

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590930

研究課題名（和文）心臓組織内の内皮細胞を起点としたシグナルネットワークによる心筋保護の分子機構

研究課題名（英文）The signaling network between endothelium and myocardium responsible for myocardial protection

研究代表者

中岡 良和（NAKAOKA YOSHIKAZU）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：90393214

研究成果の概要（和文）：心筋から分泌される angiotensin-1(Ang1)の機能を解明するため、Ang1^{flax} マウスを作成してα-MHC-Cre マウスと交配して、心筋特異的 Ang1 欠損(Ang1CKO)マウスを作成した。Ang1CKO マウスは E12.5-E14.5 で胎生致死を呈し、(1)心内膜と心筋肉柱層の接着不全、(2)心筋肉柱と緻密帯の発達不全、(3)冠血管形成異常などの表現型を呈した。Ang1CKO マウスと野生型マウスの心臓で内皮細胞を抗 CD31 抗体で免疫染色すると、野生型で心室壁の心外膜直下と一層内側に形成される冠静脈と冠動脈の 2 層の血管構造のうち、外側の冠静脈のみが Ang1CKO マウスで特異的に欠損していた。

研究成果の概要（英文）：To reveal the role of angiotensin-1 (Ang1) secreted from myocardium, we crossed *Ang1^{flax}* mice with α-MHC-Cre transgenic mice to create cardiomyocyte-specific Ang1 knockout (Ang1CKO) mice. Ang1CKO mice showed embryonic lethality between E12.5 and 14.5 with defects in (1) attachment between endocardial endothelium and ventricular trabeculae, (2) development of both trabeculae and compact layer, and (3) coronary vessel formation. We performed immunohistochemical analysis using CD31 antibody and found that Ang1CKO mice exhibit the defects in coronary vein formation, namely ‘coronary venogenesis’.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：angiotensin-1、冠血管、冠静脈、心筋、内皮、パラクラインシグナル

1. 研究開始当初の背景

冠動脈疾患での虚血時に見られる冠血管新生は、胎生期の冠血管発生と類似の分子機序が利用されると考えられる。よって、冠動脈疾患での新規治療法開発を考える際には、胎生期の冠血管発生を詳細に理解す

ることが非常に重要である。胎生期 E10.5 までは、心筋細胞へと酸素や栄養物は受動的拡散で供給されるが（図 1a）、心臓の成長により心室壁厚が肥厚するとともに冠血管ネットワークが形成され、冠血管を介した供給へ移行する。

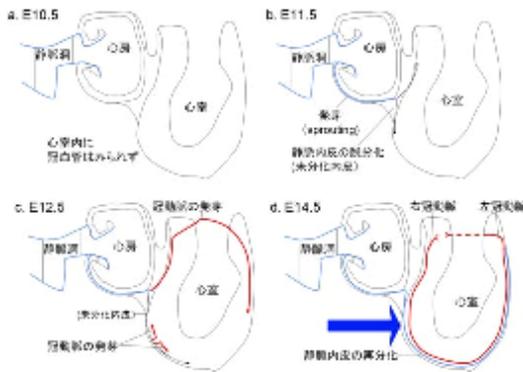
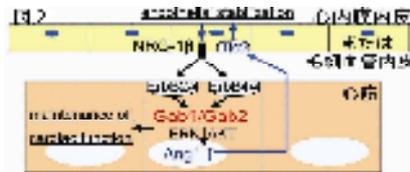


図1冠動脈・冠静脈の発生のスキーム

最近、Red-Horse らは冠血管の起源と発生メカニズムに関して詳細な検討を行って画期的な報告をした(Nature, 464, 549, 2010)。冠動脈も冠静脈とも冠血管の発生起源は右心房と接する静脈洞(sinus venosus)の静脈内皮細胞(図 1a 水色)にあり、それが発芽(sprouting)して無血管状態の心室へ向かって遊走して、心室に進入する前に静脈内皮から脱分化し(図 1b 灰色)、心室表層を走行する血管内皮は冠静脈へ再分化して(図 1c-d 水色)、その一層内側へ侵入した血管内皮は冠動脈(図 1c-d 赤色)へ再分化すると彼らは報告した。一方、この未分化内皮細胞(灰色)を心室へ遊走させ、動脈化・静脈化の分化を促す因子については全く不明であった(図 1 青矢印)。

