

様式3

平成 29 年度愛媛大学プロテオサイエンスセンター共同研究報告書

平成 30 年 2 月 28 日

国立大学法人愛媛大学
プロテオサイエンスセンター長 殿

研究代表者

所属機関 : 日本医科大学先端医学研究所

部局・職名 : 病態解析学部門分子細胞

構造学分野 教授

氏名 : 福原茂朋

1. 研究課題

ゼブラフィッシュを用いた新規血管新生制御タンパク質 KCTD10 の in vivo イメージング解析

2. 研究組織

氏名	所属機関・部局	職名	分担内容
研究代表者 福原茂朋	日本医科大学 先端医学研究所 病態解析学部門 分子細胞構造学 分野	教授	血管内皮細胞特異的に Lifeact 蛍光プローブを発現するゼブラフィッシュをベースとした KCTD10 遺伝子欠損個体の作成とその血管新生のタイムラプス解析
研究分担者 坂上倫久	愛媛大学 プロテオサイエンスセンター 細胞増殖・腫瘍 制御部門	助教	培養ヒト血管内皮細胞を用いた KCTD10 によるアクチン重合制御の分子メカニズムの解析

3. 研究成果

別紙のとおり

【研究課題名】

ゼブラフィッシュを用いた新規血管新生制御タンパク質 KCTD10 の in vivo イメージング解析

【研究者所属・職】

日本医科大学 先端医学研究所 病態解析学部門分子細胞構造学分野 教授

【氏名】

福原茂朋

【研究目的】

KCTD10 による血管新生制御機構を解明するとともに、生体内での役割を明らかにする

【研究内容】

- ・ TAL エフェクターヌクレアーゼを用いたゲノム編集技術により KCTD10 ノックアウトゼブラフィッシュを樹立し、個体発生時に起こる血管新生について、血管内皮細胞の動態とアクチン細胞骨格を in vivo タイムラプスイメージングにより詳細に解析した。
- ・ KCTD10 を欠損することで得られる血管新生阻害の詳細な分子メカニズムを明らかにする目的で、KCTD10 を発現抑制した培養ヒト血管内皮細胞を用いてアクチン重合関連分子の発現レベルをウェスタンブロット法や細胞免疫染色法により解析した。

【研究成果】

- ・ KCTD10 ノックアウトゼブラフィッシュは、受精後 33 時間までの節間血管および尾側血管において、野生型と比較して明らかな血管新生の遅延を認めた。しかし、本表現型の出現率には個体差があり、KCTD10 を欠損させても血管新生の遅延が全く認められない個体も存在した。一方で、KCTD10 ノックアウトゼブラフィッシュにおいては、管腔形成不全や F アクチン形成異常なども認められたが、これらの表現型の出現頻度も個体間に差を認めた。
- ・ KCTD10 を発現抑制した血管内皮細胞において、アクチン骨格制御活性を担う Rho ファミリータンパク質の中でも GTP 結合型の RhoA の発現が亢進していた。In vivo 環境下により近い三次元培養法を用いて KCTD10 の機能解析を実施した結果、KCTD10 を発現抑制した血管内皮細胞は血管先端細胞 (tip cell) 及び茎細胞 (stalk cell) 両者において明らかなアクチン過重合の表現型を認めた。

【成果発表】

なし

【今後の課題】

- ・ KCTD10 ノックアウトゼブラフィッシュの血管新生阻害としての表現型は、その出現

頻度が個体間で大きな差が認められたため、今後は n 数をさらに増やして検討を重ねる予定である。

- ・ KCTD10 を欠損したゼブラフィッシュは心臓形成不全により致死に至るため、野生型に比べて血液循環が存在しない。従って、KCTD10 ノックアウトゼブラフィッシュで認められた血管新生異常が血管内皮細胞の KCTD10 の機能不全によるものか、それとも血流低下に伴う 2 次的なものなのかは不明である。今後、この問題を解決するため、血流開始前に誘導される血管新生をライブイメージング解析により検討する。
- ・ 培養細胞で認められた活性型 RhoA の発現亢進としての表現型を、今後 KCTD10 ノックアウトマウスで解析を展開する予定である。