

機関番号：16301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790203

研究課題名（和文） 新しい血管新生制御因子としてのアポリポ蛋白Eの機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of apolipoprotein E as a new regulator for angiogenesis

研究代表者

大久保 信孝 (OHKUBO NOBUTAKA)

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：10432791

研究成果の概要（和文）：血管新生は癌増殖などに深く関わるが、そのメカニズムは未知である。そこで我々は、角膜に色素を持たないアポE欠損マウスを作製し、硝酸銀による焼灼でおこる血管新生を観察した。その結果、アポE欠損マウスでは血管新生の伸長に障害があること、さらにアポEがVEGF非依存的に血管新生に関わることがわかった。また、アポEは血管新生の中期で見られる血液の漏出に関わることがわかった。本研究によりアポEは血管新生中期で、血管の伸長に関わることがわかった。

研究成果の概要（英文）：Angiogenesis associated with growth of a cancer is well described, but its role in the progression of the cancer is unknown. we generated the APOE deficient mouse which cornea reduced the pigment by cross-mating and observed neovascularization on the cornea of this mouse. As a result of the observation, the sprouting of new capillaries were normal, but the extension were blocked and new capillaries were then regression in APOE deficient mice. This mechanism was independent of vascular endothelial growth factor (VEGF) role. Furthermore, the vascular permeability in new capillaries were decreased in APOE deficient mice. In conclusion, our data showed ApoE concerned with the extension of new capillaries by control on the vascular permeability.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
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：基礎医学・生理学一般

キーワード：細胞運動・形態形成・細胞間相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

血管新生とは既存の血管から新たに血管が形成されることをいう。血管新生は多くの疾患に関係がある。例えば腫瘍増殖時に形成された血管新生はがん細胞の増殖速度を促進する。また糖尿病の網膜症では、網膜内に出血がくり返され失明に至る。このような血管

新生を伴う疾病では、血管新生を抑制することが治療につながる。しかし血管新生のメカニズムは未知である。

この数年間、血管新生の様々な局面において重要な役割を果たす分子の機能解析が進み、疾病治療への応用へ発展している。たとえば血管新生の重要な促進因子である血管

内皮成長因子 (VEGF) は、その阻害剤や中和抗体を用いた抗腫瘍血管新生療法の開発が進められている。(Hurwitz,H.et al. *New Engl.J.Med.*, 2004) しかし、これらの薬剤には癌腫、個体間で効果に大きな差があり、すべての癌に有効ではない。また、副作用や毒性など問題点も多い。(Avery,RL.et al. *Ophthalmology*, 2006) 他にも既知血管新生関連分子の機能解析が進んでいるが、その多くは VEGF を介した働きであり、治療の新しいターゲットとしては不十分である。現在、血管新生に関与する新規関連物質の発見が国内外で待たれている。

一方、アポ E は血漿中に存在する脂質運搬タンパク質である。これまでに動脈硬化症やアルツハイマー病との関連性が多数報告されているが、血管新生との関係については数報報告があるのみでメカニズムは全く不明のままである。

## 2. 研究の目的

アポ E 欠損マウスは高脂食を与えることで粥状動脈硬化を起こす。このとき動脈硬化巣ではマクロファージ細胞の浸潤、炎症性サイトカインの分泌、血管透過性の促進などが見られる。我々は、アポ E がマクロファージ細胞の活性化を制御し、炎症性サイトカインの分泌に関わる細胞内シグナル経路の制御に重要な役割を持つことを明らかにした。さらにアポ E が関わる細胞内シグナル伝達の詳細も明らかにしてきた。これら動脈硬化巣で見られる現象や細胞内シグナル経路は血管新生時と共通するものが多い。そこで我々は脂質運搬タンパク質であるアポリポ蛋白 E (アポ E) が血管新生に関与していると考えた。アポ E による血管新生制御能は血管新生が関与する疾病の治療につながる可能性がある。本申請ではその基盤となるアポ E が血管新生を制御するメカニズムを探った。

