

平成21年6月1日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790979
 研究課題名 (和文) 急性循環障害時におけるトロンボキサン A2 の血管新生増強メカニズムの解析
 研究課題名 (英文) Roles of a Thromboxane A2 Receptor, TP signaling in acute ischemia and SDF-1, VEGF expression
 研究代表者
 天野 英樹 (AMANO HIDEKI)
 北里大学・医学部・助教
 研究者番号：60296481

研究成果の概要：

NieらはThromboxane A2が血管内皮細胞のTP受容体に作用し血管内皮細胞の遊走を促進させ腫瘍の血管新生及び転移形成を促進させると報告した(Biochemi. Biophy. Rese. Com 2000)。しかしながら、下肢虚血モデルを用いてThromboxane A2が血小板の凝集を増強させたと同時に血管新生を促進させた報告例はない。本実験で申請者は血小板凝集能の差のあるTP+/+、TP-/-で下肢虚血モデルを作成し、虚血部位の血管新生部位に血小板由来のVEGFとSDF-1が骨髄に作用しCXCR4+VEGFR1+造血前駆細胞を虚血組織に動員させ虚血の改善を増強することを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	450,000	3,650,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：胸部外科学

キーワード：トロンボキサン A2, 血管新生, SDF-1, VEGF, 血小板

1. 研究開始当初の背景

近年日本の食生活は欧米化に伴い虚血性心疾患や末梢動脈疾患が増加している。これらの疾患に対する治療は著しく進歩しており、経皮的動脈形成術やバイパス術などの血行再建治療体系がほぼ確立されているもののこれら疾患の中には血行再建が内科的にも外科的にも困難な例がある。こうした患者群に対す

る新しい治療法として血管新生療法が注目されてきている。

1971年にFolkman(*Nature 1970*)により血管新生の概念が報告されて以来、このフィールドは今までに数多くの研究者により探求されてきた。後にFolkmanは進行癌の患者さんに血小板の増加が認め、それが癌の浸潤と発育と相関関係があると報告した(*Lancet 1998*)。

巨核球から血小板に分化するときに様々な血管内皮増殖因子(Vascular Endothelial Growth Factor(VEGF)などのサイトカイン類及びケモカイン(Stromal derived factor-1)が分泌される。申請者天野はマウスの下肢虚血モデルにおいて巨核球から血小板に分化を促す因子であるThrombopoietin(TPO)が血小板数の増加を促進かつ虚血の血流を改善させ、血小板が血管新生として重要な因子であることを確認した(*Circulation Research* 2005)。

2. 研究の目的

血小板には様々な血管新生促進因子やケモカインが含まれており、主に血管内皮障害部位に凝集しその際に放出される。Thromboxane A2はこの血小板が凝集する際に関与するリピッドメディエータである。我々は虚血状態に陥ると血小板からVEGF,SDF-1が放出され、非内皮のCXCR4+VEGFR1+造血前駆細胞(Hemangiocyteと命名)が、虚血部位に動員され虚血部の血管再生に不可欠であることを明らかにした(*Nature Medicine* 2006)。そこで、血小板凝集能に差があるワイルドタイプマウス(以下TP+/+)及びThromboxane A2受容体欠損マウス(以下TP-/京都大学医学部薬理学成宮周教授及び小野薬品から入手)で下肢虚血モデルを作成し1.虚血筋組織部分における血管新生効果の違いの検討、2.その際の血管新生因子なのであるVEGF、SDF-1とCXCR4+VEGFR1+造血前駆細胞の関係を探求する。

3. 研究の方法

1.血小板凝集の差異による虚血改善効果の検討

先頁で記したが、血小板数には差がないが、血小板凝集能に差があるTP+/+及びTP-/で左大腿動脈を結紮、切離することで下肢虚血モデルを作成した後、経日的Laser Dopplerを用いて左右の血流比を測定する。

2.免疫組織化学によるPECAM陽性細胞数/筋繊維の測定

マウスに麻酔薬過剰投与による犠牲死させた後に術後28日にマウスの左大腿部周囲筋肉組織を摘出し、筋周囲の血管内皮をPECAM-1の抗体を使用し、染色し無作為に場所を選びPECAM陽性細胞/筋繊維の測定を行う

