

組織透明化技術を用いたマウス妊娠期の
血管構造に関する研究

2017年 1月

石 丸 友 博

組織透明化技術を用いたマウス妊娠期の
血管構造に関する研究

筑波大学大学院

生命環境科学研究科

生物機能科学専攻

博士(生物工学)学位論文

石 丸 友 博

目次

Chapter I.	序論	・ ・ ・ ・ ・	P1
	図表	・ ・ ・ ・ ・	P4
Chapter II.	血管内皮細胞における PRMT1 の欠損は胎仔血管の 形成異常を示す	・ ・ ・ ・ ・	P8
	要旨		
	背景		
	実験材料および実験方法		
	実験結果		
	考察		
	図表	・ ・ ・ ・ ・	P32
Chapter III	結論	・ ・ ・ ・ ・	P48
Chapter IV	謝辞	・ ・ ・ ・ ・	P53
Chapter V	参考文献	・ ・ ・ ・ ・	P54

Chapter I

序論

血管は、酸素や栄養素など様々な物質の運搬を担う、個体の生存に必須の組織である。血管は内膜、中膜、外膜の 3 層から形成されており、このうち、内膜を形成する血管内皮細胞は全ての血管に存在し、血管の発達や機能に中心的な役割を果たす。既存の血管内皮細胞が増殖・分岐することで新たな血管を作る現象は血管新生と呼ばれ、生体内の殆どの血管は血管新生によって形成される。これまで、遺伝子の欠損マウスを用いた研究から、増殖因子とその受容体、また転写因子が、血管新生を制御する因子(血管新生関連因子)として報告されている (Jain *et al.* 2003; Park *et al.* 2013)。生体内の正常な血管形成では、これら血管新生関連因子が、厳密に制御され機能すると考えられるが、その詳細は明らかにされていない。

近年、血管新生関連因子の制御メカニズムとして、タンパク質の翻訳後修飾 (Post-translational modification: PTM) が注目されている。PTMs には、リン酸化やアセチル化、メチル化、ユビキチン化など複数の種類があり、PTMs によってタンパク質の構造や細胞内での局在が制御されていることが知られている (Fig. 1)。本研究では、PTMs の中でもアルギニン残基のメチル化に注目した。アルギニンメチル化は、リン酸化やリジンメチル化と比較すると報告が少なく、開拓途上の分野である。アルギニンメチル化は、タンパク質アルギニンメチル基転移酵素ファミリー (PRMTs) によって触媒される反応である。*in vivo* における研究では、それぞれの PRMT を欠損したマウスが作製されるなど、徐々に研究が進んできているものの (Fig. 2)、時期ごと、もしくは組織毎の PRMT の機能については未解明な点が多い。

PRMT1 は、PRMTs の中でも最も発現が高く (Bedford *et al.* 2009)、主要なアルギ

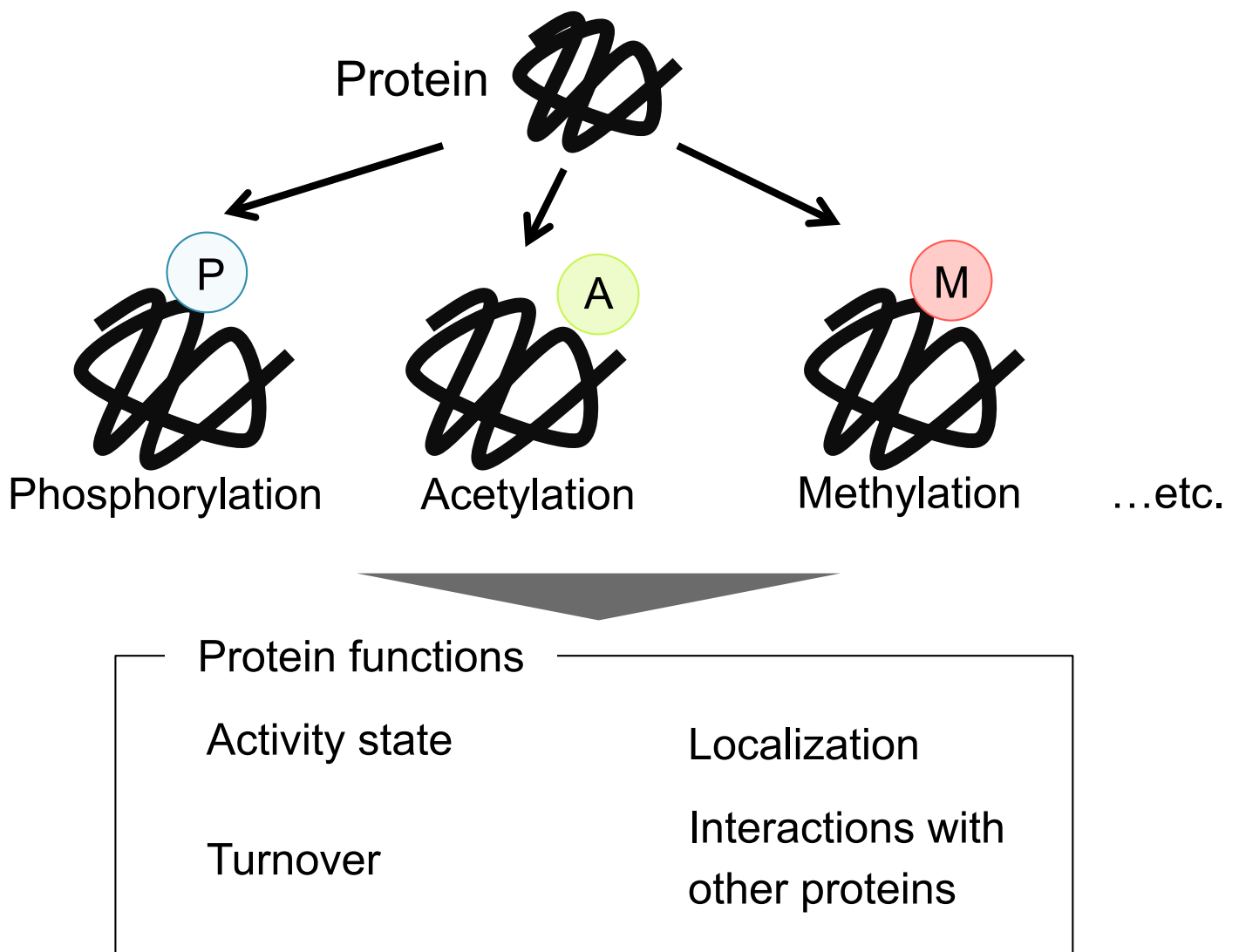
ニンメチル化酵素だと考えられている (Fig. 3)。生体における PRMT1 の機能については、15 年以上前に全身での PRMT1 欠損マウスが発生早期の胎生 7 日に致死となることが報告された (Pawlak *et al.* 2000)。この時期は、神経系組織や心臓・血管といった循環器系の組織が発達してくる時期に当たるが、PRMT1 の全身欠損マウスの報告以降、*in vivo* の研究は長年進展していなかった。最近、当研究室にて神経幹細胞で PRMT1 を欠損したマウスを樹立したところ、胎生 7 日での致死は回避したものの、大脳皮質や脊髄でミエリン形成の異常が認められ、生後 2 週間程度で致死となることを報告した (Hashimoto *et al.* 2016)。また、他のグループから、骨格筋幹細胞における PRMT1 の欠損によって、骨格筋の分化が正常に進行なくなり、骨格筋の再生に異常が認められることが報告された (Blanc *et al.* 2017)。このように、組織特異的な遺伝子改変マウスを用いた解析から、PRMT1 の組織毎での欠損戦略の有用性が示されつつあるものの、胎生期を含め血管細胞での PRMT1 の役割は検討されていない。

血管が物質の運搬などの機能を発揮するためには、3 次元的に複雑なネットワークを形成し、血液が全身へと届けられることが必要である。これまでの血管形態の評価は、切片標本を用いた手法が主流であり、胸部大動脈などの大きな血管の層構造や形態評価が行われてきた。一方で、切片を用いて検討する際には、サンプル毎の位置を揃える必要があること、また、1 枚の切片の厚さが通常 3~20 μm 程度であることから、血管の長さや分岐の程度、微小血管の形態を評価することは極めて困難である。このような切片を用いた解析の弱点を解決するための手法として、3 次元構造解析技術が注目されている。3 次元構造解析の基盤技術として、蛍光タンパク質の発見や遺伝子改変技術による細胞の蛍光標識技術の発展、2 光子顕微鏡や光シート顕微鏡な

どの深部観察に適した顕微鏡の登場、そして、観察した画像を3次元に再構築するレンダリングソフトの開発が挙げられる。最近、これらの基盤技術に加えて、組織中から水や脂質など、特定の物質を取り除いたり、逆に、溶液中の物質を組織に取り込ませたりすることで、組織を透明にする「組織透明化技術」が開発され(Fig. 4)、3次元構造解析技術は飛躍的に進歩した。

3次元構造解析技術では、画面上で組織構造をそのまま再現することが可能であるため、血管や神経など空間的な広がりを持つ組織形態の評価に適していると考えられる。実際に、神経細胞においては、細胞同士のコミュニケーションを構造面から把握するため、脳組織全体を3次元で解析するコネクトームの研究が盛んに行われている。一方で、組織透明化技術を応用して、血管構造を解析した例は殆どない。また、マウス胎仔について、胎生11日目までは、全身での免疫染色が可能だが、それ以降は胎仔の組織に色素が沈着するため、胎仔の血管構造を把握するための方法は、これまで切片を用いた解析に限られていた。

本研究では、血管内皮細胞特異的にPRMT1を欠損したマウス(PRMT1-ECKOマウス)を作製し、特に胎仔期の血管形成に対するアルギニンメチル化の役割を明らかにすることを目的とした。その際、近年に開発された透明化試薬である「Scale A2」と、2光子顕微鏡の2つの技術を組み合わせ、PRMT1-ECKO胎仔の血管形態の変化についての3次元解析を試みた。



Mann M. *et al.* **Nat. Biotech.** (2003)

Fig. 1 翻訳後修飾の役割

タンパク質は、mRNAからの転写後にリン酸化やアセチル化など、様々な翻訳後修飾を受けることで、構造や局在、活性が制御されている。

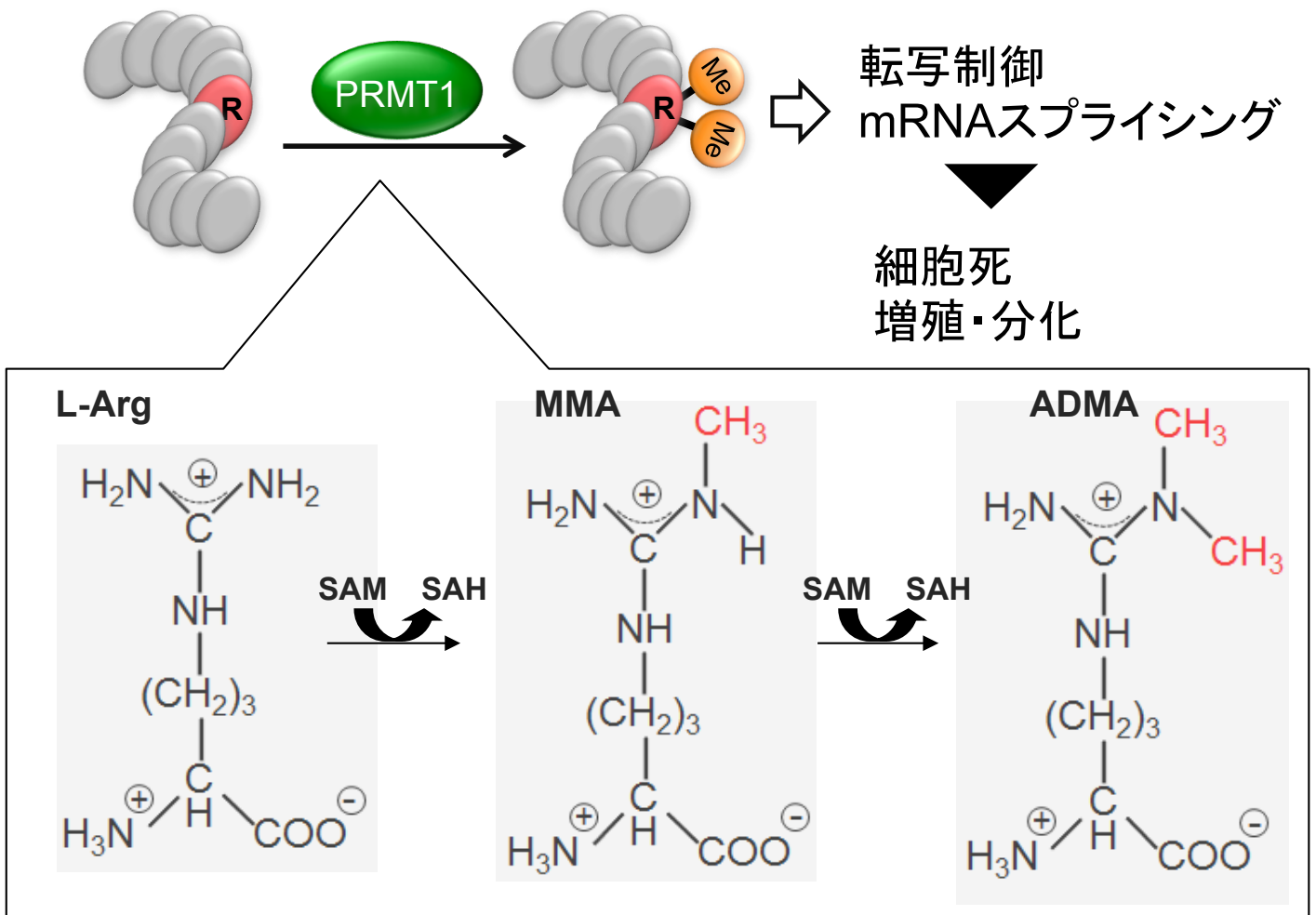
Prmt1	Embryonic lethal. Trapping mutant generates a hypomorphic allele in which embryonic stem cells can survive, but embryos die shortly after implantation. The complete null is not compatible with cell viability
Prmt2	Mice are viable. MEFs have increased activity of NF-κB transcriptional regulation and are more resistant to apoptosis than wild-type cells
Prmt3	Trapping mutant generates a hypomorphic allele. Mice are viable, but mutant embryos are slightly smaller
Carm1	Newborn knockout mice are small and die shortly after birth. Mutant embryos have defects in the differentiation of T cells, adipose tissue, chondrocytes, muscle and lungs. An enzyme-dead CARM1 mouse model phenocopies the CARM1 null
Prmt5	Early embryonic lethality. Embryos die by E6.5. PRMT5 is required for embryonic epiblast cell differentiation
Prmt6	Null mice are viable. Primary MEFs from these mice undergo rapid senescence

Yang Y. *et al.* **Nat. Rev. Cancer** (2013)

Fig. 2 PRMTファミリーの欠損による表現型

遺伝子改変技術の発達に伴い、PRMTファミリーの欠損による表現型が徐々に解明されつつある。

PRMT1



Bedford MT. *et al.* **Mol. Cell** (2009)

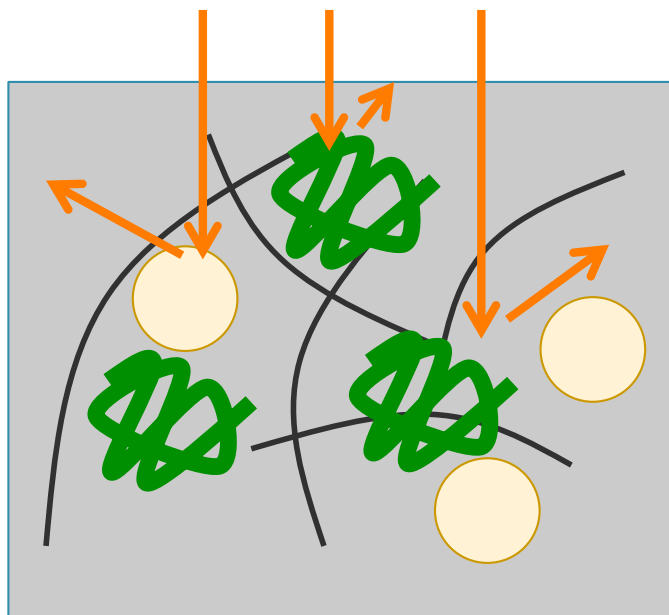
SAM: S-adenosyl methionine, SAH: S-adenosyl homocysteine,
ADMA: asymmetric dimethyl arginine

Fig. 3 タンパク質アルギニンメチル基転移酵素 (PRMT1)

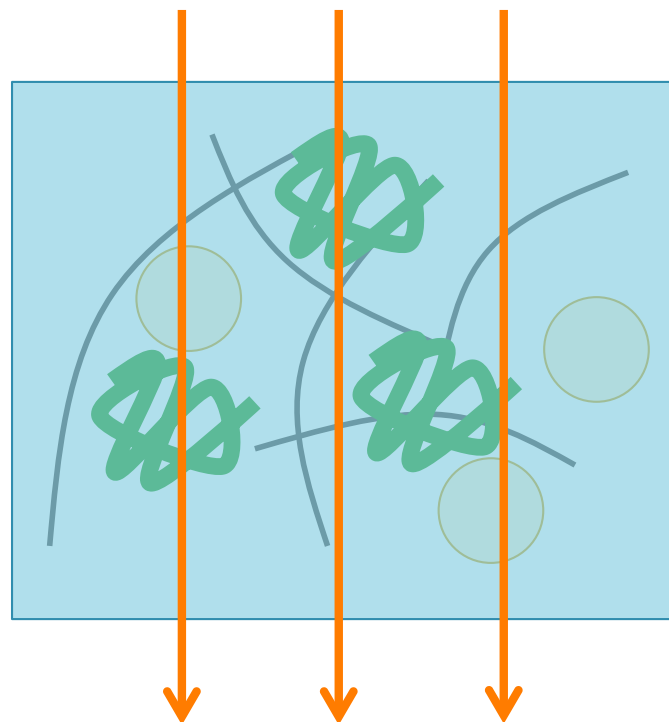
PRMT1はタンパク質中のアルギニン残基に、非対称性にメチル基を付加することで、転写の制御やmRNAのスプライシングを調節し、細胞死や細胞の増殖・分化に関わる。

