

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790870

研究課題名（和文）細胞移植による血管新生・組織再生における転写調節機構の研究

研究課題名（英文）The roles of transcriptional regulation of angiogenesis and tissue repair in cell transplantation

研究代表者

林 寿来（HAYASHI HISAKI）

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）：

転写調節因子であるHairy-related transcription factor 1（Hrt1）は血管発生において重要な遺伝子であるが、Hrt1単独のノックアウトでは明らかな異常を示さない。本研究では、Hrt1KO マウスの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、さらに組織傷害度が高かった。Hrt1は下肢骨格筋の血管内皮細胞に発現し、Hrt1KOマウスでは術後の血管密度の増加が有意に抑制されていた。以上のことからHrt1は虚血後の血管新生およびそれに伴う組織再生に必須の機能を有することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

In a mouse model of pathological angiogenesis by hindlimb ischemia (HLI) with femoral artery occlusion, the mRNA expression of Hrt1 was markedly induced in ischemic muscle. Hrt1 KO mice do not show overt cardiovascular phenotypes in adulthood, but blood flow recovery in ischemic hindlimb after HLI was significantly blunted compared to WT. Revascularization of ischemic hindlimb was also attenuated in Hrt1 KO mice, as evaluated by capillary density analysis. Accordingly, the severity of ischemic injury such as tissue necrosis and loss is much higher in Hrt1 KO mice than WT. These results suggest that Hrt1 plays important roles in regulating ischemia-induced angiogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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・循環器内科学

キーワード：血管新生・転写調節因子・虚血・シグナル伝達・細胞移植

1. 研究開始当初の背景

骨髄や末梢血の単核球を移植する血管再生治療が、閉塞性動脈硬化症などの下肢虚血疾患の治療法として行われている。しかしながら移植された細胞が、どのようなシグナル伝達機構で組織に働きかけ、血管新生を誘導しているのかは明らかでない。

2. 研究の目的

本申請研究では、心血管発生や病的血管新生に必須の働きを有するNotch シグナル系の転写調節因子であるHairy-Related Transcription Factor 1 (Hrt1)の血管新生における意義の解明を行い、効率的な血管再生治療の礎を築きたい。

3. 研究の方法

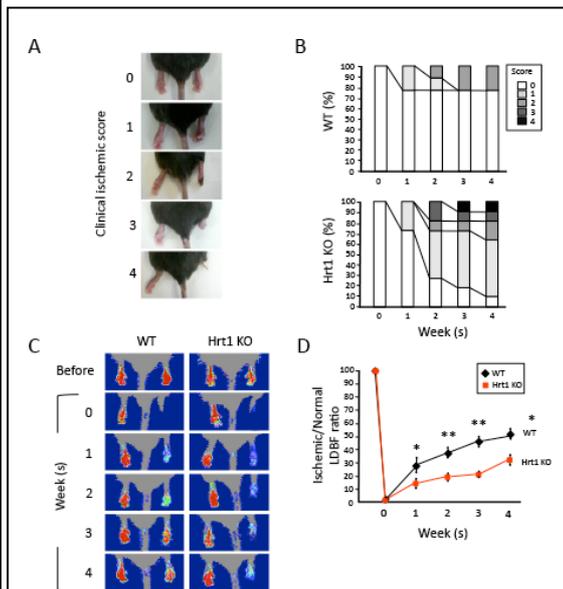
[課題 1] 虚血患部の血管において、Notchの転写活性化は単核球を誘引し、結果的に新生血管を誘導するが、同様に血管新生療法によって移植された単核球において、Notch シグナル活性化は直接あるいは間接的に血管新生を誘導する。このように、虚血患部で誘導される血管新生において、Notch シグナルは様々な局面で重要であると考えられている。本研究では、血管内皮細胞においてNotchが直接発現を制御する転写因子であるHrt1のKOマウスを用いて、大腿動脈結紮による下肢虚血(hindlimb ischemia: HLI)モデルマウスを作成し、誘導される新生血管におけるHrt1の意義を解明する。次に、虚血性血管新生におけるHrt1の意義を明らかにする。

[課題 2] 転写調節因子は下流遺伝子群の発現を「転写調節」して機能するため、その意義の解明には直接制御を受ける下流遺伝子を知る事が不可欠である。上述の様に、血管

内皮細胞、あるいは単核球細胞で機能する遺伝子を同定するために、KOマウスから分離した内皮細胞からMicroarray解析をおこなう。同時に、Hrt1が結合するゲノムDNA領域を知るために、ChIP Libraryの作成を行う。両解析を併用することで、より厳密に血管新生におけるHrt1の下流遺伝子を解明したい。

