

## 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22日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791978

研究課題名（和文） Angiogeninのアポトーシス抑制作用が血管の恒常性維持に果たす役割

研究課題名（英文） The role of the anti-apoptotic effect of angiogenin in vascular homeostasis

研究代表者

伊原木 聡一郎（IBARAGI SOICHIRO）

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：80549866

## 研究成果の概要（和文）：

Angiogenin (ANG) 遺伝子を欠損させ、その影響からANGの生理的機能を調べるために、ANG遺伝子のノックアウトマウスを作製した。野性型とKOマウスの肝臓から血管内皮細胞を単離した。野性型と比較して、KOマウスの血管内皮細胞の増殖は、抑制されていた。血清飢餓状態で培養すると、KOマウスの血管内皮細胞はストレスに感受性が高くアポトーシスが誘導されていた。ANGがアポトーシスの抑制に関与している、ことが分かった。さらにKOマウスでは野性型と比較し血管新生が抑制されていた。以上からANGが血管新生や血管の恒常性維持に重要であることが明らかとなった。

## 研究成果の概要（英文）：

To determine the physiological function of angiogenin (ANG), by making ANG gene inoperative, ANG knockout (KO) mice were created. Vascular endothelial (VE) cells were isolated from liver from wild type and KO mice, respectively. The growth of VE cells from KO mice (KOVE cells) was more suppressed than the one of VE cells from wild type mice. In serum-starved condition, KOVE cells were sensitive to stress and induced to apoptosis. ANG was found to be anti-apoptotic. Angiogenesis was suppressed in KO mice. Therefore, we shed light on the role of the anti-apoptotic effect of ANG in vascular homeostasis and angiogenesis.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：口腔外科学一般，血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

血管内皮細胞の増殖と細胞死のバランスの破綻が様々な血管疾患の原因となっている。血管内皮細胞は血管内腔に接しているため、低酸素や活性酸素などのストレスに曝されやすく、これらのストレスは血管内皮細胞に細胞死（アポトーシス）を誘導する。血管内皮細胞のアポトーシスは動脈硬化や血栓の形成を促進する。そのため血管の恒常性を維持している機構を明らかにすることは、血管疾患に関してより理解するために重要である。

Angiogenin (ANG) は HT-29 ヒト大腸癌細胞株の培養上清から単離された血管新生因子である。癌細胞の産生する ANG は、血管内皮細胞に作用し腫瘍血管新生に重要な役割を果たす。ANG 受容体は血管内皮細胞表面に存在を確認されているが、構造は全く不明である。ANG は受容体に結合すると、シグナル伝達因子である ERK と Akt を活性化させると同時に、ANG 自体も直接に核に移行する。核に移行した ANG は核小体へ集積する。核小体はリボソーム生合成が行われる部位である。核内の ANG はリボソーム DNA (rDNA) のプロモーター領域に結合し、rRNA の転写を促進する (ref. 6)。rRNA の転写は血管内皮細胞の増殖を促進する。また ANG は癌以外に糖尿病性網膜症、関節炎などの病的血管新生に関わっている。しかし ANG の生理的機能は全く分かっていない。

## 2. 研究の目的

ANG 遺伝子を欠損させ、その影響から

ANG の生理的機能を調べるために、ANG 遺伝子のノックアウトマウスを作製した。

ヒト ANG に相同するマウス ANG は 6 種のアイソフォームが存在する。マウス ANG-1 はアミノ酸レベルでヒト ANG との最も高い相同性を示す。マウス ANG-1 はヒト ANG と同じく肝臓で産生され、血漿中の ANG の大部分を占める。ANG-2 は肺、ANG-3 は前立腺、ANG-4 は直腸、にそれぞれ特異的に発現する。ANG-1 と ANG-3 は血管新生能を示す。マウス ANG-1 はヒト ANG と相同性が最も高く、組織分布（主に肝臓）が同じであり、血管新生能をもつため、これをノックアウトした。

