

平成21年6月10日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008年

課題番号：19590183

研究課題名（和文） 血管リモデリング過程の分子機構

研究課題名（英文） Molecular mechanisms of vascular remodeling process

研究代表者 小久保 博樹（KOKUBO HIROKI）

国立遺伝学研究所 系統生物研究センター 助教

研究者番号：10270480

研究成果の概要：

体の中にくまなくはりめぐらされた血管ネットワークは発生過程における組織や器官の形成及び生体の恒常性の維持に必須である。Notch シグナル伝達系の多くの構成遺伝子ノックアウトマウスが血管リモデリングの異常を伴って胎生致死となることが知られている。本研究では、組織内の血管網構築を制御する細胞間シグナル分子である Notch シグナル伝達系の制御下にある *Hesr* 遺伝子を同定し、その機能を発生遺伝学的に解析することによって、血管ネットワークの構築、特にリモデリング過程の分子機構を解明することを目的とした。

発生初期に血管形成の異常が一目瞭然に判別できる *yolk sac* に焦点を絞り、*Hesr1*、*Hesr2* の過剰発現系並びにノックアウトマウスの *yolk sac*（胎生9.5日目）についてマイクロアレイ解析を行い、遺伝子の発現変化を系統的に整理した。これを元に発現差異のある遺伝子について *Yolk sac* を用いた *in situ* スクリーニングを行うことにより血管形成に関与すると考えられる遺伝子群を同定した。その結果、*Hesr1*、*Hesr2* によって脱リン酸化酵素をコードする *Dusp4* が顕著に抑えられることを見出した。*Dusp4* は、MAP リン酸化経路の *Erk* を基質にすることが報告されていることから、*Erk1/2* のリン酸化状態が変化を観察した。*Hesr1*、*Hesr2* の過剰発現系で *Erk1/2* のリン酸化が全体にわたって見られることが明らかとなってきた。さらに、*Dusp4* を心血管系特異的に過剰発現させると、血管のリモデリングの異常が観察された。これらの結果から、Notch シグナル伝達系が *Hesr1*、*Hesr2* の発現を誘導することによって *Dusp4* を抑制し、*Erk1/2* のリン酸化状態を規定することによって血管リモデリングを制御している可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学 解剖一般（含組織・発生学）

キーワード：発生学・形態形成学

1. 研究開始当初の背景

体の中にくまなくはりめぐらされた血管ネットワークは発生過程における組織や器官の形成及び生体の恒常性の維持に必須である。血管は中胚葉から分化してきた血管内皮細胞集団がまず単純な原始血管叢と呼ばれる管腔網を形成し、徐々に毛細管、小血管、大血管、そして動静脈へと高次に組織化された血管ネットワークを構築する。特に単純な構造が階層化・複雑化する過程はリモデリングと呼ばれ、その制御には種々の細胞間シグナル分子が介在する。このように高度に複雑化した血管ネットワークの構築がいかんにして制御されるか、どのようにして動脈・静脈の分化が制御されているかなど、非常に基礎的な現象の分子機構にも未解決な問題が多い。

2. 研究の目的

Notch シグナル伝達系の多くの構成遺伝子ノックアウトマウスが血管リモデリングの欠陥を伴って胎生致死となることが知られているが、Notch シグナルは成体においても腫瘍における血管新生を促進することなどが示されてきている。本研究では、組織内の血管網構築を制御する細胞間シグナル分子である Notch シグナル伝達系の制御下にある因子を同定し、その機能を発生遺伝学的に解析することによって、血管ネットワークの構築、特にリモデリング過程の分子機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 我々が独自に有している Yolk sac

特に *Hesr* 遺伝子群を血管系全体に異所的に発現させたマウス作出し、ノックアウトマウスと共にマイクロアレイによる発現解析を行い、新たな Notch シグナル伝達系に制御される遺伝子を同定した。

