

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590273

研究課題名（和文） 血管新生に於ける新規遺伝子群の機能解明

研究課題名（英文） Elucidation of functional roles of new genes in angiogenesis

研究代表者

依馬 正次 (EMA MASATSUGU)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・講師

研究者番号：60359578

研究成果の概要（和文）：

血管系は、がん治療、虚血性疾患、さらには糖尿病の合併症においても最も重要な治療ターゲットの一つであり、血管の新生と抑制のバランスの分子基盤を理解することは、学問的に価値あるばかりでなく、それらの疾患に対する新たな分子薬剤の創出に繋がるものであり、医学的にも産業的にも大変価値が高いと考えられる。そこで、胚発生時および腫瘍血管新生に於ける PLVAP と SH2 関連遺伝子の遺伝子の解明することで、再生医学や癌治療に対する新たな手法を見いだせるものと考え、(1) 胚発生時における PLVAP と SH2 関連遺伝子の役割、(2) 培養血管内皮細胞における PLVAP と SH2 関連遺伝子の役割、(3) 腫瘍血管新生における PLVAP と SH2 関連遺伝子の役割を明らかにする事を目的とした研究を行った。(1) PLVAP と SH2 関連遺伝子のターゲティングベクターの作製を完了し、遺伝子改変 ES 細胞を樹立するためにスクリーニングを行ったが、相同組換え体は得られなかった。(2) PLVAP と SH2 関連遺伝子のノックダウンベクターを作製し、HUVEC(Human umbilical vein endothelial cell)での管腔形成実験を行ったところ、VEGF 依存的な管腔形成能に著明な減少を認めた。(3) 動物個体を用いた腫瘍血管新生のモデル実験であるマトリゲルプラグアッセイの条件検討を終了した。また、PLVAP と SH2 関連遺伝子について、ヒト神経膠腫、アストロサイトーマでの発現を検討し、ともに高発現していることを同定した。

研究成果の概要（英文）：

Blood vessels are therapeutic targets for cancer, ischemic diseases and diabetes-related diseases. Therefore, understanding the process of angiogenesis is important for not only intellectual but potentially development of medicine for such diseases. We identified that PLVAP and a novel SH2-related genes as endothelial-specific genes in a previous studies. So, we thought that elucidation of the molecular functions of PLVAP and SH2-related genes during embryogenesis and tumor angiogenesis leads us development of new therapeutic methods for cancer and regenerative medicine. Goals of this study are (1) understanding of the physiological functions of PLVAP and the SH2-related gene during mouse development, (2) understanding of the physiological functions of PLVAP and the SH2-related gene during tube formation in vitro using HUVEC (human umbilical vein endothelial cells), (3) understanding of the physiological functions of PLVAP and the SH2-related gene during tumor angiogenesis. Although the targeting vectors for PLVAP and the SH2-related gene were constructed and electroporated into ES cells, no homologous recombinant was obtained. In order to investigate the physiological functions of PLVAP and the SH2-related gene, knock-down oligonucleotides were introduced into HUVEC. The tube formation was visualized by iolectinB4-FITC staining and evaluated by a software analysis. The knock-down of PLVAP and SH-related gene clearly

showed that they are important for the network formation of endothelial cells. When mRNA expressions were investigated in human glioblastomas and astrocytomas, glioblastomas expressed human homologs of PLVAP and the SH2-related gene, indicating that they are expressed abundantly in tumor endothelial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：発生学、再生医学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：循環器、転写因子、発生、再生

1. 研究開始当初の背景

現在、高齢化の進む日本での死因の第1位は癌である。癌の治療法として、癌を栄養する血管系を標的とした腫瘍血管抑制法が有効な治療法として注目を集め、腫瘍血管を標的とする最初の分子薬剤であるベバシツマブ（組換え型抗 VEGF 抗体）が、大腸癌に対する治療薬として我が国に於いても臨床使用が開始された。また、日本人の死因の2位は心臓疾患、3位は脳虚血性疾患であるが、その治療には、虚血部位での速やかな血管系の新生や再構築を誘導する方法が求められている。さらに、糖尿病性網膜症においては、新生血管系を退縮させることが治療法となるのに対して、糖尿病性下肢大動脈閉塞症においては、虚血部位における新たな血管新生が求められる。これらの疾患の治療法に共通して見られるのは、如何にして血管新生を促進または抑制するかという点である。このように血管系は、がん治療、虚血性疾患、さらには糖尿病の合併症においても最も重要な治療ターゲットの一つであり、血管の新生と抑制のバランスの分子基盤を理解することは、学問的に価値あるばかりでなく、それらの疾患に対する新たな分子薬剤の創出に繋がるものであり、医学的にも産業的にも大変価値が高いと考えられる。このように個体において血管の新生と抑制のバランスの分子

基盤を理解することは、学問的に価値あるばかりでなく、それらの疾患に対する新たな分子薬剤の創出に繋がるものであり、医学的にも産業的にも大変価値が高いと考えられる。そこで、胚発生時および腫瘍血管新生に於ける PLVAP と SH2 関連遺伝子の遺伝子の解明することで、再生医学や癌治療に対する新たな手法を見いだせるものと考えた。

