

機関番号：24601

研究種目：若手研究 B

研究期間：平成 21 年度～平成 22 年度

課題番号：21790742

研究課題名（和文） 血管系における新しい転写調節の分子機序と病的意義の解明

研究課題名（英文） Significance of transcriptional regulation in postnatal angiogenesis

研究代表者

林 寿来 (HISAKI HAYASHI)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30533715

研究成果の概要（和文）：

心筋梗塞、脳梗塞、癌は先進国における死因の上位を占めるが、いずれも病態の進展や代償過程において、血管新生が深く関与することが知られている。そのため、血管新生とその分子基盤であるシグナル伝達機構を研究することは非常に重要である。Hairy-Related Transcription Factor は、Notch シグナルの下流に位置する転写因子である。これまで、ノックアウトマウスの解析から、個体発生において血管内皮細胞の Hrt 機能が必須であることが明らかになった。一方、様々な成人疾患における血管新生の病的意義が注目されていることから、成体における Hrt の機能解明は重要であると考えられる。本研究では、Hrt1KO マウスを用いて下肢大腿動脈結紮モデルを作製し、虚血が誘導する血管新生に基づく血流回復を解析した。対照の野生型マウスに比べて Hrt1KO では、有為に血流回復が減弱していることが判明した。以上のことから、Hrt1 は血管新生に必要な機能を有していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Cerebral and myocardial infarction and cancer are leading causes of mortality in developed countries, and therefore it is of clinical importance to study the mechanisms of pathological angiogenesis, especially the signaling pathways regulating vascular formation, in those diseases. Hairy-related transcription factor 1 (Hrt1) and Hrt2 are basic helix-loop-helix proteins enriched in the cardiovascular system, and their expression is directly up-regulated by the Notch signaling activation. So far, importance of Hrt molecules in developmental angiogenesis was reported, however, their significance in postnatal physiology, especially in angiogenesis, remained unclear. In this study, we demonstrated that Hrt1 mRNA expression was significantly induced upon hindlimb ischemia by the femoral artery occlusion. Interestingly, blood flow recovery after the surgery was markedly attenuated in Hrt1 KO mice, suggesting that Hrt1 is involved in postnatal angiogenesis. The roles of Hrt2 and molecular mechanisms of their function in postnatal angiogenesis are currently under extensive investigation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
平成 22 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野： 内科系臨床医学

科研費の分科・細目：循環器内科学

キーワード：血管新生 転写因子 シグナル伝達 虚血

1. 研究開始当初の背景

個体発生における正常な臓器形成において血管発生（血管内皮前駆細胞が内皮細胞に分化する新しい血管形成）と同様に、血管新生（成熟した脈管からの内皮細胞増殖などによる新しい血管形成）が必須である。Hairy-Related Transcription Factor (Hrt) -1およびHrt2は、Notchシグナルの下流に位置する転写因子であり発生期の心血管系（心筋・血管平滑筋・血管内皮細胞）で発現している。Hrt1、Hrt2それぞれ単独のKOでは血管系の異常を示さないが、Hrt1/Hrt2ダブルKOマウスは血管形成異常を示す。Hrt1KO/Hrt2血管内皮特異的KOマウスも、同様の表現系を示して胎生致死であることから、個体発生において血管内皮細胞のHrtの分子機能は必須である事が証明された。一方、成人における腫瘍や網膜症といった疾患に対して血管新生は明らかな増悪因子あり、逆に閉塞性動脈硬化症や心筋梗塞症に対して血管新生の誘導は治療に用いられている。この様に個体発生とヒト病態の両方において血管新生が重要な役割を果たしており、血管新生に共通のシグナル伝達系が働いていると考えられる。しかし成体での血管新生における内皮細胞機能調節に対するHrtの意義は不明であり、検討する事は非常に重要である。

2. 研究の目的

心血管系組織におけるNotchシグナルは、Hrt1とHrt2の活性化を通じて下流遺伝子の発現パターンを変化させる。これまで、Hrt1/Hrt2遺伝子変異マウスの解析から、個体発生において血管内皮細胞のHrt1/Hrt2機能が必須であることが明らかになった。一方、様々な成人疾患における血管新生の病的意義が注目されていることから、成体におけるHrtの機能解析は重要であると考えられるが、Hrt1/Hrt2ダブルKOマウスは胎生致死性であることからこれまで解析は行われていない。そこで本研究では下肢動脈結紮モデルを用いて、Hrt分子が成体において血管新生にどのように関与するのかを解明することを目的にした。

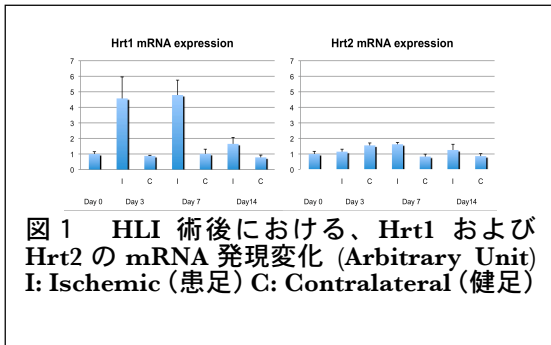
3. 研究の方法

(1) 虚血によって誘導される低酸素条件下において血管新生が誘導される事はよく知られている。また Notch シグナルは低酸素条件下で活性化すること報告されている。したがって、病的血管新生における Hrt の機能を解析するためには下肢大腿動脈結紮による虚血モデルが最適である。しかし、今回用いる実験モデルにおいて Hrt が活性化されているのかはこれまで明らかでない。そこでまず野生型マウスを用いて下肢大腿動脈結紮を行い、虚血モデルを作製し、新生血管における mRNA 発現の変化を調べた。

