

機関番号：24303
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590885
 研究課題名（和文） 血管内皮アポトーシスを制御する新規遺伝子 BLADE の血管新生における機能の解明
 研究課題名（英文） Analysis of ARIA that is a novel gene regulating endothelial apoptosis in the regulation of neovessel formation
 研究代表者
 池田 宏二（IKEDA KOJI）
 京都府立医科大学・医学研究科・助教
 研究者番号：90423871

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、ARIA（申請当初は BLADE と命名していた新規遺伝子）ノックアウト（KO）マウスを作成し、その血管新生における機能を解明した。下肢虚血モデルを作成して解析した結果、ARIA-KO マウスでは虚血誘導性の血管新生が著明に亢進していることが明らかとなった。また ARIA は血管内皮細胞だけでなく血管内皮前駆細胞にも高い発現を示し、PI3K/Akt パスウェイの制御を介してその血管新生能を調節していることを見出した。

研究成果の概要（英文）：We have generated ARIA (former BLADE) knockout mice, and analyzed the ARIA function in the regulation of neovessel formation. By using the hind-limb ischemia model, we revealed that genetic deletion of ARIA substantially enhanced the ischemia-induced neovascularization. Moreover, we found that ARIA is highly expressed in endothelial progenitor cells as well, and regulates their angiogenic functions by modulating the PI3K/Akt pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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
 虚血性心血管疾患は我が国における死亡原因の上位を占める疾患群であるだけでなく、虚血性心臓病や神経障害などの後遺症により罹患患者の生活の質を著しく低下させることが重大な問題である。虚血により壊死に陥った組織の周辺には多くの細胞が生存しているが血流不足のために正常な細胞機能が働かず全体的な臓器障害が引き起こされる。そこで血管新生を人為的に増強して臓

器・組織の血流を改善し、生き残った細胞の機能を回復させることで臓器障害を軽減させる血管新生療法が最近、注目されている。

2. 研究の目的

私達のグループでは世界に先駆けて自家骨髄細胞の移植による血管新生療法を重症末梢動脈疾患の患者さんに行った。その結果、肢の切断を回避できた症例も多く、従来の治療法では治療効果が望めない重症の患者さ

んにとって新しい治療オプションを提供することができた。しかしながら、その治療効果は未だ満足できるレベルには到達しておらず、より効果の高い治療法の開発が急がれている。従来の治療効果を上回る血管新生療法を開発するためには未知の血管新生メカニズムの解明が必須であると考えた。そこで私達は血管内皮機能を調節する新規遺伝子の探索を行った。その結果、血管内皮細胞に高い発現を示す新規遺伝子を発見し、ARIA (former BLADE) と名付けた。ARIA はマウス胎児中でも血管特異的な発現パターンを示し、ARIA は血管新生に重要な働きを有すると考えられた。次にARIA の発現をヒト血管内皮細胞中で siRNA を用いてノックダウンすると血管内皮アポトーシスが著明に抑制されることが明らかとなった。様々な検討を行った結果、ARIA ノックダウンによる抗アポトーシス効果にはアポトーシス抑制分子である inhibitor of apoptosis (cIAP)-1, cIAP-2 の発現上昇が重要であることが明らかとなった (Ikeda et al. PNAS 2009)。本研究課題ではARIA ノックアウトマウスを作成し、胎生期および虚血刺激による血管新生能を解析することによりARIA の生体内における血管新生制御機能とその分子メカニズムを解明することが目的であった。

3. 研究の方法

C57B6 マウス由来の ES 細胞を用いて、ARIA ノックアウトマウスを作成した。片側大腿動脈結紮により下肢虚血を誘導し、レーザードップラー法で虚血肢の血流を経時的に計測した。また虚血作成 2 週間後に虚血筋を摘出し、微小血管数を数えることでも虚血誘導性新生血管を評価した。

