

平成21年 5月13日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590352
 研究課題名（和文） 血管・リンパ管新生過程における細胞相互シグナルとその修飾機構の分子病理学的解明
 研究課題名（英文） Moleculo-Pathological studies on intracellular cross-talk signal in angiogenic and lymphoangiogenic process.
 研究代表者
 中川 和憲（NAKAGAWA KAZUNORI）
 九州大学・大学院医学研究院・講師
 研究者番号：50217668

研究成果の概要： 脈管（血管・リンパ管）新生での細胞間相互の情報伝達機構、細胞の機能変化、さらに脈管新生を基盤とする病態（血管新生病など）の解明と治療法の開発は極めて重要かつ緊急課題である。本研究では、動脈硬化、血管炎、血管新生病（腫瘍・糖尿病）あるいは臓器・組織虚血と側副血行路発達、リンパ管新生に関する分子病態の検討から、血管病変進展において脈管（血管・リンパ管）新生関連因シグナルが病態形成に中心的役割を果たしていることが明らかになった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：循環器、血管新生、リンパ管、動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

血管新生は、個体発生・生殖過程における胚子の発育や黄体形成のほか、成熟個体においては組織障害ならびに炎症に引き続く修復（創傷治癒）過程の1つとして普遍的に認められる生理的反応である。

しかし一方で、腫瘍、増殖性糖尿病性網膜症、リウマチ様関節炎、感染症、動脈硬化症など病的にも認められ、こうした疾患では、この新生血管自体が病因であったり、

組織や臓器機能障害を招来する。このことから、病的血管新生の機序の解明と関連疾患の治療法の開発は極めて重要かつ緊急課題とされている。

一方、リンパ管の発生・機能あるいは疾患に関する分子生物学的理解は血管に比べて遅れているが、申請者らはこれまで、血管・リンパ管の発生や新生は、個々の因子を共有しつつ、そのシグナル発現の空間性およびタイミング、階層性、さらにはシグナルの修飾（変性）により進むべき方向が

制御されていることを明らかにしてきた。しかし、複雑に交錯し細胞相互の機能を変換を果たす脈管（血管・リンパ管）新生の分子シグナルの病理学的意義については、まだまだ未解明な点が多い。そのため、これら脈管（血管・リンパ管）新生のシグナルが、病態にあってどのように機能するのかを総合的に解明することが求められていた。

2. 研究の目的

脈管（血管・リンパ管）新生過程での細胞間相互の情報伝達機構の解明と、血管壁細胞やリンパ管内皮細胞の機能変化や、それを基盤とする分子病態の解明にくわえ、近未来的に対象疾患に対する新規かつ有効な治療法の確立に発展させうるデータの集積を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 久山町剱検症例の動脈硬化標本を用い、免疫組織化学的な蛋白発現と動脈硬化の進展との関連を病理形態学的に検討すると共に、培養細胞血管内皮(HUVEC)を用いた発現制御の解析を行った。

(2) 神経細胞(R28)のアポトーシス誘導培養条件下(血清飢餓、スタウロsporin添加)でのリコンビナント PEDF 添加の影響について、細胞生物学的に検討した。

(3) 川崎病としてカンジダアルカリ抽出物投与(CAWS)誘発冠動脈炎モデルを作製し、VEGFの意義を、TNFと比較対照しつつ病理組織学的に評価検討した。

(4) 虚血下肢マウスモデルにて FGF-2 遺伝子導入による下肢脱落救済過程での血管新生関連因子の動態解析に加え、スタチン投与による遺伝子動態への影響を解析した。また、シグナル経路の阻害剤存在下での HUVEC 培養により、の血管新生関連因子の発現動態への影響から情報伝達系路を検討した。

(5) HUVEC 及び線維芽細胞株(MRC5)を用いて、アンジオポエチン/Tie-2 シグナルの阻害と細胞内シグナル制御を細胞生物学的および生化学的に評価した。

(6) 非小細胞癌手術症例における podoplanin の臨床病理学的示標としての検討を行った。また、脈管シグナルとの関連を培養肺癌細胞株(発現導入群、発現ノックダウン群)を用いて細胞生物学的および腫瘍移植マウスモデルにて解析した。