3.血中のVEGF, SDF-1値の経時的変化の測定

術後1, 3, 5, 7,14,21,28日にマウスの尾静脈から採血し、血清中のVEGF, SDF-1値をELISA kitを用いて測定する。

4.実態顕微鏡を用いた虚血筋組織での血流変化及び血小板凝集の部位の同定

下肢虚血モデルを作成し後7日目に血小板特異的に発色する色素を静脈注射し、実態顕微鏡を用いて血小板の大腿動脈断端部の血管内皮の付着程度について観察し定量化し比較検討する。尚、当実験での顕微鏡操作は当大学薬理学教室の教員のご指導を仰いでおりデータ処理の面でも、薬理学教室の教員への協力をお願いしている。

5.血中のCXCR4+VEGFR1+造血前駆細胞の発現の測定

虚血状態に陥ると血小板からVEGF, SDF-1が放出され、非内皮のCXCR4+VEGFR1+造血前駆細胞(Hemangiocyteと命名)が、虚血部位に動員され虚血部の血管再生に不可欠であることを明らかにした。血小板凝集塊からVEGF, SDF-1が放出され申請者は骨髄組織からCXCR4+VEGFR1+造血前駆細胞が動員されると仮説を立て、術後1, 3, 5日目に採血しフローサイトメトリーを用いてCXCR4+VEGFR1+造血前駆細胞の発現頻度を測定する。

フローサイトメトリーを用いたCXCR4+VEGFR1+造血前駆細胞の発現の解析は当大学免疫学教室の教員ご指導してもらう方針である。

6. VEGF及びSDF-1中和抗体による血流改善効果の遅延の検討。

血流改善がVEGF及びSDF-1によるものであるか確認するためTP+/+で下肢虚血モデルを作成した後、VEGF及びSDF-1中和抗体を連日投与(腹腔内注射)し、Laser Dopplerを用いて左右の血流比を測定し虚血の改善を認めるか否

か検討する。

7. 免疫電子顕微鏡像によるVEGF及びSDF-1の発現部位の同定

TP+/+及びTP-/-で左大腿動脈を結紮、切離することで下肢虚血モデルを作成した後、1, 3, 5, 7日目にマウスに麻酔薬過剰投与による犠牲死させた後、結紮、切離部分の血管周囲組織を摘出し、VEGF, SDF-1の抗体を用いて血小板凝集周囲にVEGF, SDF-1が発現しているか否かを比較検討する

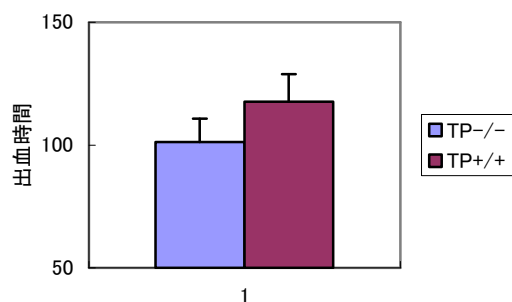
8. TP+/+の骨髄細胞をTP-/-に移植し、血流が改善するか否かの検討

あらかじめTP-/-に放射線を照射し、骨髄組織の機能を低下させたておく。6週間後下肢虚血モデルを作成する。同日TP-/-及びTP+/+の骨髄細胞 (3.0×10^6) を静脈注射し、虚血の改善が促進するか否かを経日的Laser Dopplerを用いて左右の血流比を測定する。また、術後28日にマウスの左大腿部周囲筋肉組織を摘出し、筋周囲の血管内皮をPECAM-1の抗体を使用し、染色し無作為に場所を選びPECAM陽性細胞/筋線維の測定を行う。

4. 研究成果

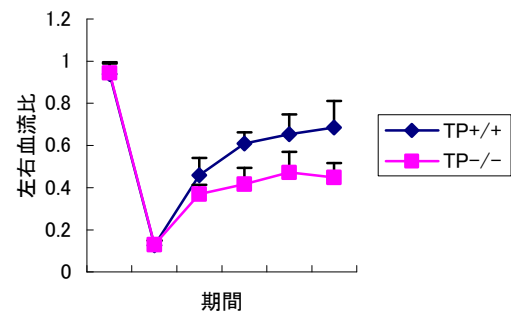
a. TP-/-はTP+/+に比べ骨髄組織中の巨核球及び血中の血小板数に差認められないが出血時間の有意な延長が認められた (図1)。