組織特異的にノックアウトできる利点、また胎生致死であった場合に成体となつてから薬剤誘導性にノックアウトできる利点から、Cre-loxP 遺伝子組換え系を用いた。ANG-1 遺伝子座に 2 つの loxP 配列をもち、ANG-1 を正常に発現する floxed マウス (ANG-1<sup>loxP/loxP</sup> マウス) を作製した。全身において Cre リコンビナーゼを発現する EIIa-Cre マウス (Jackson Lab 社 No:003314) を ANG-1<sup>loxP/loxP</sup> マウスと交配させた。得られた Mosaic マウスを野性型と交配し、ヘテロ接合体 (ANG-1<sup>+/-</sup> マウス) を得た。さらに ANG-1<sup>+/-</sup> マウス同士を交配させて、ホモ接合体 (ANG-1<sup>-/-</sup> マウス、以下 KO マウス) を得た。

KO マウスにおいて、確かに ANG-1 遺伝子がノックアウトされているか調べるため、8 週齢の野性型と KO マウスの胃、直腸、腎臓、肝臓、肺、脳、心臓、脊髄から RNA を回収しリアルタイム RT-PCR を行った。KO マウスにおいて ANG-1 遺伝子がノックアウトされているのを確認した。

KO マウスは外見上ほぼ正常に産まれて

くる。しかし生後 8 週齢になるまでに約 5%の KO マウスが水頭症となる。水頭症の病態は、脳脊髄液の産生・循環・吸収のいずれかの障害のため、脳脊髄液が頭蓋腔内に貯留することである。貯留した脳脊髄液は脳室を拡大させ、脳を圧迫する。剖検により、中脳水道の狭窄による循環障害が、KO マウスの水頭症の原因と分かった。しかし発生頻度が低いため、水頭症がこのマウスの表現型なのかは、現時点ではよく分からない。

ANG-1 遺伝子の欠損が血管内皮細胞の増殖能に与える影響を調べるために、野性型と KO マウスの肝臓から血管内皮細胞を単離し培養した。野性型と比較して、KO マウスの血管内皮細胞の増殖は、抑制されていた。細胞ストレスに与える影響を調べるために、血清飢餓状態で培養すると、KO マウスの血管内皮細胞はストレスに感受性が高く細胞死（アポトーシス）が誘導されていた。ANG がアポトーシスの抑制に関与している、ことが分かった。これらの知見より生じる疑問は、(1) ANG は血管においてどのような生理的機能を果たしているのか、(2) ANG はアポトーシスをどのように抑制しているのか、という 2 点でありその解明を目指した。

### 3. 研究の方法

(1) マウス ANG-1 ノックアウトマウスを作製した。野性型と KO マウスの胃、直腸、腎臓、肝臓、肺、脳、心臓、脊髄から、タンパクと RNA をそれぞれ採取した。上記の臓器の組織切片を作製し病理学的検索を行った。マウス ANG-遺伝子の発現を Real time RT-PCR で調べた。

(2) 野性型と KO マウスの肝臓から血管内皮

細胞を単離し培養した。血清飢餓状態で培養しアポトーシスについて検討を行った。野性型と KO マウスの骨髄および脾臓から破骨細胞を分化誘導した。破骨細胞の形成、吸収能を検討した。野性型と KO マウスの背部皮下に Matrigel を注入し Matrigel Plug Assay を行い血管新生の検討を行った。野性型と KO マウスの尾基部から 1cm 遠位の部分の表皮を 2mm 環状に剥ぎ取り、リンパ浮腫動物モデルを作製し、リンパ管新生の検討を行った。

### 4. 研究成果

ヒト Angiogenin (ANG) に相同するマウス ANG は 6 種のアイソフォームが存在する。マウス ANG-1 はヒト ANG と相同性が最も高く、組織分布（主に肝臓）が同じであり、血管新生能をもつため、マウス ANG-1 をノックアウトし、その影響から ANG の生理的機能を調べた。KO マウスは外見上ほぼ正常に生まれてきた。KO マウス作製初期に多く認められた水頭症は、ANG 遺伝子の欠損の表現型ではなく、成長や生殖にも大きな異常は認められなかった。野性型と KO マウスの胃、直腸、腎臓、肝臓、肺、脳、心臓、脊髄から、タンパクと RNA をそれぞれ採取した。マウス ANG-1 はすべての臓器でノックアウトされていた。上記の臓器の組織切片を作製し病理学的検索を行った。出血、梗塞、閉塞、狭窄、線維化、新生内膜肥厚などの血管異常は認められなかった。マウス ANG-2, 3, 4, 5, 6 遺伝子の発現を調べたところ、すべての臓器で発現上昇を認めた。ANG-2 は肺、ANG-3 は前立腺、ANG-4 は直腸、にそれぞれほぼ特異的に発現する。ANG-5, 6 の分布はよく分かっていない。循環血液中の ANG の影響を排除するため、組織から細胞を単離しさらに検討を加えた。野性型と KO マウスの肝臓から血管内皮細胞を単離し培養した。野性型と比較し

