

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 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791565

研究課題名（和文） 鼻腔における VASOHIBIN 1 の発現、機能についての解析

研究課題名（英文） VASOHIBIN1 expression and function in the nasal tissue

研究代表者

鈴木 貴博（Suzuki Takahiro）

東北大学・病院・助教

研究者番号：50455789

研究成果の概要（和文）：Vasohibin-1 は血管新生を負に調節する新規機能性分子として報告されたが、嗅覚受容体発現に関する別の機能を有している可能性が示唆されたため、鼻腔における発現を検証した。RT-PCR 法および免疫染色法によりマウス鼻腔組織での発現は確認できたが、発現が認められたのは嗅覚器受容体神経細胞ではなく血管内皮細胞であったため、嗅覚受容体発現調節へ関与するという仮説を支持する結果は得られなかった。

研究成果の概要（英文）：Vasohibin-1 has been reported as a novel functional molecules which negatively regulated angiogenesis. It was suggested by our preliminary experiment that Vasohibin-1 might be involved in the expression of the olfactory receptor, so we verified the expression of Vasohibin-1 in the nasal tissue. Although we confirmed Vasohibin-1 expression in mouse nasal tissue by RT-PCR and immunostaining method, it was not observed on olfactory cells but endothelial cells. The result which supported our hypothesis of the regulation the olfactory receptor by Vasohibin-1 was not obtained.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	500,000	150,000	650,000
2011 年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
年度			
総計	700,000	210,000	910,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科学

キーワード：VASOHIBIN 鼻腔

1. 研究開始当初の背景

ゲノムプロジェクトによって従来知られていなかった数多くの遺伝子の存在が提示され、生物学上のあらゆる問題に対して、包括的で偏見に捕らわれない新たな解析法

の必要性が指摘されている。そのような背景から、佐藤ら¹⁾はマイクロアレイ法を用いて血管内皮細胞の分化や血管新生の過程で血管内皮細胞に発現する遺伝子を網羅的に解析し、血管内皮細胞の分化と血管新生に関し

て従来全く知られていなかった新規血管新生抑制遺伝子 Vasohibin-1 を単離同定した。佐藤ら¹⁾は、ヒト臍帯静脈内皮細胞を血管新生の中心的な促進因子である血管内皮増殖因子 (VEGF) で刺激したときに変動する遺伝子を cDNA マイクロアレイ法を用いて解析を行った。その際、VEGF 刺激によって 24 時間までのいずれかの時点で 2 倍以上に誘導された遺伝子の発現プロファイルを早期に発現が上昇して以後漸減する群と 24 時間発現が持続する群に大別した。これらの中にはいまだ同定されていないが血管新生の調節を担う新規分子が含まれているものと考え、中でも発現上昇が持続する遺伝子群のうちの一遺伝子に注目した。

Watanabe ら²⁾は本遺伝子の機能について詳細な解析を行っている。本遺伝子がコードするタンパク質はヒトでは 365 個のアミノ酸から構成され、マウスカウンターパートはヒトとアミノ酸レベルで約 94% 相同である。VEGF による内皮細胞の遊走促進作用は、濃度反応曲線はベル型を示し、低い濃度で強く作用し高濃度では逆に減弱する特性があることは以前より知られていたが、本遺伝子の発現を選択的に阻害すると高濃度 VEGF での作用減弱が消失した。また本遺伝子を癌細胞の安定導入すると、癌細胞自身の増殖には影響は与えないが、腫瘍血管新生の抑制のため動物に移植した際の *in vivo* における癌の発育は抑制された。すなわち、本遺伝子は VEGF によって内皮細胞に誘導されて、VEGF の作用を抑制するネガティブフィードバック調節分子と考えられたことから、Watanabe らは本遺伝子を *vasohibin* と命名した。血管新生刺激に応答したネガティブフィードバック因子はそれまでに報告がなく世界初である。

その後、*Vasohibin* のホモログの *Vasohibin-2* が単離・同定された³⁾。従ってプロトタイプ

である *Vasohibin* は *Vasohibin-1* と呼ばれるようになった。これまでの研究から、*Vasohibin-1* は、血管新生を終息させるのみならず、種々のストレスに対する血管内皮細胞の抵抗性を増し、血管内皮細胞の生存を促進して血管老化を防御すること、これに対して *Vasohibin-2* は、炎症細胞や癌細胞に発現し、*Vasohibin-1* に対して一部拮抗的に作用することが明らかにされている^{4) 5)}。佐藤らは、*Vasohibin-1* が内皮細胞において他の血管新生因子の発現調節に関わっているのか否かを検証する目的で、内皮細胞由来の細胞株 MS1 に *Vasohibin-1* を過剰発現させた場合に変動する遺伝子発現プロファイルを cDNA マイクロアレイ法を用いて解析した。その結果、33710 個の DNA チップのうち 2 倍以上に誘導された遺伝子は 184 個であった。さらにその中で 5 種類の嗅覚受容体の発現が上昇することが確認された。このデータは予想外のもので、*Vasohibin-1* が血管新生抑制の役割のみならず、嗅覚受容体の発現に何らかの関与をしているのではないかと考えた。鼻腔局所における *Vasohibin-1* の発現についての解析はこれまで行われておらず、本研究ではその再現性を確認するとともにその生物学的機能、意義についても検証する。

2. 研究の目的

本研究の目標は、鼻腔での *Vasohibin-1* 発現の有無や局在を RT-PCR 法や免疫染色の手法を用いて再現性も含めて検証することである。さらに本分子の発現が確認できた際には、野生型マウスと *Vasohibin-1* ノックアウトマウスとの比較によりその生物学的機能を解析する。

