす可能性を示している。すなわち、VEGF-A の選択的スプライシングパターンを制御することによって、破壊的治療である感覚網膜への光凝固術を施行することなく、未熟児網膜症の病期進行を抑制できる可能性である。しかしながら、未熟児網膜症を呈する患者は論じるまでもなく出生直後の新生児であり、同薬剤の眼局所および全身的な薬剤動態、副作用発現などの詳細を動物実験で検討してから臨床応用に持ち込む絶対的必要性がある。本研究では、未熟児網膜症の動物モデルとして虚血網膜症マウスモデルを用いる。当該動物モデルは、マウスの新生仔を高濃度酸素に暴露させることによって既存の網膜血管をひとまず退縮させ、広大な無血管野を形成させる。その後、新生仔を再び通常酸素分圧 (大気圧条件下) の環境に戻すと著明な虚血誘導による血管新生が生じることを利用した実験動物モデルであり、未熟児網膜症の病態メカニズム解析に有用とされている。本年度における研究目的は、安定した虚血網膜症マウス作製法および網膜血管新生の評価法の確立をおこなうことである。

B. 研究方法

1) 未熟児網膜症マウスモデルの作成

未熟児網膜症の動物モデルとして「酸素誘導虚血網膜症モデル (Oxygen-induced Ischemic Retinopathy)」を用いた。同モデルの作成方法は、過去の報告に記載された方法 (Smith LE, et al. Invest Ophthalmol Vis Sci. 1994) に準じた。すなわち、マウスの新生仔を生後7日目 (P7) の時点で母親マウス (Nursing mother) とともに高濃度酸素 (80% O₂) に暴露し、5日後 (P12) に通常酸素分圧へ戻す方法を用いた。動物実験施設に常設されたガス供給装置 (酸素) を酸素インキュベーター (図1) に接続し、高濃度酸素条件でマウス飼育をおこなった。マウス飼育ケージ内の状態をモニターするために、高濃度酸素インキュベーター内には吸湿材、酸素濃度計および湿度計を設置した。



<図1 高濃度酸素インキュベーター>

2) 網膜血管新生に対する評価法の確立

通常酸素分圧 (大気条件下) へ戻し、その5日後 (P17) の時点で血管新生の状態を評価する実験プロトコルとした。網膜血管新生の評価法は、共同研究者である石田らが留学中に以前報告したレクチン灌流ラベル法変法に準じた (Ishida S, et al. Nat Med. 1994)。すなわち、深麻酔を動物に施した後に開胸し、PBS で心臓灌流をおこなって血液を循環系から除去した後に FITC-Concanavalin A lectin (FITC-Con A) を心臓灌流し、再度 PBS で循環系を洗浄した。その後、眼球摘出をおこない、1%PFA で組織固定し、網膜フラットマウントを作成した。虚血網膜および病的血管新生の形成は、倒立型蛍光顕微鏡 (BIOREVO、キーエンス社) を用いて観察した。

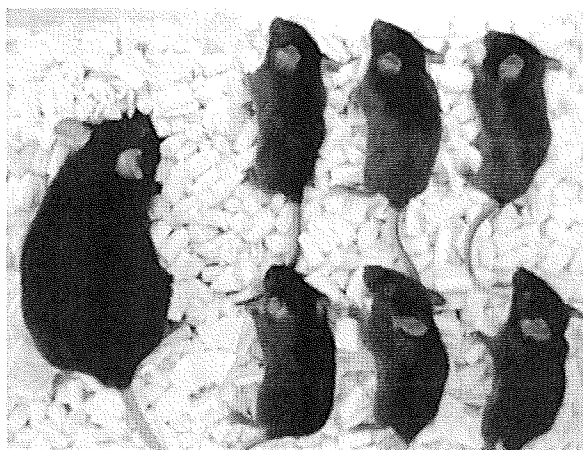
(倫理面への配慮)

本実験は、北海道大学動物実験委員会の動物実験倫理審査における実験承認を受けており、その承認されたプロトコル内で施行されている。

C. 研究結果

1) 未熟児網膜症マウスモデルの作成

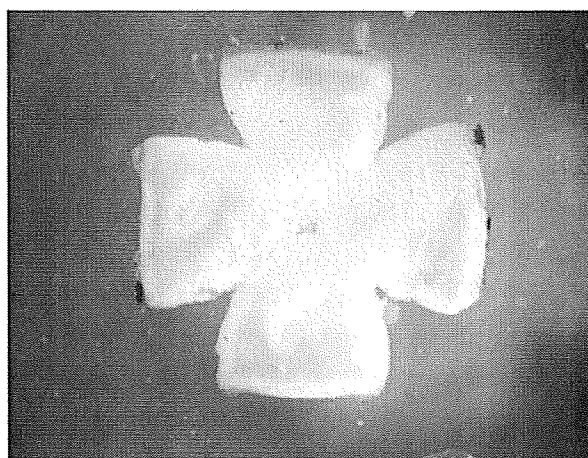
実験開始時の問題点として、P17 時点での個体間の成長差があった。この問題は、生後直後の時点で母親マウス (Nursing mother) 1匹に対する新生仔数を6匹と一定化することで解決できた (図2)。