一方で、研究代表者らはレセプター型チロシンキナーゼのシグナル伝達で重要な機能を持つ Gab ドッキングタンパク質の心血管系での機能を中心に解析を進めて来た。心筋細胞特異的 Gab タンパク質(Gab1/Gab2)二重欠損(DKO)マウスの解析を行い、このマウスが心臓組織内での内皮細胞から心筋細胞へ伝達される「neuregulin-1(NRG-1)/ErbB シグナル」と心筋細胞から内皮細胞へ伝達される「Ang1/Tie2 シグナル」からなるパラクラインシグナルネットワーク



(図 2)に破綻を来して拡張型心筋症を自然発症することを報告した(Nakaoka et al. J. Clin. Invest. 117, 1771, 2007)。上記の研究結果を背景として、研究代表者らは心筋から分泌される Ang1 の機能を明らかにする必要があると考えた。

2. 研究の目的

心筋 - 内皮間相互作用は心機能維持、心臓発生で重要な役割をすることが知られているが、心筋から分泌される Ang1 の役割は明らかではなかったため、本研究ではその機能解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Ang1^{fllox}* マウスの作成と *a-MHC-Cre* トランスジェニックマウスの交配による心筋特異的 Ang1 欠損(Ang1CKO)マウスの作成
基盤研究 (C)「心筋 - 内皮組織間のパラクラインシグナルネットワーク」(研究代表者: 中岡良和、2007年 - 2008年)にて作成した Ang1 第 1 エクソンを loxP 配列で挟んだ *Ang1^{fllox}* マウスと *a-MHC-Cre* トランスジェニックマウスを交配して心筋特異的 Ang1 欠損(Ang1CKO)マウスを作成した。In situ hybridization と qRT-PCR を用いてノックアウトの確認とともに致死となる時期を調べた。

(2) Ang1CKO マウスの表現型の解析

Ang1CKO マウスは胎生 E12.5-14.5 で致死を呈したため、その心臓の表現型を組織学的、免疫組織化学的 (CD31 に対する免疫染色) に解析を行った。

4. 研究成果

(1) Ang1CKO(*Ang1^{fllox/fllox}; a-MHC-Cre+*)マウスの Ang1 欠損の確認:

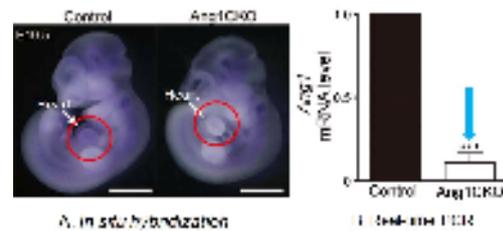


図3 Ang1CKOマウスでのKO確認

In situ hybridization により Ang1 の E10.5 マウス胚での発現を検討すると、図 3A に示す様にコントロールの心臓で見られる Ang1 の発現は Ang1CKO マウスでは消失していて、心臓での Ang1 発現レベルを qRT-PCR で定量すると Ang1CKO マウスでは Ang1 の発現量が約 90%低下していた(図 3B)。

(2) Ang1CKO マウスの胎生致死の時期: Ang1CKO マウスは下記の表の如く、E12.5-14.5 で死亡することが明らかとなった。

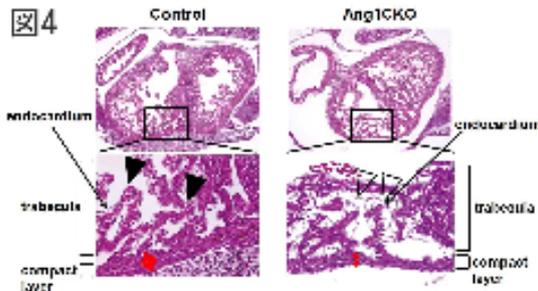
表 1 ♂ *Ang1^{+fllox}; aMHC-Cre* × ♀ *Ang1^{fllox/fllox}*

