

様式3

令和元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

令和2年2月27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

新規 CUL3 複合体による血管新生制御機構の in vivo 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	研究全体の統括と血管内皮細胞特異的に KCTD10 あるいは CUL3 遺伝子をノックアウトさせる遺伝子改変マウスの作成および表現型評価
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	講師	培養ヒト血管内皮細胞を用いた CUL3-KCTD10 軸の機能解析。さらには、血管内皮細胞特異的に KCTD10 あるいは CUL3 遺伝子をノックアウトさせる遺伝子改変マウスの作成および表現型評価

3. 研究成果

別紙のとおり

【研究課題名】

新規 CUL3 複合体による血管新生制御機構の *in vivo* 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】

血管新生制御に重要である CUL3-KCTD10 複合体の機能を *in vivo* で明らかにする

【研究内容】

- ・ Floxed CUL3 マウス (Cul3^{tm1Jdsr}/J (The Jackson Laboratory 社より購入) および VE-cadherin CreERT2 マウス (C57BL/6-Tg(Cdh5-CreERT2) 慶應義塾大学 久保田義顕教授より譲渡) を交配し、タモキシフェン誘導型血管内皮細胞特異的 CUL3 ノックアウトマウスを作成した。
- ・ Floxed KCTD10 マウス (C57BL/6-Kctd10^{tm1855_3.1Arte} Tg (タコニック社より購入) および VE-cadherin CreERT2 マウス (C57BL/6-Tg(Cdh5-CreERT2) 慶應義塾大学 久保田義顕教授より譲渡) を交配し、タモキシフェン誘導型血管内皮細胞特異的 KCTD10 ノックアウトマウスを作成した。
- ・ CUL3 または KCTD10 を発現抑制した血管内皮細胞 HUVEC を用いて、その内皮細胞機能としての表現型を *in vitro* で解析した。

【研究成果】

- ・ Floxed CUL3 ヘテロマウス同士を交配し、Floxed CUL3 ホモマウスを作製した。ホモマウスと VE-cadherin CreERT2 マウスを交配し、Floxed CUL3 ヘテロ;VE-cadherin CreERT2 マウスを得た。現在このマウスを大量作出段階にあり、表現型解析のための必要個体数が揃い次第、タモキシフェンを投与して発生初期の網膜血管新生を評価する予定である。
- ・ Floxed KCTD10 ヘテロマウス同士を交配し、Floxed KCTD10 ホモマウスを作製した。今後ホモマウスと VE-cadherin CreERT2 マウスを交配し、Floxed KCTD10 ヘテロ;VE-cadherin CreERT2 マウスを得る予定としており、上記の CUL3 ノックアウトマウス同様に解析を進める予定としている。
- ・ CUL3 を発現抑制した HUVEC においては、血管内皮細胞のマーカー遺伝子である VEGFR2 や CD31 の発現低下に伴い、SM22 などの mesenchymal cell マーカーの発現上昇を認めていた。CUL3 は血管内皮細胞としての特異性維持に必須であることがわかり、CUL3 を欠損したマウスを用いた *in vivo* 解析においては内皮-間葉転換

(Endothelial-mesenchymal transition) の有無についても併せて検証する予定である。

【成果発表】

なし

【今後の課題】

- ・ 血管内皮細胞特異的 CUL3 および KCTD10 マウスを用いたマウス網膜血管新生における機能解析を実施する。生後 1 日目マウス皮下にタモキシフェンを三日間に渡って投与し、6 日目および 7 日目にアイソレクチン B4 によって血管内皮細胞を、ファロイジンによって細胞骨格を可視化し、血管構造を解析する。
- ・ CUL3 または KCTD10 ノックアウトマウスを用いて、血管内皮細胞マーカーである CD31 および間葉系細胞マーカーである aSMA や SM22 を組織染色し、内皮間葉転換における CUL3-KCTD10 複合体の *in vivo* での生理的意義を証明する。