

平成20年 5月15日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790519
 研究課題名（和文） 血管病における細胞分化・形質変換を制御する転写調節機構の解析
 研究課題名（英文） Analysis of the transcriptional control mechanism which regulates cell differentiation and phenotype alteration in vascular disease
 研究代表者
 西村 剛（NISHIMURA GO）
 東京大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：20422305

研究成果の概要：転写因子 SIP1 はヒトにおける遺伝子欠損で先天性心疾患を起こすことが報告されている。この SIP1 の発現欠損をマウスの心臓・動脈系に起こすと大動脈弁・肺動脈弁の形成異常が起こり大動脈弁狭窄の状態となることを発見した。この形成異常は心臓の形成段階で起こる弁間質細胞のアポトーシスの異常とコラーゲン産生異常によると考えられる結果を得た。弁の形成異常を来すモデル動物は少なく、先天性心疾患・弁膜症の発症機序解明の糸口を得たと考えている。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	0	1,500,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	480,000	3,580,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：転写因子 EF1, 転写因子 SIP1, TGF β , 大動脈弁, 肺動脈弁

1. 研究開始当初の背景

血管平滑筋細胞は血管の発生分化と動脈硬化などの血管病発症において、外部からの刺激に応じて劇的な形質変換を起こし、重要な役割を果たすが、この外部からの刺激と形質変換をつなぐ分子機構は不明な点が殆どである。我々は転写因子 EF1 が TGF β の刺激を受けて平滑筋形質変換に重要な役割を果たすことを以前の研究で明らかにした。また、この EF1 には近縁転写因子 SIP1 が存在し、同様に血管平滑筋細胞に発現することを我々が確認した。この SIP1 はヒトにおける遺伝子欠損で心臓流出路に異常をもつ先天

性心疾患を高率に発症することが報告されている。大動脈弁・肺動脈弁は大動脈基部の平滑筋細胞と同様に神経堤細胞から由来した細胞と内皮由来の細胞から構成される。

2. 研究の目的

EF1 および近縁の転写因子である SIP1 の機能を解析することにより、血管病態や血管及び心臓形成の過程で、平滑筋細胞などの神経堤由来細胞がどのように外部環境からの情報を受容し、いかにして環境に応じた遺伝子発現・形質の調整を行っているかを明らかとし、さらに血管病などの疾患に対する新た

な治療手段開発の可能性を探ることを目的とする。

3. 研究の方法

EF1 ノックアウトマウスと SIP1 ノックアウトマウスを用い両転写因子の心・血管病変における *in vivo* 機能を解析する。遺伝子のノックアウトを行う際に、平滑筋特異的、心筋細胞特異的あるいは血管内皮細胞特異的にノックアウトの生じるマウスを作成し、EF1 と SIP1 のノックアウトによる心血管系の発形態態・遺伝子発現変化を観察し、心血管系の発生分化における EF1 並びに SIP1 の機能解析と、細胞種特異的な SIP1 の機能解析を行う。この動物モデルから得た結果を基に、培養細胞において SIP1 の発現誘導を行うサイトカインなどの外的因子を探す。SIP1 の強制発現あるいは発現抑制を行い、標的遺伝子の探索を行う。その標的遺伝子への作用において、相互作用因子の存在など遺伝子調節機構を、蛋白相互作用等の調査から、*in vitro* で解明し、心血管系の発生・分化を調節する転写機構を解明していく。

4. 研究成果

SIP1 および EF1 マウスの観察を多く行った中で、SIP1 が血管平滑筋でノックアウトされるマウスに出生時半分程度が死亡することと、その平滑筋 SIP1 ノックアウトマウスは出生時に色が白い外見をしており血行障害を示唆すると考えられた。

対照マウス

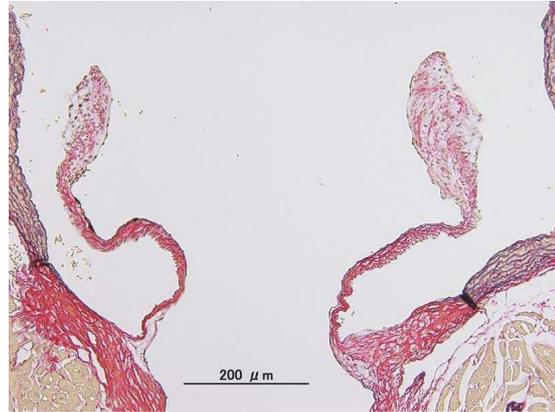


平滑筋 SIP1 ノックアウトマウス

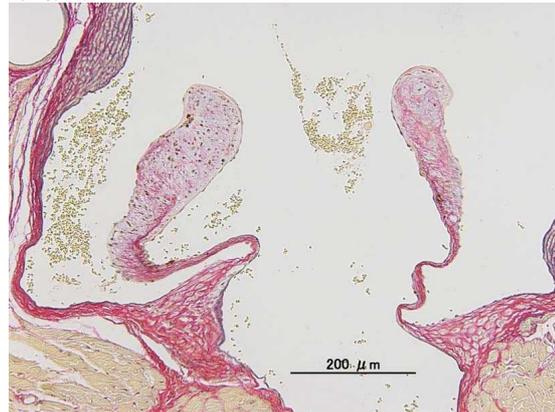


その心臓を観察すると、大動脈弁・肺動脈弁の肥厚が見られ、成長した個体においても、大動脈弁の弁尖肥厚が見られた。

(成長個体 大動脈弁
エラスティカファンギーソン染色)
対照マウス

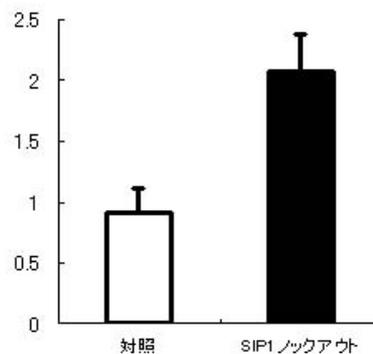


平滑筋 SIP1 ノックアウトマウス



成長した個体において心臓超音波検査で血行動態を評価したところ、血管平滑筋細胞 SIP1 ノックアウトマウスでは、左室から駆出される血液の血流速度が上昇しており、肥厚した大動脈弁が血行動態に影響を与えていることが示された。

