

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461132

研究課題名(和文) サイトカイン TGF- $\beta$ 1 による血管成熟化機構 - VEGFR2 とのクロストーク -研究課題名(英文) Vessel maturation by a cytokine TGF $\beta$ 1 and crosstalk with VEGFR2 signaling

## 研究代表者

五十嵐 淳介 (Igarashi, Junsuke)

香川大学・医学部・准教授

研究者番号：20346638

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：血管新生は既存血管から新しい血管が生じる現象であり、その調節機構をよりよく理解することで幅広い疾患に対して新しい治療的応用法を開発することが可能になると期待される。当研究では特に新生血管の成熟化過程に注目し、サイトカイン TGF- $\beta$ 1 の新たな役割を明らかにした。さらにアデノシン類似化合物であるコアクロルを独自に合成し、これが新生血管の成熟化に關与する S1P1 受容体を活性化すること、ならびに新生血管の出芽を促す成長因子 VEGF の分泌を促すことを見出した。

研究成果の概要(英文)：Angiogenesis is a process in which new blood vessels arise from pre-existing ones. A better understanding of angiogenesis may lead to a development of novel therapeutic interventions for a wide array of disease states. In the present study, we focused on a maturation process of newly formed vessels, and revealed novel actions of a cytokine TGF $\beta$ 1. Furthermore, we have newly synthesized a pro-angiogenic adenosine-like agent termed COA-Cl. COA-Cl on the one hand induces VEGF to promote vessel sprouting from fibroblasts, and on the other hand stimulates S1P1 receptor in vascular endothelial cells to promote vessel maturation. Thus, these findings may contribute for the development of a pharmacological intervention to modulate angiogenic processes.

研究分野：生理学

キーワード：血管新生 内皮細胞 受容体 サイトカイン 成長因子

### 1. 研究開始当初の背景

血管新生は胎生期に重要であるのみならず、虚血、悪性新生物、創傷など高齢化に伴いますます増加しつつある諸疾患の病態生理においても大きな役割を果たす。

血管新生の初期には内皮細胞が新生血管誘導因子に向かって遊走し、内皮のみからなる内容物を保持する能力に乏しい壁の薄い血管が構築される。然る後に平滑筋細胞、周細胞等が血管壁に recruit され、さらには結合組織の産生・構築が行われて安定した血管を形作る(未熟新生血管の成熟化)。病的に生じた未成熟な新生血管は病態の悪化につながる場合もある。例えば糖尿病性網膜症における眼底出血、粥状冠動脈硬化症における不安定プラークの破裂などである。すなわち、新生血管の成熟化過程をコントロールできれば、これらの疾病への新たな対策となり得る。

### 2. 研究の目的

新生血管の成熟化を促進する因子、並びにその受容体を介した細胞内情報伝達機構の解明を試みた。新生血管の成熟化を促進する因子として、a) サイトカイン TGFβ1 と、b) 脂質メディエータースフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) に特に着目した。さらに、S1P 受容体新規リガンドの開発、も試みた。

### 3. 研究の方法

1) 培養細胞:

ウシ大動脈由来血管内皮細胞 (BAEC)  
ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞 (HUVEC)  
ヒト皮膚由来正常線維芽細胞 (NHDF)

2) タンパク質発現、リン酸化:

ウエスタンブロット法、ELISA 法

3) 遺伝子発現:

RT-PCR 法

4) 血管新生能:

HUVEC と NHDF の共培養による管腔形成能測定法

5) 受容体結合能:

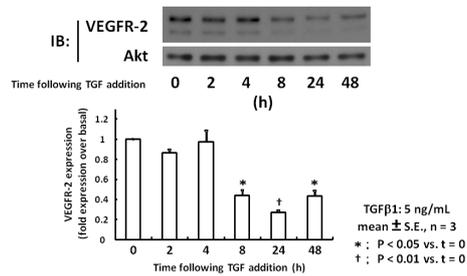
放射性リガンド結合競合アッセイ法

### 4. 研究成果

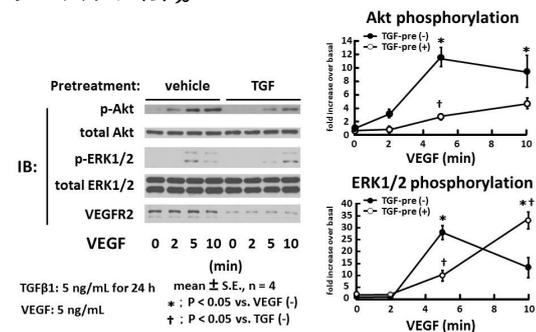
#### (1) 内皮細胞における、TGFβ1 の VEGF 受容体シグナルに対する効果