<図2 P17時点での虚血網膜症マウス>

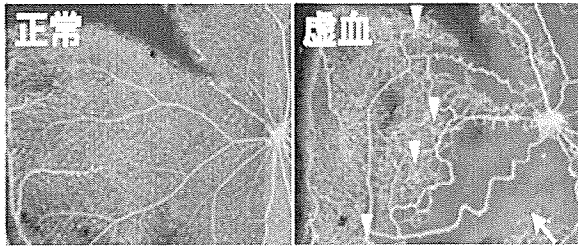
2) 網膜血管新生に対する評価法の確立

網膜フラットマウントの作成は新生仔の眼球サイズが小さいためにやや技術的習熟を要したが、複数回の施行および手技の改良によって安定した作成が可能となった (図3)。



<図3 網膜フラットマウント>

蛍光顕微鏡による観察では、大気圧条件下で飼育した正常マウス（図4左）では生じていない網膜虚血部（図4右、矢印）および病的新生血管の形成（図4右、矢頭）を虚血網膜症モデルで認めることができた。



<図4 P17時点での網膜所見>

また、網膜血管内には白血球接着も確認された。

D. 考察

今年度の実験目的である安定した未熟児網膜症モデル作製法および網膜血管新生の評価手技の確立は達成されたと考える。過去に報告された方法に準じてモデル作成をおこなったが、虚血網膜症マウスでは全ての動物で網膜血管新生が観察されるようになった。この結果を受けて、次年度は同一の方法で作成した虚血網膜症マウスに対してSRPK選択的阻害剤SRPIN340を投与し、その血管新生抑制効果を検討する予定である。今年度の実験を通じて感じられたことであるが、新生仔マウス（P17）の眼球サイズは非常に小さく、硝子体注射などの眼内への薬剤投与はほぼ手技的に不可能と考えられる。しかしながら、将来的に臨床応用が行われた際の投与方法は眼局所で行われると考えられるため、眼局所投与した場合の全身的な薬剤動態や副作用発現などを本研究課題ではする必要がある。阻害剤の投与方法については、今後検討を要すると考えられた。

また、今回の実験ではFITC-Con Aによって染色された白血球の血管壁への接着も観察された。虚血網膜症モデルにおける無血管野形成は、網膜血管内皮細胞のアポトーシスによる血管退縮であることが過去に報告されているが、これには白血球接着とFasL-Fasを介するアポトーシスが関与することを共同研究者である石田らが過去に報告している。次年度の研究においてSRPK選択的阻害剤の効果を考察していく上で、同阻害剤がこの白血球接着はどの現象にも関与するかどうか

E. 結論

安定した未熟児網膜症モデル作製法および網膜血管新生の評価手技の確立は達成された。次年度は本結果を元にして、未熟児網膜症マウスにおけるSRPK選択的阻害剤の抑制効果を検討する予定である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

3. 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 (難治性疾患克服研究事業)
(分担) 研究報告書

未熟児網膜症の原因と治療に関する研究

研究分担者 片岡直行

研究要旨

網膜での血管新生因子VEGFの発現抑制を目指し、転写阻害因子IPASをHIF3 α のmRNA前駆体から産生させるための選択的スプライシング制御機構の解析に用いるレポーターを作製した。

A. 研究目的

血管新生因子VEGF-Aの転写調節には、低酸素応答遺伝子の転写因子HIFが関わっている。HIFは α と β のサブユニットからなり、HIF α をコードする遺伝子は3つ存在する。その内の1つHIF3 α には、IPASというスプライシングバリエーションが報告されている。IPASは低酸素状態でのみ産生され、HIFによる転写を阻害する。そこで、IPASの発現を誘導することで、VEGFの発現を抑えることを目指し、選択的スプライシングにより、HIF3 α のmRNA前駆体からIPAS mRNAが産生される機構を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

HIF3 α とIPASとでスプライシングパターンが異なる領域をマウスゲノムよりクローニングし、細胞内で選択的スプライシングを解析できるプラスミドの構築を目指した。

(倫理面への配慮)

組換えDNA実験等は、研究者が所属する大学の実験指針やガイドラインに準拠して行った。

C. 研究結果

マウスHIF3 α 遺伝子のエクソン3から4までの領域をクローニングし、スプライシングパターンによってGFPまたはRFPが産生されるレポータープラスミドを構築した。

D. 考察

細胞内で蛍光観察できるレポーター系ができたため、今後は各種マウス培養細胞でHIF3 α 型とIPAS型mRNAの比を比較し、最適な細胞を選択する予定である。

E. 結論

スプライシングレポータープラスミドが作成できたため、細胞株や初代培養細胞を用いてスプライシング機構を解析する系が構築できた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nojima, T., Oshiro-Ideue, T., Nakanoya, H., Kawamura, H., Morimoto, T., Kawaguchi, Y., **Kataoka, N.**, and Hagiwara, M. (2009)

Herpesvirus protein ICP27 switches PML isoform by altering mRNA splicing.

Nucleic Acids Research **37**: 6515-6527

Kataoka, N., Fujita, M. and Ohno, M (2009).

Functional association of the Microprocessor complex with spliceosome

Molecular and Cellular Biology **29**: 3243-3254

2. 学会発表

Kataoka N., Fujita, M. and Ohno M. (2009)

Functional association of the Microprocessor complex with spliceosome.