2. 研究の目的

申請者らは、既に4カ年計画で胚発生時の血管内皮細胞に豊富に発現している24遺伝子を同定している(H18年度終了課題)。それらの中には VEGF シグナル系の下流に存在する可能性が示唆される遺伝子が2つ存在していた。PLVAP (plasmalemmal vesicle associated protein) と呼ばれる遺伝子は、血管内皮細胞の有窓構造の隔膜に存在するタンパク質で、VEGF によって mRNA が誘導される事が先行研究により報告されている (Strickland, 2005, J. Pathol)。一方、新規の SH2 ドメインタンパク質は、SHB と呼ばれるシグナル伝達因子と一次構造上類似性を示すが、SHB は Flk1 の細胞質側に存在するキナーゼドメインと相互作用するアダプター因子として機能する事が報告されており (Holmquist, J. B. C, 2004)、我々が単離した SH2 タンパク質もまた、Flk1 のアダプタ

一因子として機能している事が推測される。そこでそれら 2 遺伝子について、VEGF シグナル伝達系の下流で作用しているかどうか試験管内アッセイ系により検討するとともに、ホモマウスの表現型解析を通して血管新生過程で役割を果たすのかどうか明らかにすることが目的である。具体的には、ヘテロマウス同士の交配により、ホモマウスを作製する。胚致死となる場合は、ホモ胚が認められる発生ステージまで遡り、その表現型を詳細に明らかにする。また、2 遺伝子に対するアデノウイルス siRNA ノックダウンベクターを作製し、成獣マウスにおける血管新生に役割を果たすかどうか明らかにする。具体的には、マウスの皮下に VEGF などの血管内皮増殖・透過性因子を含んだマトリゲルを注入し、ゲル中に新生する血管内皮細胞を評価することで腫瘍血管新生能を定量化するアッセイを用いる。このマトリゲル中に PLVAP と SH2 関連遺伝子に対する siRNA ノックダウンウイルスを導入し、腫瘍血管新生能を定量化する。このような手法を用いて、抗腫瘍血管新生活性を有する新規の分子薬剤の創出を目標とするものである。(1) 胚発生時における PLVAP と SH2 関連遺伝子の役割、(2) 培養血管内皮細胞における PLVAP と SH2 関連遺伝子の役割、(3) 腫瘍血管新生における PLVAP と SH2 関連遺伝子の役割を明らかにする事を目的とした研究を行う。

3. 研究の方法

(1) PLVAP と SH2 関連遺伝子のマウスゲノム領域を単離し、ポジティブセレクションマーカー、ネガティブセレクションマーカーを含むターゲティングベクターの構築を行った。その後、E14 ES 細胞へエレクトロポレーションし、相同組み換え体を PCR にてスクリーニングした (2) HUVEC (Human umbilical vein endothelial cell) での管腔形成実験の条件検討を行い、VEGF 依存的な管腔形成能を評価する系を樹立した。PLVAP と SH 関連遺伝子に関する siRNA をトランスフェクションし、管腔形成能を評価した。(3) 動物個体を用いた腫瘍血管新生のモデル実験であるマトリゲルプラグアッセイの条件検討を終了した。ヒト神経膠腫、アストロサイトーマでの発現を

半定量 PCR 法で評価した。

4. 研究成果

(1) PLVAP と SH2 関連遺伝子のターゲティングベクターの作製を完了し、遺伝子改変 ES 細胞の樹立を試みたが、相同組換え体は得られなかった。(2) PLVAP と SH2 関連遺伝子のノックダウンベクターを作製し、HUVEC (Human umbilical vein endothelial cell) での管腔形成実験の条件を検討したところ、管腔形成能に重要な役割を果たすことを明らかにした。(3) PLVAP と SH2 関連遺伝子がともに、ヒト神経膠腫、アストロサイトーマにおいて高度に発現している事を見出した。

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)

[学会発表] (計 3 件)

1. 松本健、石飛博之、浅見拓哉、伊東史子、伊東進、田中順子、三輪佳宏、高橋智、依馬正次、血管内皮細胞を可視化するための Flk1-GFP および Flt1-DsRed BAC トランスジェニックマウスの作製、第 3 3 回日本分子生物学会年会、神戸、2010 年 12 月 7 日～10 日
2. 松本健、高瀬春香、鈴木留美子、山寺里枝、大津彩香、石飛博之、小島崇宏、内田和彦、高橋智、依馬正次、新規血管内皮細胞特異的遺伝子群の網羅的探索、第 3 2 回日本分子生物学会年会、横浜、2009 年 12 月 9 日～12 日
3. 鈴木留美子、山寺里枝、石飛博之、高橋智、依馬正次、新規血管内皮細胞特異的遺伝子群の網羅的探索、第 3 1 回日本分子生物学会年会・第 8 1 回日本生化学会大会合同大会、神戸、2008 年 12 月 8 日～12 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

依馬 正次 (EMA MASATSUGU)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
講師
研究者番号：60359578

(2) 研究分担者

高橋 智 (TAKAHASHI SATORU)
筑波大学・大学院人間総合科学研究科・
教授
研究者番号：50271896