サイトカイン TGFβ1 は新生血管の成熟化を促進することが知られる。一方、成長因子 VEGF は新生血管の出芽を促進することから、両経路のクロストークを検討した。

あ) TGFβ1 の VEGFR2 発現に対する効果: BAEC において、TGFβ1 は時間・濃度依存的に VEGFR2 (VEGF 受容体タイプ 2) のタンパク質・遺伝子発現を低下させる。図はタンパク質レベルにおける時間依存性の効果を示す(ウエスタンブロット法)



い) TGFβ1 の VEGFR2 発現に対する効果: BAEC において、TGFβ1 前処理により VEGFR2 発現が低下した細胞では VEGF によるリン酸化反応が低下 (Akt) あるいは遅延 (ERK1/2) することが分かった(図: ホスホウエスタン法)

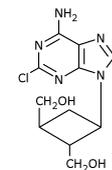


う) 小括:

以上より、サイトカイン TGFβ1 による新生血管の成熟化には、出芽シグナルである VEGF の働きを受容体発現のレベルで抑制することが関与する可能性が示唆された。

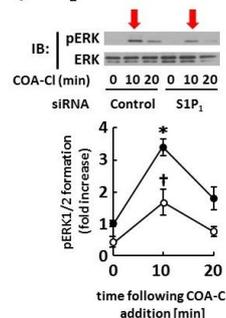
#### (2) 新規アデノシン類似化合物 COA-Cl の、内皮細胞における S1P<sub>1</sub> 受容体を介した新生血管成熟化シグナルへの効果

研究代表者は以前に新規アデノシン類似化合物 COA-Cl (コアクロール) を合成し、これに強い血管新生促進作用を見出していた(図に構造式を示す: Tsukamoto I, Igarashi J, et al., BBRC 2010 (399)

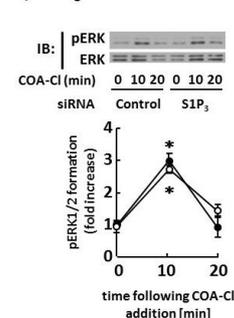


699)。本研究では、内皮細胞において新生血管の成熟化をもたらす S1P<sub>1</sub> 受容体に対して、COA-Cl がアゴニストとして作用するか否かを検討した。

#### A) S1P<sub>1</sub> siRNA



#### B) S1P<sub>3</sub> siRNA

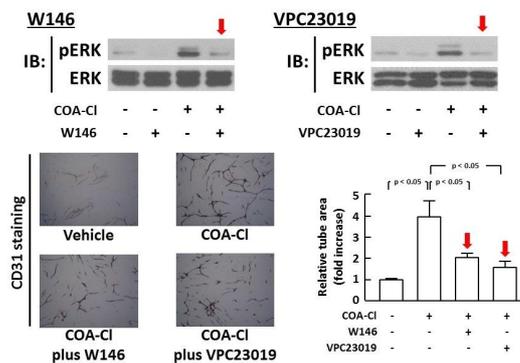


あ) S1P<sub>1</sub> 受容体遺伝子サイレンシングによる検討:

HUVEC に S1P<sub>1</sub> 受容体を標的とした siRNA を一過性導入しその発現を低下させると、COA-Cl による ERK1/2 のリン酸化反応は抑制された。一方、S1P<sub>3</sub> 受容体の siRNA では変化は見られなかった (図 (前頁): ホスホウエスタン法)

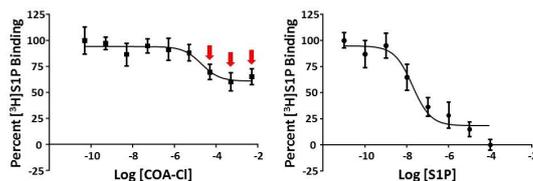
い) S1P<sub>1</sub> 受容体拮抗薬による検討:

HUVEC に S1P<sub>1</sub> 受容体の特異的アンタゴニストである W146 または VPC23019 を用いると、COA-Cl による反応は ERK1/2 のリン酸化・NHDF との共培養系における管腔形成の両パラメータとともに有意に抑制された (図: ホスホウエスタン法及び管腔形成能測定法)



う) COA-Cl の S1P<sub>1</sub> 受容体結合能の検討:

COA-Cl は、陽性対照の S1P よりは弱いものの、有意な S1P<sub>1</sub> 受容体結合能を有することが分かった (図: 放射性リガンド結合競合アッセイ法)



え) 小括:

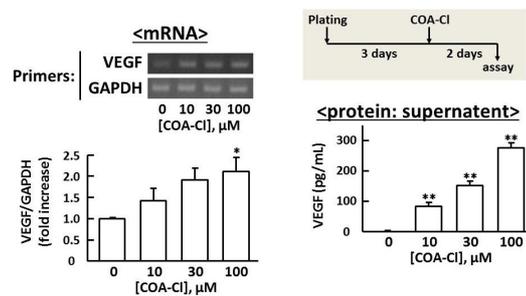
以上より、新規アデノシン類似化合物 COA-Cl は、血管内皮細胞において新生血管の成熟化反応を司る S1P<sub>1</sub> 受容体のリガンド・アゴニストとして作用し、同受容体の下流で MAP キナーゼ ERK1/2 を活性化することで管腔形成を促進することが示された。

### (3) 新規アデノシン類似化合物 COA-Cl の、線維芽細胞における VEGF 分泌への効果

HUVEC の COA-Cl による管腔形成促進は、共培養された NHDF の存在下で特に顕著であった。そこで、線維芽細胞において COA-Cl が VEGF リガンドを誘導するか及びその分子機作を検討した。

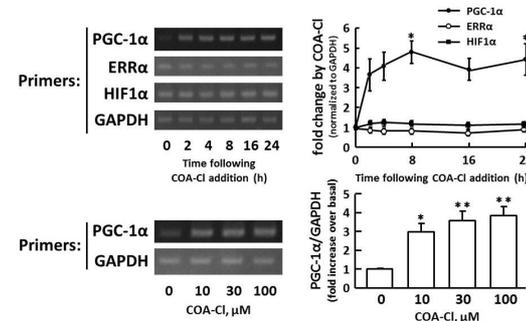
あ) COA-Cl の VEGF リガンド発現・分泌への効果:

NHDF において、COA-Cl は濃度依存的に VEGF の遺伝子を誘導し、タンパク質分泌を促進した (図: RT-PCR 法及び ELISA 法)

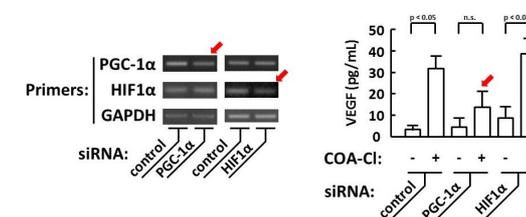


い) COA-Cl は転写補助因子・PGC-1α を介して VEGF 遺伝子を誘導する:

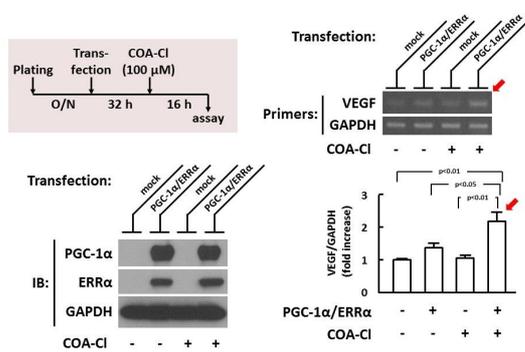
VEGF 遺伝子の誘導には、低酸素依存性の転写因子である HIF1α と、代謝ストレス依存性の転写補助因子・転写因子である PGC-1α・ERRα との二つの経路が関与している (Shoag and Arany, ATVB 2010 (30) 662)。そこで NHDF におけるこれらの分子の発現を検討したところ、COA-Cl が PGC-1α 遺伝子の発現を特異的に増加させることが分かった (図: RT-PCR 法)



COA-Cl による VEGF 誘導における PGC-1α の役割を遺伝子サイレンシング法で検討した。PGC-1α の発現が抑制されると COA-Cl による VEGF 分泌促進が阻害されるのに対し、HIF1α の発現抑制は無効であった (図: RT-PCR 法、ELISA 法)



さらに、遺伝子導入効率の高い、サル腎臓由来線維芽細胞様細胞である COS-7 細胞を用いて、遺伝子プラスミドの一過性強制導入を行った。COA-Cl は、PGC-1α と ERRα を強制発現させた細胞においてのみ、COS-7 細胞の内在性 VEGF 遺伝子を誘導した (図: 次ページ)。一方、HIF1α の強制発現は無効であった。

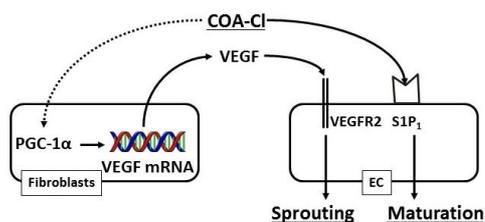


う) 小括:

以上より、新規アデノシン類似化合物である COA-Cl は、線維芽細胞において転写補助因子・PGC-1 $\alpha$  の発現を増加させて VEGF 遺伝子を誘導し、その分泌を増加させることが示された。

#### (4) 研究全体のまとめと展望

当研究により、新生血管の成熟化を促すサイトカイン TGF $\beta$ 1・脂質メディエーターS1P と新生血管の出芽を促す成長因子 VEGF は、それぞれの受容体シグナルにおいて多彩なクロストークを行うことが明らかになった。さらに当研究においては、以前に研究代表者らが合成した新規のアデノシン類似化合物である COA-Cl が血管内皮細胞における S1P<sub>1</sub> 受容体のリガンドであることを定めた。一方で COA-Cl が線維芽細胞では VEGF リガンドを誘導することから、COA-Cl には新生血管の出芽と成熟の両ステップを同時に賦活化する能力があることが分かった(モデル図)。



今後これらの知見を足がかりとして血管新生における受容体シグナルの制御をステップ別にさらに詳細に検討していくことで、血管新生を標的とした新しい治療法の開発に繋がる可能性がある。

#### 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 8 件)

1. Igarashi J, Okamoto R, Yamashita T, Hashimoto T, Karita S, Nakai K, Kubota Y, Takama M, Yamaguchi F, Tokuda M, Sakakibara N, Tsukamoto I, Konishi R, Hirano K. A key role of PGC-1 $\alpha$  transcriptional coactivator in production of VEGF by a novel angiogenic agent

COA-Cl in cultured human fibroblasts. *Physiological Reports*, 4(6): e12742, 2016. **査読有**

2. Sakakibara N, Igarashi J, Takata M, Konishi R, Suzue N, Kato Y, Maruyama T, Tsukamoto I. Design, synthesis, and evaluation of novel 2-halogenated or aminated carbocyclic oxetanocin analogs as potential angiogenic agents. *Heterocycles* in press. **査読有**

3. Sakakibara N, Igarashi J, Takata M, Demizu Y, Misawa T, Kurihara M, Konishi R, Kato Y, Maruyama T, Tsukamoto I. Synthesis and evaluation of novel carbocyclic oxetanocin A (COA-Cl) derivatives as potential tube formation agents. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 2015, 63, 701-709. **査読有**

4. Hasan AU, Ohmori K, Konishi K, Igarashi J, Hashimoto T, Kamitori K, Yamaguchi F, Tsukamoto I, Uyama T, Ishihara Y, Noma T, Tokuda M, Kohno M. Eicosapentaenoic acid upregulates VEGF-A through both GPR120 and PPAR $\gamma$  mediated pathways in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2015, 406, 10-18. **査読有**

5. Igarashi J, Hashimoto T, Kubota Y, Shoji K, Maruyama T, Sakakibara N, Takuwa Y, Ujihara Y, Katanosaka Y, Mohri S, Naruse K, Yamashita T, Okamoto R, Hirano K, Kosaka H, Takata M, Konishi R, Tsukamoto I. Involvement of S1P<sub>1</sub> receptor pathway in angiogenic effects of a novel adenosine-like nucleic acid analogue COA-Cl in cultured human vascular endothelial cells. *Pharmacology Research & Perspective*, 2014, e00068. **査読有**

6. Hashimoto T, Igarashi J, Hasan AU, Ohmori K, Kohno M, Nagai Y, Yamashita T, Kosaka H. Mifepristone promotes adiponectin production and improves insulin sensitivity in a mouse model of diet-induced-obesity. *PLOS ONE*, 2013, e79724. **査読有**

7. Igarashi J, Hashimoto T, Shoji K, Yoneda K, Tsukamoto I, Moriue T, Kubota Y, Kosaka H. Dexamethasone Induces Caveolin-1 In Vascular Endothelial Cells: implications for attenuated responses to VEGF. *Am. J. Physiol. (Cell Physiology)* 304(8): C790-C800, 2013. **査読有**

8. Moriue T, Igarashi J, Yoneda K, Hashimoto T, Nakai K, Kosaka H, Kubota Y. Sphingosine 1-phosphate attenuates peroxide-induced apoptosis in HaCaT cells cultured in vitro. *Clinical and Experimental Dermatology*. 38(6) 638-645, 2013. **査読有**

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 五十嵐淳介 COA-Cl (コアクロル) による血管新生促進作用に関わる細胞内情報伝達の仕組み(公募シンポジウム) 第93回日本生理学会大会、北海道札幌市 2016年3月招待講演

