

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月24日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590173

研究課題名（和文） 胎生期浮腫を示す内皮細胞遺伝子変異マウスの病態と分子機構

研究課題名（英文） Pathology and molecular mechanism of embryonic edema in mice carrying endothelial gene mutations

研究代表者

平島 正則（HIRASHIMA MASANORI）

神戸大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：40383757

研究成果の概要（和文）：胎生期に一過性の浮腫をきたす *Asppl*^{-/-}マウスと *Flt1*^{+/-}マウスの血管透過性、血管・リンパ・心臓形成について解析した。*Asppl*^{-/-}マウスではリンパ管形成異常が認められ、*Flt1*^{+/-}マウスでは *Flk1* リン酸化の上昇を伴う血管透過性亢進が認められた。透過電子顕微鏡解析で *Flt1*^{+/-}マウス胎仔において細胞膜の嵌入がみられ、内皮細胞内輸送経路が亢進していることが強く示唆された。また、*Asppl*^{-/-};*Flt1*^{+/-}マウスでは両方の異常を伴って胎生致死となることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：We analyzed vascular permeability and development of the heart, blood vessels, and lymphatic vessels in *Asppl*^{-/-} and *Flt1*^{+/-} mice showing embryonic edema. Lymphatic vascular development is defective in *Asppl*^{-/-} embryos, whereas vascular permeability is enhanced in *Flt1*^{+/-} embryos with enhancement of *Flk1* phosphorylation. Transmission electron microscopic analysis reveals an intricate luminal surface and huge vesicle-like structures in *Flt1*^{+/-} capillary endothelial cells, suggesting a promoted transcellular transport. Our analysis also shows that defective lymphatic vessels and enhanced vascular permeability cause embryonic lethality of *Asppl*^{-/-};*Flt1*^{+/-} mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般（含組織学・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

血管系は血液を循環させて末梢組織への酸素・栄養分の運搬や老廃物の交換を促進し、動物の恒常性維持に重要な役割を果たしている。微小血管から組織間質に漏出した体液の10～15%は、末梢組織で盲端から始まるリンパ管によって再吸収されて血管系に戻さ

れる。つまり、体液の分布は血管壁の透過性とリンパ管再吸収（ドレナージ）のバランスによって制御されており、制御機構が崩れると組織間液量が異常に増大して浮腫（むくみ）を生じることが知られている。体液制御は胎生期から重要であり、心奇形やリンパ管形成・機能異常などを示す遺伝子変異マウス

では妊娠中期に浮腫が認められる。

我々は、Aspp1 が胎生期に内皮細胞特異的に発現すること、並びにAspp1 ノックアウト (Aspp1^{-/-}) マウスが胎生期リンパ管形成の異常でドレナージ機能が低下し胎生期浮腫を示すことを、世界で初めて報告した。Aspp1^{-/-}マウスでは、心臓形成は正常でドレナージ機能をもつリンパ管が徐々に形成される。そのため、胎生期にみられる浮腫は一過性で、成体まで正常に発育することが分かっていた。

また、Flt1 (別号 VEGFR1) のヘテロ変異 (Flt1^{+/-}) マウスが、Aspp1^{-/-}マウスと同様に、一過性の胎生期浮腫を示すことを見出した。Flt1 はチロシンキナーゼ型受容体であり、リガンドは血管内皮細胞増殖因子かつ血管透過性亢進因子として知られる VEGF-A (Vascular Endothelial Growth Factor) である。内皮細胞において、Flk1 (別号 VEGFR2) が主要なシグナル受容体であるのに対して、Flt1 は細胞外ドメインで VEGF-A と結合してその局所濃度を調節するデコイ受容体であると言われている。したがって、Flt1^{+/-}マウスにおいては、VEGF-A/Flk1 シグナルの過剰な活性化が予想され、実際、成体 Flt1^{+/-}マウスにおいて血管透過性が亢進している知見を得ていた。

