

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26年 1月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590825

研究課題名（和文） 転写因子コアクチベータPGC-1 α による血管内皮遊走・血管新生制御機構研究課題名（英文） The regulation of endothelial migration and angiogenesis by transcriptional coactivator PGC-1 α

研究代表者

澤田 直樹（SAWADA NAOKI）

東京医科歯科大学・歯と骨のGCOE拠点・GCOE拠点形成特任教員

研究者番号：40343751

研究成果の概要（和文）：

重症下肢虚血は糖尿病患者の10-15%に認められ、下肢切断原因の首位を占める病態であり、有効な治療法の開発が社会的急務である。糖尿病では新たな血管を作り血流回復させるための能力（血管新生能）が損なわれていることがその背景にあるが、その機序は従来不明であった。本研究では、糖尿病により血管内皮細胞における遺伝子発現調節因子 PGC-1 α の量が持続的に上昇する結果、血管新生促進因子に対する内皮細胞の応答性が低下し、血管新生能の減弱に至ることを解明した。

研究成果の概要（英文）：

Critical limb ischemia, the leading cause of limb amputation, affects 10-15% of diabetic population, thus calling for critical needs to develop effective therapeutic means. The high prevalence of limb ischemia in diabetes is in significant part caused by the inability of diabetics to elaborate new blood vessels (the process called angiogenesis) to resume blood supply in ischemic tissues. However, the underlying mechanism for this has been largely undefined. In the present study, we demonstrated that diabetes increases the abundance of transcriptional co-activator PGC-1 α in endothelial cells, which then renders endothelial cells unresponsive to angiogenic factors, and causes diminished angiogenic capacity in diabetes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子血管病態学

1. 研究開始当初の背景

虚血性心疾患および末梢動脈閉塞性疾患は死亡・後遺症の主原因である。従来の血管形成術を代替補足する血管新生誘導療法

(Therapeutic angiogenesis)の開発に近年力が注がれている。血管内皮細胞の遊走は、血管新生および傷害血管再内皮化の鍵を握るステップである。血管内皮増殖因子(VEGF)をはじめ数多くの内皮遊走制御物質がこれまで同

定されたが、これらによる血管新生誘導療法の臨床試験はほぼ全例が不成功に終わっている。機能的に成熟分化した血管を創り出すためには、単一の血管新生制御分子やシグナル経路を標的とする従来法では不十分であり、血管内皮遊走・血管新生を「多様な遺伝子群による協調的制御プロセス」として捉え、その分子機構を解明することの重要性が認識されつつある。

転写因子コアクチベータは、転写因子にドッキングして転写装置機能を変化させることにより遺伝子発現を調節する。従来の遺伝子発現研究は個々の転写因子に着目したものが主であったが、最近では生理的刺激やホルモン応答性遺伝子発現の制御標的としてコアクチベータの役割が注目されている (*Cell* 119:157-167, 2004)。PPAR- γ -coactivator (PGC)-1 α は作用の解明が最も進んでいるコアクチベータであり、骨格筋や肝臓、褐色脂肪等の様々な代謝臓器で核内受容体やその他の転写因子と結合して、ミトコンドリア生合成・酸化リン酸化・呼吸など一連のエネルギー代謝系転写プログラムを動員するマスター分子として知られている (*Endocr Rev* 27:728-735, 2006)。

研究代表者が最近 (2008 年7 月-2009 年2 月) 所属していた Arany 博士 (Harvard Medical School, 研究協力者) の研究室では、骨格筋 PGC-1 α が虚血により発現誘導され、PGC-1 α 欠失マウスで虚血後血管新生が阻害されること、骨格筋 PGC-1 α の強制発現により血管密度が増加することを報告した (*Nature* 451:1008-1012, 2008)。骨格筋 PGC-1 α は、VEGF、angiopoietin 2、PDGF-B を含む一群の血管増殖因子を協調的に発現させることにより、成熟血管の新生を促して酸素や栄養分の効率的供給を可能とする。これは、VEGF 単独療法で誘導される透過性の高い病的な蛇行血管と対照的である。PGC-1 α は、さらに細胞エネルギー産生 (代謝) と酸素・栄養の血流を介した供給 (血管新生) をカップリングさせるユニークな役割を担うと考えられる。以上の観点から、PGC-1 α は新規血管新生創薬の有力な分子標的である。一方 PGC-1 α を全身で欠失したノックアウトマウスでは、痩せ、多動性、グルコース・インスリン軸の異常、行動日内リズムの異常など多様な表現型が認められ、骨格筋での役割と全く異なる、組織・細胞特異的でプライオトロピックな PGC-1 α の役割が想定される (*Cell* 119:121-135, 2004; *Nature* 447:477-481, 2007)。