(2) それらの遺伝子を強制発現系に入れるなどその機能解析を進めた。

(3) Erk のリン酸化等、他のシグナル伝達系との関連を調べた。

4. 研究成果

我々は、*Hesr1-3* 遺伝子ノックアウト (KO) マウス作製し、各単独 KO マウスでは血管形成不全は認められなかったが、*Hesr1/Hesr2* 重複 KO マウスで大動脈縮窄を引き起こし(図1)、動脈マーカーである *EphrinB2* が発現しないことを明らかにした。この結果から、マ

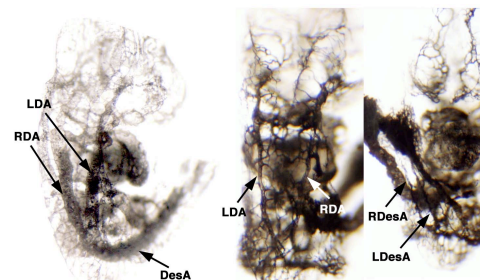


図1: *Hesr1/2* 重複KOマウス胚では動脈狭窄が認められる

ウスでもゼブラフィッシュ同様に、*Hesr2/gridlock* の発現が動脈を規定する因子であると考えられた⁴。そこで我々は、*Hesr2* が直接動脈を誘導できるかどうかを確かめるため、トランスジェニックマウスを用いて

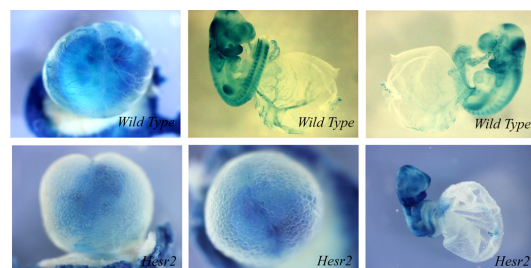


図2: *Hesr2* は、直接 *EphrinB2* の発現を誘導できない

心血管前駆細胞から強制的且つ継続的に発現させたところ、動脈マーカーである Ephrnb2 の発現を誘導することができないことが明らかとなった(図2)。さらに、Hesr1 および Hesr2 を強制発現させた Yolk sac においては、非常に特徴的な血管形成異常を観察した(図3)。Hesr1/Hesr2 重複 KO マウスで

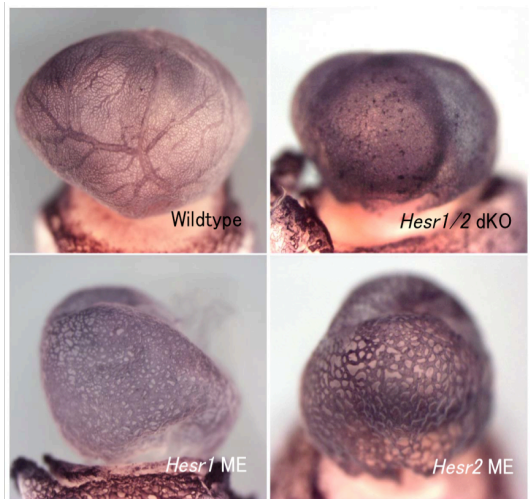


図3: Hesr1/2重複KOもしくはHesr1/2を異所的発現させたyolk sacでは、リモデリングの異常が見られる

は、血管異常が遅れて認められた。これらの観察から、Hesr1 および Hesr2 は動静脈の分化以前のリモデリングの時期に機能することが示唆された。

次に我々は、Hesr 遺伝子の発現変化に伴って発現が変化する遺伝子が、これらの血管形成異常を引き起こし、正常な血管形成においても重要な働きをしていると考え、Hesr によって制御される血管形成関連遺伝子群の探索し、その機能解析を試みた。Hesr1 および Hesr2 の強制発現系並びにノックアウトマウスの yolk sac について、時間経過を追って (E8.5 および E9.5) マイクロアレイ解析を行った。まず、遺伝子の発現変化を系統的に整理し、正常胚と比較して Hesr1 もしくは Hesr2 で 2 倍以上発現量が減少した遺伝子プロブのうち、血管形成に関与すると考えられる遺伝子群をリストアップした。本当に発

