

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23659424

研究課題名（和文）血管新生制御機構に関与する新規遺伝子の同定と循環器疾患における意義の解明

研究課題名（英文）Identifying a novel gene contributing to vascular maturation and its significance in cardiovascular diseases.

研究代表者

齋藤 能彦 (SAITO YOSHIHIKO)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30250260

研究成果の概要（和文）：

TGF β スーパーファミリーの受容体 ALK1 はリガンド BMP9/10 刺激を受け、血管形成や血管成熟に重要な役割を持つ。またヒトにおいて ALK1 は遺伝性出血性毛細血管性拡張症や肺高血圧などの循環器疾患の原因遺伝子としても知られている。しかし、それらのシグナルの下流で機能する遺伝子は不明な点が多い。我々は本研究で遺伝子 X が ALK1/BMP2 複合受容体の下流で機能し、血管新生や血管の成熟化に働く重要な遺伝子であることを遺伝子 X 欠損 (KO) マウスを用いて証明した。それら遺伝子 X KO マウスは血管形成異常で胎生致死した。KO マウスの血管形成異常の表現型の一因として動脈形成に重要とされる Notch 活性や AKT のリン酸化が障害されていることを見出した。遺伝子 X は ALK1/BMP2 シグナルの下流で血管発生に重要な遺伝子であることを証明した。

次に遺伝子 X と肺高血圧の関連を調べるため、遺伝子 X の薬剤誘導型コンディショナル KO (cKO) マウスを作製した。現在のところ通常酸素化の飼育では cKO マウス肺で軽度の筋性動脈の肥厚を認めるのみであり、明らかな肺高血圧は誘発されていない。今後は環境要因を変化させることが必要である。

研究成果の概要（英文）：

Members of the transforming growth factor β superfamily play essential roles in various aspects of embryonic development and physiological organ function. Among them, bone morphogenetic protein (BMP) 9 and BMP10 regulate embryonic vascular development by activating their endothelial receptor ALK1. ALK1-mediated intracellular signaling is implicated in the etiologies of human diseases such as HHT and pulmonary hypertension, but their downstream functional proteins are largely unknown. We identified gene X to be an embryonic endothelium-enriched gene activated by BMP9 and BMP10 through the ALK1 receptor. Gene X null mice showed embryonic lethality due to impaired differentiation of arterial endothelium and defects of vascular morphogenesis. The activity of Notch- and Akt-mediated signaling, which is essential for vascular development, was down regulated in gene X null mice, suggesting that the gene X deficiency leads to vascular demise, at least in part, through dysregulation of these signaling pathways. These data indicated that gene X play indispensable roles downstream of BMP9/BMP10-ALK1 signaling during endothelial differentiation and vascular morphogenesis.

Mutations in *ACVRL1/ALK1* and *BMPR2* cause hereditary hemorrhagic telangiectasia as well as pulmonary arterial hypertension in humans. Gene X might be involved in the mechanisms of these diseases as an additional causative gene or a modifier. To demonstrate this hypothesis we analyzed conditional KO mice of tamoxifen-induced inactivation of gene X. However cKO mice did not develop pulmonary hypertension spontaneously under unstressed conditions. We are investigating whether hypoxia induced severe pulmonary hypertension in cKO mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	3,000,000	900,000	3,900,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：(1) 血管新生 (2) 動脈分化 (3) TGFβ スーパーファミリー (4) 肺高血圧

1. 研究開始当初の背景

近年、血管新生は癌や心筋梗塞・脳梗塞等の虚血性疾患の発症進展への関与や治療的意義を持つことが報告されている。そのため、血管新生の制御機序を解明することは、発生期の血管形成のみならず成人疾患の治療においても重要である。我々動脈内皮細胞を BMP9 で刺激した際に濃度依存的に誘導される遺伝子をマイクロアレイで網羅的に解析、その中で遺伝子発現が数百倍まで亢進し機能解析されていない新規遺伝子（仮称遺伝子 X）に着目し研究を開始した。

内在性の遺伝子 X の機能を調べるために遺伝子 X 欠損(KO)マウスを作製しその表現型を解析した。KO マウスは胎生 E10.5 日齢前後で血管新生障害のため胎生致死した。遺伝子 X と血管新生のメカニズムを解析する必要がある。

次に遺伝子 X の成体での発現は肺および心臓で豊富に認められた。遺伝子 X は ALK1/BMPR2 受容体で発現が調節されていた。これらの受容体の変異は肺高血圧に関連

することが知られている。そこで肺高血圧の代表的もであるモノクロタリン肺高血圧ラットモデルを作製し遺伝子 X の発現を確認したところ、肺での発現が著しく低下しており、肺高血圧や何らかの関与があるという仮説が立てられた。薬剤誘導型 cKO マウスを用いて肺高血圧との関連を検討する必要がある。

2. 研究の目的

遺伝子 X の血管発生期における動脈化、動脈成熟化に関与する下流シグナルを研究する。また、遺伝子 X と成体における肺高血圧の関係を薬剤誘導型 cKO マウスを用いて検討する。

3. 研究の方法

遺伝子 X の胎生早期の血管新生に対する機序解明のために KO マウス胎仔を使用し ISH 法や免疫組織染色法で血管新生に関する遺伝子の発現を解析する

また、成体での肺高血圧や右心不全および

虚血性血管新生における遺伝子 X の意義を解析する。そこで遺伝子 X の flox マウスと CAG-ER-Cre トランスジェニックマウスとの交配で得られたマウスに薬剤（タモキシフェン）を投与し成長後に遺伝子欠損を誘導できるコンディショナル KO (cKO)マウスを作成する。その上でその成体で遺伝子 X 欠損を誘導できる cKO マウスに肺高血圧が惹起されるかを検討する。

4. 研究成果

我々の血管新生に対する研究の中から TGFβ ファミリーのリガンド Bone morphogenetic protein (BMP) 9 および BMP10 から受容体 ALK1/BMP2 を介した刺激により内皮細胞で誘導される遺伝子を網羅的に解析した。さらにそれらの遺伝子から動脈内皮細胞に豊富に存在するが機能解析されていない新規遺伝子 X に着目した。X のアミノ酸配列は脊椎動物間で強く保存されていた。遺伝子 X 欠損 (KO) マウスを作製したところ胎生 E10.5 日齢前後で血管形成異常のため胎生致死した。その詳細な表現型を解析したところ動脈マーカーの低下を認め動脈分化障害が認められ、また、平滑筋マーカーが動脈周囲で発現低下する血管成熟障害のため胎生致死となることが判明した。また、E9.5 日齢では動静脈奇形 (AVM) が認められることを見出した。さらにこの遺伝子 X の KO マウスでは血管形成、動脈化に重要とされる Notch1 の cleavage と Akt のリン酸化が選択的に障害されていることが確認された。さらに KO マウスにおける Notch1 の活性化障害の原因として Notch の切断の関与する γ セクレターゼの主要構成成分のプレセニリンのリン酸化が低下していることを見出した。さらに、血管内皮における遺伝子 X が重要な Tie2/Cre マウ

スを用いた内皮特異的遺伝子 X 欠損マウス、コンディショナル KO (cKO) を作製し、ストレート KO マウスの表現型と同様であることも確認した。

ALK1/BMP2 の変異は肺高血圧の原因遺伝子であることが報告されている。胎生期の血管発生に関与した遺伝子 X は ALK1/BMP2 受容体複合体の下流で発現が調節されており、成人循環器疾患の肺高血圧の発症・進展に関与すると仮説を立てた。ストレート KO マウスは胎生致死のため成体における KO マウスの解析は不可能であった。そこで遺伝子 X の薬剤（タモキシフェン）誘導性コンディショナル KO (cKO) マウスを作成し成長後に遺伝子欠損を誘導できるマウスを作製した。通常飼育下で誘導型 cKO マウスはごく軽度の肺動脈平滑筋の増殖肥厚が認められるのみであり、右室重量などに変化は認められなかった。今後肺高血圧の進展に重要な環境因子の一つである低酸素刺激を実施しそれら cKO マウスとコントロールマウスとの病理組織学的解析、心エコー、右室圧測定法を用いて遺伝子 X と肺高血圧との関連を研究し、成体における遺伝子 X の役割を検討する。

さらに、肺高血圧症例の患者血球のゲノム遺伝子から遺伝子 X のエクソンおよびその周辺領域の情報を直接シーケンス法で解析し変異の有無を確認していく方針としている。

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）

現在投稿中

〔学会発表〕（計 1 件）

Somekawa S, Hayashi H, Sakabe M, Ioka T, Sato G, Inada K, Uemura S, Nakagawa O, Saito Y
Tmem100, A Novel BMP-dependent Endothelial Gene Essential for Arterial Development and Morphogenesis.
American Heart Association Scientific Session
2011 オーランド アメリカ

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 能彦 (SAITO YOSHIHIKO)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30250260

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：