血管増殖因子に対する内皮細胞の遊走反応性は血管新生の重要な規定因子である。糖尿病等の代謝疾患や高血圧などの病態で内皮細胞の遊走性は減弱しているが、その機序は明らかでない。内皮機能制御における PGC-1 α の

関与を示唆する所見として、最近 Monsalve、Keany らの2つのグループにより、内皮 PGC-1 α によるミトコンドリア解毒遺伝子 (Mn-SOD, thioredoxin) の発現、活性酸素抑制、抗アポトーシス作用が報告された (*FASEB J* 20:1889-1891, 2006; *Circulation* 118:1347-1357, 2008)。しかしながら PGC-1 α の内皮遊走における役割に関しては全く報告がない。さらに、抗酸化作用以外の機序により PGC-1 α が内皮機能を制御する可能性も十分想定される。

2. 研究の目的

糖尿病には高率に血管内皮機能障害が合併し、そのために一般の集団に比べ心血管病を高頻度に発症する。重症下肢虚血は糖尿病患者の10-15%に認められ、下肢切断原因の首位を占める病態であり、予後が極めて不良であるため有効な治療法の開発が社会的急務である。糖尿病患者で下肢の虚血をきたし重症化しやすい背景には、虚血に反応して新たな血管を作り血流回復させるための能力 (血管新生能) が大きく減弱していることが関与しているが、その主要な機序は明らかにされていない。虚血に陥った組織では、VEGF を中心とする血管新生促進因子が産生される。2型糖尿病患者の虚血組織では VEGF の産生は認められるものの、何らかの原因で血管が VEGF に反応しなくなっているために正常な血管新生が起こらない (VEGF 抵抗性の獲得)。従って、糖尿病における血管内皮がどのようにして VEGF 抵抗性を獲得するのかを明らかにすることが、減弱した血管新生能を回復させる有効な治療法開発への鍵であると言える。

近年、糖尿病において肝臓の PGC-1 α 発現が持続的に上昇して糖新生が促進され、高血糖の持続に繋がること、骨格筋で PGC-1 α 発現が減少することが、インスリン抵抗性を惹起する原因となることが報告されており、糖尿病の病態形成に全身各臓器の PGC-1 α が重要な役割を担う可能性が示唆される。今回我々は、内皮 PGC-1 α が糖尿病における血管新生障害をきたす主要な原因分子であると仮説し、検討を行った。

3. 研究の方法

(1) ストレプトゾシン (STZ) 負荷による1型糖尿病モデルマウス、高脂肪食負荷による2型糖尿病モデルマウス、遺伝的な2型糖尿病モデルマウス (db/db マウス、ob/ob マウス) からそれぞれ内皮細胞を採取した。また、2型糖尿病患者の末梢血から CD34 陽性細胞 (内皮前駆細胞を多く含む) を分離した。さらに糖尿病患者の末梢血単核球を培養して内皮前駆細胞に分化させた。これらの細胞

における PGC-1 α mRNA の発現を定量した。

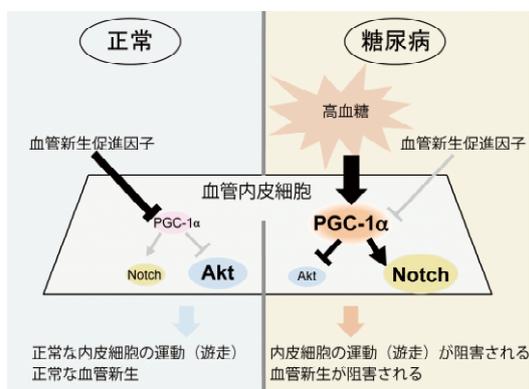
(2) 糖尿病マウス (STZ マウス、db/db マウス) 由来の培養内皮細胞、糖尿病患者由来の培養内皮前駆細胞を用いてトランスウェルによる細胞遊走アッセイを行った。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) にレトロウイルスを用いて PGC-1 α 遺伝子を強制発現させ、VEGF、スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) 刺激後の細胞遊走、細胞形態 (アクチン骨格)、細胞内 Akt/eNOS 経路活性を検討した。

(3) PGC-1 α 遺伝子を強制発現させた HUVEC における Notch 経路活性を検討した。内皮細胞遊走および ex vivo 3次元毛細管形成に対する PGC-1 α 強制発現および Notch 阻害薬の効果を検討した。

