

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 19 日現在

機関番号：32653

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15449

研究課題名(和文) 心臓間質細胞の抗血管新生作用の原因遺伝子Xの発現制御分子機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of molecular mechanisms of angiogenesis inhibitory function of heart interstitial cell-derived factor

研究代表者

松浦 勝久 (Matsuura, Katsuhisa)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70433993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：これまで特性の多くが不明であったヒト心臓線維芽細胞が、共培養した様々なヒト血管内皮細胞のネットワーク形成を抑制することを見出した。これは心臓線維芽細胞が血管新生抑制作用をその特性として有することを示唆するものであり、ヒト心臓線維芽細胞の血管新生抑制作用の責任因子として、LYPD1の同定に成功した。LYPD1タンパク量を添加すると、心臓線維芽細胞がなくても血管内皮細胞のチューブ状構造を抑制したことから、LYPD1タンパク自体に血管新生抑制作用があると考えられた。本成果は、再生医療のみならず、LYPD1の血管新生抑制作用を抑えることで血管新生を誘導する新たな治療法開発など幅広い展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：We have found that human cardiac fibroblasts, which were unknown in many of the characteristics, inhibit the network formation of various human vascular endothelial cells in co-culture condition. This suggests that cardiac fibroblasts possess angiogenesis inhibitory function as a phenotype and we have succeeded in identifying LYPD1 as a responsible factor for the angiogenesis inhibitory action of human cardiac fibroblasts. Since endothelial cell network formation and tube formation were also attenuated in the presence of recombinant LYPD1 even without the existence of cardiac fibroblasts, LYPD1 protein has an angiogenesis inhibitory function. The findings in the present study are expected not only for regenerative medicine but also the development of new therapeutic methods to induce angiogenesis by suppressing angiogenesis inhibitory action of LYPD1.

研究分野：循環器内科

キーワード：血管新生抑制因子 線維芽細胞 心臓

1. 研究開始当初の背景

組織工学を用いた3次元組織は、疾患・創薬研究への応用も世界中で進められている。生体の組織は、様々な構成細胞からなる共同体であり、各構成細胞の特性理解とともに、その細胞間の相互作用を理解することは、より機能的な再生医療用および疾患・創薬研究用組織の開発のみならず生体の組織・臓器の特性の理解にもつながるものと考えられ、我々は細胞シート工学を基盤に、組織・臓器構築を目指した研究開発を進めている。

生体の心臓には、実質細胞としての心筋細胞だけでなく、間質には線維芽細胞および血管の細胞が存在し、心臓で最も多く存在すると言われている細胞が線維芽細胞である。細胞シート工学を用いて心筋組織を構築する上でも、心筋細胞とともに線維芽細胞が不可欠であり、さらに3次元組織の構築には、組織を栄養する血管網も不可欠である。線維芽細胞は、様々な組織・臓器に存在しており、その由来による機能的特性の差異を明らかにすることは、より生体に近い組織構築を可能にするものであり、ひいては心臓の特性をより深く理解することになると考えられる。

2. 研究の目的

ヒト心臓線維芽細胞とヒト皮膚線維芽細胞の血管新生能を、ヒト血管内皮細胞との共培養によって比較検討し、得られた機能的差異の分子機序を解析することで、心臓線維芽細胞の特性を明らかにすることを目的に以下の検討を行った。

3. 研究の方法

1) ヒト心臓由来線維芽細胞ないしヒト皮膚由来線維芽細胞を、様々なヒト血管内皮細胞と共培養を行い、線維芽細胞の違いによる血管内皮細胞のネットワーク形成を抗 CD31 抗体での染色およびハイコンテツ共焦点レーザー顕微鏡解析で定量評価する。

2) ヒト心臓由来線維芽細胞およびヒト皮膚線維芽細胞より RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行い、心臓線維芽細胞で発現が高く、細胞外に発現する遺伝子を抽出する。抽出された遺伝子の心臓線維芽細胞での発現を siRNA の遺伝子導入によって抑制し、ヒト血管内皮細胞と共培養することで、心臓線維芽細胞の血管内皮細胞のネットワーク形成に影響する因子を同定する。