Eukaryotic mRNA processing, Cold Spring Harbor,

New York, USA. August 18-22

片岡直行, 二宮賢介, 吉田真由美, 萩原正敏 (2009)

選択的スプライシング調節因子 SRp75 の

標的遺伝子の同定と解析

第11回日本RNA学会年会 新潟朱鷺メッセ

7月27日-29日

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
萩原正敏、野島孝之	ウイルスによるスプライシング暗号の利用と攪乱	実験医学	Vol. 27 No. 10		2009
Takeuchi A, Hosokawa M, Nojima T, Hagiwara M	Splicing reporter mice revealed the evolutionally conserved switching	PLOS One	in press		2010
Kuroyanagi H, Ohno G, Sakanabe H, Maruoka H, and Hagiwara M	Visualization and genetic analysis of alternative splicing regulation <i>in vivo</i> using fluorescence reporters in transgenic <i>Caenorhabditis elegans</i> .	Nature Proteomics	in press		2010
Nowak DG, Amin EM, Rennel ES, Hoareau-Aveilla C, Gammons M, Damodaran G, Hagiwara M, Harper SJ, Woolard J, Ladomery MR, and Bates DO	Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) splicing from pro-angiogenic to anti-angiogenic isoforms - a novel therapeutic strategy for angiogenesis.	J. Biol. Chem.	285	5532-5540	2010
Nojima T, Oshiro-Ideue T, Nakano H, Kawamura H, Morimoto M, Kawaguchi Y, Kataoka N and Hagiwara M	Herpesvirus protein ICP27 switches PML isoform by altering mRNA splicing.	Nucleic Acids Res	37	6515-6527	2009
Jiang K, Patel NA, Watson JE, Apostolatos H, Kleiman E, Hanson O, Hagiwara M, Cooper DR	Akt2 regulation of Cdc2-like kinases (Clk/Sty), serine/arginine-rich (SR) protein phosphorylation, and insulin-induced alternative splicing of PKC β II mRNA.	Endocrinology	150	2087-2097	2009

Splicing Reporter Mice Revealed the Evolutionally Conserved Switching Mechanism of Tissue-Specific Alternative Exon Selection.

Akihide Takeuchi^{1,3}, Motoyasu Hosokawa², Takayuki Nojima^{1,2}, Masatoshi Hagiwara^{1,2,3,4}

¹Department of Functional Genomics, Medical Research Institute, Tokyo Medical and Dental University, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

²Laboratory of Gene Expression, School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

³Department of Anatomy and Developmental Biology, Kyoto University Graduate School of Medicine, Sakyo-ku, Kyoto, Japan

⁴Corresponding author

Mailing address: 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan.

Phone: +81-3-5803-5838. Fax: +81-3-5803-5853. E-mail: m.hagiwara.end@mri.tmd.ac.jp

Abstract

Since alternative splicing of pre-mRNAs is essential for generating tissue-specific diversity in proteome, elucidating its regulatory mechanism is indispensable to understand developmental process or tissue-specific functions. We have been focusing on tissue-specific regulation of mutually exclusive selection of alternative exons because this implies the typical molecular mechanism of alternative splicing regulation and also can be good examples to elicit general rule of "splice code". So far, mutually exclusive splicing regulation has been explained by the outcome from the balance of multiple regulators that enhance or repress either of alternative exons discretely. However, this "balance" model is open to questions how to ensure the selection of only one appropriate exon out of several candidates and how to switch them. To answer these questions, we generated an original bichromatic fluorescent splicing reporter system for mammals using fibroblast growth factor-receptor 2 (FGFR2) gene as model. By using this splicing reporter, we demonstrated that FGFR2 gene is regulated by the "switch-like" mechanism, in which key regulators modify the ordered splice-site recognition of two mutually exclusive exons, eventually ensure single exon selection and their distinct switching. Also this finding elucidated the evolutionally conserved "splice code", in which combination of tissue-specific and broadly expressed RNA binding proteins regulate alternative splicing of specific gene in tissue-specific manner. These findings provide the significant cue to understand how a number of spliced genes are regulated in various tissue-specific manners by a limited number of regulators, eventually to understand developmental process or tissue-specific functions.

Introduction

Genome projects have shown that metazoans generate a hugely diverse proteome from a limited number of genes. This finding underscores the importance of alternative splicing, through which a single gene can generate multiple structurally and functionally distinct protein isoforms. Moreover, recent transcriptome analyses with splicing-sensitive microarrays or deep sequencers have revealed that alternative splicing occurs in more than 90% of multi-exon genes in human [1] and over 60% of these cases are regulated in a tissue- and cell type-specific manner [2]. Alternative splicing is regulated by auxiliary cis-elements with regulatory proteins that enhance or repress splicing of adjacent exons [3,4] however, the mechanism by which a number of genes are regulated in various tissue-specific manner by a limited number of regulatory factors remains unclear.