4. 研究成果

(1) 免疫組織化学的検討より、動脈硬化の進展に連動して PKC (図1)、ヘムオキシゲナーゼ(HO)-1 発現が亢進することが明らかになり、両者が冠動脈硬化の防御・促進両面の因子である可能性を示唆した。1SNP 解析により脳梗塞関連遺伝子として明らかになっている apelin を加えて、VEGF による誘導の有無を HUVEC にて検討したところ VEGF 刺激は PKC、apelin の発現を誘導した。なお、HO-1 は既に VEGF で発現誘導が知られており、肥厚内膜での低酸素環境での遺伝子発現制御に、VEGF が中心的役割を果たしていることが判明した。

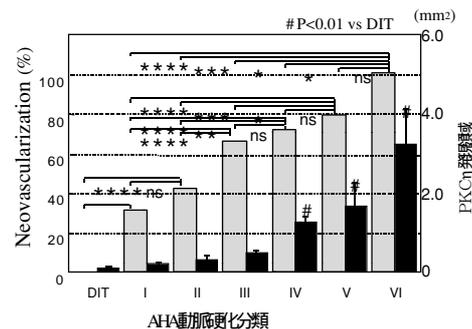


図1. 動脈硬化度と新生血管、PRKCH 発現の相関

(2) 血管新生阻害因子 PEDF は、カスパーゼ経路に非依存的に神経細胞のアポトーシスを抑制した。SiRNA やイムノサイトメトリーの解析より、PEDF は AIF 活性化を抑制して抗アポトーシス作用を発揮することが判明した(図2)。

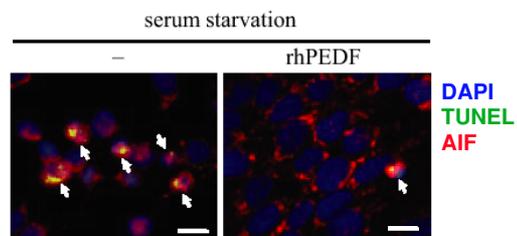


図2. PEDF による血清飢餓誘導性アポトーシスの抑制(矢印; TUNEL 陽性細胞)

(3) 川崎病動物モデルにて、血管新生因子である VEGF-A 活性中和抗体の同時投与により基底膜の破壊が軽減されたことから、既に知られている TNF と同様に病態の鍵を握る制御因子であることが判明した。また、治療標的としての VEGF-A 有効性が明らかになった。

(4) FGF-2 による機能的血管新生誘導による下肢救済には、VEGF を介した PIGF 発現の増幅が重要なことが判明した(図3)。

また、糖尿病下肢での血流改善に PDGF-B シグナルとは独立して、スタチンによる NO 産生を介した内皮細胞保護が補完的に機能していた(図4)。

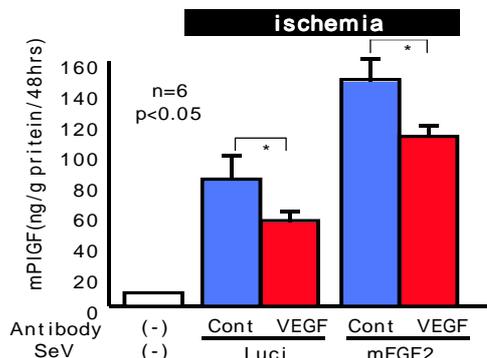


図3. 虚血下肢マウスでの FGF-2/VEGF による PIGF 発現誘導

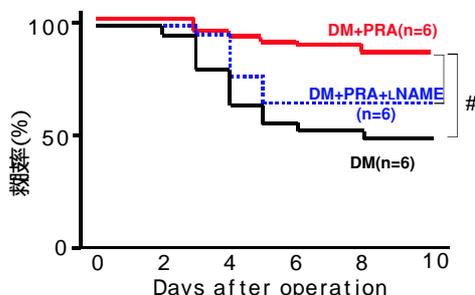


図4. 糖尿病虚血下肢モデルマウスにおけるスタチン投与と NOS 阻害剤の影響 (# p < 0.05)

