

平成 22年 4月 1日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20790168
 研究課題名 (和文) ダウン症原因遺伝子 DSCR1 の血管サイズ決定因子としての役割とその分子機構の解明
 研究課題名 (英文) Functional and molecular analysis of DSCR1 as a regulator of vascular morphology
 研究代表者
 藤原 正和 (FUJIWARA MASAKAZU)
 日本医科大学・老人病研究所・助教
 研究者番号：20312069

研究成果の概要 (和文)：血管の形態は組織やその領域によって大きく異なる。ゆえに、血管が関わる疾患の治療には、適切な形態の血管を用いることが必要である。ところが、血管の多様な形態がどのように生じるのか、その形成機構はまだ解明されておらず、目的の血管を自由に作製することは現在の技術では行うことができない。そこで、本研究は血管の様々な形態、特にサイズと分岐頻度に焦点を絞り、その制御機構を明らかにすることを目的とした。今回、我々は Down Syndrome Critical Region 1 (DSCR1) が血管の分岐頻度を調節し、太い血管と細い血管の形態の違いを調節していることを明らかにした。これによって、将来、分岐頻度や太さの異なる様々な形態の血管を自由に形成する、DSCR1 による新しい血管新生治療の開発が可能となった。

研究成果の概要 (英文)：Morphology of blood vessels is diverse. However, we do not know how these morphological variations are made during vasculogenesis/angiogenesis. In this study, we found that DSCR1 regulates the morphology of blood vessels by suppressing the branching of blood vessels during vasculogenesis/angiogenesis. In the near future, we may generate blood vessels with appropriate morphology for the patients by using DSCR1 as a new vasculogenesis/angiogenesis suppressor.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	700,000	210,000	910,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,300,000	390,000	1,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般 (含組織学・発生学)

キーワード：発生学・形態形成学

1. 研究開始当初の背景

ヒトのほとんど全ての組織に存在する血管は、大動脈や毛細血管などで代表されるように、様々な形態を持つ。しかしながら、これらの形態の違い（血管サイズや分岐頻度など）がどのような過程で生じるのか、その機構は全く分かっていない。血管の形態学的な多様性は医療の面からも重要視されており、「血管の形態制御機構」の理解は今後、治療の面からも重要な役割を果たすことが期待されている。

2. 研究の目的

血管の形態を制御する機構を明らかにすれば、自由に血管の形態を制御することが可能となり、骨髄細胞移植や外科的手術に頼らない患者への負担が少ない薬剤による血管新生治療が期待される。そこで、血管の形態がどのような制御機構によって形成されていくのか、その分子機構を明らかにすることを本研究の目的とした。本研究では特に、血管の形態で顕著な「サイズ」と「分岐頻度」に焦点を絞った。

3. 研究の方法

(1) フィブリンゲル三次元培養

正常ヒト臍帯静脈血管内皮細胞を用い、「太く分岐の少ない血管構造」(図 1 A)と「細く分岐の多い血管構造」(図 1 B)を作製した。同じ血管内皮細胞を用いても、処理する血管内皮増殖因子の濃度によって、図 1 A と B のように異なる形態を形成させることができた。「太く分岐の少ない血管構造」は高濃度 (10 ng/ml) の血管内皮増殖因子を、「細く分岐の多い血管構造」は低濃度 (2 ng/ml) の血管内皮増殖因子を処理した。血管の高次構造は、特殊な培養方法、フィブリンゲル三次元培養を用いて形成させた。

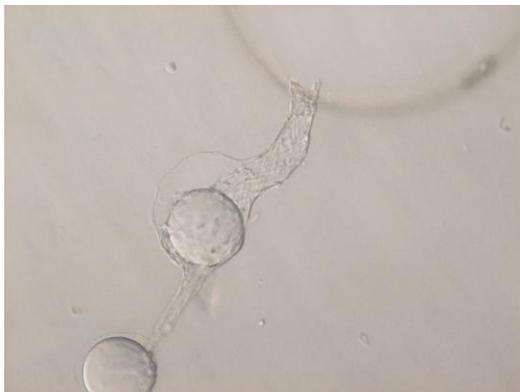


図 1 A : 太く分岐の少ない血管構造

これらの血管構造における mRNA の発現様式の違いをマイクロアレイで解析した。解析はフィブリンゲル三次元培養開始後、12、24、48、73時間後の形成過程にある血管構造を用いて行った。



図 1 B : 細く分岐の多い血管構造

(2) アフリカツメガエルによる解析

マイクロアレイで得られた 50 程度の候補遺伝子の中から、特に発現レベルの差が顕著な DSCR1 の解析を次に行った。DSCR1 はダウン症関連遺伝子の 1 つで、癌の罹患率が非常に低いダウン症患者において、その発現が高いことが知られている。癌の進行には血管が必要不可欠なことから、DSCR1 が何らかの形で血管形成に関与していることが推測された。