In mammals, fibroblast growth factor-receptor 2 (FGFR2) is one of the best

characterized gene in which mutually exclusive alternative splicing produces two isoforms. Exon 8 (also termed IIIb) isoform is specifically expressed in epithelial tissues, whereas exon 9 (or IIIc) isoform is selected in non-epithelial or mesenchymal tissues [5,6]. The structural difference between two splice isoforms markedly affects the specificity of ligand-receptor binding [7,8,9], and exon switching is shown to be essential for development in the mouse [10,11]. Several factors have been identified which positively or negatively regulate either of alternative exons of FGFR2 independently. For exon 8 regulation, Del Gatto-Konczak et al. found that heterogeneous nuclear ribonucleoprotein, hnRNP A1, binds to exon 8 (also termed K-SAM exon) as ESS (exonic splicing silencer) and represses its inclusion [12]. Carstens et al. found the polypyrimidine tract binding protein (PTB) represses exon 8 inclusion through ISS-1 and ISS-2 (intronic splicing silencers-1 and 2) [13]. Warzecha et al. recently cloned RBM35a and RBM35b as epithelia-specific activators of exon 8 inclusion, and renamed them epithelial splicing regulatory proteins 1 and 2 (ESRP1 and ESRP2), respectively [14]. For exon 9 regulation, Chen et al. found that Tra2 β represses the selection of exon 9 [15]. Baraniak et al. reported that Fox2 represses selection of exon 9 through binding to a UGCAUG sequence in intron 8 [16]. Hovhannisyanyan et al. found that a hnRNP M binds to ISS-3 and represses inclusion of exon 9 [17]. Manger et al. showed that hnRNP H and F interact with Fox2 and repress exon 9 inclusion [18]. Also, presence of unknown enhancer is speculated for exon 9 inclusion through ISE (intronic splicing enhancer) in intron 9 [14]. So far, mutually exclusive splicing regulation is widely believed as the outcome from the balance of multiple regulators that enhance or repress either of alternative exons discretely [19,20]. However, this "balance" model is open to questions, 1) How the balance of multiple regulators can ensure the selection of only one appropriate exon out of several candidates?, 2) Whether transcriptional or post-transcriptional control of multiple regulators is possible to achieve distinct switching of alternative exons?, 3) If 2) is the case, how to control the multiple regulators at once for exon switching? To answer these questions, we generated a bichromatic fluorescent splicing reporter system for mammals using FGFR2 gene as a model. This reporter contains entire cis-elements necessary to reproduce native alternative splicing regulation and enable us to visualize and monitor it *in vitro* and *in vivo*. The transgenic mice expressing this splicing reporter clearly showed the epithelial tissue-specific splicing pattern throughout their entire bodies. By using this splicing reporter, we demonstrate that key regulators define the single exon expression in the tissue-dependent manner through the ordered splice-site recognition of the mutually exclusive exons.

Results

Generation of the FGFR2 splicing reporter system

We used a 3.7-kb genomic fragment of FGFR2 gene that included two alternative exons (exon 8 and 9) flanked by their upstream and downstream exons (exon 7 and 10), with introns in between (Figure 1A). By using mostly entire genomic region around alternative exons, this reporter system was expected to contain all the regulatory cis-elements essential for tissue-specific regulation and to tell which splice site sequences and cis-elements are truly critical for regulations. The genomic fragment was cloned into a vector containing RFP and EGFP in tandem with different reading frames [21]. With this reporter system, splicing regulation could be monitored from a single reporter vector that expresses either EGFP when exon 8 is chosen or RFP when exon 9 is selected (Figure 1A).

By using two prostate carcinoma cell lines, AT-3 and DT-3 cells, we then examined whether the reporter system could reflect cell type-specific splicing regulation. AT-3 cell is a mesenchymal-type cell that specifically expresses exon 9 isoform of endogenous FGFR2, and DT-3 cell is an epithelial-type cell that predominantly expresses exon 8 isoform [22]. When this reporter system was introduced into these two cell lines, AT-3 cell specifically expressed exon 9-RFP and DT-3 cell predominantly expressed exon 8-EGFP (Figure 1B). We therefore could confirm that our reporter vector reflects cell type-specific regulation of endogenous FGFR2 splicing.

We next checked whether our reporter system could show tissue-specific regulation of FGFR2 splicing *in vivo* by generating transgenic mice from this reporter. A well-known change in the FGFR2 splicing isoforms occurs in mouse development stages from E14.5 to E16.5. In these stages, differentiation of future epithelial cells is induced and they start expressing exon 8 isoform of FGFR2 to receive morphogen signals, such as FGF-10, from mesenchymal cells [23]. When the whole body of a transgenic embryo was examined at E14.5, a broad RFP signal was detected throughout the entire body, and a specific EGFP signal was detected as the whisker pattern and on the edges of limbs or the body (Figure 1C). We further evaluated the detailed expression profile through examining series of sections from the transgenic embryos in the late development stage of E16.5 (Figure 1D). An EGFP signal was detected specifically in cells on the surface of the skin and bulbs of hair follicles, where differentiated epithelial cells were located (Figure 1D, shown with arrows). Also, the EGFP signal was detected at epithelial cells in the alveoli of the lung, in the esophagus and colon, at the thymus epithelia, and at the salivary gland ductal cells (Figure 1D, arrows in the top and middle panels). A strong RFP signal was detected in the developing brain (hippocampus) and peripheral nervous system (trigeminal ganglia) (Figure 1D, arrows in bottom panels). Expression patterns of EGFP were compatible with reported FGFR2 exon 8 expression patterns [23,24], indicating that our reporter system

reflects endogenous splicing regulation of FGFR2 in vivo and the genomic fragment used in the vector contains the regulatory elements necessary for tissue-specific switching of mutually exclusive exons.

Unbalanced sequence of 3' splice site is essential for mutually exclusive exon selection