(5) 血管・リンパ管の成熟過程に重要な Ang-1/Tie-2 シグナルについて、血管内皮内皮細胞での Tie-2 発現は、様々な刺激に対応して細胞内で変化する AKT と MAPK の相反するシグナルのバランスで調節されている事を解明した。さらに病態に応じて増幅される炎症性刺激などが ADAM、TIMP-2/3 の活性均衡を変化せしめることが細胞表面の Tie-2 シェディングを調節し、生じた可溶性分子が血管安定化に関わる内皮の Ang-1 シグナルを修飾する事が判明した。

(6) 肺扁平上皮癌における腫瘍辺縁部での podoplanin の低発現群は、予後不良であった (p < 0.05)。免疫組織化学および培養細胞での実験より、腫瘍細胞における podoplanin の有無が、VEGF-C 発現の変化をもたらし、結果的にリンパ節転移に大きく影響していることが明らかになった。

以上のごとく、脈管新生の分子基盤の解明と制御が、病態の治療戦略に極めて重要であることが判明した。

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9件)

Song J, Sumiyoshi S, Nakashima Y, Doi Y, Iida M, Kiyohara Y, Sueishi K. Overexpression of heme oxygenase-1 in coronary atherosclerosis of Japanese autopsies with diabetes mellitus: Hisayama study. *Atherosclerosis*. 202(2):573-81, 2009.(査読有)

Murakami Y, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Onimaru M, Nakagawa K, Kohno R, Miyazaki M, Hisatomi T, Nakamura M, Yabe T, Hasegawa M, Ishibashi T, Sueishi K. Inhibition of nuclear translocation of apoptosis-inducing factor is essential mechanism of the neuroprotective activity of pigment epithelium-derived factor in a rat model of retinal degeneration. *Am J Pathol*, 173(5):1326-38.2008.(査読有)

Miyazaki M, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Goto Y, Kohno RI, Murakami Y, Inoue M, Ueda Y, Hasegawa M, Tobimatsu S, Sueishi K, Ishibashi T. Synergistic neuroprotective effect via simian lentiviral vector-mediated simultaneous gene transfer of human pigment epithelium-derived factor and human fibroblast growth factor-2 in rodent models of retinitis pigmentosa. *J Gene Med*. 10(12):1273-81.2008.(査読有)

Takehita M, Koga T, Takayama K, Kouso H, Nishimura-Ikeda Y, Yoshino I, Maehara Y, Nakanishi Y, Sueishi K. CHFR expression is preferentially impaired in smoking-related squamous cell carcinoma of the lung, and the diminished expression significantly harms outcomes. *Int J Cancer*. 123(7):1623-30. 2008.(査読有)

Fujii T, Onimaru M, Yonemitsu Y, Kuwano H, Sueishi K. Statins restore ischemic limb blood flow in diabetic microangiopathy via eNOS/NO upregulation but not via PDGF-BB expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 294(6):H2785-91, 2008.(査読有)

Nakashima Y, Wight TN, Sueishi K. Early atherosclerosis in humans: Role of diffuse intimal thickening and extracellular matrix proteoglycans. *Cardiovasc Res*. 79(1):14-23, 2008.(査読有)

Fujii T, Yonemitsu Y, Onimaru M, Inoue M, Hasegawa M, Kuwano H, Sueishi K. VEGF function for upregulation of endogenous PIGF expression during FGF-2-mediated therapeutic angiogenesis. *Atherosclerosis*. 200(1):51-7. 2008.(査読有)

Nakashima Y, Fujii H, Sumiyoshi S, Wight TN,

Sueishi K. Early Human Atherosclerosis. Accumulation of Lipid and Proteoglycans in Intimal Thickenings Followed by Macrophage Infiltration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27(5):1159-65, 2007. (査読有)