生体組織

透明化前



透明化後



タンパク質



脂質

← 光

Fig. 4 組織透明化の原理

生体は水などの屈折率が低い物質と、タンパク質や脂質などの屈折率が高い物質の混合物であり、通常は光は分散してしまう。それに対し、外部から溶液を取り込んだり、特定の物質を取り除くことで、屈折率を一定にすると、光は直進することが出来るようになり、物質は透明に見える

Chapter II

血管内皮細胞での PRMT1 の欠損は、胎仔の血管形成異常を引き起こす

要旨

胎仔発生において、血管系は神経系と同様に、最も初期に発生が進行する組織である。特に血管内皮細胞は血管構造の発達や血管機能の発揮に中心的な役割を果たす。これまでに、遺伝子改変モデル動物を用いた解析から、血管内皮増殖因子（VEGF）などの増殖因子とその受容体や転写因子が血管形成の制御に関わることが明らかにされてきている。近年、新たな血管形成の制御メカニズムとして、タンパク質の翻訳後修飾が注目されつつあるが、*in vivo* における翻訳後修飾の関与は殆ど明らかにされていない。タンパク質アルギニンメチル基転移酵素 1（PRMT1）は、タンパク質中のアルギニン残基のメチル化を触媒する主要な酵素であり、*in vitro* の研究から、PRMT1 が細胞増殖やアポトーシスに関与することが報告されている。一方、*in vivo* では、全身で PRMT1 を欠損したマウスが胎生初期に致死となることが報告されており、生体の血管内皮細胞での PRMT1 の機能は未解明である。

そこで、本研究では、血管内皮細胞の PRMT1 が、個体レベルで血管の形態や機能の制御に関与するのか明らかにすることを目的とした。メチル化活性部位を loxP 配列で挟んだ *PRMT1^{fllox}* マウスと、*Tie2*-promoter の制御下で Cre 組換え酵素を発現する *Tie2-Cre⁺* マウスを交配することで、血管内皮細胞特異的に PRMT1 を欠損したマウス（PRMT1-ECKO）を作製した。解析の結果、PRMT1-ECKO マウスは、胎生 15 日目までに血管形態の異常や浮腫を伴って致

死となることが判明し、胎生 14 日目の胎仔の血管内皮細胞の形態を免疫染色で確認したところ、血管内皮細胞が不規則に集まった異常な形態が認められた。また、血管の詳細な構造解析のために、透明化試薬 *Scale* A2 と 2 光子顕微鏡を組み合わせ、3 次元的に血管構造を解析した結果、PRMT1-ECKO マウスでは、頭部の血管網の管腔が拡大し、分岐が低下して断片化された異常な構造をとっていることが明らかになった。本研究から、血管内皮細胞の PRMT1 は、胎仔期の血管形成を制御しており、胎仔の生存に必須であることが明らかになった。

背景

血管の総延長は、成人男性において約 10 万 km と言われており、全身の至る所に張り巡らされている。血管の基本構造は、内側から 1 層の血管内皮細胞によって形成される内膜、血管平滑筋や弾性板によって形成される中膜、そして、壁細胞に取り囲まれた外膜の 3 層構造である。中でも血管内皮細胞は、酸素や栄養素をはじめとした様々な物質を全身へと供給する「細胞のインフラ」として働くほか、組織の内と外を分けるバリアとして働いている。また、ホルモンを分泌することで、血圧の維持などにも寄与しており、全身の恒常性を制御する上で重要な細胞である。このような血管内皮細胞の機能が十分に発揮されるためには、血管が正常に発達し、ネットワークを形成することが重要である (Murphy *et al.* 2006)。

血管内皮細胞は、全ての組織の中で最も早くから形成が始まり、マウスにおいては胎生 7 日目頃から血管内皮細胞の前駆体が分化することが知られている。胎仔期の血管形成は、血管内皮前駆細胞が分化し血管内皮細胞を新規に合成する「脈管形成」と、既存の血管から血管内皮細胞が増殖、分化し、新しく枝分かれした血管を形成する「血管新生」という 2 つのイベントから成り立っている (Park *et al.* 2013; Herbert *et al.* 2011)。脈管形成は、発生初期を中心に起こり、胸部大動脈や心内膜などの大きな血管内皮細胞を形成するのに対し、血管新生は、発生中期以降から活発に行われ、全身の殆どの血管が血管新生によって形成される (Folkman 1995)。また、遺伝子改変技術の発展に伴って、血管新生の制御分子についての理解が進み、これまでに、Vascular endothelial growth factor (VEGF) および、その受容体である VEGF receptor 2 (VEGFR-2) に代表

されるような増殖因子およびその受容体、また、Hypoxia induced factor 1 (HIF-1) などの転写因子、さらに、MAPK などのシグナル分子が、血管新生に重要であることが明らかにされている (Folkman 1995; Bader *et al.* 1998)。最近、リン酸化、アセチル化、メチル化、ユビキチン化などの翻訳後修飾が、増殖因子や転写因子の制御に大きく関わるということが明らかにされてきており (Rahimi *et al.* 2006)、タンパク質の翻訳後修飾が血管形成を制御するという新しい概念が形成されつつある。例えば、血管新生のキーレギュレーターである VEGFR-2 および VEGFR-3 のリン酸化が、VEGFA および VEGFC シグナル伝達の持続時間および強さを決定することが報告されている (Herbert *et al.* 2011)。また、同じく VEGFR-2 について、リジン残基とアルギニン残基がメチル化されることが報告されているが (Rahimi *et al.* 2015; Hartsough *et al.* 2013)、このメチル化が、*in vivo* においてどのような機能を持つかは分かっていない。

タンパク質中のアルギニン残基は、タンパク質アルギニンメチル基転移酵素 (PRMT) ファミリーによってメチル基が付加されることで、シグナル伝達や mRNA の翻訳制御、DNA のスプライシング制御など、多様な機能の制御を行うことが報告されている (Bedford *et al.* 2009; Yang *et al.* 2013; Fig. 12)。PRMT ファミリーは、酵素活性の違いから、モノメチル化及び非対称性ジメチル化を担うタイプ 1、モノメチル化及び対称性ジメチル化を担うタイプ 2、モノメチル化のみを担うタイプ 3 に分類される。PRMT1 は、哺乳類において非対称性アルギニンメチル化全体の 85 % を担う主要なタイプ 1 の PRMT であることが知られている (Bedford *et al.* 2009)。これまでに、*in vitro* の実験において、PRMT1 がヒストンやその他の基質をメチル化することで、多様な細胞機能の制御に関わ

ることが示唆されている (Fig. 5)。一方、*in vivo* においては、全身で PRMT1 を欠損したマウスが胎生 7 日目に致死になることが示されているものの (Pawlak *et al.* 2000)、これ以降報告が殆ど無く、生体における PRMT1 の重要性は現在まで不明な点が多いままである。最近、当研究室で、PRMT1 を中枢神経系で欠損したマウスが、ミエリンの低形成を伴って脳の形態や機能に異常をきたすことを報告している (Hashimoto *et al.* 2016)。また、他のグループから、骨格筋幹細胞における PRMT1 の欠損によって、骨格筋の分化が正常に進行しなくなることで、骨格筋の再生に異常が認められることが報告された (Blanc *et al.* 2017)。このように、組織毎に PRMT1 が異なる機能を持つ可能性が考えられるが、血管内皮細胞における PRMT1 が血管の構造や機能に対し、どのような役割を担うのかということは明らかにされていない。

実験材料および実験方法

抗体

Western blotting 解析には、ラビット抗マウス PRMT1 抗体 (Millipore, 07-404)、ラビット抗マウス CD31 抗体 (Cell Signaling Technology, 77699)、ラビット抗 GFP 抗体 (Cell Signaling Technology, #2956)、マウス抗 β -actin 抗体 (MBL, M177-3)、HRP 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体 (GE Healthcare, NA934) を使用した。

免疫染色には、ラビット抗マウス PRMT1 抗体 (Abcam, ab92299)、ラット抗マウス CD31 抗体 (BD Bioscience, #550274)、ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Vector Laboratories, BA-1000)、AlexaFluor568 ヤギ抗ラット IgG 抗体 (Life Technologies, A11077) を用いた。

実験動物

動物実験は、国立大学法人筑波大学動物実験委員会の承認の元に実施し、筑波大学動物実験取扱規定と日本文部科学省管轄下にある日本学術会議の動物実験の適正な実施に向けたガイドラインに従って行った。マウスは気温 22°C、湿度 40-60% の環境にて飼育し、12 時間ごとの明暗周期が管理された環境で飼育を行った。

血管内皮細胞特異的な PRMT1 欠損マウスの作製には Cre-loxP システムを使用した。まず、*Prmt1^{fllox/flox}* (*Prmt1^{ff}*) マウスを作製するために、*Prmt1^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}* ノックインマウスを European Conditional Mouse Mutagenesis (EUCOMM) より導入し、 *β -actin-Flp* トランスジェニックマウス (B6.SJL-Tg (ACTFLPe) 9205Dym/J, stock number: 003800, The Jackson Laboratory) と交配することでジーントラップ

カセットを除いた。次に、血管内皮細胞特異的に *Prmt1* の欠損を誘導するために、作製した *Prmt1^{ff}* マウスを、血管内皮細胞特異的に発現する *Tie2-promoter* の下流で Cre 組換え酵素を発現する *Tie2-Cre⁺* マウス (B6.Cg-Tg (Tek-cre) 1Ywa/J, Stock Number: 008863, The Jackson Laboratory) と交配し *Prmt1^{ffw}Tie2-Cre⁺* マウスを作製した (Fig. 5)。作製した *Prmt1^{ffw}Tie2-Cre⁺* マウスについて、動物センターの 八神健一 特命教授、および 杉山文博 教授のご好意により供与いただいた、Cre レポーターマウス (C57BL/6N-Gt (ROSA) 26Sor<tm1 (CAG-EGFP,tdsRed) Utr>/Rbrc (RBRC04874) : *R26GRR* マウス) と交配し、*R26GRR; Prmt1^{ffw}Tie2-Cre⁺* マウスを作製した。*R26GRR* マウスは、Cre 酵素による組換えが起きていない細胞では緑色の蛍光を、組換えが起こった細胞では強い赤色の蛍光を呈する (Hasegawa *et al.* 2013)。そのため、作製した *R26GRR; Prmt1^{ffw}Tie2-Cre⁺* マウスにおいては、血管内皮細胞が赤色に、それ以外の細胞が緑色に標識される。なお、*Tie2-promoter* はメスの生殖細胞において作用し、受精卵で Cre 酵素活性を発現することで、全身の欠損を誘導することが報告されていることから (De Lange *et al.* 2008)、オスの *R26GRR; Prmt1^{ffw}Tie2-Cre⁺* マウスに対し、メスの *Prmt1^{ff}* マウスを交配することで、実験個体を作製した (Fig. 6)。

遺伝子型の同定

ゲノム DNA は酢酸アンモニウム法により抽出した。マウスの尾または胎仔の右前肢に、375 µg/ml の Proteinase K を 320 µl 加えて O/N で反応させた。その後 15 µg/ml の RNase A 30 µl を加えて 37°C で 2 時間反応させ、7.5 M の酢酸アンモニウムを 100 µl 加えてタンパク質を沈殿させた。次に、遠心して上清を 300

μl 回収し、等量のイソプロピルアルコールによって DNA を析出させて遠心した後、70% エタノール 120 μl を加えてリンスした。DNA は乾固した後に、10 ng/μl となるように 1 x Tris-EDTA バッファーに溶解した。遺伝子型の同定は Polymerase chain reaction (PCR) 法によって行った。PCR に使用したプライマーを以下に示す。

Prmt1;

5'-GTGCTTGCCATACAAGAGATCC-3'

5'-ACAGCCGAGTAGCAAGGAGG-3'

Tie2-Cre;

5'-GCAATGGTGCGCCTGCTGGAAGATGG-3'

5'-GAGCTGGTGCAAGTGCAGGAGCC-3'

R26GRR;

5'-AAAGTCGCTCTGAGTTGTTAT-3'

5'-CTTGTACAGCTCGTCCATGCCGAG-3'

血管内皮細胞の単離

血管内皮細胞における PRMT1 の発現を確認するために、Magnetic-activated cell sorting (MACS) 分離システムを使用した。野生型 (C57BL/6J) の胎生 12 日目、14 日目、16 日目の胎仔および、生後 0 日目と 7 日目の新生仔の肺をサンプリングした。また、作製した PRMT1-ECKO マウスにおいて、PRMT1 がタンパク質レベルで消失しているかを確認するために、胎生 14 日目の PRMT1-ECKO

マウスの胎仔をサンプリングした。サンプリングした胎仔及び肺は、Tumor Dissociation Kit (Miltenyi Biotec, 130-096-730) で処理した後に POLYTRON ホモジナイザーを用いて細胞を乖離させた。細胞懸濁液は 100 μ m のセルストレイナーを通し、マウス抗 CD45 マイクロビーズ (Miltenyi Biotec, 130-052-301) と 4 °C で 15 分間反応させた後に、MACS LS カラムを通すことでネガティブセクションを行った。回収したフロースルーを更にマウス抗 CD31 マイクロビーズ (Miltenyi Biotec, 130-097-418) 及びマウス FcR ブロッキング試薬 (Miltenyi Biotec, 130-092-575) を加えて 4 °C で 15 分間反応させた。その後、MACS LS カラムを通して抗 CD31 マイクロビーズにネガティブの画分を洗い流し、ポジティブ画分を回収した (Fig. 7)。

タンパク質解析

MACS システムによって回収した血管内皮細胞に対して、25 μ l の lysis バッファー (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, pH 8.0, 1% Nonidet P-40, 5% glycerol, 1x protease inhibitor cocktail) を加えて on ice で 25 分間反応させた。反応後のサンプルを 4 °C、14,000 rpm で 10 分間遠心した後に上清を回収し、25 μ l の 2x Laemmli sample buffer (Bio-Rad) と混合し、95 °C で 5 分間加熱した。サンプルを 10% SDS-PAGE で泳動した後に PVDF 膜に転移した。PVDF 膜は 5% スキムミルクを溶解した 1x TBST (Tris-buffered saline and Tween 20) バッファー中で、室温で 45 分間ブロッキングを行った。その後、抗体反応を室温で 1 時間または、4 °C で一晩行った。免疫反応は Luminata Forte Western HRP substrate (Millipore) によって増感し、X 線フィルム (Fujifilm) を用いて検出した。

形態学的解析

生後 10～20 週目のマウスを交配し、妊娠 13～15 日目に頸椎脱臼にて安楽死を行った。その後、速やかに胎仔を取り出し、phosphate-buffered saline (PBS) に浸した状態で、実体顕微鏡 (Olympus, SZ61+DP21) を用いて胎仔写真を撮影した。観察の際には、2.5 mm 平方の方眼紙を下に敷き、胎仔全身の観察は拡大率 8 倍で、頭部の血管形態の観察は 40 倍の拡大率で行った。また、Cre 酵素の発現による *R26GRR* 導入遺伝子の組換えを確認するために、蛍光実体顕微鏡 (Leica, MZFLIII+MC120HD) を用いて観察を行った。

血管内皮細胞における PRMT1 タンパク質の発現解析

Prmt1^{flw}Tie2-Cre⁺ マウスのオスと *Prmt1^{fl}* マウスのメスの組み合わせから得られる個体を使用し、胎生14日目のマウスを4%パラホルムアルデヒド (PFA) /PBS にて、4 °Cで一晩固定した。その後PBS中に4°Cで2時間洗浄し、70-100%のエタノールで脱水を行い、100%キシレンに置換した後、パラフィンにて包埋した。包埋した胎仔はミクロトーム (Thermo Scientific, HM 340E) を用いて5 μmの切片を作製した。作製した切片は、100%キシレンで脱パラフィン処理した後に、100-70%のエタノールで水和し、20 μg/mlのProteinase K (Sigma) /PBSに37°Cで30分間反応させ、抗原賦活化処理を行った。次に、3% H₂O₂/PBSを用いて内因性ペルオキシダーゼを失活させ、TSA blocking reagent (PerkinElmer, FP1020) でブロッキングを行った。さらに、ラビット抗マウスPRMT1抗体 (Abcam, ab92299) または、ラット抗マウスCD31抗体 (BD Bioscience, #550274) に4°Cで一晩反応させ、続いてビオチン標識されたヤギ抗ウサギIgG抗体 (Vector Laboratories,

BA-1000) に常温で30分間反応させた。そして、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (PerkinElmer, NEL750) で反応させた後、TSA plus fluorescein system (PerkinElmer, NEL750001EA) または、TSA plus tetramethylrhodamine (TMR) system (NEL756001KT PerkinElmer)にて蛍光標識した。また、Hoechst33258を用いて対比染色を行った。切片は共焦点顕微鏡 (Olympus, FV10i) を用いて、Z stack を1 μm 毎に25枚撮影し、全ての画像を重ね合わせて出力した。