図1



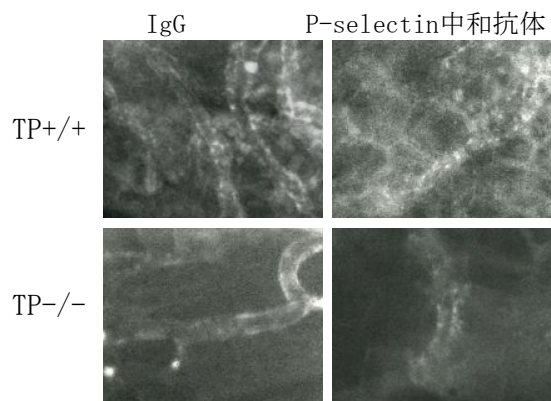
b. TP-/-はTP+/+に比べ虚血部の血流の改善の遅延が認められた (図2)。

図2



また生体顕微鏡にてTP-/-はTP+/+と比べ有意に虚血組織内の新生血管における血小板の付着の低下を認めた。またTP+/+の血小板の付着はP-selectin中和抗体を投与することで抑制された(図3)。

図3

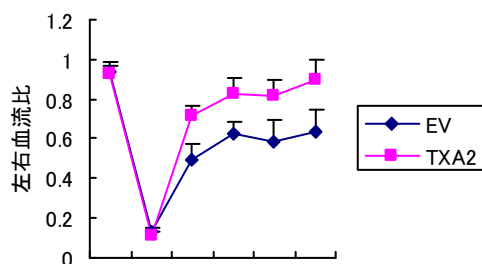


c. TP-/-はTP+/+に比べ有意に血小板由来のVEGF, SDF-1低下を認めた。また、血液中及び虚血筋肉組織中のCXCR4⁺VEGFR1⁺発現細胞の低下を認めた。

d. TP+/+にVEGF及びSDF-1の中和抗体を投与すると虚血の改善が有意に遅延した。

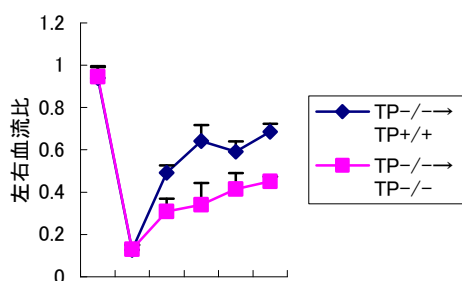
e. トロンボキサンA2合成酵素のcDNAを組み込んだレトロウイルスベクターを線維芽細胞に感染させ下肢虚血モデル作成後局所注射したところ対照群と比較し有意に血流の改善を認めた(図4)

図 4



f. TP+/+の骨髄細胞を移植されたTP-/-はTP-/-の骨髄細胞を移植されたマウスにより有意に虚血の血流の改善が認められた (図 5)。

図 5



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 3 件)

- ①Ogawa Y, Suzuki T, Oikawa A, Hosono K, Kubo H, Amano H, Ito Y, Kitasato H, Hayashi I, Kato T, Sugimoto Y, Narumiya S, Watanabe M, Majima M.

Bone marrow-derived EP3-expressing stromal cells enhance tumor-associated angiogenesis and tumor growth.

Biochem Biophys Res Commun. 2009 15:382(4):720-5. (査読有)

- ②Toda M, Suzuki T, Hosono K, Hayashi I, Hashiba S, Onuma Y, Amano H, Kurihara Y, Kurihara H, Okamoto H, Hoka S, Majima M. Neuronal system-dependent facilitation of tumor angiogenesis and tumor growth by calcitonin gene-related peptide.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2008 9;105 (36):13550-5. (査読有)

- ③Ohnuma Y, Toda M, Fujita M, Hosono K, Suzuki T, Ogawa Y, Amano H, Kitasato H, Hayakawa K, Majima M.

Blockade of an angiotensin type I receptor enhances effects of radiation on tumor growth and tumor-associated angiogenesis by reducing vascular

endothelial growth factor expression.

Biomed Pharmacother .

2009;63(2):136-45. Epub 2007 (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

- ①天野 英樹

TP receptor signaling enhances angiogenesis during ischemia via P-selectin mediated adhesion of platelets to endothelial cells

微小循環学会総会 (2009.2 東京)

- ②天野 英樹

Roles of a Thromboxane A2 Receptor, TP signaling in acute ischemia and SDF-1, VEGF expression

微小循環学会総会 (2007.2 京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

天野 英樹 (AMANO HIDEKI)

北里大学・医学部・助教

研究者番号: 60296481