具体的には

(1) モデルマウスを作製し、血管新生を経時的に観察し、血管新生にアポ E が必要である事を証明した。

(2) アポ E が関与する血管新生関連因子を調べ、アポ E の作用機序の詳細について調べた。

## 3. 研究の方法

血管新生の観察に適したアポ E 欠損マウスを交配により作製し、角膜を刺激して生じた新生血管の観察を行った。さらに既知血管新生関連因子の変化をアポ E 欠損マウスで調べ、アポ E が血管新生のどの過程で重要な働きを行っているか調べた。

(1) アポ E 欠損マウスを作製 (交配による) 本研究室ではアポ E 欠損マウスを継続して飼育しているが、遺伝的背景が C57BL6 マウス

である事から角膜に色素を持ち、角膜を用いた血管新生の観察には不向きである。そこで Balb/c マウスと掛け合わせ、角膜に色素を持たないアポ E 欠損マウスの作製を行った。作成後遺伝的背景をそろえるため Balb/c マウスとバックメイトを 6 回以上行った。さらにマウスの遺伝子型 (アポ E の欠損) は PCR 法により調べた。

(2) B. 血管新生の形態学的変化の観察 交配により得られたアポ E 欠損マウスおよび対照群 Balb/c マウスを生後 6 週齢で用いた。麻酔下で角膜を硝酸銀で焼灼し血管新生を誘導した。マウス角膜を硝酸銀にて刺激したときを 0 日目とし、7 日目までの新生血管の形態学的変化を実体顕微鏡にて経時的に観察した。このとき 3 日目で新生血管の発芽があることを確認できたものを実験に用いた。さらに、アポ E タンパク質を添加したマトリゲルをアポ E 欠損マウスの角膜に注入し、同様に硝酸銀にて血管新生の誘導を行い、レスキュー出来るかどうか調べた。アポ E 欠損マウスで見られた変化がアポ E タンパク質の補充でレスキューされることが観察されれば、アポ E が血管新生に必要な事を証明した。血管新生では血管透過性の上昇による血管の不安定化、血管分枝の発芽及び伸長、血管のリモデリングなどいくつかの過程を経ることが知られており、経時変化を観察することでアポ E がどの過程で働くかを明らかにした。

(3) 血管新生関連蛋白質の変化の計測 血管新生初期では VEGF 関連因子 (VEGF や Flt-1 など) や炎症性サイトカインが血管新生刺激因子として働き、その後アンジオポエチンや MMP、PDGF の働きによって血管透過性の上昇が起こり、新生血管の伸長が続く。形態学的変化の観察から関連性の高い因子群を中心に、アポ E による既知血管新生関連分子の変化を調べた。アポ E 欠損マウス及び野生型マウスの角膜を硝酸銀刺激し、眼球あるいは角膜から mRNA および蛋白質を抽出し、RT-PCR 法、リアルタイム PCR 法、ウェスタンブロット法にて変化を調べた。

## 4. 研究成果

(1) アポ E 欠損マウスを作製 (交配による) アポ E 欠損マウスと Balb/c マウスを掛け合わせ角膜に色素を持たない ApoE ヘテロ欠損マウスを作製した。さらにこのマウスと Balb/c マウスとの掛け合わせを 6 代繰り返し最終的にアポ E 欠損マウスを作製した。以降このマウスをアポ E 欠損マウス、Balb/c マウスを対照群として次からの実験に供した。