In the embryos of splicing reporter transgenic mouse, RFP was expressed almost throughout the entire body, and EGFP was specifically expressed in epithelial cells. This expression pattern suggested the possible regulatory mechanism that exon 9 was dominantly selected as "default" in reporter transgenic mouse, and epithelial-specific regulators might promote inclusion of exon 8. To test this hypothesis, we initially compared sequence of alternative exons including their 3' and 5' splice sites. The major difference identified between these two exons is that exon 8 has a weaker 3' splice site and a polypyrimidine moiety that contains several mismatches from the consensus sequence (Figure 2A, TGTTCTAG ca), whereas exon 9 has stronger 3' splice site which has conserved consensus sequences (Figure 2A, TTTTCTAG gc). There are no obvious differences in their 5' splice sites (data not shown). To examine whether the unbalanced 3' splice site is essential for "default" selection of exon 9 in non-epithelial cells, we introduced mutations in their 3' splice sites and observed change in splicing regulations. We prepared two types of mutated vectors, one has the same stronger 3' splice sites on both exon 8 and 9 (Figure 2A, E8-S vector), and the other has the same weaker 3' splice sites on both exon 8 and 9 (Figure 2A, E9-W vector). These vectors were transfected into AT-3 and DT-3 cells, and the change of splicing regulation was examined by RT-PCR. When WT vector was introduced into AT-3 cell, it adopted almost 100% of the exon 9 form, whereas DT-3 cell adopted around 45% (34.5/(34.5 + 42.7) %) of exon 8 form among the single inclusion product (Figure 1B, lane 1, 4), which was consistent with the expression pattern of fluorescence in Figure 1B. Our splicing reporter was designed not to cause early premature termination codon in double-inclusion form to escape the nonsense-mediated decay (NMD) reaction [25]. We therefore could monitor all splicing products, including the double-inclusion and the double-skip forms. Strikingly, when E8-S vectors were transfected, AT-3 cell mostly expressed the double-inclusion form, meaning that two alternative exons were processed as constitutive exons (Figure 2B, lane 2). This result indicates that the weaker 3' splice site of exon 8 is critical for single exon selection of exon 9 from two mutually exclusive exons in non-epithelial AT-3 cell (Figure 2B, lane 2), though the ESS or ISS on or close to exon 8 may be required for the complete suppression [13,26,27]. When the 3' splice site of exon 9 was weakened (E9-W vector), selection in DT-3 cell almost fully switched to exon 8 (Figure 2B, lane 4 and 6), indicating that full repression of exon 9 might be important for exon 8 inclusion

in epithelial DT-3 cell. Thus unbalanced 3' splice sites are essential for the single exon choice from mutually exclusive exons and for their switching.

Disruption of exon 9 causes switching to exon 8

Results in Figure 2 showed that weaker 3' splice sites of exon 8 is essential for the single exon selection of exon 9 in non-epithelial AT-3 cell. And epithelial DT-3 cell efficiently chose exon 8 form when 3' splice site of exon 9 was weakened. These observations suggest a possibility that repression of exon 9 causes switching to exon 8. To examine this hypothesis, we introduced mutations on either or both of the 3' and 5' splice sites of exon 9 to destroy its splice site consensus sequence mimicking repression, and transfected these into AT-3 cell (Figure 3A). When both splice sites of exon 9 were mutated (Figure 3A, 3' & 5' ss Mut), AT-3 cell expressed the exon 8 form (22.9%) and the double-skip form (77.1%) (Figure 3B, lane 4). These results indicated that blocking of exon 9, at least partially, promotes switching to exon 8 in AT-3 cell. Interestingly, mutation of the 3' splice site (Figure 3A, 3' ss Mut) was just sufficient to cause this switching (Figure 3B, lane 2), whereas mutation of the 5' splice site (Figure 3A, 5' ss Mut) produced an aberrant splicing product of exon 9 using a cryptic 5' splice site at ggGT in exon 9 (Figure 3B, lane 3 indicated by arrowhead and scheme was illustrated on the right side). These results indicate that recognition of 3' splice site is essential for exon 9 selection, suggesting the possibility that recognition of exon 9 is its 3' splice site dependent. To test this hypothesis, we performed in vitro splicing assay to directly monitor the splice site recognition by U2 and U1 snRNA/snRNP binding (Figure 3C). The ³²P-labeled RNA probes for wild-type and mutated exon 9 containing the flanking introns (top panels of Figure 3C) were crosslinked by UV irradiation after incubation with HeLa nuclear extract and separated by electrophoresis. HeLa cell was confirmed to have non-epithelial cell character. The specificity of U2 or U1 binding was confirmed by addition of an oligonucleotide complementary to U2 or U1, and RNase H digestion [28,29] (Figure 3C and Figure S1). In the splicing conditions, binding and shift of U1 and U2 snRNAs were observed with the WT RNA probe, in which the U1 and U2 bands overlap (Figure 3C, lane 1-4, and Figure S1, lane 1-4, indicated by an arrow). They became fainter by RNase H digestion with U1 (Figure 3C, lane 3, and Figure S1, lane 3) or U2 oligos (Figure 3C, lane 4, and Figure S1, lane 4). Shifted band almost disappeared with double digestion with U1 +U2 oligos (Figure S1, lane 7), while the band was resistant against the RNase H digestion with U6 oligo (Figure S1, lane 8), indicating that the exon 9 RNA probe is recognized by U1 and U2 oligos in this splicing condition. Strikingly, the 3' splice site mutation of the exon 9 RNA probe resulted in a significant loss of the shifted band (Figure 3C, lane 6-8). These results suggested that recognition of exon 9 primary depends on the binding of U2 snRNA to the 3' splice site. On the contrary, with the probe harboring with 5' splice site

mutation (5' ss mutation), binding of both U1 and U2 was retained (Figure 3C, lane 10-12), in good accordance with the results of RT-PCR shown in Figure 3B, lane 3. These results suggest a possibility that binding of U2 snRNA supports the binding of U1 snRNA, so that much weaker cryptic 5' splice sites in exon 9 was used in its 5' ss mutation (Figure 3B, lane 3 and Figure 3C, lane 12, indicated by an arrowhead with an asterisk). These observations give a possible explanation why the selective use of exon 9 in non-epithelial cells depends on the relative strength of its 3' splice site.