Age (d.p.c.)	No. of Mice analyzed	Total No. (M/F)	Ang1CKO (M/F)	Ang1CKO/aMHC-Cre (M/F)	Control (M/F)	Ang1CKO/aMHC-Cre (M/F)
E11.5	50	5/1	0/0	0/0	100	0/0
E12.5	20	1/1	1/1	1/0	50	0/0
E13.5	40	20/0	8/20	0/0	70	0/0
E14.5	45	2/2	0/2	0/0	75	0/0
E14.5	18	7/1	2/1	1/1	18	1/1
E14.5	12	7/0	1/1	1/1	18	1/1

また、死亡個体は全身性の浮腫、皮下出血を伴っていた。

(3) Ang1CKO マウス心臓の組織学的解析: Ang1CKO マウス心臓の表現型を解析する

目的で、HE染色で組織解析を行ったところ、興味深いことにE13.5では十分に心内膜-心筋肉柱間の接着が野生型では見られるのに対して、Ang1CKOマウスの心臓では接着が見られず浮いた状態となっていることが観察された(図4)。また、緻密帯、肉柱の形成もAng1CKOマウスでは野生型よりも遅滞していることが明らかとなった(図4)。



(5) Ang1CKOマウス心臓の免疫組織化学による解析:

次に、内皮細胞に対する抗CD31抗体でホルマウント免疫染色を行って、冠血管形成について検討を行った。その結果、表層に野生型では観察されるCD31陽性の血管像がAng1CKOマウスでは消失していることが明らかとなった(図5)。

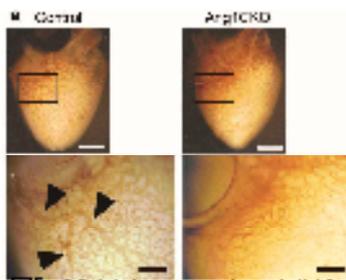
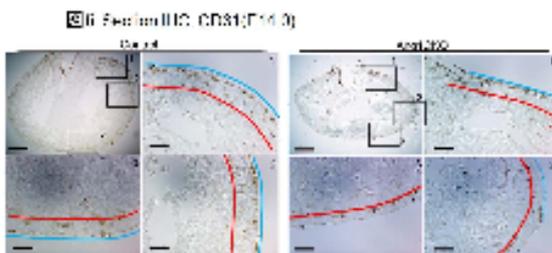


図5 CD31ホルマウントIHC

これらのサンプルを切片化して検討すると、興味深いことに2層のCD31陽性冠血管の外側の冠静脈と考えられる血管がAng1CKOマウスでは特異的に欠損していることが明らかとなった(図6青矢印部分)。



一方、内側のCD31陽性血管は冠動脈と考えられたため、インクを用いた冠動脈造影実験を行ったが、冠動脈の形成に野生型とAng1CKOマウスの間で差は見られなかった。以上より、心筋から分泌されるAng1は冠血管形成、特に冠静脈の形成に必須の役割を担うことが示唆された。これまで、いかなる臓器においても動脈・静脈の特異的な分化を促進する増殖因子、サイトカインは同定されておらず、画期的な発見と考えられる。

今後は、更に静脈内皮マーカーの発現を

Ang1CKOマウスで検討して、冠静脈欠損についての詳細な解析を進めてその分子機構を明らかにする必要がある。

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12件)