2. 研究の目的

我々はこれまでに、Aspp1^{-/-}マウスと Flt1^{+/-}マウスが胎生期に一過性の浮腫をきたしながら、成体まで正常に発育することを見出した。本研究では、これらの「予後の良い」胎生期浮腫を示す内皮細胞遺伝子変異マウスの病態と分子機構の解明を目的とした。また、Aspp1^{-/-};Flt1^{+/-}ダブル変異マウス胎仔の大部分が致死となることから、Aspp1 と Flt1 の変異が協調して生じる致死的な異常を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

以下に述べる方法で、Aspp1^{-/-}マウスおよび Flt1^{+/-}マウスにおける血管透過性、血管・リンパ管形成、心臓形成について解析した。

(1) マウス胎仔の血管透過性を評価する系の確立と、Flt1^{+/-}マウス胎仔および Aspp1^{-/-}マウス胎仔の解析

マウス胎仔の血管内に Hoechst33258 を注入後、血管から漏れ出した場合に周辺組織の細胞核が染色されることを利用して、染色範囲を定量することで血管透過性を評価する系を確立した。これを用いて、Aspp1^{-/-}マウス胎仔および Flt1^{+/-}マウス胎仔を解析した。

(2) Flt1^{+/-}マウス胎仔および Aspp1^{-/-}マウス胎仔の血管・リンパ管形成についての解析
血管・リンパ管形成の組織学的解析として、ピプラトーム (数 100 μ m 厚) 切片や胎仔皮膚のフラットマウント標本などを作製し、血管内皮細胞・リンパ管内皮細胞・血管周囲細胞 (平滑筋細胞および周皮細胞) のマーカーに対する抗体を用いて染色後、共焦点レーザー顕微鏡で解析した。

リンパ管ドレナージ機能を解析するために、胎仔の皮下に蛍光標識高分子デキストランを注入するリンパ管造影法を行った。

(3) Flt1^{+/-}マウス胎仔の心臓形成についての解析

心臓弁の形態をマクロで把握するために、心房を切除して露出する大動脈弁・肺動脈弁および2つの房室弁を観察した。また、パラフィン包埋連続切片標本を作製し、心臓の組織学的解析を行った。

(4) Flt1 シグナル欠損 (Flt1^{-tk}) マウス胎仔の解析

Flt1^{-tk} マウスは、Flt1 の細胞内領域のみを欠損する遺伝子改変マウスである。Flt1 シグナルを欠損しているにもかかわらず、正常に発生することが報告されている。Flt1 シグナルの減弱あるいは VEGF-A/Flk1 シグナルの増強のいずれかで浮腫が生じるか明らかにするために、Flt1^{-tk} マウス胎仔が胎生期に浮腫を示すかどうか解析した。

(5) Aspp1^{-/-};Flt1^{+/-}ダブル変異マウス胎仔の血管・リンパ管形成、心臓形成についての解析

Aspp1 変異マウスと Flt1 変異マウスを交配して Aspp1^{-/-};Flt1^{+/-}ダブル変異マウスを作製し、上記項目の解析を行った。

(6) 生化学的・細胞生物学的解析 (Aspp1 と VEGF-A/Flk1 シグナルの相互作用)

野生型、Aspp1^{-/-}、Flt1^{+/-}、および Aspp1^{-/-};Flt1^{+/-}ダブル変異マウスから胎仔組織を採取した後に、組織ライセートを調整し、Flk1 や血管透過性に影響する VE-カドヘリン、Src, eNOS 等のリン酸化状態を生化学的に解析した。

(7) Flt1^{+/-}マウス胎仔の毛細血管についての透過電子顕微鏡解析

透過性亢進がみられた領域の胎仔皮膚毛細血管に注目して透過電子顕微鏡解析を行った。

4. 研究成果

(1) マウス胎仔の血管透過性を評価する系の確立と、Flt1+/-マウス胎仔およびAspp1-/-マウス胎仔の解析

マウス胎仔における血管透過性を評価する上記解析系を確立し、Aspp1-/-マウスおよびFlt1+/-マウス胎仔の血管透過性について解析した。前者ではコントロール群と同等であったが、後者では亢進していることが明らかになった (図1)。