血管分岐の評価

Prmt1^{flw}Tie2-Cre⁺ マウスのオスと*Prmt1^{flf}* マウスのメスの組み合わせから得られる個体を使用し、妊娠14日目の母体マウスをイソフルランで麻酔し、卵膜に包まれた状態で胎仔を摘出し、臍帯や卵膜の血管を傷つけないように留意しながら胎仔を取り出した。次に、Griffonia simplicifolia Lectin I-B4 Isolectin (Vector laboratories, FL-1201) をPBSにて終濃度50 $\mu\text{g/ml}$ になるように希釈し、1 mlシリンジおよび34 Gニードルを用いて、胎仔の浅側頭静脈より100 μl 注入した。胎仔は10分間PBS中に静置した後に、蛍光実体顕微鏡 (Leica, MZFLIII+MC120HD) を用いて蛍光の確認を行った。その後、4% PFA/PBSにて、4°Cで一晩固定した。さらに、胎仔を10% sucrose/PBS に2時間、20%、30% sucrose/PBS に一晩ずつ置換し、O.C.Tコンパウンド (Sakura Finetek Japan, #4583) に封入した。封入したサンプルについて、クライオスタット (Thermo Scientific, HM560) を用いて厚さ20 μm の凍結切片を作製した。作製した切片は、PBSで水洗した後に5 % BSA/0.1 % Triton X-100/PBSにてブロッキングを行い、ラット抗マウスCD31抗体

(BD Bioscience, #550274) で4 °Cで一晩反応させた。その後AlexaFluor568で標識されたヤギ抗ラットIgG抗体 (Life Technologies, A11077) と室温で1時間反応させた。切片は共焦点顕微鏡 (Olympus, FV10i) にて観察を行った。焦点のずれによる見え方の違いを解消するため、Z 軸方向に1 μm 毎に30枚撮影し、Z stackモードにて全ての画像を重ねあわせて出力した。

2 光子顕微鏡を用いた血管構造のイメージング

妊娠14日目でサンプリングした胎仔を、4% PFA/PBSにて4°Cで一晩震盪した後、透明化試薬Scaleview A2に置換し、室温で2週間から1ヶ月かけて透明化処理を行った。その後、実体顕微鏡 (Olympus, SZ61+DP21) および蛍光実体顕微鏡 (Leica, MZFLIII+MC120HD) を用いて、透明化の進行と蛍光の保持を確認した。サンプルは2 %アガロースゲルに封入し、Scaleview A2中に沈めた上で、2光子顕微鏡 (Olympus, FV1200MPE) を用いて観察を行った (Fig. 15)。その際、レーザー装置MaiTai DeepSee laser (Spectra Physics) 及び、Scaleview A2用の25倍対物レンズ (Olympus, XLPLN25XSVMP2) を組み合わせて使用した。励起光には975 nmのレーザーを使用し、Z軸方向8 μm 毎に200枚の画像を観察した。Z軸の移動による明るさは、検出器の感度を調整することで補正した。隣り合った画像は10 %ずつ重なるように撮影し、ソフトウェア (Olympus, FV10i-ASW) 上でタイリングを行った。タイリング後の画像は3Dイメージング解析ソフトのVolocity (Improvision/PerkinElmer) で3次的に画像化した。出力した画像について、約460 μm 四方に切り出し、AngioTool (<https://ccr.cancer.gov/>) および

WimTube (<http://ibidi.wimasis.com>) という解析ソフトを用いて血管の面積、総延長、および分岐点の数について評価を行った。

統計解析

2 光子顕微鏡を用いて観察した画像の定量解析において、統計ソフト (GraphPad Prism version 5 for Windows; GraphPad Software 社) を用いて統計解析を行った。各群でデータの正規性の検定後、分散の検定として F 検定を行った。両者の結果から、スチューデントの t 検定、ウェルチの t 検定、マン・ホイットニーの u 検定のいずれかで有意差検定を行い、 $p < 0.05$ を有意とみなした。

実験結果

野生型マウスの胎仔、新生仔における血管内皮 PRMT1 発現量の変化

野生型の胎生12、14、16日目の胎仔全身、および、産後0、7日目の産仔の肺から、MACSシステムを用いて回収した血管内皮細胞を用い、PRMT1タンパク量の経時的な変化を検討した。胎生12-16日目の胎仔と産後0、7日目の産仔の両者の時期において、血管内皮細胞でPRMT1の発現が認められ、特に胎生12日目から14日目にかけてPRMT1が高発現していた (Fig. 8)。

PRMT1-ECKO マウスの作製と遺伝子型の確認

生体の血管内皮細胞におけるPRMT1の機能を明らかにするために、*Prmt1^{ff}* マウスと、血管内皮細胞特異的にCre組換え酵素を発現する*Tie2-Cre*マウスとの交配により、血管内皮細胞特異的に*Prmt1*を欠損するマウス (PRMT1-ECKOマウス) を作製した。この交配によって、PRMT1のメチル化活性部位を含むエクソンの4と5が欠失される (Fig. 6)。得られた産仔について、生後1ヶ月で、マウス尾部より抽出したゲノムDNAを用いて、ジェノタイピングを行った。各アレルのPCRによって、PRMT1の野生型アレルは277 bpで、*Prmt1-flox*アレルは410 bp、また、*Tie2-Cre*アレルは551 bpで増幅される。また、*R26GRR*アレルを持つ個体では、およそ2800 bpのバンドが検出される。PCRの結果、*Prmt1^{ww}Tie2-Cre⁻*マウス、*Prmt1^{fw}Tie2-Cre⁻*マウス、*Prmt1^{ff}Tie2-Cre⁻*マウス、*Prmt1^{ww}Tie2-Cre⁺*マウス、*Prmt1^{fw}Tie2-Cre⁺*マウスの遺伝子型を持つ産仔が得られたが、*Prmt1^{ff}Tie2-Cre⁺*マウス (PRMT1-ECKO) マウスの遺伝子型を持つ産仔は得られなかった (Fig. 9A)。そこで、産仔の遺伝子型の割合を検討するために、オスの*Prmt1^{fw}Tie2-Cre⁺*マウス

スと、メスの *Prmt1^{ff}Tie2-Cre* マウスの組み合わせから産まれた41匹の産仔について、産後1か月で遺伝子型の解析を行った。この交配の組み合わせからは、*Prmt1^{fw}Tie2-Cre* マウス、*Prmt1^{ff}Tie2-Cre* マウス、*Prmt1^{fw}Tie2-Cre⁺* マウス、*Prmt1^{ff}Tie2-Cre⁺* マウスが同じ割合で産まれてくることが予測される。しかし、実際に得られた産仔は、*Prmt1^{fw}Tie2-Cre* マウスが16匹 (39%)、*Prmt1^{ff}Tie2-Cre* マウスが12匹 (29%)、*Prmt1^{fw}Tie2-Cre⁺* マウスが13匹 (32%) であり、*Prmt1^{ff}Tie2-Cre⁺* マウスは1匹も得られなかった (Fig 9B)。このことから PRMT1-ECKO マウスが出産以前に致死となっている可能性が示された。

胎仔生存率の解析

PRMT1-ECKO マウスが致死となるタイミングを確認するため、胎生期での胎仔の遺伝子型を同定した。胎生14日目の胎仔から得られたゲノムDNAを用いてPCRを行ったところ、*Prmt1^{fw}Tie2-Cre* マウス、*Prmt1^{ff}Tie2-Cre* マウス、*Prmt1^{fw}Tie2-Cre⁺* マウス、*Prmt1^{ff}Tie2-Cre⁺* マウスの全ての遺伝子型の個体が、存在することが分かった (Fig. 10A)。また、*Tie2-Cre* 遺伝子を保持しない *Prmt1^{fw}Tie2-Cre* マウス、*Prmt1^{ff}Tie2-Cre* マウスでは、EGFP由来の緑色の蛍光のみが認められたのに対し、*Tie2-Cre* 遺伝子を持つ *Prmt1^{fw}Tie2-Cre⁺* マウス、*Prmt1^{ff}Tie2-Cre⁺* マウスにおいて、EGFP由来の緑色の蛍光と、DsRed由来の赤色の蛍光が確認できた (Fig 10B)。そこで次に、胎仔の遺伝子型の比率と生存率を確認した。胎生13日目から15日目において各遺伝子型の胎仔数は、*Prmt1^{fw}Tie2-Cre* マウス (胎生13日目=16、胎生14日目=29、胎生15日目=16)、*Prmt1^{ff}Tie2-Cre* マウス (胎生13日目=12、胎生14日目=24、胎生15日目=15)、

*Prmt1^{fw}Tie2-Cre⁺*マウス（胎生13日目=12、胎生14日目=27、胎生15日目=15）、*Prmt1^{fw}Tie2-Cre⁺*マウス（胎生13日目=12、胎生14日目=23、胎生15日目=20）であり、胎生13-15日目において、概ねメンデルの法則に従って胎仔が得られた。この内コントロール群の*Prmt1^{fw}Tie2-Cre⁻*マウス、*Prmt1^{ff}Tie2-Cre⁻*マウス、*Prmt1^{fw}Tie2-Cre⁺*マウスでは、胎生13-15日目において全ての個体が生存していた。一方、PRMT1-ECKOマウスでは、胎生13日目までは全ての個体が生存しているものの、胎生14日目には生存率が83%になり、胎生15日目では5%まで低下し、ほぼ全ての個体が死亡することが判明した（Fig. 11）。

血管内皮細胞におけるPRMT1のタンパク発現解析

実際に血管内皮細胞においてPRMT1が欠損されているのかを確認するため、MACSシステムを用いて回収した血管内皮細胞画分について、CD31抗体およびPRMT1抗体でWestern Blottingを行った。コントロールマウスと比較して、*Prmt1^{fw}Tie2-Cre⁺*マウスでPRMT1のタンパク発現量の減少が認められ、*Prmt1^{ff}Tie2-Cre⁺*マウスでは、PRMT1のタンパク質は殆ど検出されなかった（Fig 12A）。さらに、胎仔組織切片において、同じくCD31抗体およびPRMT1抗体を用いて、免疫染色を行った。コントロールの*Prmt1^{ff}Tie2-Cre⁻*マウスでは、赤色で示されるCD31+の蛍光に囲まれた血管内皮細胞の核において、PRMT1陽性の強い緑色の蛍光が認められた（Fig. 12B、左パネル）。一方、PRMT1-ECKOマウスにおいては、同じ部位での緑色の蛍光が大幅に消失していた（Fig. 12B、白矢頭）。一方で、CD31+細胞以外でのPRMT1の発現には変化が認められなかった（Fig.

12B、右パネル)。このことから、PRMT1-ECKOマウスにて、血管内皮細胞特異的にPRMT1が欠損されていることを確認した。

胎仔の形態学的観察

胎生14日目のマウス胎仔では、血管の分岐が活発に起こり、血管のネットワークが急速に発達してきていることが知られている (Vu *et al.* 2003)。そこで、妊娠14日目における血管形成に対する血管内皮細胞のPRMT1の役割を検討するため、実体顕微鏡を用いて胎生14日目にサンプリングした胎仔の形態学的な観察を行った。コントロール群では、浅側頭動脈を含めた太い血管が明瞭に観察され、末梢の細い血管が微細なネットワークを形成していることが観察できた (Fig. 13、左側3つのパネル)。一方、PRMT1-ECKOマウスでは太い血管が不明瞭になっていることに加えて、細かな血管が殆ど観察できなかった (Fig. 13、右端のパネル)。

血管の分岐と機能の評価

実体顕微鏡において、PRMT1-ECKOマウスの血管が不明瞭だったことから、蛍光色素を血管に注入することで、血管が機能しているかどうかを確認した。FITC標識されたイソレクチン-B4を胎仔に注入した後に、切片を作製し、抗CD31抗体で染色することで、血管内皮細胞を標識した。CD31陽性の細胞は、全ての血管内皮細胞を示すのに対し、イソレクチン-B4は血流によって運ばれることから、イソレクチン-B4で染色される細胞は、血液の流れる機能血管の血管内皮細胞を示す。コントロール群およびPRMT1-ECKO群のどちらにおいても、CD31

の蛍光が認められる部位では、イソレクチン-B4の蛍光が観察された (Fig. 14)。一方で、CD31抗体陽性の細胞において、PRMT1-ECKOマウスでは、コントロールと比較して分岐が少なく、血管径が太くなった異常な形態が認められた (Fig. 14、右パネル)。

2光子顕微鏡を用いた胎仔血管の3次元構造解析

複雑な血管網の発達を評価するため、血管の立体構造の可視化を試みた。*R26GRR*マウスでは、Cre酵素を発現していない細胞が緑色の蛍光を、Cre酵素を発現している細胞が赤色の蛍光を発する。透明化試薬Scale A2で胎仔を処理することによって、明視野で胎仔の透明度が上昇していることが確認できた。一方で、蛍光については、透明化処理によって殆ど影響を受けていないことが明らかとなった (Fig. 16)。そこで、これらサンプルを2光子顕微鏡で観察したところ、胎仔血管を深部まで観察することが出来た。観察した画像を3次元構築したところ、緑色の蛍光と赤色の蛍光が重なり合わず完全に分かれていることが示された (Fig. 17、上段)。PRMT1-ECKOマウスの胎仔においては、コントロールの*Prmt1^{flw}Tie2-Cre⁺*マウスの胎仔と比較して、血管の網目構造が荒くなり、血管が分断されたような構造をとっている可能性が示された (Fig. 17、下段)。そこで、血管の長さや分岐を評価するために、AngioToolおよびWimTubeを用いて定量解析を行った。解析のために、後頭部に存在する浅側頭動脈周辺をトリミングした画像を準備した (Fig. 18A)。解析後の画像から、血管の分岐を認識していることが確認できた (Fig. 18B)。定量解析の結果、AngioToolを用いた解析では、血管の面積や血管の総延長の低下に加えて、血管の接合点の数が有意に

減少していた (Fig. 19)。また、WimTubeを用いた定量解析でも、血管の本数や総延長が有意に低下していることが明らかになった (Fig. 20)。この結果から、PRMT1-ECKOマウスにおいて、血管の分岐に異常があり、血管形成が低下していることが明らかになった。

考察

野生型マウスの胎仔、新生仔における血管内皮 PRMT1 発現量の変化

血管は、全身の隅々まで酸素や栄養素などの物質を運搬するために、殆ど全ての組織に存在している。一方で、組織を構成する細胞全体に占める血管内皮細胞の割合が低いため、組織の状態では血管内皮細胞におけるタンパク質の発現量を議論することは難しい。これまでに全身の組織でPRMT1の発現量を検討した報告は散見されるものの (Pawlak *et al.* 2000; Bulau *et al.* 2007; Lin *et al.* 1996; Hong *et al.* 2012)、血管内皮細胞でのPRMT1の発現の報告は無い。本研究では、磁気標識された抗体を用いて細胞を回収するMACSシステムを、組織からの血管内皮細胞の分離回収に応用することによって、短時間で効率よく生体組織から血管内皮細胞を回収することを可能とし、PRMT1が血管内皮細胞で実際に発現していることを明らかにした。特に胎生12日目から14日目の血管内皮細胞で、PRMT1が高発現するのに対し、胎生16日目では発現が低下することが判明した。この時期は、PRMT1-ECKOマウスにおいて血管の分岐の異常や血管形成の低下などの表現型が認め始められる時期と重なっている。

これまでに、PRMT1-ECKOマウスに近い表現型を示す遺伝子改変マウスについて、いくつかの報告が成されている。Tie1受容体欠損マウスでは、血管内皮細胞の細胞接着に異常が認められ、浮腫や出血などの表現型を認め (Sato *et al.* 1995)、また、Ets-1/Ets-2ダブル欠損マウスでは、血管内皮細胞においてアポトーシスの亢進が認められ、胎仔血管の分岐の抑制が認められる (Wei *et al.* 2009)。本研究のPRMT1の発現解析から、胎生期の血管内皮細胞の機能には、PRMT1の量的変動が重要である可能性が考えられ、PRMT1-ECKOマウスで認められた表

現型の要因として、PRMT1が欠失することにより、PRMT1の量的なバランスが崩れた際に、上述のような成長因子受容体や転写因子の発現や機能の変化が関与する可能性が考えられる。

血管形成における血管内皮細胞 PRMT1 の役割

胎仔において、血管は神経系や心臓と並んで、最も早く発生が始まる臓器である（Mouse Development, https://embryology.med.unsw.edu.au/embryology/index.php/Mouse_Development）。胎仔期では、血管内皮細胞を*de novo*合成する「脈管形成」と、既存の血管から血管内皮細胞が増殖し、新しく血管を形成する「血管新生」と呼ばれる2つのイベントによって血管内皮細胞は形成される。脈管形成は、胎生9日目前後まで活発に行われ、胸部大動脈をはじめとした大きな血管を形成する。一方、胎生9日以降は、血管新生が優勢になり、複雑に入り組んだ血管ネットワークを形成していく。そのため、VEGFR-2のように、血管新生だけでなく、血管内皮細胞の分化にも関わる因子を欠損したマウスでは、血管形成が殆ど起こらず、胎生期の早い段階で致死になる（Shalaby *et al.* 1995）。一方、Smad5のように、血管新生に関与する因子を欠損した場合には、胎生10日目以降に致死になる傾向がある（Yang *et al.* 1999）。このように、脈管形成と血管新生は、どちらも胎仔の生存に必須であり、厳密に制御されていることが伺える。