(4) 正常内皮細胞を VEGF など内皮遊走促進因子で刺激し、PGC-1 α mRNA の発現を定量した。さらに PGC-1 α ノックアウトマウスから分離した内皮細胞を用い、細胞遊走を検討した。

(5) 血管内皮特異的に PGC-1 α を強制発現させるトランスジェニックマウスを作成した。このマウスを用いて、頸動脈内皮をワイヤーで機械的に擦過傷害した後の内皮再生、背部に小さな皮膚欠損を作成した後の創傷治癒、および下肢虚血術 (左大腿動脈摘出) 後の血流回復能力を検討した。

(6) 血管内皮で PGC-1 α を特異的に欠失したマウス (内皮 PGC-1 α ノックアウトマウス) を作成した。ノックアウトマウスおよび対照野生型マウスに対して STZ による糖尿病を誘発する群・誘発しない群の計 4 群を用意し、上記 (5) で記した皮膚創傷モデル実験、および下肢虚血モデル実験を施行した。



血管内皮で PGC-1 α の働きを抑制したマウスでは

- ・糖尿病になっても創傷治癒速度が低下しない。
- ・糖尿病になっても虚血後の血流回復が正常。

【図1】本研究成果の模式図

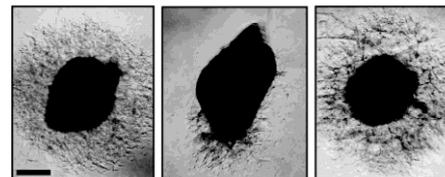
4. 研究成果 (図1に要約)

(1) 1型糖尿病モデルマウス、2型糖尿病モデルマウスから採取した内皮細胞全てにおいて、PGC-1 α mRNA 発現は非糖尿病対照マウスと比較して 1.5-3 倍に上昇していた。2型糖尿病患者由来の末梢血 CD34 陽性細胞および培養内皮前駆細胞においても同様に、健康者に比べ PGC-1 α mRNA 量が増加していた。正常マウス内皮細胞に高濃度グルコースを負荷すると PGC-1 α mRNA 量の上昇が認められることから、糖尿病においては主として高血糖が原因となって、内皮における PGC-1 α 発現が上昇すると考えられた。

(2) 糖尿病マウス由来の培養内皮細胞および糖尿病患者由来の培養内皮前駆細胞では、PGC-1 α の上昇とともに、細胞の遊走能低下を認めた。一方、(非糖尿病) 正常内皮細胞に遺伝子導入して PGC-1 α を強制的に増加させると、内皮の遊走能が低下し、VEGF、S1P など内皮遊走促進因子により通常誘導される細胞内シグナル (Akt キナーゼおよび内皮型一酸化窒素合成酵素 eNOS) の活性化や細胞の形態変化が認められず、糖尿病における VEGF 抵抗性と類似する病態を認めた。

(3) PGC-1 α を強制発現させた内皮では、遊走阻害作用を持つ細胞膜分子 Notch が活性化されることにより血管新生が抑制されることを明らかにした (図2, 3次元培養血管片からの毛細血管形成モデル)。PGC-1 α は細胞外マトリックスメタロプロテアーゼ ADAMTS10 の発現上昇を介して Notch 経路を活性化させることを明らかにした。

対照正常血管 内皮 PGC-1 α 過剰発現血管 内皮 PGC-1 α 過剰発現血管 + Notch 阻害薬



【図2】血管内皮で PGC-1 α を過剰発現するマウスでは血管からの毛細血管形成が著明に抑制されるが、Notch 阻害薬 (DAPT) により血管新生能は正常化する。

