

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590859
 研究課題名（和文） Notchシグナル制御による血管新生、再生療法の開発
 研究課題名（英文） Development of angiogenetic and regenerative therapy with regulation of Notch signaling
 研究代表者
 竹下 享典（Kyosuke Takeshita）
 名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教
 研究者番号：70444403

研究成果の概要：血管新生は既存の血管から新たな血管枝が分岐して血管網を構築する生理的現象であり、その制御は、虚血をきたした組織の血流の改善、あるいはがん細胞増殖の抑制のために重要な治療ポイントである。本研究では、受精卵から成体になる過程で重要な役割を果たすことで知られる Notch シグナルが、成体の虚血組織の血管新生においても重要であることを、細胞内シグナル解析および遺伝子改変マウスを用いて明らかにした。

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
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：血管新生、血管内皮細胞、Notchシグナル

1. 研究開始当初の背景

(1)Notch 受容体は線虫からヒトに至るまで種を超えて保存された1回膜貫通型受容体である。Notch シグナルの生理的作用はショウジョウバエ、ゼブラフィッシュ、マウスの個体発生において精力的に解析され、多くの臓器で細胞間相互作用を介して、細胞運命の決定を行い、殊に神経、体節形成に必須であること報告されている。しかし、これまで、哺乳類の血管発生における Notch シグナルの役割については議論が分かれるところであった。(2)申請者は血管内皮特異的 Notch1 欠損マウス(ecNotch1^{-/-})を、Cre-loxp システムを用いて作製し、その胎児における血管発生について検討した(Takeshita *Circulation* 2005)。同欠損

マウスは胎生期初期に死亡し(E11.5)、発育障害、卵黄嚢、胎児における血管リモデリングの異常、胎盤の胎児由来の血管新生障害、アポトーシスをきたした内皮細胞、神経細胞を多く認めた。これらの検討により、血管内皮細胞の Notch1 は血管リモデリング、内皮細胞の生存を制御して血管発生に重要な役割を果たしていると考えられた。

(3)近年、Notch シグナルは、胎生期のみならず成体における役割が注目を集めている。Notch シグナルは成体の血液、神経、腸管上皮の幹細胞の維持、骨格筋の再生を制御しているという知見もあり、成体の血管新生への関与、そして新しい血管新生の制御ポイントとして大いに期待される。

2. 研究の目的

(1)高齢者人口の増加、食生活の欧米化および身体活動低下などの変化に伴って心筋梗塞や狭心症など虚血性心疾患、慢性閉塞性動脈硬化症患者は増加の一途にある。経皮的カテーテルインターベンション、外科的バイパス手術が発達した現状にもかかわらず治療困難な虚血性疾患症例は多く、それに対して、虚血部の周辺から血管新生、および側副血行の発達を促し、組織障害や壊死を軽減させる新しい治療、血管新生療法に我々は取り組んでいる。血管新生療法には、サイトカイン、薬剤、細胞治療、遺伝子治療など多くの方法が試みられてきたが決定的なものは未だない。このことは血管新生についての理解が不十分であり、これまで検討のない新しい機序を探求する必要があることを示している。

(2)申請者は個体発生においては細胞運命を決定して神経発生、体節形成を司る一方、成体においては体性幹細胞維持など多彩な作用を持つ Notch シグナルが血管発生においても重要であることを明らかにした(Takeshita et al. Circulation 2005)。本研究では虚血に反応して起こる血管新生における Notch シグナルの役割と、生体内における Notch シグナルの活性化機構を明らかにすることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1)Notch 遺伝子改変マウスの下肢虚血モデルの解析