Identification of silencing elements for exon 9 recognition

Non-Epithelial or Mesenchymal regulation, unbalanced 3' splice sites are essential for single exon selection of exon 9 in non-epithelial cells and recognition of exon 9 is its 3' splice site dependent. Also disruption of this 3' splice site of exon 9 partially caused switching to exon 8. These results suggest the presence of silencer(s) for exon 9 to cause switching to exon 8 in epithelial cell. To test this hypothesis, we initially screened suppressive cis-elements located near the 3' splice site of exon 9, and picked up two highly conserved sequences: the UGCAUG sequence and ISE/ISS-3 (intronic splicing enhancer/silencer-3) in intron 8, both of which have been reported as the silencing cis-elements for exon 9 [16,30] (Figure 4A). To examine whether these two cis-elements are essential for silencing exon 9, we introduced mutations in either or both UGCAUG and ISE/ISS-3 in our reporter, and transfected into epithelial DT-3 cell. First, we substituted UGCAUGCAUG for UACGUACGUG to disrupt the binding to the RNA-binding protein of Fox, which was reported as the repressor of exon 9 [16]. Then, the ratio of exon 8 selection in DT-3 cell fell by a half (44.7% to 21.9%, Figure 4B, lane 2). Next, we deleted ISE/ISS-3, an 85-bp sequence containing several dinucleotide GU sequences. The deletion of ISE/ISS-3 reduced the ratio of exon 8 inclusion to one-fourth (44.7% to 12.4%, Figure 4B, lane 3). When both of these elements were mutated, DT-3 cell could no longer choose exon 8, and all splicing products were the exon 9 form (Figure 4B, lane 4). These results indicate that DT-3 cell use both of these cis-elements to select exon 8 presumably by silencing the exon 9 via its 3' splice site.

Regulatory mechanism of transacting factors to switch exons

Results from Figure 4 suggest that both UGCAUG and ISE/ISS-3 are necessary and sufficient for selecting exon 8. A previous study has shown that Fox2 promotes exon 8 inclusion through UGCAUG in intron 8 [16]. Also, a recent study from cDNA library screening identified epithelial splicing regulatory protein ESRP1 and ESRP2, which mediate exon 8 inclusion through binding to ISE/ISS-3 [14]. We therefore examined whether Fox1, Fox2, ESRP1, and ESRP2 promote switching from exon 9 to exon 8. First, we examined and compared the

expression levels of these RNA-binding proteins between AT-3 and DT-3 cells by RT-PCR. Fox2 was expressed in both cell lines at similar levels, whereas expression of Fox1 was undetectable (Figure 4C), and both ESRP1 and ESRP2 were specifically expressed in epithelial type DT-3 cell (Figure 4C). Considering the observation that both UGCAUG and ISE/ISS-3 are essential cis-elements for selecting exon 8 (Figure 4B), broadly expressed Fox2 might cooperates with epithelial-specific ESRP1 and ESRP2 for exon 8 inclusion. To test this hypothesis, we transfected our FGFR2 splicing reporter with Fox1, Fox2, ESRP1, or ESRP2, or combinations of these into HeLa cell, which has non-epithelial cell character (Figure 5A, lane 1).

When Fox1 or Fox2 was introduced into HeLa cell, selection of exon 8 increased in a dose-dependent manner and reached 10% (Figure 5A, lanes 2-4) or 40% (Figure 5A, lanes 5-7), respectively. When ESRP1 or ESRP2 was introduced, selection of exon 8 also increased in a dose-dependent manner, and reached over 90% (Figure 5A, lanes 8-10 and 15-17, respectively). As HeLa cell expresses endogenous Fox2 in a similar manner to AT-3 cell (Figure 5A, lane 1), we introduced ESRP1 or ESRP2 under the Fox2 knockdown condition, and evaluated the cooperative effects of ESRP1 or ESRP2 with endogenous Fox2. The knockdown efficiency of Fox2 was more than 80% at the mRNA level (average 81.2%). Knockdown of endogenous Fox2 decreased the ratio of exon 8 selection promoted by ESRP1 or ESRP2, with a maximum reduction of 24% (35.1-11.0%, Figure 5A, lane 8 versus lane 11) or 23% (55.9-32.6%, lane 15 versus lane 18), respectively. When both Fox2 and ESRP1 were transfected, the ratios of exon 8 inclusion were similar to those obtained with a single transfection of ESRP1 (Figure 5A, lanes 21-24). These results indicate that introduced ESRPs promote exon 8 inclusion with endogenous Fox2, suggesting that Fox2 and ESRPs cooperatively act together for exon 8 inclusion. These results were also confirmed by means of the fluorescence from the splicing reporter co-transfected with Fox1, Fox2, ESRP1, or ESRP2, or both Fox2 and ESRP1 (Figure 5B). Over-expression of ESRP1 or ESRP2 changed the color from red to green, but Fox1 or Fox2 alone had a smaller effect on the color change. Co-transfection of Fox2 and ESRP1 gave the maximum effect on the color switching which reflected the switching of proteins coded by the mutually exclusive exons. We then tested whether exon switching by Fox2 and ESRP1 depends on UGCAUG and ISE/ISS-3 in intron 8.