DSCR1 による血管形態への影響は血管の可視化が容易な実験動物、アフリカツメガエルを用いた。アフリカツメガエルの DSCR1 遺伝子のクローニングを先ず行い、次に、得られたクローンから mRNA を合成し、アフリカツメガエルの受精卵に注入した。発生が進んだところで、過剰発現させた DSCR1 の血管形態への影響を検討した。形態は、朱墨を心臓に注入するマイクロアンジオグラフィーによって検討した。血管の分岐頻度は 0.25 cm^2 当りの血管の分岐点を数えることによって数値化した。また、導入した DSCR1 の発現は Western blot などで確認し、その他にも、DSCR1 と直接相互作用するカルシニューリンの過剰発現実験、DSCR1 と同様な活性をもつ FK506 や CsA などの阻害剤を用いた実験も行った。

4. 研究成果

(1) DSCR1 の発現様式は、フィブリンゲル三次元培養で作製した「太く分岐の少ない血管構造」(図 1 A)と「細く分岐の多い血管構造」(図 1 B)において大きく異なることが分

った。DSCR1 の発現レベルは「太く分岐の少ない血管構造」では高く、「細く分岐の多い血管構造」では低かった。発現レベルの違いは血管構造形成後 8 時間では 4 倍、24 時間では 11 倍の差がみられた。DSCR1 の発現レベルの違いは 6 日以上維持され、その時点においても 6 倍の差がみられた。

次に成熟したそれぞれの血管構造に通常とは反対の血管内皮増殖因子の濃度を処理した。その結果、血管構造に半可逆的な変化がみられた。「太く分岐の少ない血管構造」では分岐が多くなり、「細く分岐の多い血管構造」では分岐が減少することが分かった。この際、DSCR1 の発現レベルも形態と同様に変化することが分かった。これらのことから、DSCR1 が血管の分岐頻度を制御する因子であることが示唆された。

(2) DSCR1 が生体内でも血管の分岐を制御していることを示すために、アフリカツメガエルで DSCR1 を一過的に過剰発現させた。その結果、DSCR1 が体軀を走行する小さい血管の分岐を抑制することが分かった。また、DSCR1 と直接相互作用するカルシニューリンを DSCR1 と共に発現させたところ、DSCR1 の効果が抑えられ、血管の分岐が正常に戻ることが分かった。さらに、DSCR1 と同じような活性をもつ FK506 や CsA をアフリカツメガエルの幼生に処理したところ、DSCR1 の過剰発現と同様に、血管の分岐が正常個体 (図 2A) と比べ大幅に減少していることが確認された (図 2B)。

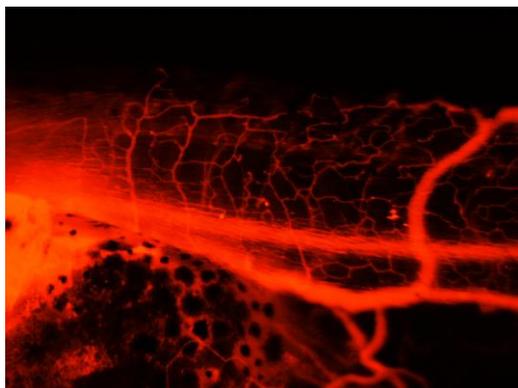


図 2A : 正常個体における血管分岐

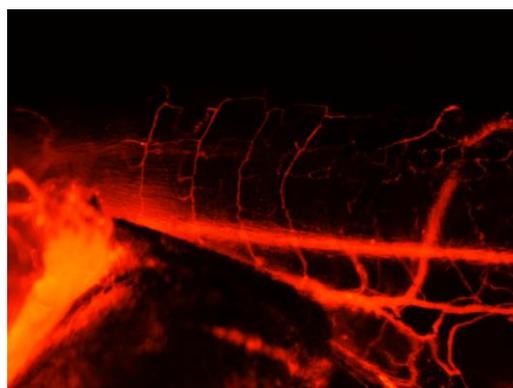


図 2B : CsA 処理による血管分岐抑制

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 2 件)

- ① Fujiwara Masakazu、 Ghazizadeh Mohammad、 Kawanami Oich, Dynamic and complex movement during formation of vascular structures studied with the fibrin bead assay、 J Nippon Med Sch、 査読有、 75 巻、 2008、 194-5
- ② Fujiwara Masakazu、 Expression of down syndrome critical region 1 represses vascular branching in *Xenopus laevis* larvae、 J Nippon Med Sch、 査読有、 75 巻、 2008、 62-4

[学会発表] (計 3 件)

- ① 藤原正和、 VEGF によって誘導される遺伝子の血管形態における役割、 第 17 回日本血管生物医学会学術集会、 2009 年 10 月 8-9 日、 東京
- ② Fujiwara Masakazu、 Down syndrome critical region 1 represses vascular branching in *Xenopus laevis* larvae、 International Vascular Biology Meeting、 2008 June 1-5、 Sydney
- ③ Fujiwara Masakazu、 Overexpression of regulator of calcineurin 1 represses vascular branching in *Xenopus laevis* larvae、 The 6th Korea-Japan Symposium on Vascular Biology、 2008 December、 Kanazawa、 Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 正和 (FUJIWARA MASAKAZU)
日本医科大学・老人病研究所・助教
研究者番号：20312069

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：