Kubo M, Hata J, Ninomiya T, Matsuda K, Yonemoto K, Nakano T, Matsushita T, Yamazaki K, Ohnishi Y, Saito S, Kitazono T, Ibayashi S, Sueishi K., Iida M, Nakamura Y, Kiyohara Y. A nonsynonymous SNP in PRKCH (protein kinase C eta) increases the risk of cerebral infarction. *Nat Genet.* 39(2):212-217. 2007. (査読有)

[学会発表](計9件)

Murakamia Y, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Onimaru M., Nakagawa K., Kohno R, Miyazaki M, Nakamura M, Yabe T, Inoue M, Hasegawa M, Ishibashi T, Sueishi K.: Regulation of mitochondrial release of apoptosis-inducing factor is a mechanism for neuroprotective activity of pigment epithelium-derived factor in retinal degeneration. ARVO 2008 Annual Meeting (78回) (2008.4.27-5.1, Florida, U.S.A.)

Onimaru M., Sueishi K.: Metalloproteinase-mediated ectodomain shedding of Tie-2 modulates angiopoietin-1-dependent Tie-2 signaling in endothelial cells. 15th International Vascular Biology Meeting (2008.6.1-6.5, Sydney, Australia)

鈴木華子、鬼丸満穂、中川和憲、中村誠司、居石克夫: 扁平上皮癌における Podoplanin の発現と癌リンパ管新生に関する病理学的検討. 第97回日本病理学会総会(2008年5月15日-5月17日、金沢市)

竹下正文、古賀孝臣、高祖英典、吉野一郎、前原喜彦、中西洋一、居石克夫: 非小細胞肺癌における細胞周期制御分子 Aurora-A 及び CHFR 発現の臨床病理学的検討. 第97回日本病理学会総会(2008年5月15日-5月17日、金沢市)

岡野慎士、近藤晴彦、有松千絵、居石克夫: 樹状細胞(DC)療法における腫瘍血管新生抑制効果とT細胞の役割に関する病理学的検討. 第49回日本脈管学会総会(2008年10月24日-10月26日、東京)

Fujii T, Yonemitsu Y, Onimaru M., Sueishi K.: VEGF function for upregulation of endogenous PLGF expression during FGF-2-mediated therapeutic angiogenesis. XXIst Congress of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. (2007.7.6-8.12, Geneva, Switzerland)

西尾壽乗、鬼丸満穂、三浦典子、大野尚

仁、高橋 啓、鈴木和男、原 寿郎、居石克夫: 抗 VEGF-A 抗体、抗 TNF 抗体投与によるマウス CAWS 惹起冠動脈炎の発症抑制効果に関する病理検討. 第48回日本脈管学会総会(2007年10月25日-10月27日、松本市)

中島 豊、住吉真治、トーマス ホワイト、居石克夫: ヒト早期粥状硬化の発生: 肥厚内膜におけるプロテオグリカンとリポ蛋白の局在の関連、ならびにマクロファージの浸潤の機序に関する免疫組織化学的検討. 第39回日本動脈硬化学会総会・学術集会(2007年7月13日-7月14日、大阪市)

中野敏昭、鬼丸満穂、米満吉和、岡野慎士、居石克夫: 血管新生因子 VEGFs による動脈硬化進展に関する病態学的研究. 第96回日本病理学会総会(2007年3月13日-15日、大阪市)

[図書](計1件)

Sueishi K., Onimaru M., Nakashima Y. Atherosclerosis and Angiogenesis: Double face of neovascularization in atherosclerotic intima and collateral vessels in ischemic organs. *Recent Advances In Thrombosis And Hemostasis* 2008. pp374-386.2008. Eds.Tanaka K and Davie EW, Springer.

6. 研究組織

(1)研究代表者

中川 和憲 (NAKAGAWA KAZUNORI)
九州大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号: 50217668

(2)研究分担者

居石 克夫 (SUEISHI KATSUO)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号: 70108710

古賀 孝臣 (KOGA TAKAOMI)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号: 70380615

岡野 慎士 (OKANO SHINJI)
九州大学・大学病院・臨床助教
研究者番号: 10380429

鬼丸 満穂 (ONIMARU MITSUHO)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号: 00380626

(3)連携研究者

なし