前述のPRMT1の全身欠損マウスは、胎生7日目までに致死となることが明らかにされており（Pawlak *et al.* 2000）、また、本研究でCre酵素の発現誘導に使用したTie2プロモーターは、胎生7日目に既に発現が認められることから、PRMT1が脈管形成と血管新生のどちらにも関わる可能性がある。しかし、血管内皮細

胞特異的にPRMT1を欠損したPRMT1-ECKOマウスが、胎生13日で全て生存しており、胸部大動脈もコントロールと同様の大きさや形態をしていることが本研究より明らかになっている。これらのことから、血管内皮細胞のPRMT1は、脈管形成には大きな影響を与えず、血管新生による血管ネットワーク形成の制御に深く関わっていると考えている。

内皮PRMT1欠損による胎仔の血管形態変化の3次元構造解析

神経は、細胞が複雑に入り組むことによって、巨大なネットワークを形成しているため、従来の切片を用いた観察法では、ネットワークのごく一部しか観察することが出来ず、生体の複雑な現象を解明するには不十分であった。そのため、1990年代より組織全体の3次元構造解析技術の開発が試みられてきたが、生体組織は水と脂質、タンパク質など複数の物質から構成されるため、光が屈折または反射してしまい、組織の深部観察は非常に困難であった。そのような中、近年の「Scale法」をはじめとした、蛍光を保持しつつ組織を透明にする技術の開発によって、特に神経ネットワークの3次元構造解析技術は飛躍的に進歩した（Hama *et al.* 2011; Katona *et al.* 2012; Amato *et al.* 2016）。一方で、血管についても複雑なネットワークを形成するため、神経と同様に3次元構造解析の恩恵が大きいと考えられるが、現在、血管の3次元構造解析に関する報告はほとんど無く、解析の手技も確立されていない。

血管の形態評価には、血管の大きさや周囲の細胞の形態評価、また、血管の分岐や伸長の程度など、様々な項目を検討し、総合的に判断する必要がある。そのため本研究では、血管の形態に対する内皮細胞のPRMT1欠損の影響を、従

来の組織切片を用いた評価に加え、2光子顕微鏡と組織透明化技術を用いた3次元的な血管形態評価を確立した。薄切した切片を用いる2次元的な観察は解像度に優れ、血管の断面の層構造や細胞内での分子の発現パターン、細胞同士のインタラクション等の評価に大きな力を発揮する (Wei *et al.* 2009)。本研究でも、胎仔の胸部大動脈の組織形態や頭部血管の分岐ポイントの構造が明瞭に示されている。一方で、血管の走行や分岐の伸展などの空間的なパラメーターの評価のため、本研究では、透明化処理を施した組織の2光子顕微鏡観察に加えて、血管を赤色蛍光に標識するレポーターマウス (Hasegawa *et al.* 2013) を活用することにより、胎仔の頭部全体を網羅する範囲で、浅側頭動脈をはじめとした大小の血管で構成されるネットワークを俯瞰的に観察することに成功した。また、内皮細胞のPRMT1欠損により引き起こされる標的イベントの一つとして、血管の分岐に異常があることを、2光子顕微鏡解析に初めて血管網の定量解析ツールを導入することにより特定した。これらのことは、これまで解析が困難だった胎生後期の血管の空間的な形態を正確に把握、評価するための手法を確立した点で、血管研究において大きな意義があったと考える。

本研究では、生体内での機能が未解明であるアルギニンメチル化について、その主要酵素であるPRMT1に着目し、胎生期にPRMT1の発現が高い血管内皮細胞特異的にPRMT1を欠損するマウスを解析した。*R26GRR*マウスを用いたターゲット細胞の蛍光標識技術、*Scale A2*による組織透明化技術、そして、2光子顕微鏡を用いた観察技術を組み合わせることによって、血管内皮細胞のPRMT1が、マウス胎仔期の血管網の構築を制御しており、胎仔の生存に必須であることを

明らかにした。今後、内皮PRMT1が担う血管制御の分子基盤の解明が期待される。

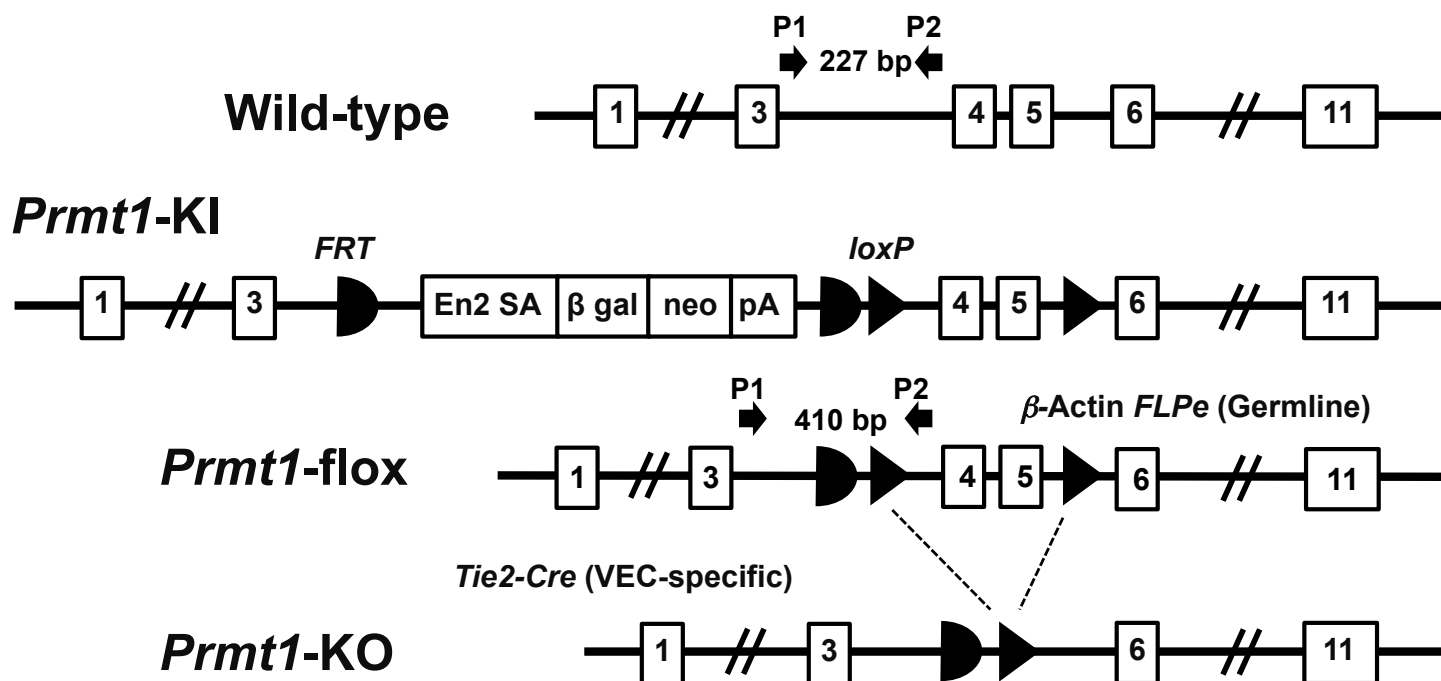


Fig. 5 PRMT1-ECKOマウス作製のスキーム

血管内皮細胞特異的にPRMT1を欠損したマウス(PRMT1-ECKO)の作製のために、*Prmt1*-KIマウスに対して、*β-Actin FLPe*マウスを交配し、ネオマイシンを含むカセットを取り除いて、*Prmt1*-floxマウスを作製した。その後 *Tie2-Cre*⁺マウスと交配することで、PRMT1-ECKOマウスを作製した。

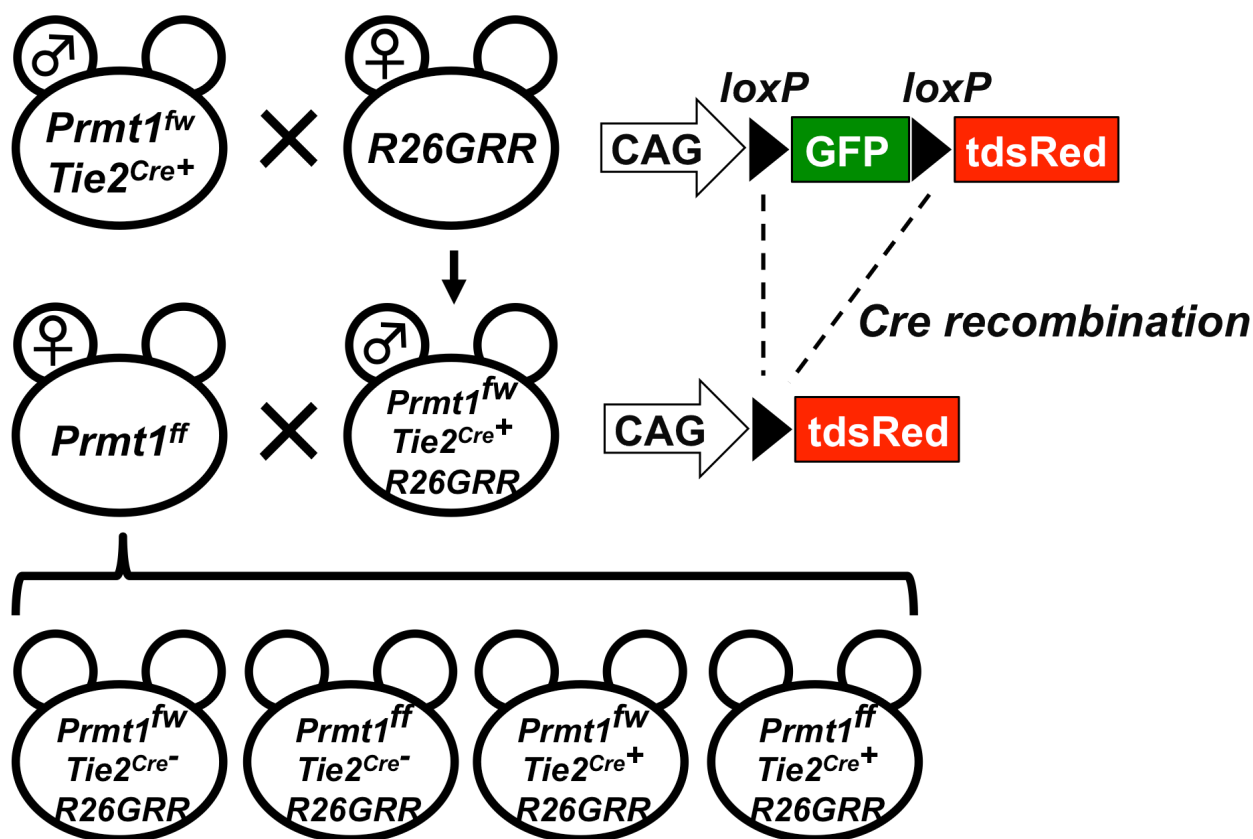


Fig. 6 マウス交配の模式図

PRMT1-ECKOマウスにおける血管構造を可視化するために、*Prmt1^{fw} Tie2^{Cre+}*マウスを*R26GRR*マウスと交配した。*R26GRR*マウスは、Cre酵素を発現しない細胞では緑色の蛍光を、Cre酵素を発現する細胞では赤色の蛍光を呈する。作製したオスの*R26GRR; Prmt1^{fw} Tie2^{Cre+}*マウスを、*Prmt1^{ff}*のメスマウスと交配することで、実験個体を得た。

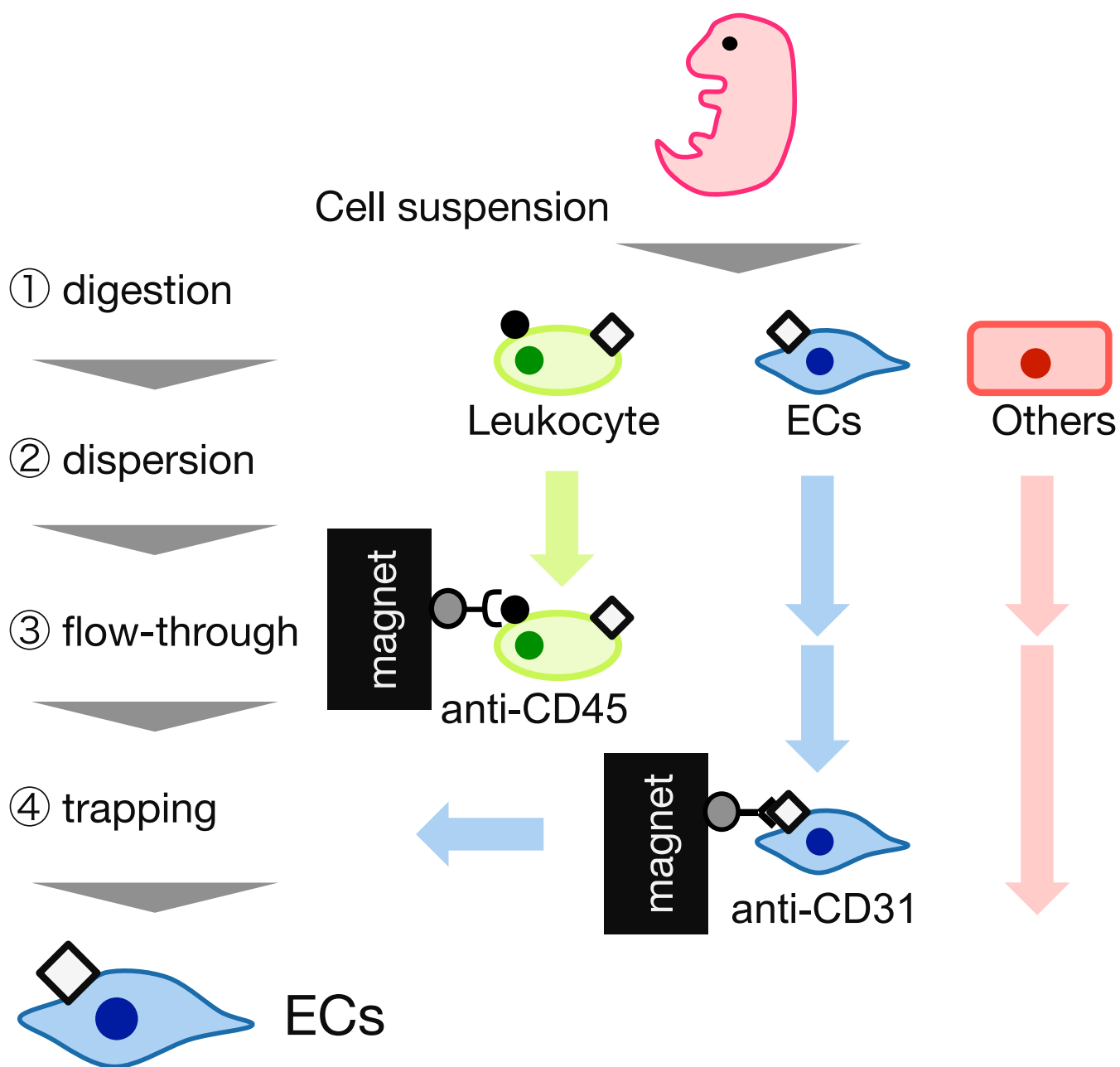


Fig. 7 MACSシステムを用いた血管内皮細胞の単離

胎仔などの組織を細かく細断して、酵素消化によって単一の細胞にした後、CD45抗体によるネガティブセレクション、およびCD31抗体によるポジティブセレクションを行い、血管内皮細胞を回収した