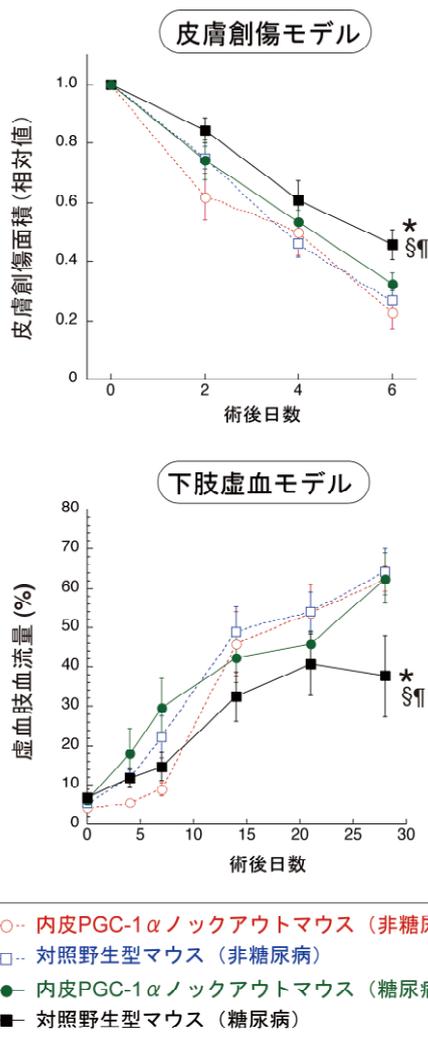
(4) (非糖尿病) 正常内皮細胞を VEGF、S1P、NO など内皮遊走促進因子で刺激すると、数時間のうちに細胞内の PGC-1 α mRNA が著明に減少した。この所見から、内皮遊走促進因子に反応して内皮細胞が遊走する際に、細胞内 PGC-1 α の量が減少することが重要な役割を果たす可能性が示唆された。実際、PGC-1 α

を欠損するマウスの内皮は、内皮遊走促進因子による刺激がない状態でも著明な遊走を呈し、PGC-1 α ノックアウトマウス血管片からの3次元毛細血管形成能も上昇していた。

(5) 血管機能制御における内皮 PGC-1 α の役割を生体内で検討するために、血管内皮における PGC-1 α を強制発現させるトランスジェニックマウスを作成した。内皮 PGC-1 α トランスジェニックマウスでは、頸動脈内皮ワイヤー傷害後の内皮再生の減弱、背部皮膚欠損作成後の創傷治癒の抑制、および下肢虚血術後の血流回復能力の減少を認めた。糖尿病モデルマウスおよび糖尿病患者においてもこれらと同様の病態が認められることから、内皮 PGC-1 α の発現上昇が糖尿病性血管障害の原因である可能性が示唆された。

(6) 糖尿病性血管障害における内皮 PGC-1 α の役割を直接検討するために、血管内皮特異的 PGC-1 α ノックアウトマウスを作成した。ノックアウトマウスの血管内皮では PGC-1 α mRNA 発現が対照野生型マウスの3割程度に減少していた。ノックアウトマウスおよび対照野生型マウスに対してSTZによる糖尿病を誘発する群・誘発しない群の計4群を用意し、皮膚創傷モデル実験、および下肢虚血モデル実験を施行した(図3)。糖尿病を発症した野生型マウスでは、非糖尿病マウスに比べ皮膚の創傷治癒力の低下を認めたが、ノックアウトマウスでは糖尿病を発症しても非糖尿病マウスと同様に健常な速度で創傷が治癒した。同様に、下肢虚血後の血流回復は糖尿病の野生型マウスで顕著に低下していたが、内皮 PGC-1 α の働きが抑えられたノックアウトマウスでは、糖尿病の有無にかかわらず正常に血流が回復した。

本研究結果から、糖尿病・高血糖によりもたらされる血管内皮 PGC-1 α の活性亢進が原因となって、血管の VEGF に対する反応性が低下し、新しく血管を作り出す力が損なわれることが解明された。内皮 PGC-1 α を標的とした糖尿病血管合併症の新たな治療法開発に道を拓く成果であると考えている。



【図3】マウスで血管内皮PGC-1 α の働きを抑制すると、糖尿病により減弱する皮膚創傷治癒能力(上)および下肢虚血後の血流回復(下)が正常化する。

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4件) ※すべて査読有り

1. Sawada N^{*,§}, Jiang A[§], Takizawa F, Safdar A, Manika A, Tesmenitsky Y, Kang K-T, Bischoff J, Kalwa H, Sartoretto J, Kamei Y, Benjamin LE, Watada H, Ogawa Y, Higashikuni Y, Kessinger CW, Jaffer FA, Michel T, Sata M, Croce K, Tanaka R, Arany Z*. Endothelial PGC-1 α mediates vascular dysfunction in diabetes.

Cell Metab, in press.

*, co-corresponding authors.

§, equal contribution

2. Sawada N, Liao JK. 2013. Rho/Rho-Associated Coiled-Coil Forming Kinase Pathway as

Therapeutic Targets for Statins in Atherosclerosis.
Antioxid Redox Signal [Epub ahead of print]

3. Takizawa F, Mizutani S, Ogawa Y, **Sawada N***.
2013. Glucose-independent persistence of PAI-1
gene expression and H3K4 tri-methylation in type
1 diabetic mouse endothelium; Implication in
metabolic memory.