(2) 血管新生の形態学的変化の観察

作製したアポ E 欠損マウスおよび Balb/c マウスの角膜を硝酸銀で焼灼しておこる血管新生の観察を行った。はじめに焼灼時に起

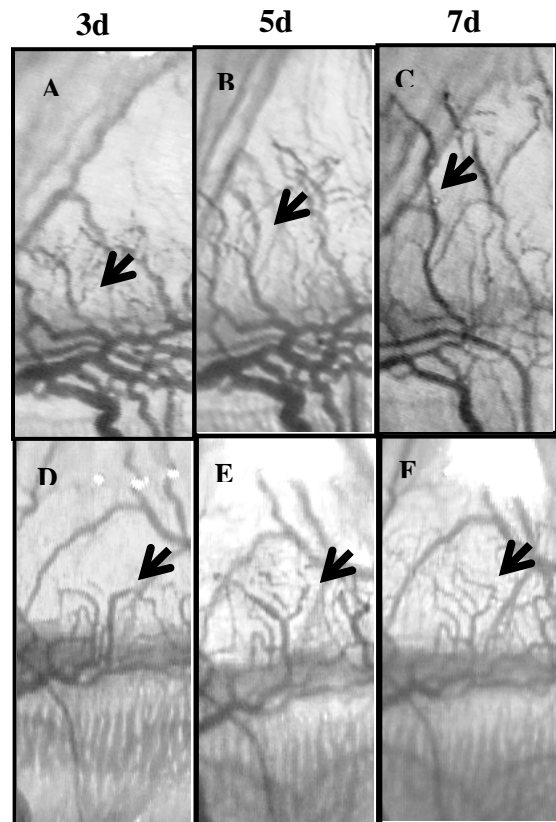
この血管新生が硝酸銀によるものであることを証明するために、Balb/c マウスの角膜焼灼を硝酸銀の濃度を 2.0、2.4、2.8mg で行った。その結果、濃度依存的に新生血管の発芽、伸長が高まった。ただ、2.8mg 以上では新生血管の数が多くなり良好な伸長の観察が難しくなるため、以降の実験では硝酸銀 2.8mg で行うこととした。

次に作製したアポ E 欠損マウスの角膜を焼灼し新生血管の伸長を経時的に観察し、Balb/c 野生型マウスと比較した (Fig.1)。その結果、新生初期である 3 日目ではアポ E 欠損マウスでも野生型マウスと同様に新生血管の萌芽がおこった (Fig.1A,D)。新生中期である 5 日目では野生型マウスでは血管伸長が順調に起こるが (Fig.1B)、アポ E 欠損マウスでは新生血管の伸長が止まる (Fig.1E)。新生後期である 7 日目では野生型マウスでは伸長した血管がしっかり太くなっていき、さらに伸張する場合もあるが、アポ E 欠損マウスでは新生血管が完全に退縮した (Fig.1C,E)。これらの結果はアポ E が血管新生中期の新生血管の伸長に重要な働きをしていることを表している。

さらに我々は、この血管新生中期の血管伸長阻害がアポ E 欠損によるものであることを証明するために、アポ E 欠損マウスの角膜焼灼後、アポ E タンパク質を含んだマトリゲルを角膜に入れた。その結果、角膜焼灼後 5 日目において新生血管はアポ E を含まないマトリゲルをおいたものに比べ、伸長していた。さらに 7 日目においても新生血管が残っていた。また、同様の実験を野生型マウスを用いて行なった。しかし、野生型マウスではアポ E の添加による血管新生の大きな変化は見られなかった。

以上の結果から、アポ E は血管新生において新生血管の伸長に重要な働きをしていることがわかった。さらに、アポ E はそれ自身が伸長因子ではなく、正常な伸長に重要であることがわかった。一般に新生血管の伸長には発芽血管の先端における血液の漏出が必要であることが知られている。そこでマウスの尾静脈より色素 (墨汁) を入れ、角膜での新生血管の観察を行った。その結果、野生型マウスに比べアポ E 欠損マウスでは血管より漏れた墨汁が少ないことがわかった。このことからアポ E が血管伸長に必要な新生血管先端の血液の漏出に関わっていることがわかった。