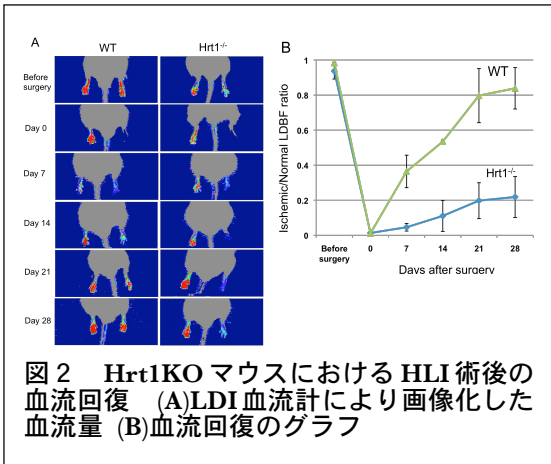
(2) Hrt1KO マウスは異常を示さない。また Hrt 2 KO マウスでは出生後に致死性であるものの、血管の形成においては正常である。ところが Hrt1 と Hrt2 は血管系において相補的な関係にあり、Hrt1/Hrt2 ダブル KO マウスは血管形成に異常を示し胎生致死であることから、成体における解析は出来ない。そこで、本来は成長後に Hrt2 欠損が誘導されるコンディショナル KO マウス (ER-Cre⁺;Hrt1^{-/-};Hrt2^{loxP/+}) を作製して解析する予定であった。しかし、後述するように、この遺伝型マウスの作成に必要な中間産物である Hrt1^{-/-};Hrt2^{+/+} マウスは出生することなく無く全て死に至り、現実的に解析することが不可能であったため、次善の策として Hrt1KO マウスの解析を行った。

4. 研究成果

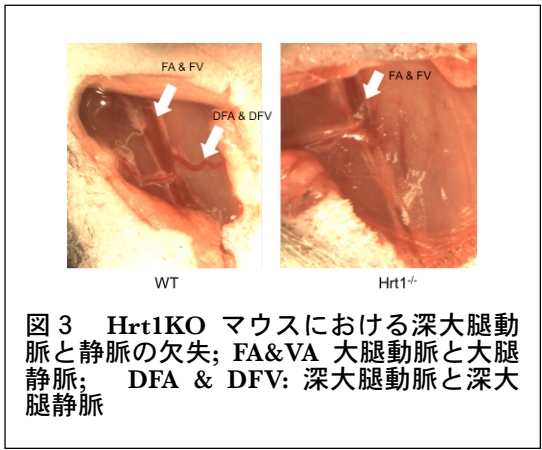
(1) C57BL6/N 野生型マウスに対して、下肢大腿動脈結紮の手術を行い、Hrt1 および Hrt2 の発現変化を Realtime PCR によって定量を行った。その結果、術後3日目から7日目にかけて、Hrt1 の発現誘導が見られた。一方 Hrt 2 の発現誘導においては、発現の誘導が非常に小さかった(次頁図1)。



(2) (1) の結果に基づいて、Hrt ファミリーの中でも Hrt1 に着目した。Hrt1KO マウスを用いて、下肢虚血モデルの作成を行い、Laser Doppler 血流計を用いて、血流回復をモニタリングした。対照である野生型マウス(WT)では、術後14日で50パーセント、21日で80パーセントの血流の回復が見られるものの、同腹子の Hrt1KO マウスにおいては、驚くべきことに14日後、21日後にそれぞれ10パーセント、20パーセント程度の回復しか見られなかった(図2)。以上のことから、Hrt1 は下肢虚血によって発現が誘導され、かつ組織回復・血管新生に必要な分子であることが明らかになった。



(3) これまで Hrt1KO マウスは、明らかな表現型を示さないことが報告されているが、共同研究者から分与された系統の一部の雌の Hrt1KO マウスにおいて、大腿動脈から分岐する深大腿動脈が欠損している個体の存在が確認された(図3)。同様にこれまでの報告に反して、遺伝的バックグラウンドによって、特に outbreed 型の遺伝背景の Hrt1KO マウスの場合、Mendelian ratios を大幅に下回る確率でしか KO を得ることが出来なかった。



(4) Hrt1KO マウスにおいて術後の血流回復が減弱した(図2)現象は、血管新生等の血管内皮の機能が影響を受けた可能性が考えられた。そのため、試験的に Tek2-GFP マウス(血管内皮においてのみ GFP を発現するトランスジェニックマウス)から血管内皮細胞の分離を行った。蛍光顕微鏡下で、概算80パーセントの細胞が GFP を発していた。また、Matrigel 上で Tube formation assay を行い、管腔形成を In vitro で再現することに成功した。以上のことから、今後 Hrt1KO マウスから内皮細胞を分離して、管腔形成を定量化することが可能になった。

(5) 組織の炎症反応等によって浸潤してくる血球系細胞が、血管新生を誘導する因子を分泌することがよく知られている。これまでのところ、血球系細胞での Hrt 発現は報告されていないものの、Hrt が欠損したために分泌される増殖因子等の血管新生誘導因子が影響を受けている可能性が否定出来ない。このことから、白血球マーカーである CD45 抗体を用いて、蛍光免疫染色を試み成功した。そのため、今後 Hrt1KO マウスの術後における CD45 陽性細胞の発現を解析、定量化して Hrt1 欠損における白血球の浸潤の影響を解析することが可能となった。

5. 主な発表論文等
(学会発表)

Hisaki Hayashi, Significance of Hrt family of transcription factors in postnatal angiogenesis, ISTH 2011 - XXIII Congress of the international society on haemeostasis 57th annual meeting, July25,

2011, Kyoto

6. 研究組織

(1)研究代表者

林 寿来 (HISAKI HAYASHI)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30533715