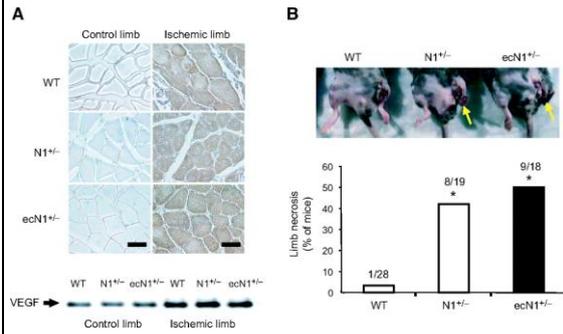
Notch1^{flox/flox} mouse と Tie2-Cre recombinase transgenic mouse を交配して、内皮特異的 Notch1 ノックアウトマウス(ecNotch1^{-/-})と同ヘテロノックアウトマウス(ecN1^{+/-})を作製した。ecNotch1^{-/-}は胎生期致死(E11.5)、血管リモデリングの異常、内皮細胞にアポトーシスがみられた。しかし、ecN1^{+/-}は表現型に異常を認めなかった。そこで、対照マウス、ecNotch1^{+/-}、全身 Notch1 ヘテロノックアウトマウス(N1^{+/-})、全身 Notch4 ノックアウトマウス(N4^{-/-})において下肢虚血モデルを作製して下肢血流の回復を下肢の脱落の有無、Laser Doppler Image (LDI)、毛細血管密度で解析した。

(2)ヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)における Notch1 受容体の活性化機構の解明
HUVECを血管内皮増殖因子(VEGF)で刺激してNotchシグナル関連分子の発現、 γ -secretase 活性を検討する。同様の検討をconstitutive active Akt、dominant negative Aktを遺伝子導入して行う。

4. 研究成果

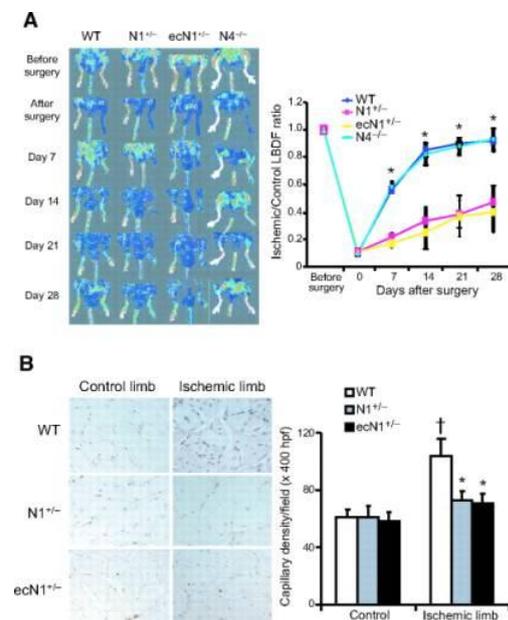
(1)片側下肢虚血モデルを作製したところ、虚血肢における VEGF の誘導は対照マウスでも ecNotch1^{+/-}、N1^{+/-}でも同様であったが(A)、壊死による脱落は両ミュータントマウスで有意に多かった。

図1 虚血肢の VEGF 誘導と壊死



(2)下肢血流の回復を LDI で測定したところ対照マウスと Notch4 ミュータントマウスでは良好な回復を示したが、Notch1 ミュータントマウスでは有意に低下していた。

図2 虚血肢の血流回復と毛細血管密度



(3)虚血肢の新生血管内皮において Notch1(A)とその下流の転写因子 Hes-1 の発現(B)が増加していた。VEGF の刺激に対して対照マウスと Notch1 ミュータントマウスの動脈片よりの血管内皮遊走能を検討したところ、ミュータントマウスにおいてのみ低下を認めた(C)。以上より VEGF の下流で Notch1 は血管新生作用について重要であると考えられた。