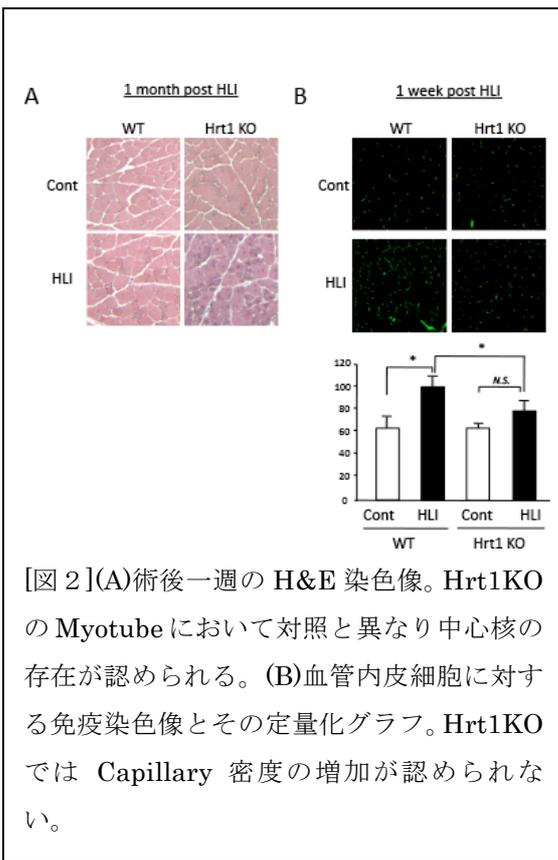
4. 研究成果

(1) Hrt1KO マウスを用いて下肢大腿動脈結紮の手術を行った。その結果、対照と比較して有意にクリニカルスコアが高く、一部のマウスにいたっては足が一部(スコア3)または完全に欠損(スコア4)するまで重篤な損傷に至った。定量可能なマウスのみ血流を測定したところ、Hrt1KO では顕著な血流回復の減少が認められた(図1)。



[図1] (A,B) Hrt1KO マウスの HLI 術後 4 週間の写真。一部のマウスでは完全に後肢が欠失し、クリニカルスコアは有意に高い。(C,D) HLI 術後の経時的な血流解析。KO では術後 4 週経っても血流が有意に低い。

(2) HLI 術後一ヶ月の骨格筋 Hematoxylin-Eosin 染色像を解析したところ、対照ではほとんど確認されない Myotube の中心核が多数みられた。一方で、骨格筋そのものには病的な組織像が認められないことから、Hrt1KO では対照の野生型に比べて組織再生が遅延していることが考えられる。次に、術後一週間の骨格筋に対する血管内皮マーカーPECAM1 による組織染色像および、その定量化を行った。Hrt1KO では、Capillary 密度の上昇が有意に抑えられることから、Hrt1 は術後の血管新生に必須の因子であることが示唆された。



【図2】(A)術後一週間のH&E染色像。Hrt1KOのMyotubeにおいて対照と異なり中心核の存在が認められる。(B)血管内皮細胞に対する免疫染色像とその定量化グラフ。Hrt1KOではCapillary密度の増加が認められない。

(3) ChIP ライブラリーの作成や Microarray 解析に先立ち、Hrt1 によって制御される候補遺伝子の検索を行った。まず、HLI 手術を行った Hrt1KO マウスの下流遺伝子の検索を行った。術後12時間、24時間、3日間と経時的に骨格筋 mRNA の定量を行い、血管新生に重要な複数の遺伝子発現変動を解析した。非常に興味深いことに、術後24時間で

Cxcl12 の mRNA 発現が亢進されるが、KO マウスではほとんど確認されなかった。Cxcl12 はケモカインとして骨髄由来の単核球などの誘引に関わることがよく知られており、誘引される単核球が血管新生に重要な役割を果たしていることが報告されている。以上のことより、Hrt1 は傷害を受けた血管において、Cxcl12 の遺伝子発現調節を介して、単核球などの骨髄由来細胞を誘引し、血管新生に寄与すると考察される。

Hrt1 がどのような分子機構で Cxcl12 の発現を調節しているのか、Hrt1 によって発現制御された Cxcl12 が実際に血管新生・組織修復に機能するのか、そして細胞移植において Hrt1 が Cxcl12 を制御してか血管新生を促進するのかを解明することは今後の検討課題である。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

(1) 林寿来, 坂部正英, 井岡朋子, 井岡朋子, 森岡崇, 佐藤玄基, 稲田賢, 伊藤宗洋, 八反丸美和, Manuel F. Utset, Eric N. Olson, 中川修 Expression profiles and importance of Hairy-related transcription factor (Hrt) in ischemia-induced angiogenesis. 第35回日本分子生物学会総会、平成24年12月14日、福岡

(2) 森岡崇, 林寿来, 井岡朋子, 坂部正英, 木村弘, 中川修 Hrt転写調節因子の血管発生と血管新生における意義日本内科学会総会、平成24年4月14日、京都

(3) Hisaki Hayashi, Masahide Sakabe, Tomoko Ioka, Tomoko Fujita, Takashi Morioka, Genki Sato, Ken Inada, Munehiro Ito, Manuel F Utset, Eric N Olson, Osamu Nakagawa Significance of Hairy-related transcription factor1 in postnatal angiogenesis. 第34回日本分子生物学会年会、平成23年12月12日、横浜

(4) Hisaki Hayashi, Masahide Sakabe, Tomoko Ioka, Takashi Morioka, Genki Sato, Ken Inada, Osamu Nakagawa Significance of Hrt family of transcription factors in postnatal angiogenesis. ISTH2011、平成23年7月25日、京都

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 寿来 (HAYASHI HISAKI)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30533715