We performed overexpression study of Fox2 and/or ESRP1 on reporter vectors mutated on either UGCAUG, ISE/ISS-3, or both of them with or without knock down condition of endogenous Fox2. When Fox2 was transfected with the UGCAUG site-mutated reporter, the promoting effect of Fox2 on exon 8 inclusion was lost (Figure 6A, lane 7). Overexpression of ESRP1 still promoted exon switching of the UGCAUG-mutated reporter, but the ratio of exon 8 selection was slightly reduced (Figure 6A, lane 8) in comparison with the wild-type reporter

(Figure 6A, lane 3). To the contrary, when ISE/ISS-3 was mutated, the promotion effect of ESRP1 on the exon switching was significantly reduced (Figure 6A, lanes 13), and the effect of Fox2 remained (Figure 6A, lanes 12 and 15). When both UGCAUG and ISE/ISS-3 were mutated, neither Fox2 nor ESRP1 caused a drastic switching any more (Figure 6A, lane 16-20). These results showed that Fox and ESRP cooperatively promote switching from exon 8 to 9 through the cis-elements of UGCAUG and ISE/ISS-3 located near exon 9.

Next, we tested whether Fox and/or ESRP cause switching from exon 9 to exon 8 through interruption of exon 9 recognition. We examined this under the *in vitro* splicing conditions using ³²P-labeled RNA probe of exon 9 with introns containing UGCAUG and ISE/ISS-3 sites (Figure 6B, top panel) and the exon 8 RNA probe of same stretches. When the exon 9 probe was crosslinked by UV irradiation after incubation with HeLa nuclear extract and separated by electrophoresis, shifted band by crosslinking U1 and U2 was observed as overlap (Figure 6B, lane 2, indicated by arrow), as same as Figure 3C. However, in the exon 8 probe, only shifted band by U1 was observed (Figure 6B, lane 8, indicated by arrow, and data not shown for RNaseH digestion), presumably due to its weaker 3' splice site. When recombinant Fox2 or ESRP1 protein was added with the exon 9 probe, shifted bands by U1 and U2 snRNA were decreased (Figure 6B, lanes 4 and 5, respectively), and almost disappeared by addition of both Fox2 and ESRP1 proteins (Figure 6B, lane 6). However, suppressive or activating effect of Fox2 or/and ESRP1 was not obvious with exon 8 probe (Figure 6B, lanes 9-12). These data indicate that both Fox and ESRP interrupt exon 9 recognition *in vitro*. Combining results from Figure 5 and Figure 6 indicate that Fox and ESRP disrupt exon 9 recognition from its 3' splice site through UGCAUG and ISE/ISS-3, and promoted switching to exon 8.

Expression profile of Fox and ESRP coincide with exon8-EGFP *in vivo*

In vitro study showed that disruption of exon 9 recognition from its 3' splice site by Fox and ESRP through UGCAUG and ISE/ISS-3 promoted switching to exon 8. Remaining question is whether the expression of Fox and ESRP coincides with the expression of exon 8 form in tissue-specific manner during development *in vivo*. We examined the expression profiles of Fox1, Fox2, ESRP1, and ESRP2 by *in situ* hybridization using the serial sections from our reporter transgenic mice embryos at E16.5 (Figure 7). As we have already shown in Figure 1D, the exon 8-EGFP expression was on left panels (as indicated by white arrows). In the *in situ* hybridization performed with adjacent sections, Fox1 expression was not detected in tissues where the EGFP signal was observed, whereas strong signal of Fox1 was detected mainly in neuronal tissues in the same sections (data not shown). To the contrary, Fox2 mRNA was detected broadly throughout whole embryos at this stage, and its expression was overlapped with exon 8-EGFP signals localized in the epithelial tissues (indicated by black arrows). The

expression of ESRP1 and ESRP2 was specifically detected in epithelial tissues (indicated by black arrows) and these expression almost completely overlapped with exon 8-EGFP signals during developing stage. These observations *in vivo* support an epithelial regulation model in Figure 8A in which tissue specific factor ESRPs act together with generally expressed Fox family to promote exon 8 inclusion.

Discussion

Several groups have generated reporter system to visualize splicing regulation of FGFR2 gene. Newman et al. generated fluorescent reporter vectors with the minimum genomic region that can reflect endogenous splicing regulation in AT-3 and DT-3 cells. With this reporter, they identified specific ISEs, including ISS/ISS-3, that respond to Fox regulation [31]. Bonano et al. constructed another fluorescent reporter vector by using the genomic fragment around exon 8, and they visualized the regulation of exon 8 inclusion in the mouse [32]. In this study, we originally developed a transgenic reporter system using FGFR2 gene as model and succeeded in visualizing tissue-specific expression profiles of the mutually exclusive exons through differential expression of EGFP and RFP in mice for the first time to our knowledge. Using the mostly entire genomic region around alternative exons with their upper and lower constitutive exons, we could evaluate which splice site sequences and cis-elements are truly critical for regulations. This system has great advantage, 1) to monitor the dynamism of splicing regulation *in vivo* with single cell resolution, 2) to identify essential cis-elements and trans-factors, and reveal the hidden mechanisms of splicing regulation like this study, 3) to identify the essential candidate factors by fluorescent color change or to screen the regulators using cDNA or siRNA library. In this way, splicing reporter system has great advantage to decipher the hidden splice code and also to reveal the important roles regulated by alternative splicing during development or in adult with tissue- or cell-type specific manner.