4. 研究成果

本研究期間中にARIA ノックアウトマウスの作出に成功した。ARIA ノックアウトマウスは正常に誕生し、明らかな発育異常を認めなかった。しかしながら胎生 14.5 日のマウス胎児では発育遅延を認めないものの末梢の出血を高頻度に来たすことを見出した。切片を作成し、免疫染色にて検討した結果、血管平滑筋細胞・壁細胞による血管の被覆には明らかな異常を認めなかった。一方、ARIA ノックアウトマウスでは微小血管密度が有意に増加しており、微小血管の過剰な増生が出血の原因であると考えられた。次に成体マウスを用いて、下肢虚血モデルを作成し、虚血誘導性の血管新生能を評価した。ARIA ノックアウトマウスではレーザードップラーで計測した虚血肢の血流回復が著しく亢進しており、2 週間後には健側と同程度にまで回復した。虚血作成 2 週間後に摘出した虚血筋中の微小血管数を計測したところ、ARIA ノッ

クアウトマウスでは野生型に比べて微小血管数が有意に増加していた。以上の結果から、ARIA ノックアウトマウスでは虚血誘導性の血管新生が顕著に亢進していることが明らかとなった。さらに私達は本研究期間中にARIA が血管内皮細胞だけでなく血管内皮前駆細胞にも極めて多く発現していることを見出した。血管内皮前駆細胞中のARIA をノックダウンするとアポトーシスが減少するだけでなく細胞遊走能や管腔形成能が著明に亢進することがわかった。ARIA をノックダウンした血管内皮前駆細胞では既報の血管内皮細胞と同様に cIAP-1, cIAP-2 の発現が有意に上昇していた。cIAP-1, cIAP-2 を同時にノックダウンするとARIA ノックダウンによる抗アポトーシス効果は部分的にキャンセルされた。一方、cIAP-1, cIAP-2 を同時にノックダウンしてもARIA ノックダウンによる遊走能の亢進はまったく影響をうけなかったことからARIA ノックダウンによる血管新生能の亢進には cIAP-1, cIAP-2 発現上昇以外のメカニズムが存在すると考えられた。次に様々な細胞内シグナル伝達阻害物質の効果を検討した結果、ARIA ノックダウンによる血管新生能の亢進は MEK 阻害剤では影響をうけないが、PI3K 阻害剤や一酸化窒素合成酵素(NOS)阻害剤によりほぼ完全にキャンセルされることが明らかとなった。さらに cIAP-1, cIAP-2 のダブルノックダウンに加えて PI3K 阻害剤で処理することでARIA ノックダウンによる抗アポトーシス効果は完全にキャンセルされることがわかった。これらの結果からARIA ノックダウンによる血管新生能の亢進には PI3K/Akt/eNOS シグナルの活性化が重要であると考えられた。実際にウェスタンブロット法を用いてシグナル活性を検討した結果、ARIA をノックダウンした血管内皮前駆細胞では PI3K/Akt/eNOS シグナルが明らかに活性化されていることがわかった。次に私達はARIA ノックアウトマウスで認めた血管新生亢進が PI3K/Akt/eNOS シグナル活性化によるものかどうかを検討した。マウスに PI3K 阻害剤あるいは NOS 阻害剤を投与した上で下肢虚血を作成して血流改善と血管新生を検討した結果、ARIA ノックアウトマウスで認められた血管新生亢進は PI3K 阻害剤および NOS 阻害剤で完全に消失することがわかった。以上、本研究課題ではARIA が PI3K/Akt/eNOS シグナルの調節を介して血管内皮細胞・血管内皮前駆細胞機能を制御し、その結果、血管新生コントロールしていることを明らかとした。

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6件)