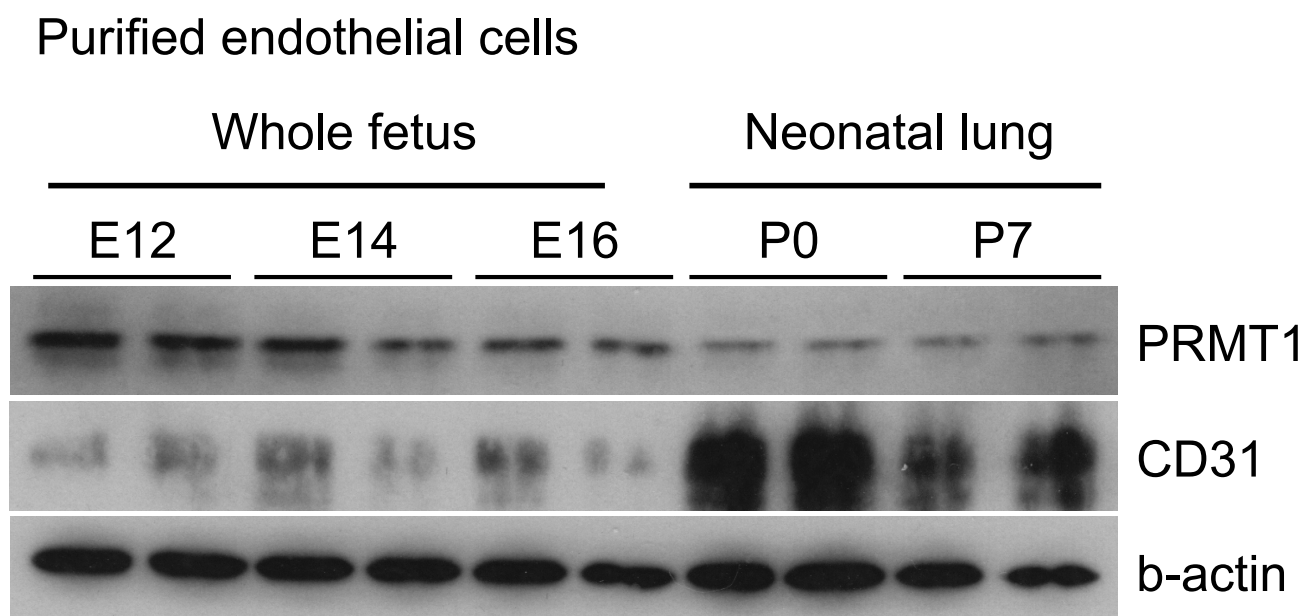
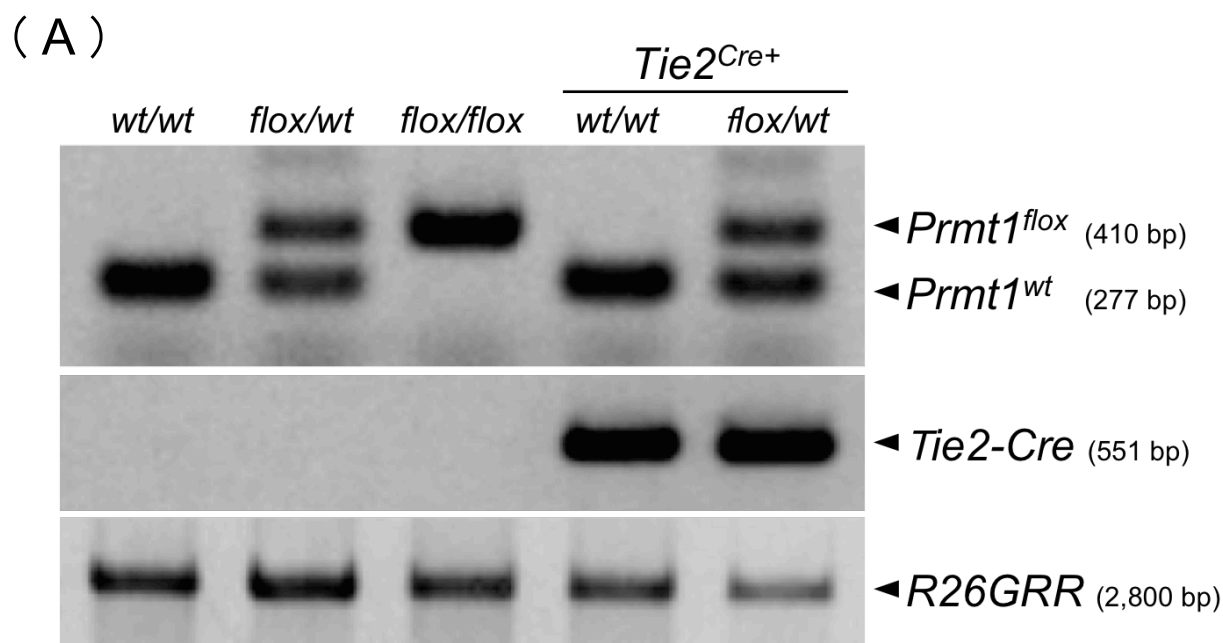


Fig. 8 胎仔期・新生児期の血管内皮細胞におけるPRMT1の発現量

野生型マウス(C57BL/6J)の胎生12、14、16日目の胎仔全身、および生後0、7日目の新生仔の肺より単離した血管内皮細胞を用いて、PRMT1のタンパク質レベルでの発現を確認した。



(B)

Genotype	<i>Prmt1</i> ^{fw} <i>Tie2</i> ^{Cre-}	<i>Prmt1</i> ^{ff} <i>Tie2</i> ^{Cre-}	<i>Prmt1</i> ^{fw} <i>Tie2</i> ^{Cre+}	<i>Prmt1</i> ^{ff} <i>Tie2</i> ^{Cre+}
Number of pups	16	12	13	0
Rate (%)	39	29	32	0
Predicted rate (%)	25	25	25	25

Fig. 9 産仔の遺伝子型の解析

(A) 産仔における遺伝子型の確認

(B) *PRMT1*^{flox/w}/*Tie2*^{Cre+} × *PRMT1*^{flox/flox} の交配から産まれた
産後1か月の産仔の遺伝子型毎の匹数と割合

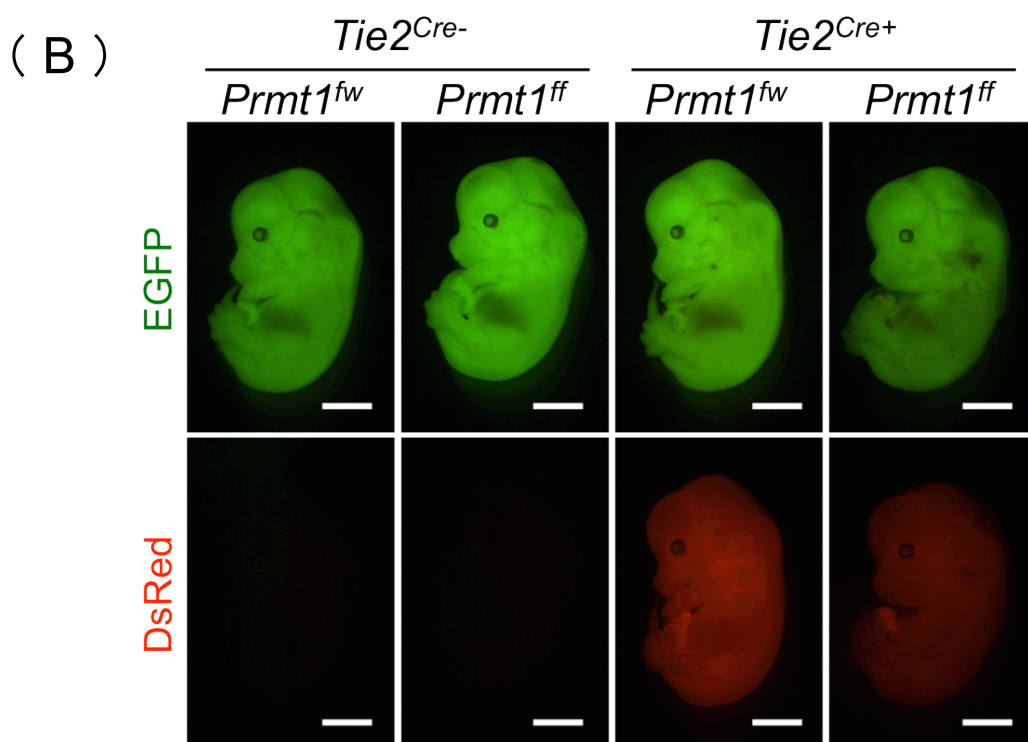
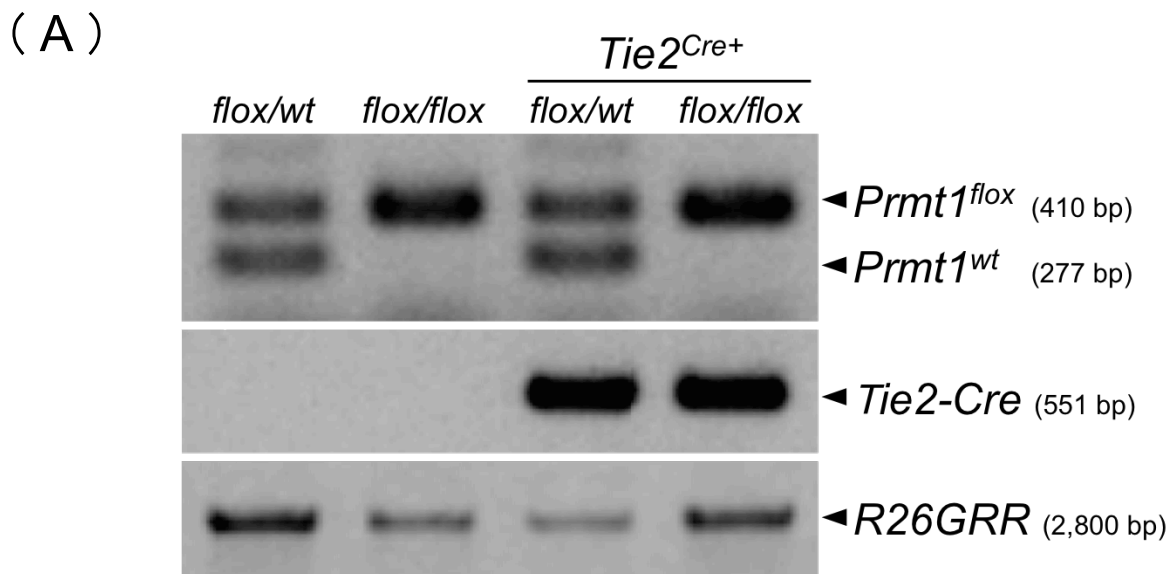


Fig. 10 PRMT1-ECKOマウス胎仔の遺伝子型と蛍光の置き換わり

(A) 胎生14日目における胎仔遺伝子型の解析

(B) 蛍光実体顕微鏡観察によるR26GRRの組換えの確認

(上段): EGFP、(下段): DsRed、Scale bar: 2.5 mm

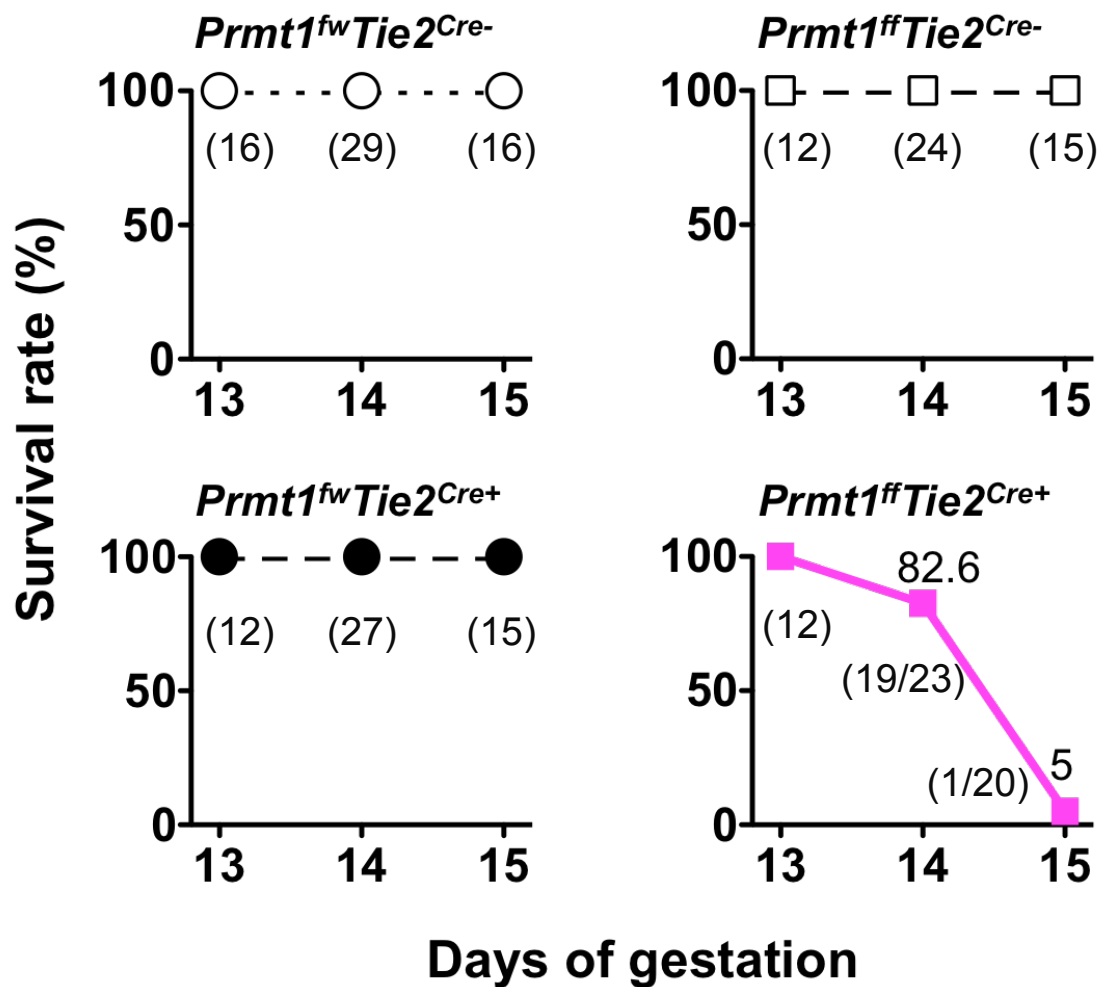
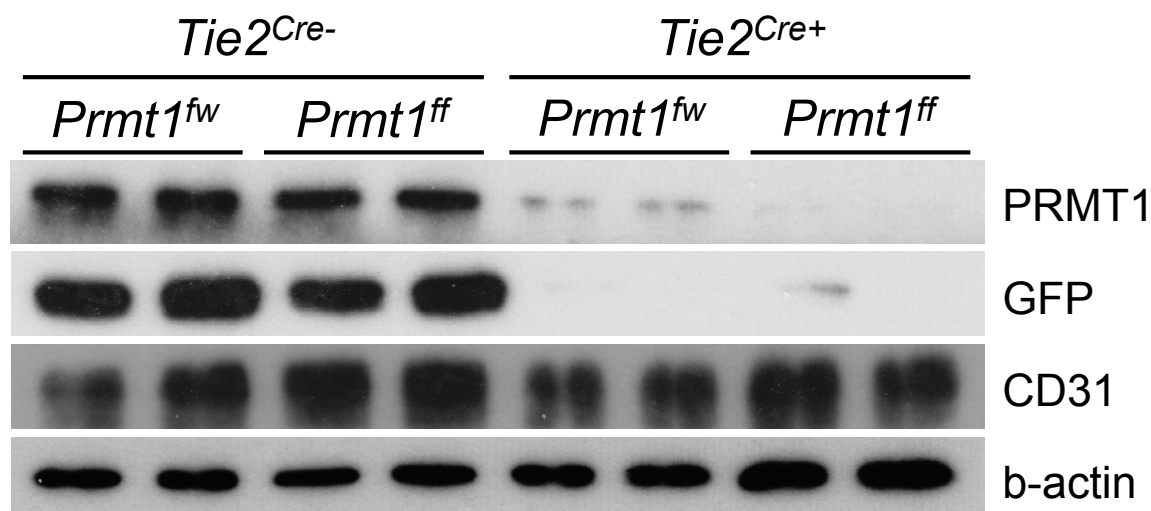


Fig. 11 PRMT1-ECKOマウス胎仔の生存率

胎生13日目から15日目にかけてのPRMT1-ECKOマウスの生存率を調べた。生死の判定は実体顕微鏡下での心拍の有無の確認によって行った。
()内は生存数/個体数を示し、全個体が生存している場合には生存数のみ表記した。

(A)



(B)

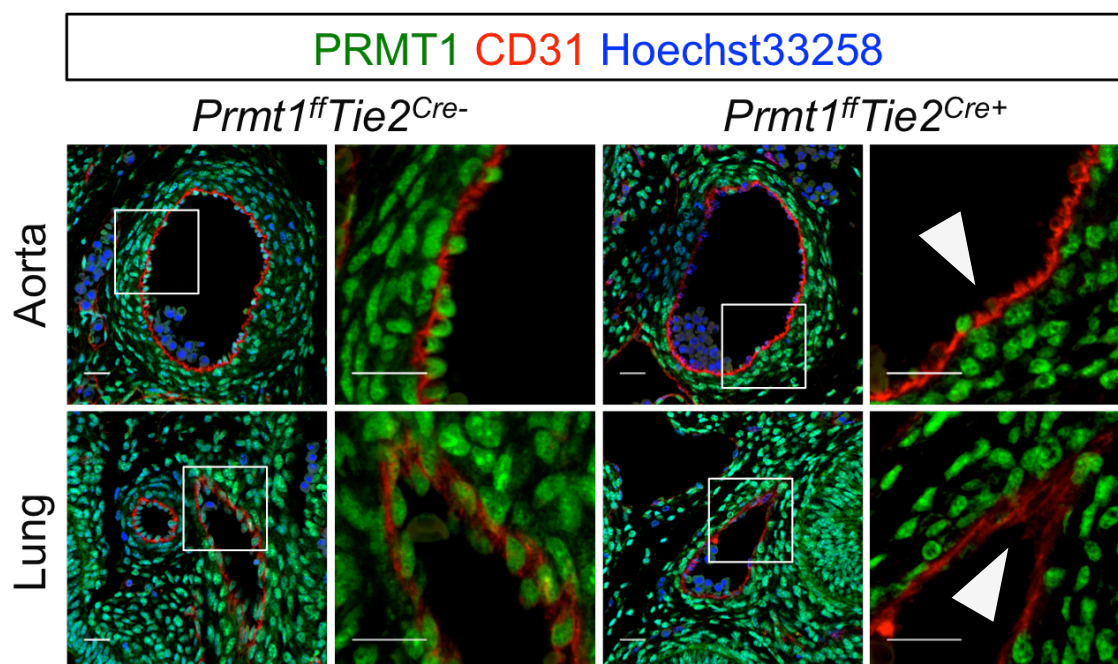


Fig. 12 血管内皮細胞のPRMT1タンパク発現の確認

(A) 胎生13.5日目のPRMT1-ECKOマウス胎仔より、MACSシステムを用いて回収した血管内皮細胞におけるPRMT1タンパク質の発現量の比較。

(B) PRMT1-ECKOマウスの胸部大動脈および肺の血管での、PRMT1の欠損確認。
 青色: 核 (Hoechst)、赤色: 血管内皮細胞 (CD31)、緑色: PRMT1、
 (左) 60倍、(右) 180倍、白矢頭: 血管内皮細胞、Scale bar: 30 μm