With splicing reporter system, we showed that two mutually exclusive exons of FGFR2 gene seem to have "primary" and "secondary" fates. Without tissue-specific regulators, "primary" exon 9 is chosen as the "default" and the "secondary" exon 8 is silenced due to its weaker 3' splice site with exonic and intronic splice silencers sequence around exon 8 (Figure 8A, Non-Epithelial or Mesenchymal regulation). When tissue-specific key regulator ESRPs are expressed, these factors bind close to the 3' splice site of "primary" exon 9 with Fox, repress exon 9 recognition, and then "secondary" exon 8 will be chosen instead of exon 9 (Figure 8A, Epithelial regulation). In this step, exon 8 selection may be activated by ESRPs and/or Foxs because ESRPs are cloned as activators of 5' exon when its binding site is located in

downstream intron [16, 30, 31]. Our observation that overexpression of ESRPs mostly caused switching from exon 8 to exon 9, but did not increase the double-skip form (Figure 5), may be in good accordance with this hypothesis. However, in our X-link experiment with RNA probe possessing both exon 8 and UGCAUG + ISE/ISS-3 on its down-stream intron (intron 7, 77bp; exon 8, 148bp; intron 8, 122bp; UGCAUG + ISE/ISS-3 portion from 5' of exon 9, 165 bp), we could not observe the increment of shifted band by addition of Fox2 and ESRP1 (data not shown). The deleted elements (ISE2, ISAR, and so on) or RNA structure may also be involved in the ESRPs-dependent promotion of exon 8 recognition, although more clarification is required.

Mutually exclusive alternative splicing regulated through the ordered splicing recognition with tissue specific factors has been observed in nematodes [33]. With this ordered splice-site recognition, transacting regulators can sequentially control the selection of mutually exclusive exons in a tissue-specific manner, in a similar manner to which a chess piece, usually a knight, can simultaneously attack a rook and check the king so that the former must be lost (Figure 8A). This regulatory mechanism clearly answered to our initial questions described in introduction. So far, tissue-specific alternative splicing regulation has been understood from the viewpoint of the balance between enhancement and silencing of the alternative exons mediated by trans-factors through specific cis-elements [3]. In this idea, each alternative exon is regulated discretely, and the final splicing isoforms are determined from the sum and balance of these independent regulations. If this were the case in mutually exclusive alternative splicing, the initial splicing products would be mixtures of the single-exon-inclusion form, double-inclusion form, and double-skip form. As the last two isoforms would be eliminated by NMD [25], only the single-exon-inclusion forms would remain as final splicing products. On the other hand, if mutually exclusive splicing is regulated by the switch-like manner, the initial spliced products would consist mainly of one of the single-inclusion forms. If the exon selection in AT-3 cell is on a balance of combined regulations of enhancer for exon 9 and repressor for exon 8, overexpression of repressor for exon 9 should produce mostly the double-skip form. We did not, however, observe this (Figure 5A). In addition, when the 3' splice site of exon 8 in the reporter was changed to be as strong as that of exon 9, the double-inclusion splicing product became dominant in AT-3 cell, without any change in the transacting factors or specific cis-elements affecting exon 8 (Figure 2, lane 2). Also, splice site mutation of exon 9 caused switching to epithelial exon 8 in non-epithelial AT-3 cell (Figure 3, lane 2 and 4). These results suggest that alternative splicing is not achieved by a complicated balance of multiple regulators, but is defined by a simple switch-like mechanism in which only one appropriate exon can be selected and switched by key regulators such as ESRPs.

Our previous study showed that mutually exclusive splicing of the worm FGFR

homologue gene *egl-15* is regulated by the cooperation of broadly expressed Fox-1/ASD-1 family and the muscle-specific RNA binding motif proteins (RBMs) of SUP-12 (a nematode homologue of mRBM24), which act together to repress inclusion of alternative exon 5B to promote muscle-specific expression of exon 5A [34,35] (Figure 8B, nematode). In the case of mammalian FGFR2, the generally expressed Fox family cooperate with the tissue-specific alternative splicing ESRPs (RBM35a & b) to repress alternative inclusion of exon 9 and to promote epithelial tissue-specific expression of exon 8 (Figure 8B, mammals). Moreover, both of nematode and mammalian Fox family proteins bind to the UGCAUG element, and SUP-12 and ESRPs bind to GU stretches. Nematode has rather similar number of genes (~20,000) comparing with mammals but the size of its genome is much smaller (about 1/30) with very shorter intron (average 561 bp). So, alternative splicing in nematode is considered to be regulated with much simpler rules [36,37]. Thus, it is amazing that regulatory mechanism of tissue-specific alternative splicing is evolutionally conserved from nematode to mammal, and regulation through Fox and another tissue-specific RBMs may turn out to be a widespread essential phenomenon to regulate tissue-specific alternative splicing of multiple genes. Our findings also provide the significant cue to understand how a number of spliced genes are regulated in various tissue-specific manners by a limited number of regulators, eventually to understand seemingly complicated developmental process or tissue-specific functions.

Materials and Methods

Plasmid construction

We constructed the reporter vector essentially as described in the text. The FGFR2 genomic region spanning from exon 7 to exon 10 from mouse genomic DNA was amplified by PCR and cloned into Gateway Destination vector (Invitrogen), carrying both EGFP (Clontech) and mRFP [38] with different reading frames, under the control of the CAGGS promoter. To stabilize and enhance reporter protein expression, artificial sequence of modified glutathione S-transferase (GST) gene (QIAGEN) was introduced in front of the FGFR2 genomic fragment and connected in frame with exon 7. A 1-kbp fragment at the center of the FGFR2 intron 9 was removed because of its significant reducing effect in mRNA expression. Mutations of cis-elements were introduced by using QuikChange XL II (Stratagene). Mouse Fox1 and Fox2 cDNAs were kindly provided by Dr. Kawamoto [39] and cloned into the Gateway Destination vector driven by a CAGGS promoter. Primer sequences for amplifying FGFR2, deleting 1kbp in the middle of intron 9, and introducing mutations were indicated in Method S1.