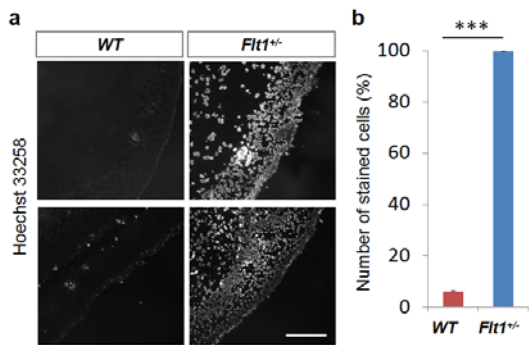


図1. Flt1+/-マウスでは血管透過性が亢進している

(a) Flt1+/-マウスはWTマウスに比べてHoechst 33258の漏れ出しが増加し、血管周囲組織まで染色が及んでいる。スケールバーは200 μm。 (b) 血管の周囲20,000 μm²の範囲で染色された細胞の割合。***, p<0.001

(2) Flt1+/-マウス胎仔およびAspp1-/-マウス胎仔の血管・リンパ管形成についての解析
血管・リンパ管形成の組織学的解析をしたが、Flt1+/-マウス胎仔においては、どちらも異常を認めなかった。

Aspp1-/-マウス胎仔においては、以前からわかっていたリンパ管ネットワーク形成異常に加えて、リンパ管周囲への平滑筋細胞の異常集積が明らかになった。

(3) Flt1+/-マウス胎仔の心臓形成についての解析

心臓には異常を認めなかった。

(4) Flt1シグナル欠損 (Flt1-tk) マウス胎仔の解析

Flt1-tk マウス胎仔において、胎生期浮腫を認めなかった。

(5) Aspp1-/-;Flt1+/-ダブル変異マウス胎仔の血管・リンパ管形成、心臓形成についての解析

Aspp1+/-;Flt1+/-マウスとAspp1-/-マウスを交配して得られる4つの遺伝子型のマウス胎仔の血管透過性、血管・リンパ管形成、心臓形成について解析した。血管透過性につ

いては、Flt1+/-マウスとAspp1-/-;Flt1+/-ダブル変異マウスにおいて亢進していたが、Aspp1-/-マウスでは正常であった。リンパ管形成については、Aspp1-/-マウスとAspp1-/-;Flt1+/-ダブル変異マウスにおいて同等の異常所見を認めたが、Flt1+/-マウスでは正常であった。心臓形成はこれらすべての遺伝子型で正常であった。

(6) 生化学的・細胞生物学的解析 (Aspp1とVEGF-A/Flk1シグナルの相互作用)

(5)と同様の交配で得られるマウス胎仔から組織ライセートを調整しFlk1や血管透過性に影響するVE-カドヘリン、Src、eNOS等のリン酸化状態を生化学的に解析した。Flt1遺伝子ヘテロ欠損に応じてFlk1リン酸化の上昇が認められたが、その他の分子のリン酸化には変化が認められなかった。Flt1+/-マウス胎仔でFlk1の下流シグナル分子で血管透過性亢進に関わるSrcやeNOSのリン酸化状態を解析したが、野生型との有意な差は認められなかった。また、eNOS阻害剤であるL-NAMEを妊娠マウスに投与しても、Flt1+/-マウス胎仔の浮腫は軽減されなかった。