3. 研究の方法

Vasohibin-1 の生理的発現が鼻腔に特異的か否かを検証するため、同じく上気道の一部

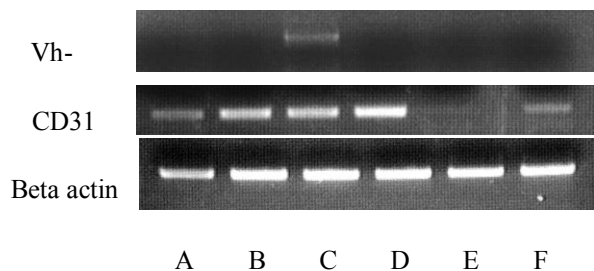
である上咽頭、喉頭、耳管などの粘膜も同時に採取しRT-PCRにより発現の有無を観察する。その結果発現が確認できれば組織切片を作製し免疫染色を追加することで

Vasohibin-1の局在を調べる。前述の方法により、鼻腔特異的な発現が確認できた際には野生型マウスとVasohibin-1ノックアウトマウスとの比較によりその生物学的機能を解析する。

4. 研究成果

8週齢マウスの鼻腔、上咽頭、耳管、喉頭、鼻腔の各上皮を採取し、RT-PCR法による遺伝子の発現の再現性を確認した。いずれの組織においても血管内皮のマーカであるCD31の発現は認められたもののVasohibin-1の発現が認められたのは、鼻腔においてのみであった(図1)。

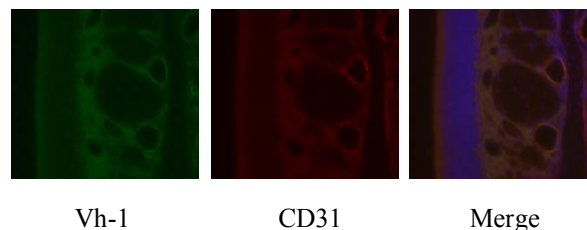
図1 上気道におけるvasohibin1 (Vh-1) とCD31の発現



A 耳管 B 上咽頭 C 鼻腔上方粘膜
D 鼻腔下方粘膜 E 喉頭 F 蝸牛

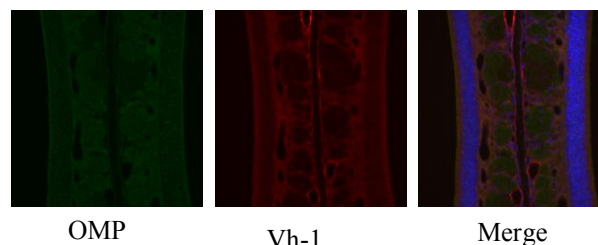
さらに発現している組織を同定するべく、また経時的な発現過程を検証すべく胎生14日目、生後1日目、生後8週目のマウス鼻腔のパラフィン切片を作成し免疫染色を施行した。胎生14.5日および生後1日においては嗅上皮、血管内皮いずれにおいてもVasohibin-1の発現は認められなかった。しかし8週齢になると嗅上皮下層にある血管内皮に一致してVasohibin-1の発現が認められた(図2)。成熟した嗅覚器受容体神経細胞にのみ結合する嗅覚標識タンパク質(OMP)の免疫染色によりラベルした嗅神経細胞においてVasohibin-1が共発現しているかどうかを検証したが、結果、嗅神経細胞にVasohibin-1の発現は認められなかった(図3)。

図2 Vasohibin1とCD31の鼻腔での共発現



Vh-1: vasohibin1

図3 Olfactory marker protein(OMP)とvasohibin1の鼻腔での発現



OMP: olfactory marker protein
Vh-1: vasohibin1

以上からはVasohibin-1が、血管新生抑制以外の機能として嗅覚受容体発現調節へ関与するという仮説を支持する結果は得られなかった。

Vasohibin-1の発現は組織別にみた場合血管内皮細胞で発現が確認されているが、器官別にみた場合、各臓器での発現パターンはまだ十分には解析されていない。鼻腔においてもVasohibin-1の発現は血管内皮に局限していたが、胎生期および出生直後には発現しておらず成熟してからVasohibin-1の発現が顕著になるのは新しい知見であり、マウスの成長に従って血管新生を負に調節する機構が鼻腔において働いている可能性が示唆された。

1) 佐藤靖史: 血管内皮に発現し、血管新生を調節する新規分子 実験医学22巻8号 46-51, 2004

2) Watanabe K, Hasegawa Y, Yamashita H et

al.: Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis. J. Clin. Invest. 114:898-907, 2004

3) Shibuya T, Watanabe K, Yamashita H et al.: Isolation and characterization of vasohibin-2 as a homologue of VEGF-inducible endothelium-derived angiogenesis inhibitor vasohibin. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 26:1051-1057, 2006

4) Hosaka T, Kimura H, Heishi T et al.: Vasohibin-1 expression in endothelium of tumor blood vessels regulates angiogenesis. Am. J. Pathol. 175:430-439, 2009

5) Kimura H, Miyashita H, Suzuki Y et al. Distinctive localization and opposed roles of vasohibin-1 and vasohibin-2 in the regulation of angiogenesis. Blood. 113:4810-4818, 2009

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 0 件)

[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]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 貴博 (Suzuki Takahiro)
東北大学・病院・助教
研究者番号: 50455789

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者