1. 中岡良和、小室一成; 冠動脈疾患研究の・治療の進歩と今後の課題; 日本臨床, 69 (Suppl 7), 20-24, 2011 (査読無)
2. Shioyama W, Nakaoka Y*, Higuchi K, Minami T, Taniyama Y, Nishida K, Kidoya H, Sonobe T, Naito H, Arita Y, Hashimoto T, Kuroda T, Fujio Y, Shirai M, Takakura N, Morishita R, Yamauchi-Takahara K, Kodama T, Hirano T, Mochizuki N, Komuro I* (*corresponding author). Gab1 is essential for postnatal angiogenesis via hepatocyte growth factor/c-Met signaling. *Circ Res* 108, 664-675, 2011 (査読有)
3. Shimomura Y, Hara M, Mizote I, Nakaoka Y, Tanaka H, Asano Y, Sakata Y, Komuro I. Sildenafil and steroid therapy effectively improved POEMS syndrome-associated pulmonary arterial hypertension. *International Journal of Hematology*. 92, 774-776, 2011 (査読有)
4. Hara M, Mizote I, Nakaoka Y, Tanaka H, Asano Y, Sakata Y, Komuro I. A case of non-cardiogenic acute pulmonary edema in a patient with POEMS syndrome-associated pulmonary arterial hypertension. *Ann Hematol*. 90: 489-90, 2011 (査読有)
5. Nakaoka Y*, Shioyama W, Kunimoto S, Arita Y, Higuchi K, Yamamoto K, Fujio Y, Nishida K, Kuroda T, Hirota H, Yamauchi-Takahara K, Komuro I, Mochizuki N. SHP2 mediates gp130-dependent cardiomyocyte hypertrophy via negative regulation of skeletal α -actin gene. *J Mol Cell Cardiol*. 49: 157-164, 2010 (*corresponding author) (査読有)
6. Arita Y, Sakata Y, Sudo T, Maeda T, Matsuoka K, Tamai K, Higuchi K, Shioyama W, Nakaoka Y, Kanakura Y, Yamauchi-Takahara K. The efficacy of tocilizumab in a patient with pulmonary arterial hypertension associated with Castleman's disease. *Heart Vessels* 25: 444-7, 2010 (査読有)
7. Obana M, Maeda M, Takeda K, Hayama A, Mohri T, Yamashita T, Nakaoka Y, Takeda K, Matsumiya G, Azuma J, Fujio