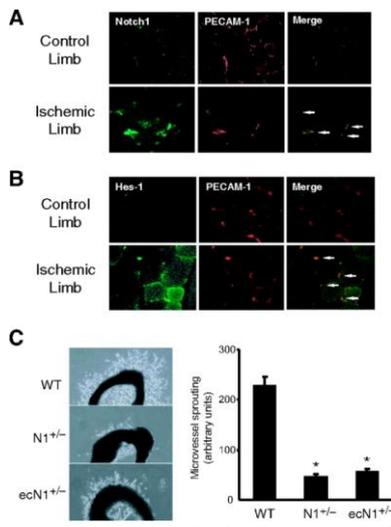


図3 新生毛細血管の Notch シグナル活性化と動脈片における血管内皮遊走

(4) HUVEC を VEGF で刺激すると短時間で Akt の活性化と平行して Notch1 は活性化した (A)。この活性化は PI-3kinase-Akt の阻害薬、dominant negative Akt の transfection で抑制され、active Akt の transfection で活性化した。

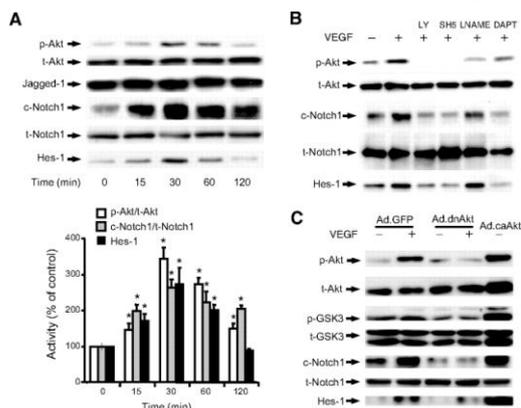


図4 VEGF による Notch シグナルの活性化

(5) HUVEC を VEGF で刺激すると γ -secretase 活性は増加した (A)。この活性化は PI-3kinase-Akt (A) と γ -secretase (B) の阻害薬で抑制された。これは Notch1 の活性化に関連していた (C)。 γ -secretase 活性を反映する presenilin1 の活性化は dominant negative Akt の transfection で抑制され、active Akt の transfection で促進された。

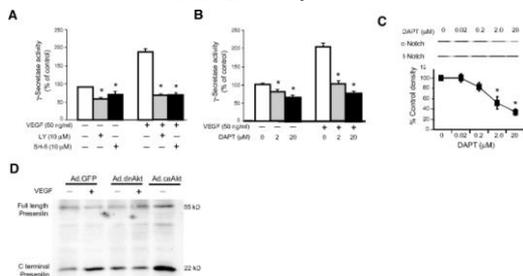


図5 VEGF による血管内皮 γ -secretase 活性化

(6) HUVEC を VEGF で刺激すると細胞数(A)、

thymidine 取り込み(B)、接着能(C)、遊走能(D) が促進されたが、これは γ -secretase 阻害薬の濃度依存性に抑制された。

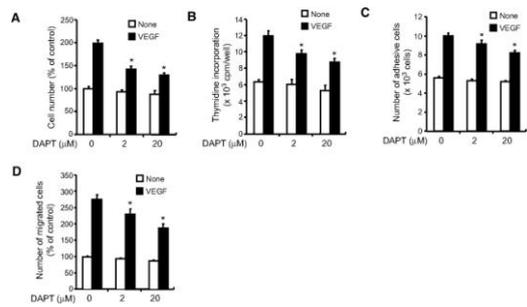


図6 VEGF による血管内皮の活性化と薬理的 Notch 阻害の影響

(7) 無血清下で HUVEC を VEGF で刺激するとアポトーシスは抑制された (A)。しかし γ -secretase 阻害薬的作用により濃度依存性に caspase3 は活性化し (B)、アポトーシスは促進された (A)。