3) 上記検討で同定された遺伝子の上流に Flag タグを挿入した発現ベクターを作成し、cos7 細胞に遺伝子導入し、細胞抽出液より抗 Flag タグ抗体マグネットビーズを用いてリコンビナントタンパクを精製する。得られたリコンビナントタンパクを、Matrigel 上で培養されたヒト血管内皮細胞に添加し、血管内皮細胞の管腔形成に及ぼす影響を評価する。

4) 新生仔および成体ラットより心臓および皮膚線維芽細胞を単離し、2) で同定された因子の発現を定量的 RT-PCR にて評価すると

もに、心臓由来 CD31 陽性血管内皮細胞と共培養し、心臓線維芽細胞の血管内皮ネットワーク形成を評価する。

5) 発生段階から成体に至るまでのラット心臓における、2) で同定された因子の発現を定量的 RT-PCR にて評価する。

6) ラット心筋梗塞モデル心臓における、2) で同定された因子の発現を定量的 RT-PCR にて評価する。

4. 研究成果

ヒト臍帯静脈血管内皮細胞やヒト心臓微小血管内皮細胞およびヒト大動脈血管内皮細胞をヒト皮膚線維芽細胞と共培養すると、いずれも血管内皮細胞の密なネットワークが形成されるのに対し、これらの血管内皮細胞をヒト心房および心室由来心臓線維芽細胞と共培養すると、血管内皮細胞のネットワーク形成が抑制される様子が観察された(図1)。このことは、心臓線維芽細胞が、血管新生に対し抑制的に働いていることを示唆するものであり、「ヒト心臓線維芽細胞には血管新生抑制因子が高発現している」との仮説をたてた。ヒト皮膚線維芽細胞に比して、ヒト心房由来線維芽細胞およびヒト心室由来線維芽細胞で発現が高く、細胞外ないし細胞膜のタンパク質をコードする遺伝子をマイクロアレイ解析にて選定し、さらに定量的 RT-PCR 法にて発現レベルを再評価した結果、3 つの候補遺伝子が残った。siRNA を用いてこれらの遺伝子発現を抑制したヒト心臓線維芽細胞と、ヒト臍帯静脈血管内皮細胞を共培養し、心臓線維芽細胞の血管内皮細胞ネッ

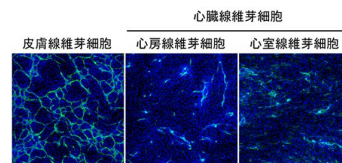


図1: 緑で血管内皮細胞のネットワーク形成を、青で核を示す。ヒト線維芽細胞とヒト臍帯静脈血管内皮細胞との共培養実験。皮膚線維芽細胞との共培養では、血管内皮細胞のネットワーク形成が豊富に観察されるが、心臓線維芽細胞との共培養では、血管内皮細胞ネットワーク形成は少ない。

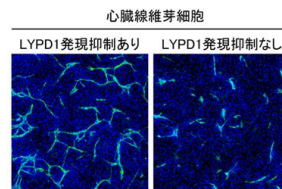


図2: 緑で血管内皮細胞のネットワーク形成を、青で核を示す。ヒト心臓線維芽細胞とヒト臍帯静脈血管内皮細胞との共培養実験。心臓線維芽細胞におけるLYPDI発現を抑制すると、血管内皮細胞のネットワーク形成が認められるようになる。

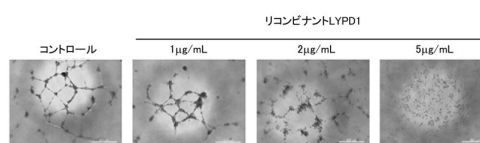


図3: Matrigel 上での血管内皮細胞の管腔形成画像。スケールバー: 500µm。リコンビナントLYPDIを添加すると、容量依存的に血管内皮細胞の管腔形成が抑制される。

トワーク形成における各遺伝子の関与を評価したところ、LYPDI の発現を抑制した時の

み血管内皮細胞ネットワーク形成が回復した(図 2)。以上より、ヒト心臓線維芽細胞はLYPD1 を介して血管内皮細胞ネットワーク形成を抑制していると考えられた。

次に、LYPD1 タンパク自体の血管新生に対する影響を評価した。ヒト皮膚線維芽細胞との共培養によるヒト臍帯静脈血管内皮細胞の豊富なネットワーク形成は、作製したリコンビナントLYPD1 の添加により抑制された。さらにリコンビナントLYPD1 を、マトリゲル中で培養された血管内皮細胞に添加すると、容量依存的に血管内皮細胞の管腔形成が抑制されることも明らかとなった(図 3)。以上より、LYPD1 タンパク自体に血管新生抑制作用があると考えられた。