Biochem Biophys Res Commun 433(1):66-72.

*, corresponding author.

4. Yamashiro K, Sasano T, Tojo K, Namekata I,
Kurokawa J, **Sawada N**, Suganami T, Kamei Y,
Tanaka H, Tajima N, Utsunomiya K, Ogawa Y,
Furukawa T. 2010. Role of transient receptor
potential vanilloid 2 in LPS-induced cytokine
production in macrophages.

Biochem Biophys Res Commun

398(2):284-289.

〔学会発表〕（計 6 件）

1. Naoki Sawada, Aihua Jiang, Fumihiko
Takizawa, Kevin Croce, Andre Manika, Yevgenia
Tesmenitsky, Kyu Tae Kang, Joyce Bischoff,
Hermann Kalwa, Thomas Michel, Yasutomi Kamei,
Laura E. Benjamin, **Masataka Sata**, Yoshihiro
Ogawa, Zolt Arany. Endothelial PGC-1alpha
mediates vascular dysfunction in diabetes.

**The American Society for Clinical
Investigation / Association of American
Physicians Joint Meeting.**

Apr. 26-28, 2013. Chicago, Illinois, USA.

2. Fumihiko Takizawa, Naoki Sawada, Aihua
Jiang, Kevin Croce, Andre Manika, Yevgenia
Tesmenitsky, Kyu Tae Kang, Joyce Bischoff,
Hermann Kalwa, Thomas Michel, Laura E.
Benjamin, **Masataka Sata**, Zolt Arany.
Endothelial PGC-1alpha mediates vascular
dysfunction in diabetes.

第 77 回日本循環器学会学術集会

2013 年 3 月 16 日、横浜市

3. Naoki Sawada, Aihua Jiang, Fumihiko
Takizawa, Kevin Croce, Andre Manika, Yevgenia
Tesmenitsky, Kyu Tae Kang, Joyce Bischoff,
Hermann Kalwa, Thomas Michel, Yasutomi Kamei,
Laura E. Benjamin, **Masataka Sata**, Shuki
Mizutani, Yoshihiro Ogawa, Zolt Arany.
Endothelial PGC-1alpha mediates vascular
dysfunction in diabetes.

**Gordon Research Conference, Vascular Cell
Biology.**

Jan. 27-Feb. 1, 2013. Ventura, California, USA.

4. Naoki Sawada, Yoshihiro Ogawa, James K.
Liao. Rac1 GTPase is a critical mediator of
endothelium- derived neurotrophic activity.

Neuro-Vascular Wiring Symposium 2012.

Nov. 12-13, 2012. Nara, Japan.

5. Naoki Sawada, Aihua Jiang, Fumihiko
Takizawa, Kevin Croce, Andre Manika, Yevgenia

Tesmenitsky, Kyu Tae Kang, Joyce Bischoff,
Hermann Kalwa, Thomas Michel, Yasutomi Kamei,
Laura E. Benjamin, **Masataka Sata**, Shuki
Mizutani, Yoshihiro Ogawa, Zolt Arany.
Endothelial PGC-1alpha mediates vascular
dysfunction in diabetes.

**ATVB Early Career Investigator Award
competition, American Heart Association
Scientific Sessions 2012.**

November 3-7, 2012. Los Angeles, California,
USA.

6. Naoki Sawada, Aihua Jiang, Fumihiko
Takizawa, Kevin Croce, Andre Manika, Yevgenia
Tesmenitsky, Kyu Tae Kang, Joyce Bischoff,
Hermann Kalwa, Thomas Michel, Yasutomi Kamei,
Laura E. Benjamin, **Masataka Sata**, Shuki
Mizutani, Yoshihiro Ogawa, Zolt Arany.
Endothelial PGC-1alpha is highly responsive to
metabolic stress and serves as a key determinant
of angiogenic response.

Symposium: Young Scientist Initiative Program

**The 19th Scientific session. Japanese
Vascular Biology and Medical Organization.**

Dec. 9, 2011. Tokyo, Japan.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤田直樹 (SAWADA NAOKI)

東京医科歯科大学・歯と骨の GCOE・

拠点形成特任教員（特任講師）

研究者番号：40343751

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

佐田政隆 (SATA MASATAKA)

徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究・
教授

研究者番号：80345214

(4) 研究協力者

Zolt Arany

Beth Israel Deaconess Medical Center,

Harvard Medical School

Associate Professor of Medicine