Matrigel 上での管腔形成は VEGF 刺激下で促進されるが、 γ -secretase 阻害薬で抑制された (C, D)。

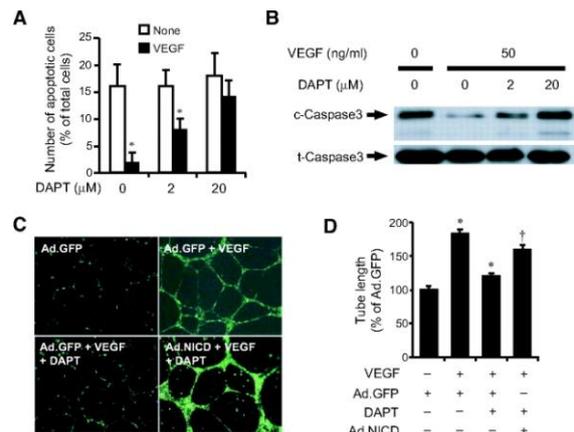


図7 Notch シグナルのアポトーシスへの影響と Matrigel 管腔形成への影響

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 12 件)

① Kondo M, Shibata R, Miura R, Shimano M, Kondo K, Li P, Ohashi T, Kihara S, Maeda N, Walsh K, Ouchi N, Murohara T.

Caloric restriction stimulates revascularization in response to ischemia via adiponectin-mediated activation of endothelial nitric-oxide synthase. J Biol Chem. 2009 Jan 16;284(3):1718-24. 査読有

②Kondo K, Shintani S, Shibata R, Murakami H, Murakami R, Imaizumi M, Kitagawa Y, Murohara T. Implantation of adipose-derived regenerative cells enhances ischemia-induced angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Jan;29(1):61-6. 査読 有

③Kato MF, Shibata R, Obata K, Miyachi M, Yazawa H, Tsuboi K, Yamada T, Nishizawa T, Noda A, Cheng XW, Murate T, Koike Y, Murohara T, Yokota M, Nagata K. Pioglitazone attenuates cardiac hypertrophy in rats with salt-sensitive hypertension: role of activation of AMP-activated protein kinase and inhibition of Akt. *J Hypertens*. 2008 Aug;26(8):1669-76. 査読 有

④Shimano M, Shibata R, Tsuji Y, Kamiya H, Uchikawa T, Harata S, Muto M, Ouchi N, Inden Y, Murohara T. Circulating adiponectin levels in patients with atrial fibrillation. *Circ J*. 2008 Jul;72(7):1120-4. 査読 有

⑤Shimano M, Inden Y, Tsuji Y, Kamiya H, Uchikawa T, Shibata R, Murohara T. Circulating homocysteine levels in patients with radiofrequency catheter ablation for atrial fibrillation. *Europace*. 2008 Aug;10(8):961-6. 査読 有

⑥Shibata R, Numaguchi Y, Matsushita K, Sone T, Kubota R, Ohashi T, Ishii M, Kihara S, Walsh K, Ouchi N, Murohara T. Usefulness of adiponectin to predict myocardial salvage following successful reperfusion in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol*. 2008 Jun 15;101(12):1712-5. 査読 有

⑦Shibata R, Skurk C, Ouchi N, Galasso G, Kondo K, Ohashi T, Shimano M, Kihara S, Murohara T, Walsh K. Adiponectin promotes endothelial progenitor cell number and function. *FEBS Lett*. 2008 May 14;582(11):1607-12. 査読 有

⑧Urano T, Ito Y, Akao M, Sawa T, Miyata K, Tabata M, Morisada T, Hato T, Yano M, Kadomatsu T, Yasunaga K, Shibata R, Murohara T, Akaike T, Tanihara H, Suda T, Oike Y. Angiopoietin-related growth factor enhances blood flow via activation of the ERK1/2-eNOS-NO pathway in a mouse hind-limb ischemia model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008 May;28(5):827-34. 査読 有

⑨竹下享典 加齢と血管新生能 血管医学 2008, 9(1): 57-63 査読 無

Yamamoto K, Kojima T, Takeshita K, Matsushita T, Takamatsu J. Pitavastatin attenuates the upregulation of tissue factor in restraint-stressed mice. *Thromb Res*. 2007; 120(1):143-4 査読 有