次に、生体心臓におけるLYPD1 の血管新生抑制能解析への応用に向け、新生仔および成体ラットより心臓および皮膚線維芽細胞を単離し、LYPD1 の発現を評価したところ、新生仔および成体いずれにおいても心臓線維芽細胞は、皮膚線維芽細胞に比してLYPD1 の発現が有意に高かった。また心臓由来 CD31 陽性血管内皮細胞との共培養において、新生仔および成体心臓由来心臓線維芽細胞は、血管内皮細胞のネットワーク形成を著しく抑制することが観察されたことから、心臓線維芽細胞は、種に依らずLYPD1 高発現を介した血管新生を抑制する特性を有していることが示唆された。

LYPD1 は、発生 E15 以降の心臓において、すでに高発現することが確認され、また心筋梗塞後心臓においては、一過性にLYPD1 の発現は低下するものの、梗塞1週間後にはLYPD1 発現レベルは健常時と同等の高発現に復することも明らかとなった。これらの結果は、心臓の間質細胞は元来血管新生に対し抑制的に作用する特性を有しており、また虚血性心疾患において新生血管を要する状況においても十分な血管新生が生じえず、病態の悪化を来している可能性を示唆するものである。

心臓線維芽細胞の特性としての血管新生抑制作用を明らかにし、新規血管新生抑制因子LYPD1 を同定した本研究は、再生医療用および疾患・創薬研究用心筋組織構築に貢献するのみならず、LYPD1 発現・機能抑制による虚血性心疾患に対する血管新生治療につながる事が期待される。

#### 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)

Masuda S, Matsura K, Shimizu T. Inhibition of LYPD1 is critical for endothelial network formation in bioengineered tissue with human cardiac fibroblasts. *Biomaterials*. 2018 Jun;166:109-121 査読有

〔学会発表〕(計7件)

増田信奈子 心臓線維芽細胞は FactorX を介して血管内皮ネットワーク形成を抑制する 第17回日本再生医療学会総会 2018年

増田信奈子 心臓線維芽細胞は FactorX を介して血管内皮ネットワーク形成を抑制する 2017年度生命科学系学会合同年次大会 2017年

阪本覚 Cardiac fibroblasts negatively regulate angiogenesis through their secreted novel anti-angiogenic factor in vitro and in vivo American Heart Association Scientific Session 2017年

松浦勝久 再生医療用組織形成に不可欠な間質細胞の組織特異性 幹細胞の培養法・培養工学のためのコンソーシアム 第二回シンポジウム 2017年

松浦勝久 心筋再生研究を通して見えてきた心疾患の新たな機序と治療戦略 第40回未来医学研究大会 2017年

松浦勝久 心臓間質細胞の特性解析を通じた心筋再生医療開発 第16回日本再生医療学会総会 2017年

阪本覚 Cardiac fibroblasts inhibit angiogenesis in nature through the novel anti-angiogenic responsible gene The 81st Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society 2017年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称:LYPD1 阻害剤及びそれを用いた生体組織の製造方法

発明者:松浦勝久、増田信奈子、阪本覚、清水達也

権利者:学校法人東京女子医科大学

種類:特許

番号:特願 2017-042200

出願年月日:2017年3月6日

国内外の別:国内

名称:血管新生抑制剤及び血管新生抑制剤のスクリーニング方法

発明者:松浦勝久、増田信奈子、阪本覚、清水達也

権利者:学校法人東京女子医科大学

種類:特許

番号:特願 2018-010489

出願年月日:2018年1月25日

国内外の別:国内

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.twmu.ac.jp/univ/news/detail.php?kbn=1&ym=201803&cd=523>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松浦 勝久 (Matsuura Katsuhisa)  
東京女子医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：70433993

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

増田 信奈子 (Masuda Shinako)  
東京女子医科大学・医学部・助教  
研究者番号：30342851

### (4) 研究協力者

阪本 覚 (Sakamoto Satoru)