現差異のある遺伝子かどうか、それぞれの mutant の Yolk sac より抽出した mRNA に対して RT-PCR を行った。その結果、Dusp4 及び Dusp6 が期待通りに Hesr1 および Hesr2 の強制発現マウス yolk sac においてその発現が低下していることが確認された(図4)。

(A)

	Hesr1	Hesr2	DKO
Dusp4	0.315	0.159	
Dusp4		0.209	
Dusp6		0.424	

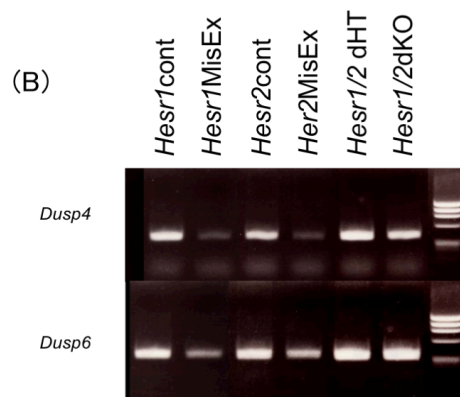


図4: HesrによってDusp4, Dusp6の発現は低下する

Dusp4 及び Dusp6 は Erk の特異的脱リン酸化酵素であるため、Hesr1 もしくは Hesr2 の強制発現マウスで Erk のリン酸化が亢進していることが考えられた。そこで、実際に Erk のリン酸化状態を観察すると、正常胚ではほとんど見られない Erk のリン酸化が、Hesr1 もしくは Hesr2 の強制発現マウス yolk sac のほとんどの内皮細胞で亢進していることが

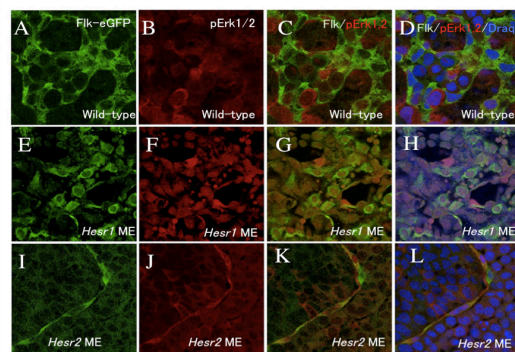


図5: Erk1/2 のリン酸化状態が亢進する

確認された(図5)。

Hesr1 および Hesr2 の強制発現マウス yolk

sac において、発現が特に低下していることが確認された *Dusp4* の強制発現マウスを作出したところ、血管リモデリング過程が著しく阻害されることが明らかとなった(図6)。