- Y. Therapeutic activation of STAT3 by Interleukin-11 ameliorates cardiac fibrosis after myocardial infarction. *Circulation*. 121: 684-691, 2010 (査読有)
8. 中岡 良和. Angiotensin-1 の心血管系での役割. 循環器内科, 67(2): 178-184, 2010 (査読無)
 9. 中岡良和, 小室一成. 心腎連関と内皮機能. 腎と透析. 69(4), 422-426, 2010 (査読無)
 10. Wang D, Paria BC, Zhang Q, Karpurapu M, Li Q, Gerthoffer WT, Nakaoka Y, Rao GN. A role for Gab1/SHP2 in thrombin activation of PAK1: gene transfer of kinase-dead PAK1 inhibits injury-induced restenosis. *Circ Res*. 104:1066-75, 2009 (査読有)
 11. Hiramoto Y, Shioyama W, Higuchi K, Arita Y, Kuroda T, Sakata Y, Nakaoka Y, Fujio Y, Yamauchi-Takahara K. Clinical significance of plasma endothelin-1 level after bosentan administration in pulmonary arterial hypertension. *J Cardiol*. 53: 374-80, 2009 (査読有)
 12. 中岡 良和. 心血管調節因子: Neuregulin-1とAngiotensin-1が形成するパラクラインシグナルネットワーク. 心臓. 41, 1298-1301, 2009 (査読無)
- [学会発表] (計 10 件)
1. Hashimoto T, Nakaoka Y, Sonobe T, Arita Y, Ikeoka K, Shirai M, Komuro I. Blockade of interleukin-6 Signaling Prevents Hypoxia-induced Pulmonary Arterial Hypertension in Mice. 第 19 回日本血管生物医学会学術集会(2011 年 12 月 9 日、東京ステーションコンファレンス(東京都))
 2. 有田陽、中岡良和、白井学、有馬勇一郎、樋口香織、橋本崇弘、池岡邦泰、安居琢、瀧原圭子、西山功一、山岸敬幸、栗原裕基、小室一成. 心筋から分泌されるアンジオポイエチン 1 は冠静脈の形成に必須である. 第 2 回 MCC II (2011 年 9 月 4 日、ホテルピアノ(北海道余市郡赤井川村))
 3. Nakaoka Y. Gab1 is an essential component for postnatal angiogenesis after ischemia via HGF/c-Met signaling. The 9th Japan-Korea Joint Symposium on Vascular Biology 2011 (招待講演: 2011 年 8 月 26 日、釜山ウェスティンホテル(韓国・釜山))
 4. Nakaoka Y, Higuchi K, Shioyama W, Taniyama Y, Arita Y, Hashimoto T, Fujio Y, Yamauchi-Takahara K, Morishita R, Hirano T, Komuro I. Gab1 Negatively regulates Angiotensin II-accelerated Atherosclerosis in Apolipoprotein E Deficient Mice. 第 75 回日本循環器学会学術集会(2011 年 8 月 4 日、パシフィコ横浜(横浜市))
 5. Nakaoka Y. The Role of Gab Family Docking Proteins in the Pathophysiology of the Cardiovascular Diseases. The 12th US-Japan-Asia Dialogue on Cardiovascular Diseases and Young Investigator Competition (Pfizer)(招待講演: 2011 年 7 月 31 日、高輪プリンスホテル(東京都))
 6. Shioyama W, Nakaoka Y, Higuchi K, Minami T, Nishida K, Taniyama Y, Kidoya H, Arita Y, Hashimoto T, Fujio Y, Shirai M, Takakura N, Morishita R, Yamauchi-Takahara K, Kodama T, Hirano T, Mochizuki N, Komuro I. Gab1 is Critically involved in HGF-dependent Postnatal Angiogenesis after ischemia. 日本循環器学会(2011 年 3 月 15 日、京都国際会館(京都府))
 7. Higuchi K, Nakaoka Y, Shioyama W, Taniyama Y, Arita Y, Hashimoto T, Fujio Y, Yamauchi-Takahara K, Morishita R, Hirano T, Komuro I. Gab1 Negatively regulates Angiotensin II-accelerated Atherosclerosis in Apolipoprotein E Deficient Mice. 2010 American Heart Association Scientific Sessions. (2010 年 11 月 15 日、米国・シカゴ)
 8. Nakaoka Y. SHP2 mediates gp130-dependent cardiomyocyte hypertrophy via negative regulation of skeletal alpha-actin gene. Basic Cardiovascular Sciences 2010 American Heart Association Scientific Sessions. (2010 年 7 月 20 日、米国・カリフォルニア州、Rancho Mirage,)
 9. Shioyama W., Nakaoka Y, Higuchi K, Minami T, Nishida K, Taniyama Y, Kidoya H, Arita Y, Hashimoto T, Fujio Y, Shirai M, Takakura N, Morishita R, Yamauchi-Takahara K, Kodama T, Hirano T, Mochizuki N, Komuro I. Interaction of Docking Protein Gab1 with Tyrosine Phosphatase SHP2 Regulates Hepatocyte Growth Factor-dependent ERK5 Activation and Upregulation of Kruppel-like Factor 2 in the Vascular Endothelium. American Heart Association, Scientific Sessions 2009, (2009 年 11 月 18 日 Orange County Convention Center(米国・フロリダ州オーランド))
 10. Nakaoka Y, Shioyama W., Higuchi K, Minami T, Nishida K, Taniyama Y, Kidoya H, Arita Y, Hashimoto T, Fujio Y, Shirai M, Takakura N, Morishita R, Yamauchi-Takahara K, Kodama T, Hirano T, Mochizuki N, Komuro I. Scaffolding Docking Protein Gab1 Has an Essential Role for HGF-dependent

Endothelial Signaling and Angiogenesis after Hindlimb Ischemia. Basic Cardiovascular Sciences Conference 2009: Molecular Mechanisms of Cardiovascular Disease (2009年7月22日 The Ritz-Carlton in Lake Las Vegas, 米国ネバダ州ラスベガス)

〔図書〕(計1件)

1. 血管生物医学事典(日本血管生物医学会編集、小室一成・中岡良和他分担執筆)
p210-212, 319-321, 478-480, 朝倉書店、2011年

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/cardiology/27research/2784res.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中岡 良和 (NAKAOKA YOSHIKAZU)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号：90393214

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし