

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790999

研究課題名(和文) 再生不良性貧血におけるHIF-1 $\alpha$ を介したVEGFの調節機構の解明

研究課題名(英文) Hypoxia-inducible factor-1 is not associated with the clinical course of aplastic anemia in children.

研究代表者

児玉 祐一 (KODAMA YUICHI)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・医員

研究者番号：20535695

研究成果の概要(和文)：

再生不良性貧血の進行に血小板内のVEGFが関与していることを以前証明したが、今回VEGFの転写因子であるHIF-1 $\alpha$ が再生不良性貧血の進行に関与しているかを評価した。再生不良性貧血患者の骨髄の有核細胞を用いてHIF-1 $\alpha$ のmRNAの発現量を評価したが、急性に進行する患者と慢性に進行する患者では有意差はなかった。VEGFには別の因子が働いている可能性があることを示唆した。今後巨核球を用いた実験系を確立する予定である。

研究成果の概要(英文)：

We assessed the level of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), which is known to be a transcription factor of VEGF. The mRNA levels of HIF-1 $\alpha$  in bone marrow mononuclear cells (BMNC) were measured by real-time PCR in 13 aplastic anemia (AA) patients. HIF-1 $\alpha$  in chronic AA patients was not significantly greater than that in acute AA patients. These data indicated that a high level of HIF-1 $\alpha$  in chronic AA does not cause the high level of VEGF in a single platelet in chronic AA. The mRNA of HIF-1 $\alpha$  in megakaryocytes should be analyzed to better understand the role of HIF-1 $\alpha$  in AA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度			
2008年度			
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

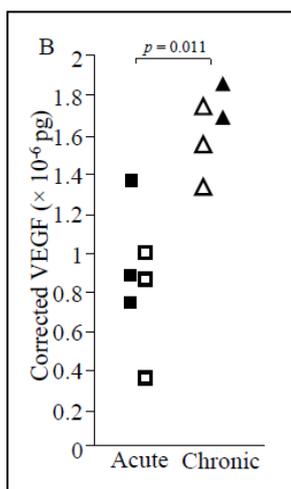
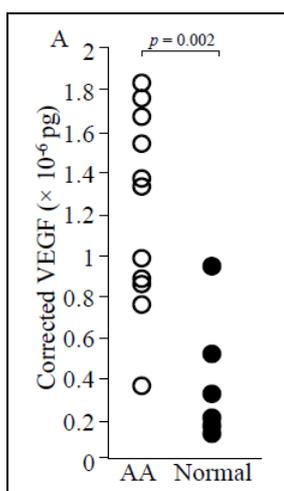
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児血液学・VEGF・再生不良性貧血・HIF-1 $\alpha$

## 1. 研究開始当初の背景

再生不良性貧血の臨床経過はさまざまであり、急激に重症化し輸血依存となり造血幹細胞移植等の治療が必要になる症例もあれば、一方長期間重症化せずに経過する症例も存在する。適切な治療を適切な時期に行うためには、発症時に臨床経過を予測する必要がある。我々は血小板あたりの VEGF がまず再生不良性貧血の症例で、正常コントロールよりも高いことを証明し、次に慢性に経過する再生不良性貧血の症例で急性に経過する症例よりも高いことを証明した。



VEGFはその転写因子である HIF-1 $\alpha$  によって調節されていることは判明している。そのため、再生不良性貧血の患者では HIF-1 $\alpha$  の発現が変化している可能性がある。再生不良性貧血患者における HIF-1 $\alpha$  に関する報告は全くなく、今回我々は再生不良性貧血患者において HIF-1 $\alpha$  と再生不良性貧血の臨床経過との関連を検討した。

## 2. 研究の目的

再生不良性貧血の症例で急速に進行する症例と慢性に進行する症例で骨髄の単核球を用いて、骨髄単核球での VEGF の発現に変化があるか、その転写因子である HIF-1 $\alpha$  の発現に変化があるかを検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 対象；当科で再生不良性貧血と診断した 13 例。また正常コントロールとして 6 例の検体を使用した。

(2) 骨髄有核細胞から Nucleospin RNA XS を使用し Total RNA を抽出し、TaKaRa Primescript II 1<sup>st</sup> strand cDNA Synthesis Kit を用いて cDNA を作成し、その cDNA を鋳型にして TaKaRa PrimeScript RT reagent Kit, Thermal Cycler Dice, Real time system, TP800, TaKaRa を用いて Real time PCR を行い VEGF、HIF-1 $\alpha$  の発現量を求めた。GAPDH から VEGF、HIF-1 $\alpha$  の発現量を相対的に評価し、さらにコントロール細胞から  $\Delta\Delta$  CT 法で発現量を相対的に解析した。

(3) 統計は SPSS Ver17 を用いて 2 群間の比較においては Mann-Whitney の U 検定で行った。

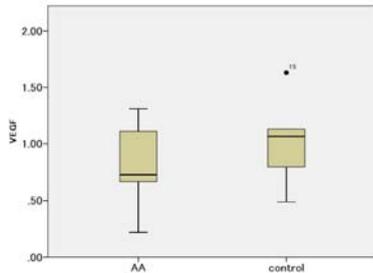
## 4. 研究成果

(1) 再生不良性貧血の症例で急速に進行した症例は 7 例、慢性に進行した症例は 6 例であった。

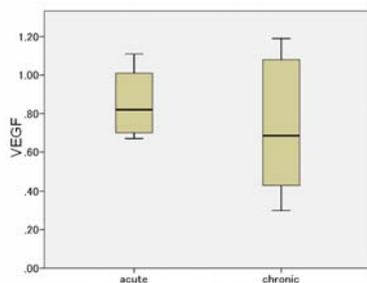
(2) VEGF

(2-1)再生不良性貧血の症例とコントロールでの比較。  
 再生不良性貧血の症例と正常コントロールにおいて VEGF の発現量に有意な変化はなかった [0.81 ( 0.22-1.31 ) vs 1.03 (0.49-1.63)] (p = 0.368)。

図 1

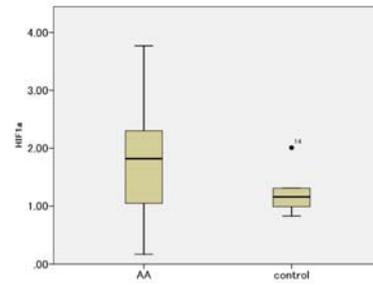


(2-2) 再生不良性貧血症例での進行度の変化。  
 再生不良性貧血症例で急性に進行する症例と慢性に進行する症例で有意差はなかった [0.88 (0.22-1.31) vs 0.73 (0.30-1.19)] (p = 0.445)。

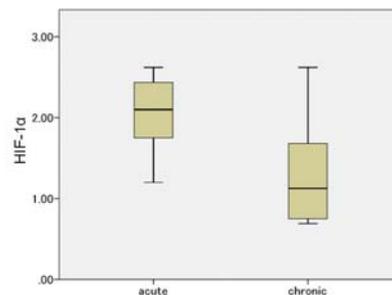


### (3) HIF-1 $\alpha$

(3-1)再生不良性貧血症例とコントロールとの比較。  
 再生不良性貧血症例と正常コントロールにおいて HIF-1 $\alpha$  の発現量に有意な変化はなかった [1.76 (0.17-3.77) vs 1.24 (0.83-2.01)] (p = 0.282)。



(3-2) 再生不良性貧血症例の進行度での変化。  
 急性に進行する症例が HIF-1 $\alpha$  の発現量が高い傾向にあったが慢性に進行する症例との間に有意差はなかった。 [2.13 (0.17-3.77) vs 1.33 (0.69-2.62)] (p = 0.181)



骨髄単核球を使用した検討では、VEGF の発現量は再生不良性貧血患者と正常コントロールでは変化はなかった。さらに、急性に進行する症例と慢性に進行する症例においても発現量に変化なかった。これは血小板あたりの VEGF は有意差をもって異なっていたこと、結果が異なっていた。さらに過去の報告で再生不良性貧血において、正常と比較して VEGF の mRNA レベルでの発現量が低いとあったが、今回の結果はその報告とも異なっていた。

HIF-1 $\alpha$  に関して、骨髄単核球での検討では再生不良性貧血症例と正常との比較では、発現量に差はなく、再生不良性貧血症例内での急性に進行する症例と慢性に進行する症例での検討でも発現量に変化はなかった。

骨髄単核球での検討であり、VEGF に変化がないため HIF-1 $\alpha$  でも変化はないのは当然か

もしれない。再生不良性貧血の症例では細胞数に問題があるが、骨髄中の巨核球、または造血幹細胞を純化して VEGF、HIF-1 $\alpha$  を検討する必要がある。

#### 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

児玉 祐一 (KODAMA YUICHI)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・医員

研究者番号：20535695