Fig.2 血管新生の経時的変化

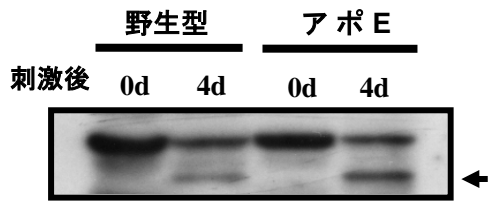


A,B,C は野生型マウス、D,E,F はアポ E 欠損マウス。 A,D は焼灼 3 日目、B,E は焼灼 5 日目、C,F は焼灼 7 日目。 矢印は新生血管を表す。

### (3) 血管新生関連蛋白質の変化

血管からの血液の漏出には既存血管の透過性の上昇が必要である。血管の透過性の上昇を行う因子として VEGF が知られている。そこで、VEGF-A165 の発現量をウエスタンブロット法にて調べた (Fig.3)。その結果野生型及びアポ E 欠損マウスの両方で血管新生誘発刺激で VEGF-A165 の発現量は増加していた。さらに刺激後 4 日目では野生型マウスに比べ、アポ E 欠損マウスでは VEGF の発現量が増加していた。以上の結果から、アポ E 欠損マウスで見られた血液の透過性の低下は VEGF の発現の低下によるものではないことがわかった。

**Fig. 3 VEGF-A165の発現**



(4) まとめ

本研究によって、血管新生においてアポ E が血管透過性を制御することで新生血管の伸長に関わることを示した。血管新生は固形がんの成長、加齢黄斑変性症、糖尿病での失明など多くの疾病に関与することが知られている。本研究の結果はこれらの疾病の治療に役立つと考えられる。

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 1 件)

Christensen DJ, Ohkubo N, Oddo J, Van Kanegan MJ, Neil J, Li F, Colton CA, Vitek MP. Apolipoprotein E and peptide mimetics modulate inflammation by binding the SET protein and activating protein phosphatase 2A. *Journal of immunology* 査読有, 186 (4) 2535-2542 2011.

[学会発表] (計 7 件)

1. 大久保信孝 アポリポ蛋白 E 由来ペプチドによる炎症制御メカニズムの解析 第 30 回免疫・感染・炎症研究会 2009 年 1 月
2. 青戸守, 大久保信孝, 鈴木洋司, 満田憲昭, 新沢康英, 辻本賀英 Essential role of p38 MAPK in caspase-independent, iPLA2-dependent cell death under hypoxia/low glucose conditions 第 36 回国際生理学会 2009 年 7 月 27 日～8 月 1 日
3. 大久保信孝, 鈴木洋司, 満田憲昭 Reelin inhibits P19 embryonal cell death during neuronal differentiation. 第 36 回国際生理学会 2009 年 8 月 1 日
4. 鈴木洋司, 大久保信孝, 寒川慶一, 阪中雅広, 満田憲昭 Effect of ginsenosides on rheological function of erythrocytes against oxidative stress. 第 36 回国際生理学会 2009 年 8 月 1 日
5. 青戸守, 大久保信孝, 鈴木洋司, 満田憲昭, 新沢康英, 辻本賀英 低酸素/低グルコース刺激によって誘導される非アポトーシス型細胞死の解析 第 61 回日本生理学会中国四国地方会 2009 年 11 月 21 日～22 日

6. 鈴木洋司, 大久保信孝, 寒川慶一, 青戸守, 満田憲昭 血液保存における赤血球レオロジー機能障害と紅蓼由来サポニンの効果、第 33 回日本バイオレオロジー学会 2010 年 6 月 3 日～4 日

7. 河野広貴, 鈴木洋司, 大久保信孝, 寒川慶一, 青戸守, 満田憲昭紅蓼由来サポニンの血液保存時の機能障害に対する保護効果 第 62 回日本生理学会中国四国地方会 2010 年 11 月 20 日～21 日

[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

大久保 信孝 (OHKUBO NOBUTAKA)

愛媛大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：10432791