(7) Flt1+/-マウス胎仔の毛細血管についての透過電子顕微鏡解析

野生型と比べてFlt1+/-マウス胎仔において内皮細胞膜の侵入が明らかとなり、内皮細胞内輸送経路が亢進していることが強く示唆された (図2)。

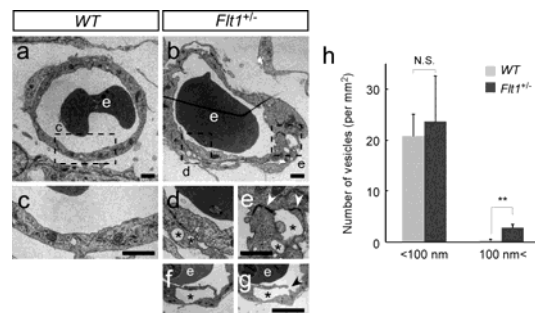


図2. Flt1+/-毛細血管内皮細胞に多数の小胞様構造がみられる

(a-g) 赤血球 (e) を含む毛細血管の透過電顕像。Flt1+/-マウスではWTマウスに比べて多数の小胞様構造 (*) が認められる。細胞間接着部位 (矢頭) や血管内腔 (矢) へ繋がっており、折れ曲がった細胞膜である。スケールバーは1 μm。 (h) 小胞数の比較。Flt1+/-マウスでは、特に巨大な小胞が認められる。WT, n=6; Flt1+/-, n=6, N.S. = 有意差無し, **, p<0.01

まとめと考察

これらのことから、Aspp1^{-/-}マウスにおいてはリンパ管形成・機能異常が存在し、Flt1^{+/-}マウスにおいてはFlk1リン酸化の上昇を伴って血管透過性が亢進していることが明らかになった。また、Aspp1^{-/-};Flt1^{+/-}ダブル変異マウスでは両方の異常を伴って胎生致死となることが明らかになった。しかし、これまでの解析では、Flt1^{+/-}マウスにて異常をきたしているFlk1下流シグナルを見出すことができなかった。一方で、Flt1^{+/-}マウス胎仔において内皮細胞内輸送経路が亢進していることが強く示唆された。これまでに分かった細胞内シグナル変化と内皮細胞形態変化の両面から、Flt1^{+/-}マウスの胎生期浮腫の背後にある分子機構の解明に繋げることが重要である。

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1件)

- ① Keigo Sano, Osamu Katsuta, Satoshi Shirae, Yoshiaki Kubota, Masatsugu Ema, Toshio Suda, Masatsugu Nakamura and Masanori Hirashima. Flt1 and Flk1 mediate regulation of intraocular pressure and their double heterozygosity causes the buphthalmia in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 420(2):422-427, 2012 (査読有)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.03.011

[学会発表] (計5件)

- ① 平島正則. 血小板はどのようにしてリンパ管網の独自性を守るのか. 第36回日本リンパ学会総会「シンポジウム・リンパ管の形成・機能の発現を左右する重要因子」, 2012年6月29日, 東京女子医科大学 (東京都)
- ② Guo Ding, Katsue Suzuki Inoue, Osamu Inoue, Masaki Hikida, Tomohiro Kurosaki, Masanori Hirashima. Platelets Contribute to the Separation between Blood Vessels and Lymphatic Vessels during Lymphatic Sprouting. 第19回日本血管生物医学会学術集会, 2011年12月9日, 東京ステーションコンファレンス (東京都)
- ③ 平島正則. 体液調節異常と胎生期浮腫をきたす遺伝子変異マウスの解析. 日本人

類遺伝学会第55回大会, 2010年10月29日, 大宮ソニックシティ (埼玉県)

- ④ Masanori Hirashima. VEGF-A receptors in lymphatic vessel development and fluid homeostasis. 2010 International Cancer Biology Symposium, 2010年6月28日, 国立中山大学 (台湾)
- ⑤ 平島正則. 体液調節異常と胎生期浮腫をきたす遺伝子変異マウスの解析. 第34回日本リンパ学会総会「シンポジウム・リンパ管新生の最前線」, 2010年6月26日, 東京大学山上会館 (東京都)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kobe-u.ac.jp/vascul/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平島 正則 (HIRASHIMA MASANORI)
神戸大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 40383757

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

森脇 一将 (MORIWAKI KAZUMASA)
神戸大学・大学院医学研究科・グローバルCOE 研究員
研究者番号: 00467656

丁 国 (GUO DING)

神戸大学・大学院医学研究科・グローバルCOE 研究員
研究者番号: 00514697