て、K0マウスの血管内皮細胞の増殖は、抑制されていた。血清飢餓状態で培養すると、K0マウスの血管内皮細胞はストレスに感受性が高くアポトーシスが誘導されていた。また野性型とK0マウスの骨髄および脾臓から破骨細胞を分化誘導した。K0マウスでは破骨細胞の形成、吸収能ともに抑制されていた。さらに野性型とK0マウスの背部皮下にMatrigelを注入しMatrigel Plug Assayを行った。K0マウスでは野性型と比較し血管新生が抑制されていた。野性型とK0マウスの尾基部から1cm遠位の部分の表皮を2mm環状に剥ぎ取り、リンパ浮腫動物モデルを作製した。K0マウスでは野性型と比較しリンパ管新生が抑制されリンパ浮腫が認められた。以上からANGが血管新生やリンパ管新生や骨代謝に重要であることが明らかとなった。

#### 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）

〔雑誌論文〕（計6件）

- ① Kishimoto K, Yoshida S, Ibaragi S, Okui T, Yoshioka N, Shimo T, Hu GF, Sasaki , Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin is related to progression of oral cancer, Oral Oncol. 査読有, in press
- ② Li S, Ibaragi S, Hu GF, Angiogenin as a molecular target for the treatment of prostate cancer, Curr Cancer Ther Rev. 査読有, 7, 2011, 83-90
- ③ Ibaragi S, Shimo T, Hassan NM, Isowa S, Kurio N, Mandai H, Kodama S, Sasaki A, Induction of MMP-13 expression in bone-metastasizing cancer cells by type I collagen through integrin  $\alpha 1 \beta 1$  and

$\alpha 2 \beta 1$ -p38 MAPK signaling, Anticancer Res. 査読有, 31, 2011, 1307-13

④ Ibaragi S, Shimo T, Iwamoto M, Hassan NM, Kodama S, Isowa S, Sasaki A, Parathyroid hormone-related peptide regulates matrix metalloproteinase-13 gene expression in bone metastatic breast cancer cells, Anticancer Res. 査読有, 30, 2010, 5029-36.

⑤ Isowa S, Shimo T, Ibaragi S, Kurio N, Okui T, Matsubara K, Hassan NM, Kishimoto K, Sasaki A, PTHrP regulates angiogenesis and bone resorption via VEGF expression, Anticancer Res. 査読有, 30, 2010, 2755-67.

⑥ Goda T, Shimo T, Yoshihama Y, Hassan NM, Ibaragi S, Kurio N, Okui T, Honami T, Kishimoto K, Sasaki A, Bone destruction by invading oral squamous carcinoma cells mediated by the transforming growth factor-beta signalling pathway, Anticancer Res. 査読有, 30, 2010, 2615-23.

〔学会発表〕（計2件）

① 岸本晃治, 吉田祥子, 帆波辰基, 伊原本聰一郎, 吉岡徳枝, 志茂剛, 佐々木 朗. Angiogeninの発現亢進は口腔癌の増殖と進展に関与する. 第29回日本口腔腫瘍学会総会 2011/1/27 熊本

② Aoki K, Hassan NMM, Yoshioka N, Ibaragi S, Kishimoto K, Mese H, Sasaki A. Does angiogenin have an important role in the cancer-induced osteolysis of oral squamous cell carcinoma? 9th Asia Congress on Oral & Maxillofacial Surgery. 2010/11/25, Malaysia

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊原木 聰一郎 (IBARAGI SOICHIRO)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：80549866

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

HU Guo-fu (HU GUO-FU)

Tufts 大学・教授

兒玉 真一 (KODAMA SHINICHI)

岡山大学・岡山大学大学院・大学院生

柴田 茜 (SHIBATA AKANE)

岡山大学・岡山大学大学院・大学院生