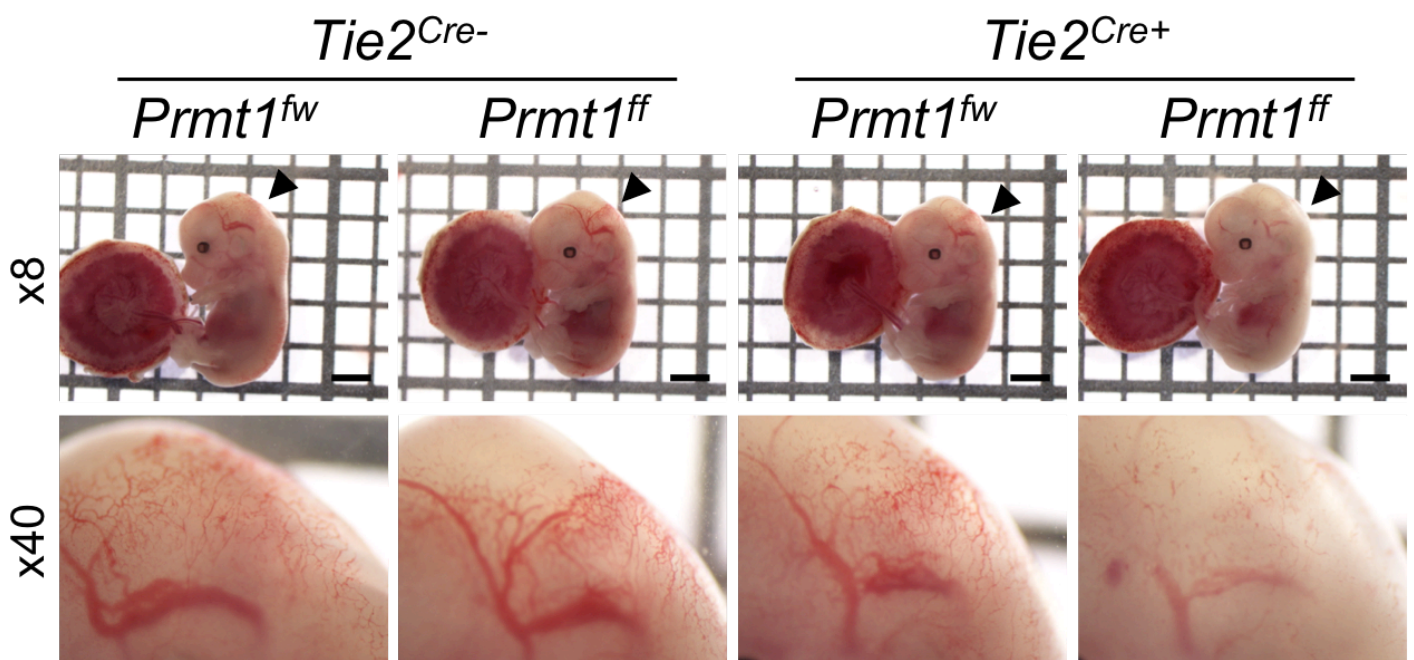


Fig. 13 胎生14日目における胎仔の形態学的所見

実体顕微鏡を用いた胎生14日目のPRMT1-ECKOマウス胎仔観察像

(上段)8倍

(下段)40倍

観察の際、下に2.5 mm四方の方眼紙を敷いて観察を行った。

Scale bar: 2.5 mm

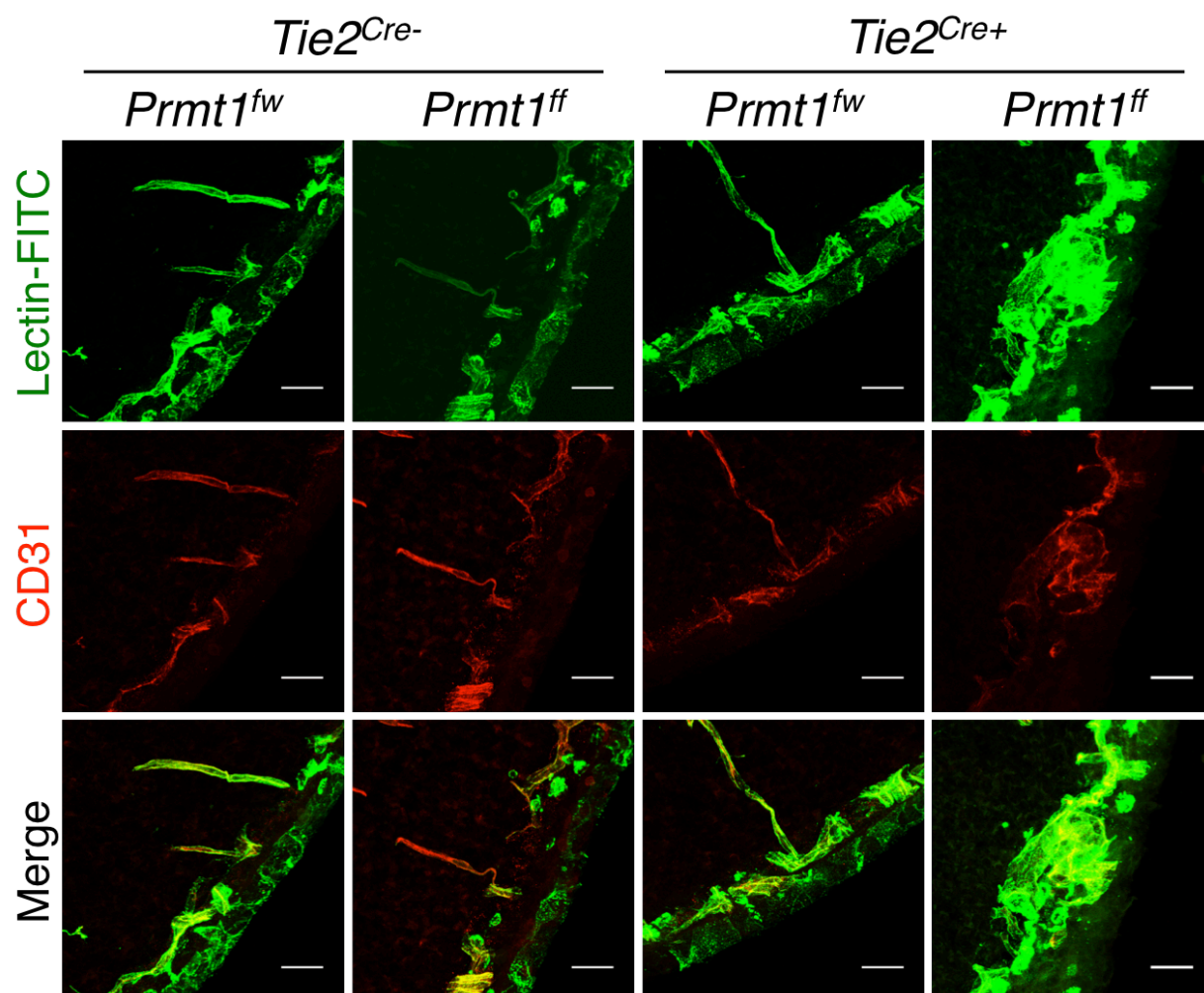


Fig. 14 PRMT1-ECKOマウスにおける頭部血管形態の評価

PRMT1-ECKOマウスの頭部サンプルを用いた。血管形態の評価。

(上段): 血流を有した血管の内皮細胞(イソレクチン-B4)(緑色)

(中段): 全ての血管内皮細胞(CD31)(赤色)