2. Okamoto R, Igarashi J, Yamashita T,

Hashimoto T, Karita S, Shoji K, Kubota Y, Takata M, Yamaguchi F, Tokuda M, Sakakibara N, Tsukamoto I, Konishi R, Hirano K. A Key Role of PGC-1 $\alpha$  Co-transcription Factor, but not HIF1 $\alpha$  Transcription Factor, in Production of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) by a Novel Angiogenic Agent COA-Cl in Cultured Human Fibroblasts. Scientific Sessions 2015, American Heart Association アメリカ合衆国フロリダ州オーランド市、2015年11月 **国際学会**

3. Okamoto R, Igarashi J, Hashimoto T, Yamashita T, Shoji K, Kubota Y, Sakakibara N, Tsukamoto I, Konishi R, Hirano K. Activation of cAMP/CREB/PGC-1 $\alpha$  Pathway Plays a Key Role for a Novel Adenosine-like Angiogenic Agent COA-Cl to Induce Production of Vascular Endothelial Growth Gactor (VEGF) in Cultured Human Fibroblasts. Scientific Sessions 2015, American Heart Association アメリカ合衆国フロリダ州オーランド市、2015年11月 **国際学会**

4. 岡本隆司、五十嵐淳介、橋本剛、山下哲生、苅田咲子、窪田泰夫、高田麻紀、小西良士、塚本郁子、平野勝也 新規アデノシン類似化合物 COA-Cl (コアクロル) は cAMP/CREB/PGC-1 $\alpha$  の経路を介して血管内皮成長因子 (VEGF) の産生を促進する 第 67 回日本生理学会中国四国地方会、2015 年 10 月 鳥取県米子市

5. 苅田咲子、五十嵐淳介、岡本隆司、山下哲生、橋本剛、窪田泰夫、塚本郁子、小西良士、平野勝也 新規アデノシン類似化合物 COA-Cl (コアクロル) はヒト皮膚由来線維芽細胞において結合組織成長因子 (CTGF) の発現を抑制する 第 67 回日本生理学会中国四国地方会、2015 年 10 月 鳥取県米子市

6. Igarashi J, Tsukamoto I, Hirano K. A novel adenosine-like angiogenic agent COA-Cl elevates VEGF production via the transcription co-activator PGC-1 $\alpha$  in cultured human fibroblasts. 第 79 回日本循環器学会学術集会、2015 年 4 月 大阪府大阪市

7. Okamoto R, Igarashi J, Yamashita T, Hashimoto T, Shoji K, Kubota Y, Takata M, Tsukamoto I, Konishi R, Hirano K. A novel angiogenic agent COA-Cl induced PGC-1 $\alpha$ -mediated VEGF production in cultured human fibroblasts. 第 92 回日本生理学会大会、兵庫県神戸市 2015 年 3 月

8. 岡本隆司、五十嵐淳介、山下哲生、橋本剛、平野勝也、高田麻紀、小西良士、塚本郁子、小路和代、窪田泰夫 アデノシン類似化合物 COA-Cl による VEGF 分泌促進機序の検討 第 66 回日本生理学会中国四国地方会、2014 年 11 月 香川県高松市

9. 五十嵐淳介 血管新生における内皮細胞の受容体シグナルの役割 (教育講演) 第 66 回日本皮膚科学会西部支部学術大会、2014 年 11 月 香川県高松市 **招待講演**

10. Igarashi J, Kubota Y, Shoji K, Sakakibara N, Maruyama T, Takata M, Kosaka H, Takuwa Y, Hashimoto T, Yamashita T, Konishi R, Tsukamoto I. S1P<sub>1</sub> receptors are necessary, but not sufficient, for the angiogenic responses induced by a novel nucleic acid analogue COA-Cl. 第 91 回日本生理学会大会、鹿児島県鹿児島市 2014 年 3 月

11. Igarashi J, Kubota Y, Shoji K, Sakakibara N, Maruyama T, Takata M, Kosaka H, Konishi R, Tsukamoto I. S1P<sub>1</sub> receptors mediate angiogenic responses of a novel adenosine analogue COA-Cl in HUVEC. Scientific Sessions 2013, American Heart Association アメリカ合衆国テキサス州ダラス市、2013 年 11 月 **国際学会**

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者  
五十嵐 淳介 (IGARASHI JUNSUKE)  
香川大学・医学部・准教授  
研究者番号：20346638

(2)研究分担者  
橋本 剛 (HASHIMOTO TAKESHI)  
香川大学・医学部・助教  
研究者番号：80380153

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：