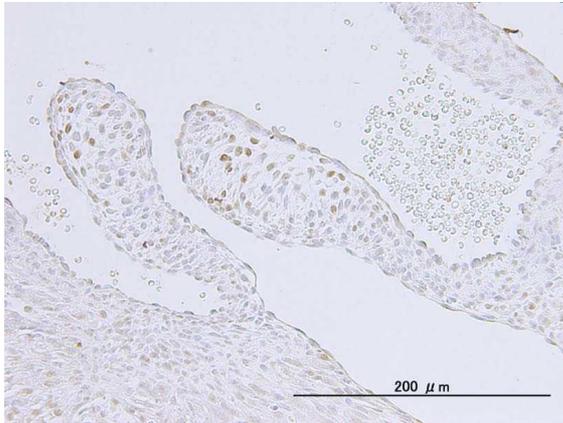
大動脈弁位流速(m/sec)



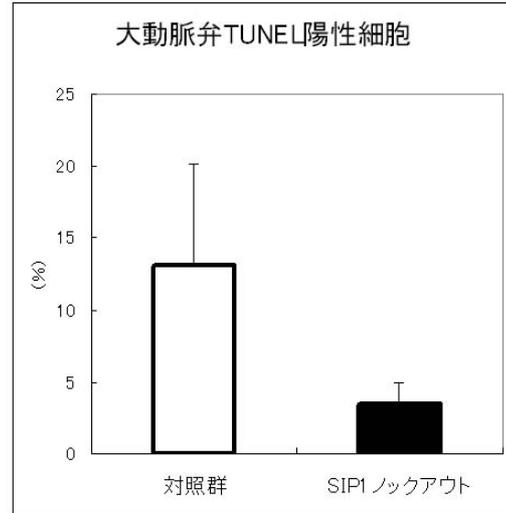
大動脈弁および肺動脈弁を構成する間質細胞は、大動脈基部の平滑筋細胞同様神経堤から由来した細胞と、血管内皮細胞が Epithelial Mesenchymal transition を起こした細胞から構成されることが知られている。EF1 同様 SIP1 も血管平滑筋細胞における発現がみられ、また、新生仔マウスの大動脈弁免疫染色で SIP1 が大動脈弁・肺動脈弁間質細胞に発現していることが観察された。

弁肥厚の機序を調べるため新生仔マウスの大動脈弁標本でアポトーシスを検出する TUNEL 染色を行った（アポトーシスを起こしている細胞は褐色に着色する）。

（新生仔マウス 大動脈弁 TUNEL 染色）
対照マウス



平滑筋 SIP1 ノックアウトマウス



平滑筋 SIP1 ノックアウトマウスの大動脈弁には、アポトーシスを示す細胞が少ないことが示された。

対して、細胞増殖の指標となる Ki67 染色では対照マウスと SIP1 ノックアウトマウスに差はなかった。

また成長した個体において、前項の写真のエラスティカファンギーソン染色では、膠原線維が赤く染められるが、SIP1 ノックアウトマウスでは、この膠原線維の減少が見られる。

SIP1 のノックアウトマウスでは弁を構成する間質細胞のアポトーシスが抑制されること、コラーゲンの産生が抑制されることから大動脈弁の機能障害が生じていることが考えられる。

弁の形成異常についてノックアウトマウスで調べた報告はごく少数であり、さらに、弁形成異常の明確な機序を記述した報告は見られない。

SIP1 のヒトホモログ ZEB2 の遺伝子異常では、高率に先天性心奇形が生じることが報告されているが、ファロー四徴症などの先天性心奇形の症例の一部に大動脈弁の先天性弁尖肥厚が見られるとする報告もある。

本研究の成果はヒトにも生じる弁形成異常をみていると考えられ、その発症機序を解明する糸口を見ている点が傑出している点と考えられる。

今後の展望として、培養細胞において SIP1 がアポトーシスの抑制、コラーゲン産生の制御を行う様式を、その作用の誘因となるサイトカインなどの外部因子の探索から始め、アポトーシスあるいはコラーゲン産生制御を行う際の標的遺伝

子、その制御を行う際に補因子が存在するかといった制御機序を調べ、弁形成異常を生じる分子機構を解明する。

併せて、ヒトにおける病態形成について、先天性心疾患症例における SIP1/ZEB2 遺伝子異常の検査などから考察を進め、また加齢者の弁膜症においても、SIP1 の発現制御から介入の糸口がないか考察する。

平滑筋細胞における SIP1 ノックアウトのほか、血管内皮細胞特異的 SIP1 ノックアウトマウスを現在作成中であり、弁形成の異常が生じるか、あるいはその他の先天性心奇形が生じるか観察し、SIP1 の作用を調べるとともに、心臓発生・形成が制御される機序を考察していく。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

西村 剛、Smad Interacting Protein 1 controls arterial valve development、第 73 回日本循環器学会学術集会、2009 年 3 月 22 日、大阪国際会議場

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究代表者

西村 剛 (NISHIMURA GO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20422305

(2)研究分担者

(3)連携研究者