(下段): 重ね合わせ

Scale bar: 30μm

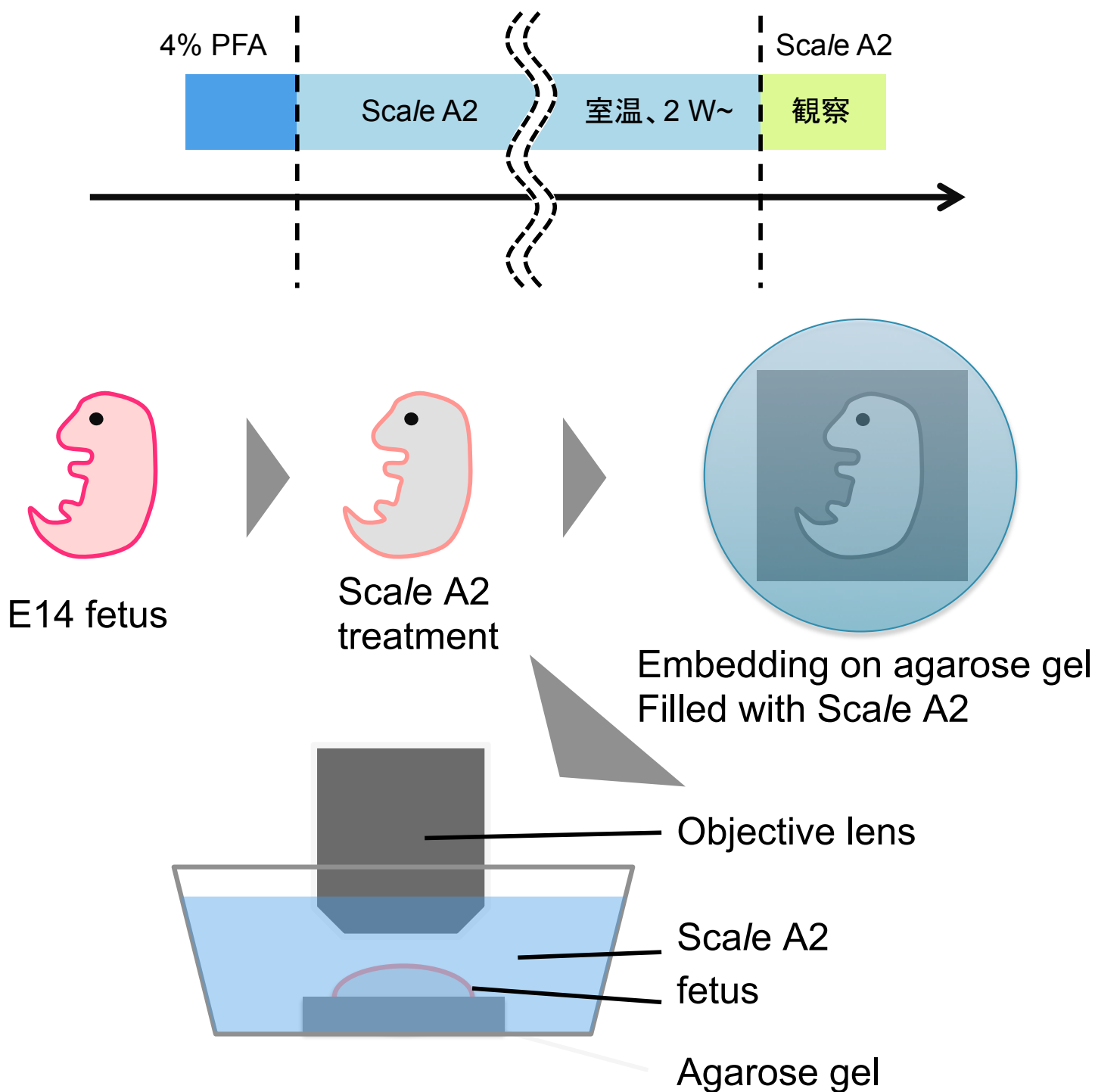


Fig. 15 2光子顕微鏡による観察方法

胎仔は透明化試薬Scale A2による透明化後、アガロースゲルにマウントし、顕微鏡にて観察を行った。

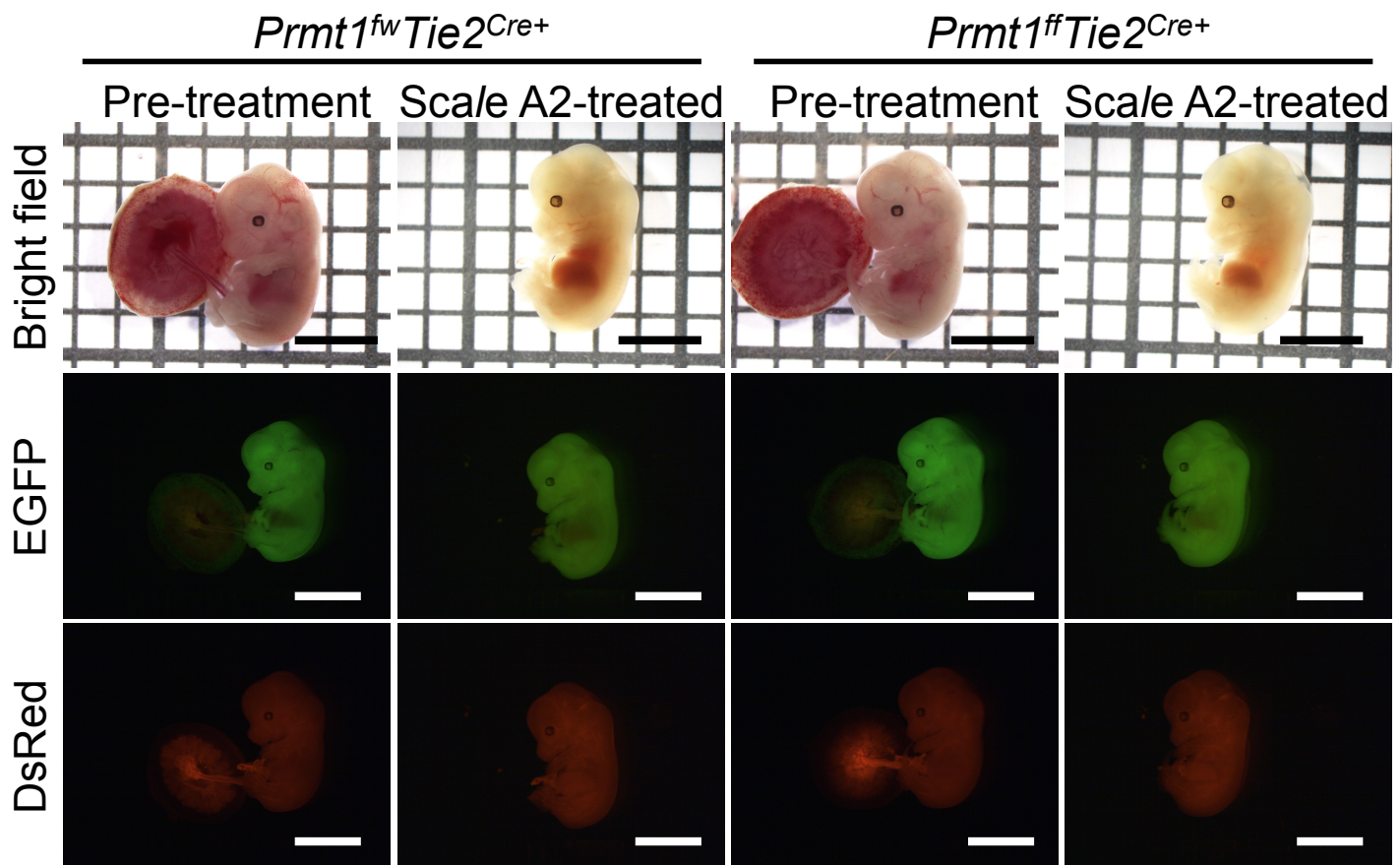


Fig. 16 Scale A2 による組織透明化の確認

透明化試薬Scale A2内に、4°Cで2週間、さらに室温で1週間静置後、実体顕微鏡を用いて観察を行った。

(上段): 明視野、(中段): EGFP、(下段): DsRed

(左側): 透明化処理前、(右側): 透明化処理後

Scale bar: 5 mm

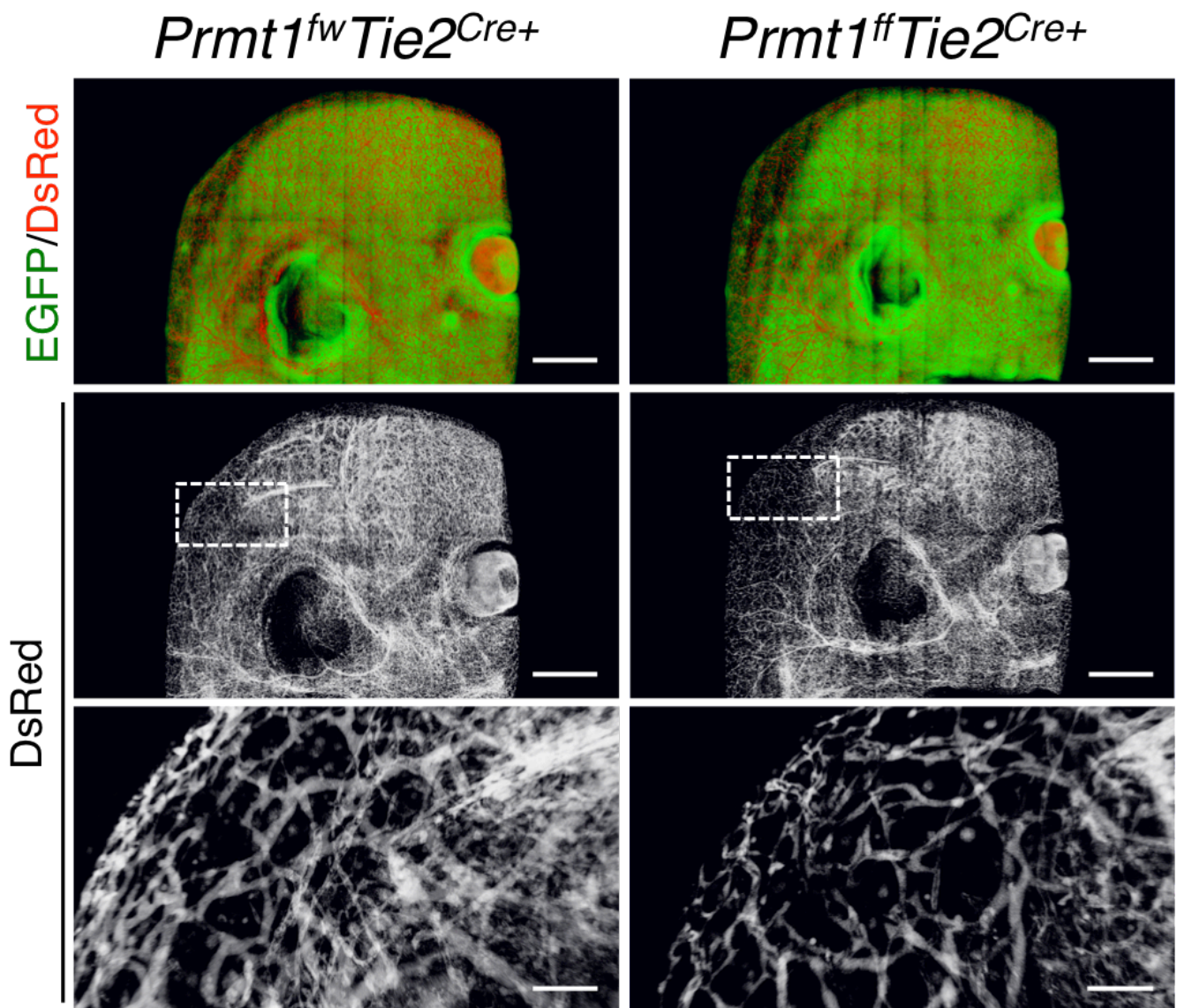


Fig. 17 2光子顕微鏡を用いた血管構造の3次元構造解析

2光子顕微鏡を用いて観察した画像を、Volocityを用いて3次元構築した。

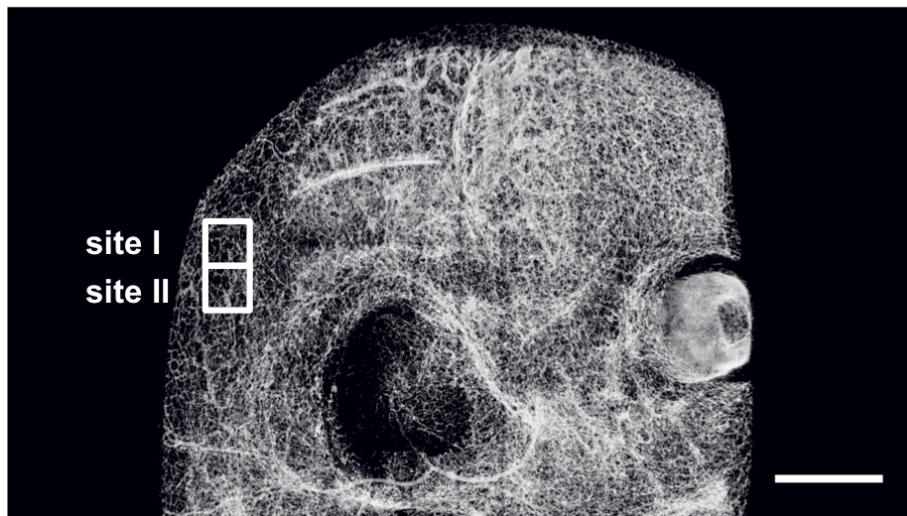
(上段) 胎仔頭部におけるEGFPおよびDsRedの蛍光

(中段) DsRedの蛍光のみをグレースケールで示した

(下段) 中段の画像の四角で囲われた部位を5倍に拡大して観察した

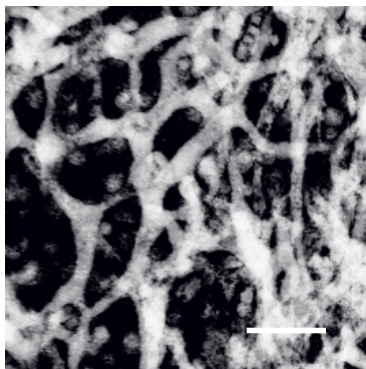
Scale bar: 上段-1 mm、下段-200 μ m

(A)



(B)

Prmt1^{fw}Tie2^{Cre+}



Prmt1^{ff}Tie2^{Cre+}

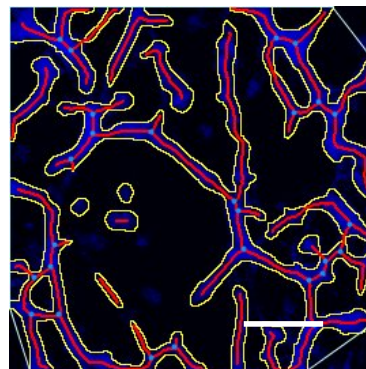
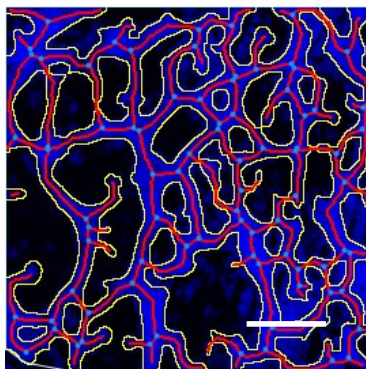
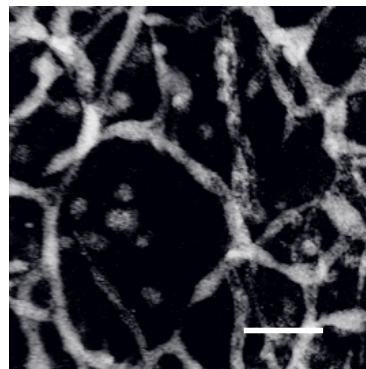


Fig. 18 3次元観察画像の定量化

2光子顕微鏡を用いて観察した画像をトリミングし、定量解析に使用した。

(A)トリミング位置、Scale bar: 1 mm

(B)トリミングした画像をAngioToolで解析した画像

Scale bar: 100 μ m

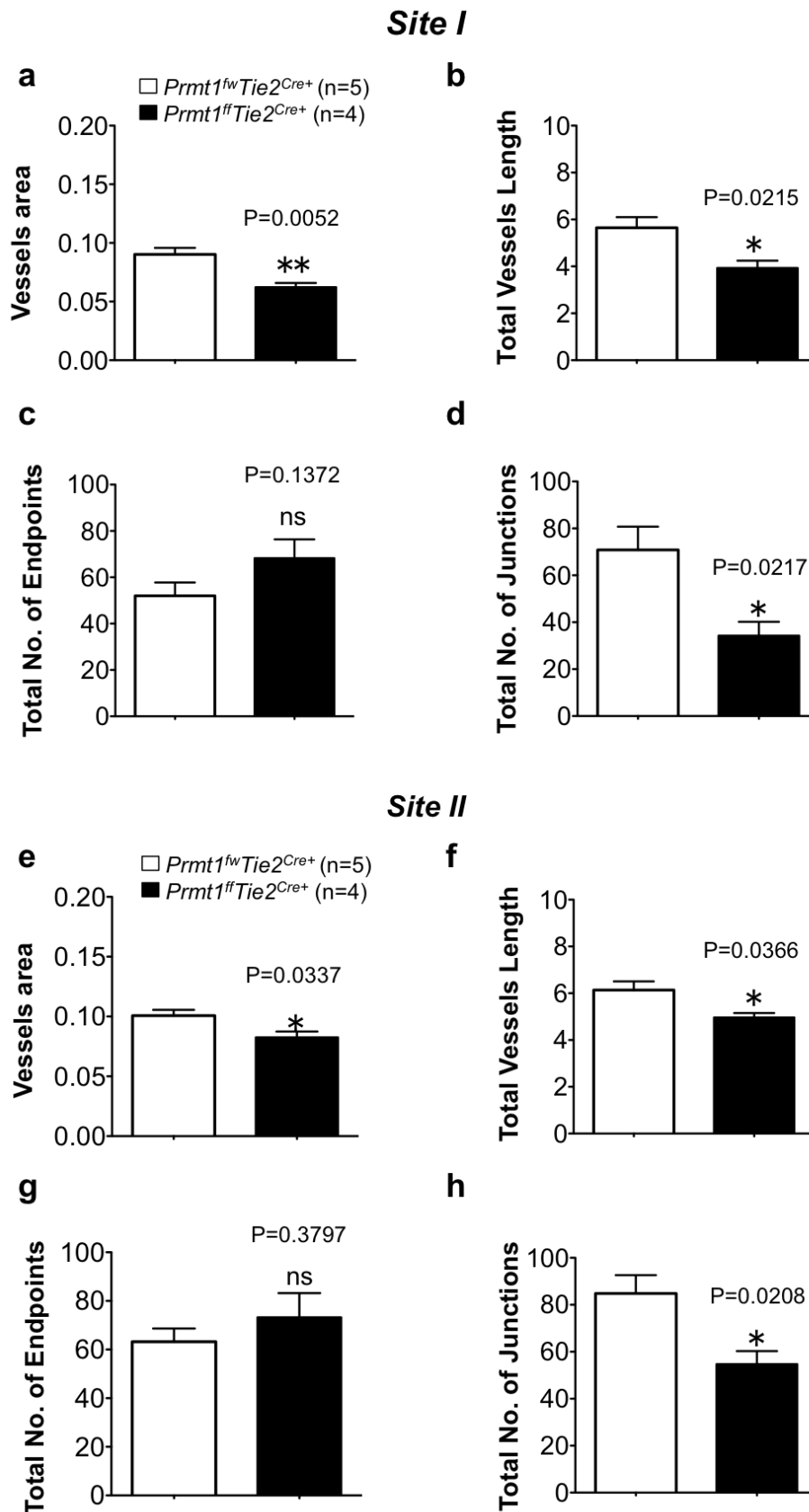


Fig. 19 AngioToolを用いた血管形態の定量解析結果

血管形態の解析ソフトAngioToolを用いて、血管の面積、総延長、末端の数、分岐点について評価した。

(control n=5, PRMT1-ECKO n=4)

* : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$

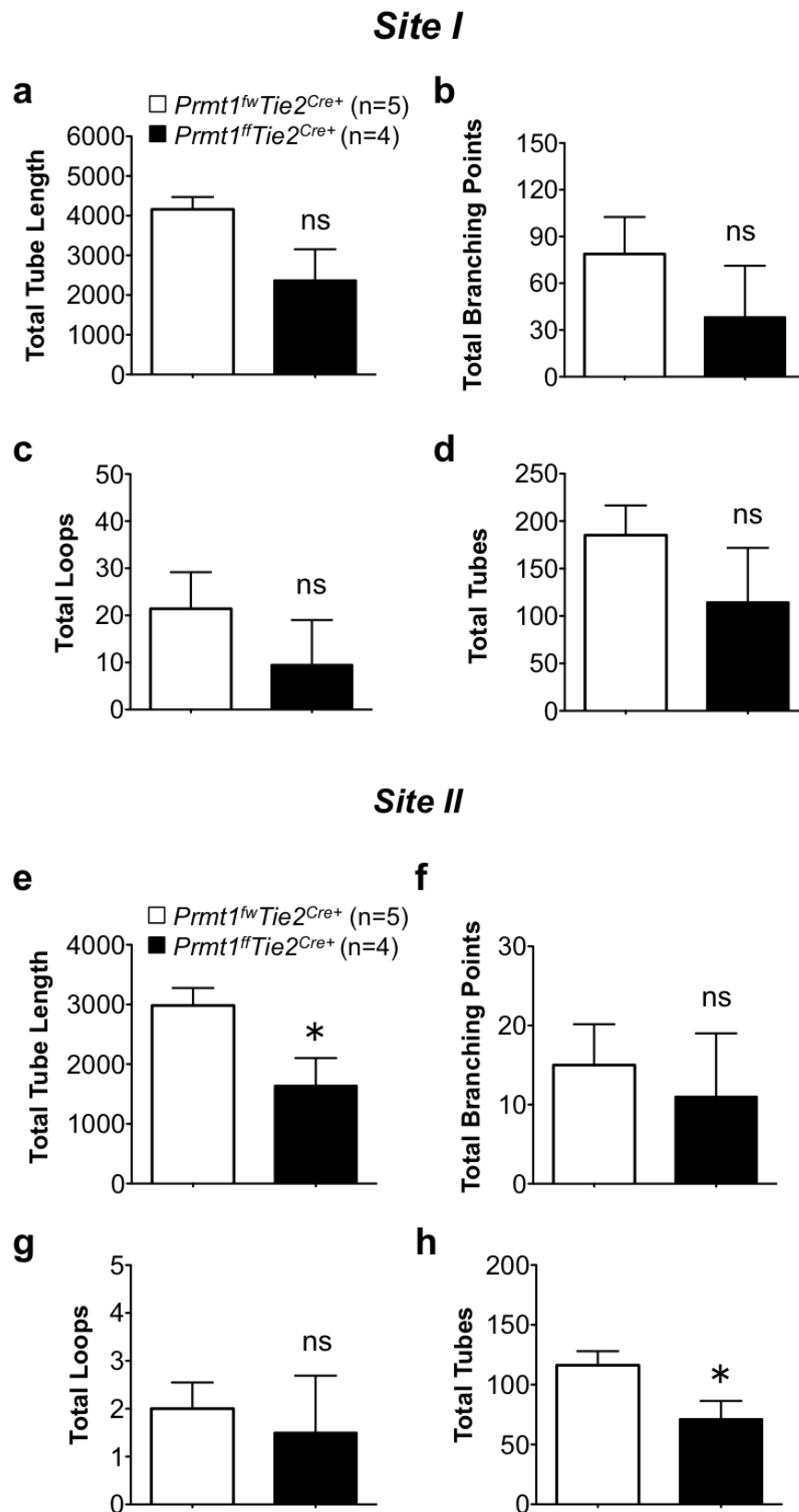


Fig. 20 WimTubeを用いた血管形態の定量解析結果

血管形態の解析ソフトWimTubeを用いて、血管の総延長、分岐数、管腔数、血管数について評価した。

(control n=5, PRMT1-ECKO n=4)

* : $p < 0.05$

Chapter III

結論

血管内皮細胞は、酸素や栄養素などの物質の運搬、血流と組織とを分けるバリア、また、ホルモン分泌による血圧制御などを担い、恒常性の維持に重要である。こうした血管の殆どは血管新生によって形成されており、中でも胎仔期は生理的な血管新生が最も活発に行われている時期である。これまで、転写因子や血管新生関連因子が翻訳後修飾によって、活性や局在が変化することが細胞レベルの研究で報告されていたものの (Herbert *et al.* 2011)、実際に翻訳後修飾の変化が生体内で血管新生を制御していることを示した報告はない。本研究では、PRMT1 を血管内皮細胞で欠損することで、生体の血管内皮細胞の構造に異常が認められることを示した。このことは、翻訳後修飾の 1 つであるタンパク質アルギニンメチル化を触媒する酵素が、血管新生を制御することを示しており、血管新生を制御する新たな分子メカニズムの柱として、翻訳後修飾の関与を証明した点で大きな意義があったと考える。

一方で、血管内皮細胞のPRMT1が、どのような分子をターゲットとして、どのように血管構造を制御しているのかという分子メカニズムについては、本研究では解明されていない。*in vitro*のこれまでの報告から、PRMT1の作用機序として、以下の3つを考えている。

① ヒストンのメチル化による制御：ヒストンは環境変化に応答して、アセチル化やメチル化、リン酸化などの翻訳後修飾を受け、遺伝子発現を調節している (Jenuwein *et al.* 2001)。ヒストンH4R3は、PRMT1によって非対称性にジメチル

化されることで転写が正に制御され、逆に、PRMT5によって対称性にジメチル化されると転写が抑制されることが知られており (Yang *et al.* 2013、Blanc *et al.* 2017)、PRMT1がヒストンのアルギニンメチル化を介して血管形成を制御している可能性がある。

②ヒストン以外のタンパク質のメチル化による制御：PRMT1の基質として多くのヒストン以外のタンパク質も同定されつつある (Yang *et al.* 2013)。当研究室では、PRMT1が転写因子FOXO1をメチル化することでAktによるリン酸化を抑制し、FOXO1の転写活性を促進させることを報告している (Yamagata *et al.* 2008, Takahashi *et al.* 2011)。また、細胞でPRMT1をノックダウンすると血管形成に重要なHIF-1 α の発現が上昇すること (Lafleur *et al.* 2014)、PRMT1は血管内皮細胞の遊走の抑制に働くPGC-1 α をメチル化して活性化する (Teyssier *et al.* 2005) など、PRMT1と血管形成との関連が示されつつある。

③コファクターとしての制御：PRMT1がメチル基転移活性非依存的に標的と結合し細胞機能を制御する可能性が考えられる。実際、PRMT1はファミリー内でのダイマーやテトラマーを形成することで、メチル基転移活性が変化すること、また、ターゲットの基質が異なることが知られている (Zhou *et al.* 2015, Lee *et al.* 2015)。一方で、PRMT1の標的タンパク質の探索が精力的に進められている段階で、メチル化の基質にはならないPRMT1の標的分子の報告はほとんど無く、今後の解析が期待される。