⑩ Takeshita K, Satoh M, Ii M, Silver M, Limbourg FP, Mukai Y, Rikitake Y, Radtke F,

Greidly T, Losordo DW, Liao JK. Critical role of Endothelial notch1 Signaling in Postnatal Angiogenesis. *Circ Res*. 2007 ; 100(1); 70-78 査読 有

⑪ Satoh M, Matter CM, Ogita H, Takeshita K, Wang CY, Dorn GW 2nd, Liao JK. Inhibition of Apoptosis-regulated Signaling Kinase-1 and Prevention of Congestive Heart Failure by Estrogen. *Circulation*. 2007 Jun 26;115(25):3197-204. 査読 有

⑫ 竹下享典 心筋の線維化と Plasminogen activator inhibitor-1 日本血栓止血学会誌 18/1, 66 2007 査読 無

[学会発表] (計 8件)

① Kikuchi R, Takeshita K, Aoyama T, Murohara T. Pitavastatin Augments Angiogenic Activity in Human Endothelial Cells via Notch Signal Activation. The 81th American Heart Association conference. New Orleans, Louisiana, USA, 9-13 November, 2008 査読 有

② Takeshita K, Kikuchi R, Aoyama T, Murohara T. 動脈硬化予防の新しいアプローチ—基礎研究から新薬開発の可能性—第17回日本心血管インターベンション学会ファイアサイドシンポジウム「虚血性心疾患の再発予防治療の up to date」2008年7月3日名古屋 査読 有

③ Aoyama T, Takeshita K, Liao JK, Murohara T. Gamma Secretase Inhibitor Reduces diet-induced Atherosclerosis in Mice by Inhibiting the Notch signaling pathway in inflammatory cells. Annual Meeting of Japan regeneration Society. Nagoya, Japan, 13-14 March, 2008. 査読 有

④ Takeshita K, Aoyama T, Murohara T. Pitavastatin Augments Angiogenic Activity in Human Endothelial Cells via Notch Signal Activation. Annual Meeting of Japan Circulation Society. Fukuoka, Japan, 28-30 March, 2008. 査読 有

⑤ Takeshita K, Aoyama T, Murohara T. Notch Signal Is Involved in Intimal thickening and Macrophage Accumulation. **Young Investigator Awards Competition Finalist**. Annual Meeting of Japan Circulation Society. Fukuoka, Japan, 28-30 March, 2008. 査読 有

⑥ Takeshita K Critical Role of Vascular Smooth Muscle Notch1 in Mediating Neointima Formation. The 8th US-JAPAN-ASIA Dialogue on Cardiovascular Diseases: Grand Rounds with Brigham & Women's Hospital Tokyo, Japan, 25 August 2007 査読 有

⑦Aoyama T, Ishii H, **Takeshita K**, Matsubara T, Murohara T. Silent brain infarction predicts cardiovascular events and mortality in long-term hemodialysis patients. The 80th American Heart Association conference. New Orleans, Florida, USA, 7-10 November, 2007 **査読有**

⑧ Aoyama T, **Takeshita K**, Liao JK, Murohara T. Gamma Secretase Inhibitor Reduces diet-induced Atherosclerosis in Mice by Inhibiting the Notch signaling pathway in inflammatory cells. The 80th American Heart Association conference. Orlando, Florida, USA, 7-10 November, 2007 (Poster competition finalist) **査読有**

(1)研究代表者

竹下 享典 (Kyosuke Takeshita)
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教
研究者番号：70444403

(2)研究分担者

沼口 靖 (Yasushi Numaguchi)
名古屋大学・医学部・寄附講座准教授
研究者番号：90378224
新谷 理 (Satoshi Shintani)
名古屋大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：20309777
柴田 怜 (Rei Shibata)
名古屋大学・大学院医学系研究科・特任助教
研究者番号：70343689
室原 豊明 (Toyoaki Murohara)
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：90299503