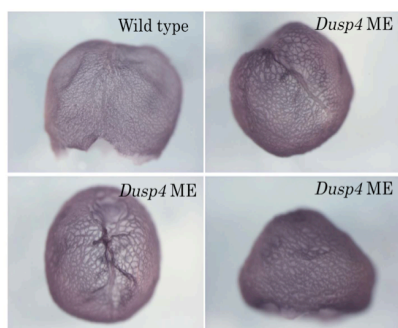


図6: *Dusp4* 異所的発現胚の yolk sac はリモデリング過程に異常が見られる

Dusp4 の強制発現マウスで Erk のリン酸化状態を観察したところ、ほとんど全ての内皮細胞で Erk のリン酸化が低下する

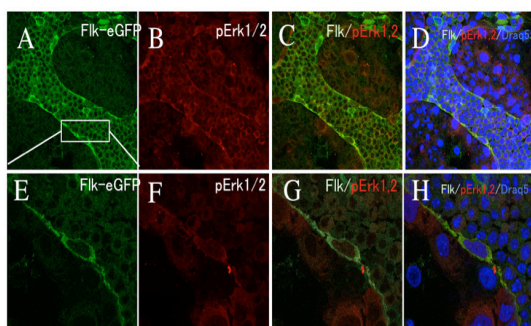


図7: *Dusp4* 強制発現 yolk sac では Erk1/2 のリン酸化が低下する

胞で Erk のリン酸化が観察されなかった(図7)。この観察から、Notch シグナル伝達系の活性化によって誘導される *Hesr* 因子が、FGF によって誘導される *Dusp4* を抑制する。さらに VEGF シグナルを受けて活性化される Erk1/2 のリン酸化状態を *Dusp4* が制御する。その結果、Notch シグナル伝達系が Erk1/2 の活性化を制御し、血管のリモデリング過程や動脈分化に関与しているのではないかと予想している(図8)。我々は、さらにこの解析を推し進めることによって、血管のリモデリング過程を司る分子機構を明らかにしたいと考えている。

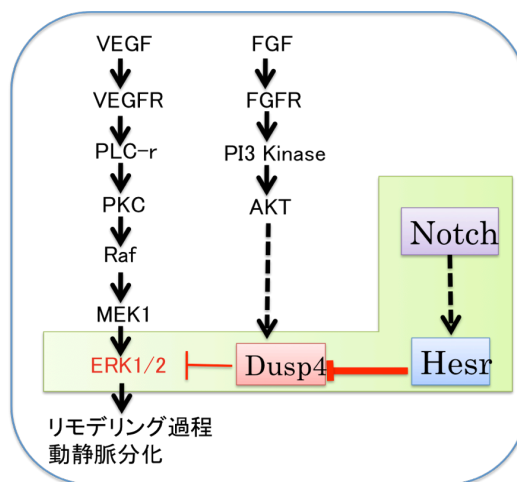


図8: 血管リモデリング過程における概念図

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

① Hayashi T, Kokubo H, Hartman BH, Ray CA, Reh TA, Bermingham-McDonogh O, Hesr1 and Hesr2 may act as early effectors of Notch signaling in the developing cochlea. (2008) *Developmental Biology* 316 87-99 査読有り

② 小久保博樹 心房と心室の境界はどのように作られるのか(2008) *Medical Bio* 5月号 16-17 査読無し

[学会発表] (計 6 件)

① 小久保博樹、富田一宮川幸子、中畠八隅、中西敏雄、相賀裕美子 “*Hesr2* disrupted mice develop stenosis and regurgitation as a result of sclerotic degeneration of the aortic valve with advancing age” 分子生物学会 2008年12月10日 神戸

② 小久保博樹、富田一宮川幸子、中畠八隅、中西敏雄、相賀裕美子 “*Hesr2* 遺伝子欠損マウスは大動脈弁石灰化を引き起こす” 心筋生

研究会 2008年11月28日 三重

③ 小久保博樹、富田一宮川幸子、中畠八隅、中西敏雄、相賀裕美子 “*Hesr2* 遺伝子欠損マウスは大動脈弁石灰化を引き起こす” 心臓血管発生研究会 2008年7月5日 福島

④ 小久保博樹、富田一宮川幸子、中畠八隅、中西敏雄、相賀裕美子 “*Hesr2* 遺伝子欠損マウスは大動脈弁石灰化を引き起こす” 日本小児循環器学会 2008年7月3日 福島

⑤ 小久保博樹、富田一宮川幸子、中畠八隅、中西敏雄、相賀裕美子 “*Hesr2* disrupted mice develop dysfunction of semilunar valve with the age” 日本循環器学会 2008年3月28日 福岡

⑥ 小久保博樹、富田一宮川幸子、相賀裕美子 “心房と心室の境界領域形成における *Hesr* の役割” 日本分子生物学会 2007年12月6日 横浜

〔図書〕(計 2 件)

① 小久保博樹 ノックアウトマウスを製作しよう(2008) *Medical Bio* 5月号 82-88

② マウス実験の基礎知識 小出剛編 オーム社 (2009) pp155-166

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小久保 博樹 (KOKUBO HIROKI)

国立遺伝学研究所 系統生物研究センター
助教 研究者番号: 10270480