複雑な血管イベントでの血管内皮細胞でのアルギニンメチル化の意義の解明には、上記3点を含め、PRMT1を介する分子的な作用点についての理解が重要であると考えている。

本研究では、R26GRR レポーターマウスを用いた細胞の蛍光標識と Scale A2 による組織透明化技術、そして 2 光子顕微鏡を用いた観察技術を組み合わせることで、これまで評価が困難であった、胎生 12 日目以降の胎仔において、血管の全体的な構造解析を可能とした。神経系においては、透明化技術を用いて、神経の回路や活動を可視化するコネクトーム解析が進められているが (Ke *et al.* 2013)、本研究のような血管に透明化技術を用いて 3 次元的に解析を行った報告は殆どない。

最近、本研究で用いた組織透明化技術である Scale A2 に加えて、立体構造を維持したまま生体組織を免疫染色し、3 次元構造解析を行える Scale S が開発された (Hama *et al.* 2015)。また、より高い透明度によって、マウス全身を観察できる CUBIC や、微細構造の保存に優れた SeeDB など、複数の透明化技術が急速に発展してきている (Tainaka *et al.* 2014, Ke *et al.* 2013, Ke *et al.* 2016)。加えて、2 光子顕微鏡の性能向上や、光シート顕微鏡の普及など、より深く、より早く広範囲に 3 次元構造を解析することができるようになってきた。今後は、どのようにして細胞を標識し、どの程度の深さをどれくらいの解像度での観察するのかなど、3 次元構造解析には目的に合わせて様々な方法を組み合わせることが可能となりつつある。

一方で、現在の 3 次元構造解析は、解析技術と生物学的意義との結びつきが弱いことが課題であると考えられる。3 次元構造解析に対する敷居は低くなり、神経系を中心として多くの画像が取得されているが、その評価には 3 次元の画像を元に構造を定量解析することが必須であるが、そのツールがまだ十分には整備されていない。特に血管は生体内で網膜血管のように平面的に血管を形成す

る部位は少なく、血管がどの程度細かく分岐し伸長しているのか、分岐のカウントはどの程度なのか、血管網としての形態はどうなっているのかなど、3次元構造をそのまま解析できるツールが存在しないのが現状である。今後、3次元での構造解析を行った画像を元に、客観的に評価し議論するためのツールを整備する必要があると考えている。また、それぞれの技術の発展に伴う高い技術の習熟に加え、得られた組織構造の情報を分子の機能へと結びつける専門的な知識と洞察力が必要であると考えている。

本研究では、血管内皮細胞でのアルギニンメチル化の役割について、メチル基転移酵素に着目し、内皮細胞特異的 PRMT1 欠損マウスの作製と、組織の透明化観察技術を組み合わせることで、内皮細胞の PRMT1 が胎仔の正常な血管形成と胎生中期以降の生存に必須であることを示した。これまで、循環器分野での血管観察では、胸部大動脈を中心とした大血管の病理解析が行われていたが、血圧を規定する要因は、心拍出量、循環血液量、末梢血管抵抗であり、末梢血管の状態から病態を評価することは困難であった。本研究では、血管網の全体像が観察に加えて、末梢血管も含めて詳細な形態評価が可能となった。今後、血管の 3 次元構造解析にて、末梢血管も含めた血管ネットワーク全体から循環器評価や疾患の把握に活用できるのではと考えている。

また、PRMT1 によって非対称性にメチル化されたアルギニンは、現時点で脱メチル化酵素が見つかっておらず、メチル化されたタンパク質が分解されると、遊離の非対称性ジメチルアルギニン (ADMA) を生成する (Bedford *et al.* 2009)。ADMA は内皮細胞に作用し、NO 合成酵素 (eNOS) の働きを阻害することで、

血圧上昇や循環器疾患に寄与することが報告されており（Goveia *et al.* 2014）、妊娠期では、子宮動脈の形成や胎盤血管の形成の障害で胎児が発育遅延を呈する危険がある（Kusinski *et al.* 2012）。このように、PRMT1 によるアルギニンのメチル化状態の変化は、正常な血管内皮細胞においてのみならず、病的な血管の構造や機能制御にも関与することが予想される。今後、血管内皮細胞の PRMT1 を介するアルギニンメチル化の分子基盤が明らかにしていくことで、病態発症メカニズムの理解や、病気の診断や予知、そして治療へと繋がっていくことを期待する。

Chapter IV

謝辞

本研究を行うにあたり、終始ご指導くださいました筑波大学生命領域学際研究センター 教授 深水 昭吉 先生に厚く御礼申し上げます。そして実際に数多くのご指導を賜りました同大学生命領域学際研究センター 石田 純治 先生、および 金 俊達 先生に深く感謝いたします。また、本研究にて多大なる協力と助言をくださいました 濱田 樹理 博士、村田 知弥 博士、橋本 美涼 氏、小池 美紗都 氏、水上 早瀬 氏、原 加奈子 氏に心より感謝いたします。また、本研究で使用した R26GRR マウスを供与していただきました、筑波大学生命科学動物資源センターの 八神 健一 先生、杉山 文博 先生、長谷川 賀一 先生に心より御礼申し上げます。そして筑波大学 生命領域学際研究センター 深水研究室の皆様感謝いたします。

Chapter V

引用文献

Amato, S.P., Pan, F., Schwartz, J., Ragan, T.M. (2016) Whole Brain Imaging with Serial Two-Photon Tomography. **Front. Neuroanat.** 10, 31

Bader, B.L., Rayburn, H., Crowley, D., Hynes, R.O. (1998) Extensive vasculogenesis, angiogenesis, and organogenesis precede lethality in mice lacking all alpha v integrins. **Cell** 95, 507–519

Bedford, M.T., Clarke, S.G. (2009) Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. **Mol. Cell** 33, 1-13

Blanc, R.S., Richard, S., (2017) Arginine methylation: the coming of age. **Mol. Cell** 65, 8-24

Blanc, R.S., Vogel, G., Li, X., Yu, Z., Li, S., Richard, S. (2017) Arginine methylation by PRMT1 regulates muscle stem cell fate. **Mol. Cell. Biol.** 37

Bulau, P., Zakrzewicz, D., Kitowska, K., Leiper, J., Gunther, A., Grimminger, F., Eickelberg, O. (2007) Analysis of methylarginine metabolism in the cardiovascular system identifies the lung as a major source of ADMA. **Am. J. Physiol. Lung Cell.**

Mol. Physiol. 292, L18-L24

De Lange, WJ., Halabi, CM., Beyer, AM., Sigmund, CD. (2008) Germ line activation of the Tie2 and SMMHC promoters causes noncell-specific deletion of floxed alleles.

Physiol. Genomics. 35: 1-4

Francois, M., Caprini, A., Hoskin, B., Orsenigo, F., Wilhelm, D., Browne, C., Paavonen, K., Karnezis, T., Shayan, R., Downes, M., Davison, T., Tutt, D., Cheah K. S. E., Stackner, S. A., Muscat, G. E. O., Achen, M. G., Dejana, E., Koopman, P. (2008) Sox18 induces development of the lymphatic vasculature in mice. **Nature** 456, 643-647

Folkman, J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. **Nat. Med.** 1, 27-31

Goveia, J., Stapor, P., Carmeliet, P. (2014) Principles of targeting endothelial cell metabolism to treat angiogenesis and endothelial cell dysfunction in disease. **EMBO Mol. Med.** 6, 1105-1120

Hama, H., Kurokawa, H., Kawano, H., Shimogori, T., Noda, H., Fukami, K., Sakaue-Sawano, A., Miyawaki, A. (2011) Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. **Nat. Neurosci.** 14, 1481-1488

Hama, H., Hioki, H., Namiki, K., Hoshida, T., Ishidate, F., Kaneko, T., Akagi, T., Saito, T., Saido, T., Miyawaki A. (2015) ScaleS: an optical clearing palette for biological imaging. **Nat. Neurosci.** 18, 1518-1529

Hartsough, E.J., Meyer, R.D., Chitalia, V., Jiang, Y., Marquez, V.E., Zhdanova, I.V., Weinberg, J., Costello, C.E., Rahimi, N. (2013) Lysine methylation promotes VEGFR-2 activation and angiogenesis. **Sci. Signal.** 6, ra104

Hasegawa, Y., Daitoku, Y., Sekiguchi, K., Tanimoto, Y., Mizuno-Iijima, S., Mizuno, S., Kajiwarra, N., Ema, M., Miwa, Y., Mekada, K., Yoshiki, A., Takahashi, S., Sugiyama, F., Yagami, K. (2013) Novel ROSA26 Cre-reporter knock-in C57BL/6N mice exhibiting green emission before and red emission after Cre-mediated recombination. **Exp. Anim.** 62, 295-304

Hashimoto, M., Murata, K., Ishida, J., Kasuya, Y., Fukamizu, A. (2016) Severe hypomyelination and developmental defects are caused in mice lacking protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) in the central nervous system. **J. Biol. Chem.** 291, 2237-2245

Herbert, S.P., Stainier, D.Y.R. (2011) Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 12, 551-564

Hong, E., Lim, Y., Lee, E., Oh, M., Kwon, D. (2012) Tissue-specific and age-dependent expression of protein arginine methyltransferases (PRMTs) in male rat tissues. ***Biogerontology*** 13, 329-336

Hua, WK., Chang, YI., Yao CL., Hwang, SM., Chang, CY., Lin, WJ. (2013) Protein Arginine Methyltransferase 1 Interacts with and Activates p38a to Facilitate Erythroid Differentiation. ***PLoS One*** 8, e56715

Jenuwein, T., Allis, CD., (2001) Translating the histone code. ***Science*** 293, 1074-1080

Katona, G., Szalay, G., Maák, P., Kaszás, A., Veress, M., Hillier, D., Chiovini, B., Vizi, ES., Roska, B., Rózsa, B. (2012) Fast two-photon in vivo imaging with three-dimensional random-access scanning in large tissue volumes. ***Nat. Methods*** 9, 201-208

Ke, MT., Nakai, Y., Fujimoto, S., Takayama, R., Yoshida, S., Kitajima, TS., Imai, T. (2016) Super-Resolution Mapping of Neuronal Circuitry With an Index-Optimized Clearing Agent. ***Cell Rep.*** 14, 2718-2732

Ke, MT., Fujimoto, S., Imai, T. SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. ***Nature Neurosci.*** 8, 1154-1161

Kusinski, LC., Stanley, JL., Dilworth, MR., Hirt, CJ., Andersson, IJ., Renshall, LJ., Baker, BC., Baker, PN., Sibley, CP., Mareing, M., Glanzier, JD. (2012) eNOS knockout mouse as a model of fetal growth restriction with an impaired uterine artery function and placental transport phenotype. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 303, R86-93

Lee, WC., Lin, WL., Matsui, T., Chen, ES., Wei, TY., Lin, WH., Hu, H., Zheng, YG., Tsai, MD., Ho, MC. (2015) Protein Arginine Methyltransferase 8: Tetrameric Structure and Protein Substrate Specificity. **Biochemistry** 54, 7514-7423

Lin, WJ., Gary, J.D., Yang, M.C., Clarke, S., Herschman, H.R.. (1996) The mammalian immediate-early TIS21 protein and the leukemia-associated BTG1 protein interact with a protein-arginine N-methyltransferase. **J. Biol. Chem.** 27, 15034-15044

Murphy,VE., Smith, R., Giles, WB., Clifton, VL. (2006) Endocrine regulation of human fetal growth: the role of the mother, placenta, and fetus. **Endocrine Review** 27, 141-169

Okamoto, A., Asai, T., Ryu, S., Ando, H., Maeda, N., Dewa, T., Oku, N. (2016) Enhanced Efficacy of Doxorubicin by microRNA-499-Mediated Improvement of Tumor Blood Flow. **J. Clin. Med.** 5

Park, C., Kim, T.M., and Malik, A.B. (2013) Transcriptional regulation of endothelial cell and vascular development. **Circ. Res.** 112, 1380-1400

Pawlak, M.R., Scherer, C.A., Chen, J., Roshon, M.J., Ruley, H.E. (2000) Arginine N-methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable. **Mol. Cell. Biol.** 20, 4859–4869

Rahimi, N. (2006) Vascular endothelial growth factor receptors: molecular mechanisms of activation and therapeutic potentials. **Exp. Eye. Res.** 83, 1005–1016

Rahimi, N., Costello, C.E. (2015) Emerging roles of post-translational modifications in signal transduction and angiogenesis. **Proteomics** 15, 300–309

Rowe, R. G., Mandelbaum, J., Zon, L., Daley G. Q. (2016) Engineering Hematopoietic Stem Cells: Lessons from Development. **Cell Stem Cell** 18, 707-720

Sato, T. N., Toawa, Y., Deutsch, U., Wolburg-Buchholz, K., Fujiwara, Y., Gendron-Maguire, M., Gridley, T., Wolburg, H., Risau, W., Qin, Y. (1995) Distinct roles of the receptor tyrosine kinases Tie-1 and Tie-2 in blood vessel formation. **Nature** 376, 70-74

Sawada, N., Jiang, A., Takizawa, F., Safdar, A., Manika, A., Tesmenitsky, Y., Kang,

KT., Bischoff, J., Kalwa, H., Sartoretto, JL., Kamei, Y., Benjamin, LE., Watada, H., Ogawa, Y., Higashikuni, Y., Kessinger, CW., Jaffer, FA., Michel, T., Sata, M., Croce, K., Tanaka, R., Arany, Z. (2014) Endothelial PGC-1 α mediates vascular dysfunction in diabetes. **Cell Metab.** 19, 246-258

Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, TP., Gertsenstein, M., Wu, XF., Breitman, ML., Schuh, AC. (1995) Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. **Nature** 376, 62-66

Takahashi, Y., Daitoku, H., Hirota, K., Tamiya, H., Yokoyama, A., Kako, K., Nagashima, Y., Nakamura, A., Shimada, T., Watanabe, S., Yamagata, K., Yasuda, K., Ishii, N., Fukamizu, A. (2011) Asymmetric arginine dimethylation determines life span in *C. elegans* by regulating forkhead transcription factor DAF-16. **Cell Metab.** 13, 505-516

Tainaka, K., Kubota, SI., Suyama, TQ., Susaki, EA., Perrin, D., Ukai-Tadenuma, M., Ukai, H., Ueda, HR. Whole-body imaging with single-cell resolution by tissue decolorization. **Cell** 159, 911-924

Teyssier, C., Ma, H., Emter, R., Kralli, A., Stallcup, MR. (2005) Activation of nuclear receptor coactivator PGC-1 α by arginine methylation. **Genes Dev.** 19, 1466-1473

Vu, T.H., Alemayehu, Y., Werb, Z. (2003) New insights into saccular development and

vascular formation in lung allografts under the renal capsule. **Mech. Dev.** 120, 305-313

Wang, Q., Stacy, T., Binder, M., Marin-Padilla, M., Sharpe, A. H., Speck N. A. (1996) Disruption of the Cbfa2 gene causes necrosis and hemorrhaging in the central nervous system and blocks definitive hematopoiesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 93, 3444-3449

Wei, G., Srinivasan, R., Cantemir-Stone, CZ., Sharma, SM., Santhanam, R., Weinstein, M., Muthusamy, N., Man, AK., Oshima, RG., Leone, G., Ostrowski, MC. (2009) Ets1 and Ets2 are required for endothelial cell survival during embryonic angiogenesis. **Blood** 114, 1123-1130

Wigle, J. T., Oliver, G. (1999) Prox1 Function Is Required for the Development of the Murine Lymphatic System. **Cell** 98, 769-778

Wilhelm, K., Happel, K., Eelen, G., Schoors, S., Oellerich, MF., Lim, R., Zimmermann, B., Aspalter, IM., Franco, CA., Boettger, T., Braun, T., Fruttiger, M., Rajewsky, K., Kekker, C., Brüning, JC., Gerhardt, H., Carmeliet, P., Potente, M. (2016) FOXO1 couples metabolic activity and growth state in the vascular endothelium. **Nature** 529, 216-220

Yamagata, K., Daitoku, H., Takahashi, Y., Namiki, K., Hisatake, K., Kako, K., Mukai, H., Kasuya, Y., Fukamizu, A. (2008) Arginine methylation of FOXO transcription factors inhibits their phosphorylation by Akt. **Mol. Cell** 32, 221-231

Yang, X., Castilla, L.H., Xu, X., Li, C., Gotay, J., Weinstein, M., Liu, P.P., Deng, C.X. (1999) Angiogenesis defects and mesenchymal apoptosis in mice lacking SMAD5. **Development** 126, 1571-1580

Yang, Y., Bedford, M.T. (2013) Protein arginine methyltransferases and cancer. **Nat. Rev. Cancer** 13, 37-50

Zhao, X., Jankovic, V., Gural, A. (2008) Methylation of RUNX1 by PRMT1 abrogates SIN3A binding and potentiates its transcriptional activity. **Genes Dev.** 22, 640-653

Zhou, R., Xie, Y., Hu, H., Hu, G., Patel, V.S., Zhang, J., Yu, K., Huang, Y., Jiang, H., Liang, Z., Zheng, Y.G., Luo, C. (2015) Molecular Mechanism underlying PRMT1 Dimerization for SAM Binding and Methylase Activity. **J. Chem. Inf. Model.** 55, 2623-32

山形 一行、大徳 浩照、深水 昭吉 (2009) アルギニンメチル化と細胞機能制御
生化学 第81巻 第8号、688-699