- ① Koide M, **Ikeda K** (corresponding author), Akakabe Y, Kitamura Y, Ueyama T, Matoba S, Yamada H, Okigaki M, and **Matsubara H**. Apoptosis regulator through modulating IAP expression (ARIA) regulates the PI3K/Akt pathway in endothelial and endothelial progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011 in press
- ② Endothelial FGF receptor signaling accelerates atherosclerosis. Che J, Okigaki M, Takahashi T, Katsume A, Adachi Y, Yamaguchi S, Matsunaga S, Takeda M, Matsui A, Kishita E, **Ikeda K**, Yamada H, **Matsubara H**. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 300(1):H151-161, 2011
- ③ p53 and TIGAR regulate cardiac myocyte energy homeostasis under hypoxic condition. Kimata M, Matoba S, Iwai-Kanai E, Nakamura H, Hoshino A, Nakaoka M, Katamura M, Okawa Y, Mita Y, Okigaki M, **Ikeda K**, Tatsumi T, **Matsubara H**. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 299(6):H1908-1916, 2010
- ④ Paracrine osteogenic signals via bone morphogenetic protein-2 accelerate the atherosclerotic intimal calcification in vivo. Nakagawa Y, **Ikeda K** (corresponding author), Akakabe Y, Koide M, Uraoka M, Yutaka KT, Kurimoto-Nakano R, Takahashi T, Matoba S, Yamada H, Okigaki M, **Matsubara H**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 30(10):1908-1915, 2010
- ⑤ Pathophysiology of vascular calcification: pivotal role of cellular senescence in vascular smooth muscle cells. Burton DG, **Matsubara H**, **Ikeda K** (last author). *Exp Gerontol*. 45(11):819-824, 2010
- ⑥ Bone marrow AT1 augments neointimal formation by promoting mobilization of smooth muscle progenitors via platelet-derived SDF-1alpha. Yokoi H, Yamada H, Tsubakimoto Y, Takata H, Kawahito H, Kishida S, Kato T, Matsui A, Hirai H, Ashihara E, Maekawa T, Iwai M, Horiuchi M, **Ikeda K**, Takahashi T, Okigaki M, **Matsubara H**. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 30(1):60-67, 2010

〔学会発表〕(計4件)

- ① ARIA regulates ischemia-induced angiogenesis and vasculogenesis through modulating the PI3K/Akt/eNOS signaling pathway. Koide M, **Ikeda K**, Kitamura Y,

Akakabe Y, Nakagawa Y, **Matsubara H**. (2010) AHA scientific sessions, *Circulation* 122(23):A-14736

② Identification of ARIA as a novel factor regulating endothelial cell apoptosis and angiogenesis in vivo. Koide M, **Ikeda K**, Nakagawa Y, Akakabe Y, Kurimoto R, **Matsubara H**. 第74回日本循環器学会学術総会 2010年3月 京都

③ Identification of ARIA as a novel factor regulating endothelial apoptosis and angiogenesis in vivo. Koide M, **Ikeda K**, Akakabe Y, Uraoka M, Nakagawa Y, Kurimoto R, **Matsubara H**. 心血管内分泌学会 2010年4月 奈良

④ Masahiro Koide, **Koji Ikeda**, Maki Uraoka, Yusuke Nakagawa, Yoshiki Akakabe, Ritsuko Kurimoto, **Hiroaki Matsubara**. Identification of ARIA as a novel factor regulating endothelial cell apoptosis and angiogenesis in vivo. **American Heart Association (米国心臓病学会)** 2009 Nov, Orlando, USA

〔図書〕(計1件)

池田 宏二,他、株式会社エル・アイ・シー、循環器疾患-疾患モデルの作成と利用 第2章9節 血管新生療法、2010、190-194

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: 肥満・インスリン感受性を制御する遺伝子およびそのノックアウト動物および本意電子の機能調節を介した肥満及び/又はメタボリック症候群の予防及び/又は治療薬のスクリーニング

発明者: **池田 宏二**、**松原 弘明**、**赤壁 佳樹**

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 特願 2011-9375

出願年月日: 平成23年1月20日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/med2/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

池田 宏二 (IKEDA KOJI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号: 90423871

(2) 研究分担者

該当なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

松原 弘明 (Matsubara Hiroaki)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：10239072