

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月28日現在

機関番号：	15501
研究種目：	挑戦的萌芽研究
研究期間：	2011~2012
課題番号：	23659615
研究課題名（和文）	熱ショック転写因子は血管再生治療の新規標的分子になり得るか？
研究課題名（英文）	Can heat shock factor 1 be a novel target for vascular regeneration？
研究代表者	
	美甘 章仁 (MIKAMO AKIHITO)
	山口大学・大学院医学系研究科・准教授
	研究者番号： 30372709

研究成果の概要（和文）：

我々は HSF1 が骨髄由来幹細胞の動員や集積による虚血誘導性の血管新生に貢献しているか否かを HSF1 ノックアウトマウス (HSF1-KO マウス) を用いて解析した。WT マウスと比較して HSF1-KO マウスの虚血下肢において血流量の回復率と毛細血管密度が有意に減少していた。さらに骨髄由来幹細胞の虚血部位への集積、遊走能、接着能、生存率も有意に減少していた。以上の結果より、HSF1 は骨髄幹細胞の動態制御を介して虚血誘導性の血管新生に寄与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We examined whether HSF1 contributes to ischemia-induced angiogenesis through the mobilization and recruitment of BM-derived stem/progenitor cells using HSF1-knockout (KO) mice. After the induction of ischemia, blood flow and microvessel density in the ischemic hindlimb were significantly lower in the HSF1-KO mice than in the wild-type (WT) mice. The mobilization of BM-derived Sca-1- and c-kit-positive cells in peripheral blood after ischemia was significantly lower in the HSF1-KO mice than in the WT mice. BM stem/progenitor cells from HSF1-KO mice showed a significant decrease in their recruitment to ischemic tissue and in migration, adhesion, and survival when compared with WT mice. These findings suggest that HSF1 contributes to ischemia-induced angiogenesis by regulating the mobilization and recruitment of BM-derived stem/progenitor cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目： 外科系臨床医学、外科学一般

キーワード：血管再生、Heat shock factor 1、骨髄細胞、幹細胞、虚血

1. 研究開始当初の背景

熱ショック転写因子 Heat shock factor 1 (HSF1) は熱ショックストレスに応答して Heat shock protein (HSP) の発現を誘導し、生体防御の役割を担うと考えられていた。しかし、近年、熱ショックのみならず様々なストレスに応答して、HSP だけでなく多様な遺

伝子群を制御することで、生体の恒常性維持に関わることが分かってきた (Nat Rev Mol Cell Biol 2010;11:545)。虚血・低酸素といったストレスにも HSF1 が応答し (Cardiovasc Res 2004;61:437)、さらに血管再生にも HSP が関与することが報告されている (Cardiovasc Res 2005;65:728, Cardiovasc

Res 2008;78:294)。しかしながら、上流分子である HSF1 自体と血管再生との関連性は不明である。我々は、HSF1-KO マウスを用いた下肢虚血モデルを用いて血管再生能を検討した結果、HSF1-KO マウスでは血流改善効果が顕著に低下することが分かり、虚血組織での血管再生に HSF1 が関与することが示唆された。今後、メカニズムのさらなる解析と共に、血管再生治療の分子標的としての可能性についての検討が必要と考えられる。

2. 研究の目的

虚血性疾患が増加している現代において、血管再生治療の標的分子を同定することが今後の治療戦略の構築に有用と考えられる。我々は、これまで血管再生や血管生物学の領域では着目されていなかった熱ショック転写因子 HSF1 が血管再生に関与する可能性を見出した。そこで、本研究では、HSF1 が血管再生治療の新規標的分子になり得るか否かについて明らかにすることを旨とし、HSF1 ノックアウトマウス (HSF1-KO マウス) を用いて血管再生における HSF1 の役割を解明することを研究目的とする。

3. 研究の方法

(1) HSF1-KO マウスと WT マウスの虚血下肢における血流量の回復率と毛細血管密度を比較する。虚血下肢の血流量は Laser Doppler 法にて、また毛細血管密度は虚血下肢筋肉の凍結切片を用いて alkaline phosphatase 法にて測定する。

(2) HSF1-KO マウスと WT マウスを用いて骨髄幹細胞の細胞機能を比較する。HSF1-KO および WT マウスから骨髄幹細胞を単離し、培養 1 日後に、遊走能、接着能、生存率を比較・検討し細胞機能を評価する。

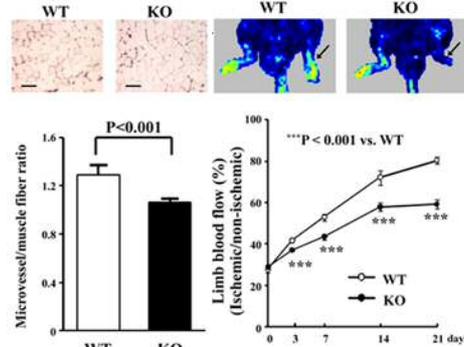
(3) HSF1-KO マウスと WT マウスを用いて骨髄幹細胞の細胞動態を比較する。FACS 解析にて虚血 3 日後の末梢血中の Sca-1 陽性、c-kit 陽性細胞を定量することで、骨髄幹細胞の動員を評価する。また、虚血 1 日後に CFSE 蛍光標識された骨髄細胞を経静脈的に投与し、虚血組織中の CFSE 陽性細胞を組織学的に解析することで、集積を評価する。

(4) 骨髄キメラマウス作製後に虚血組織での血流回復能を評価する。HSF1-KO マウス由来の骨髄細胞に置換した WT マウスおよび WT マウス由来の骨髄細胞に置換した HSF1-KO マウスの虚血下肢における血流量の変化をそれぞれ対照群と比較・検討する。

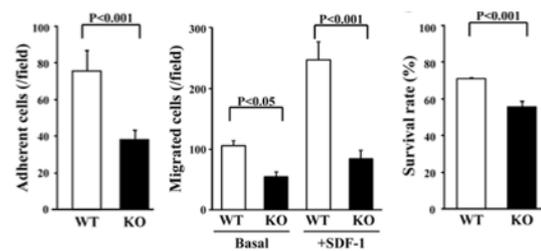
4. 研究成果

(1) 虚血下肢筋肉の凍結切片を用いた

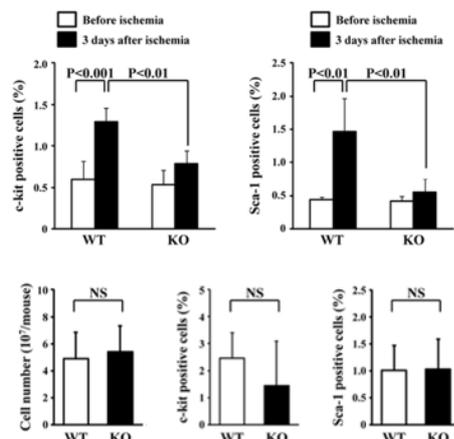
alkaline phosphatase 法による解析から HSF1-KO マウスの虚血下肢では、毛細血管密度が減少していることが明らかになった。さらに WT マウスに比べ HSF1-KO マウスの虚血下肢では Laser Doppler 法により血流量回復の低下が認められた。



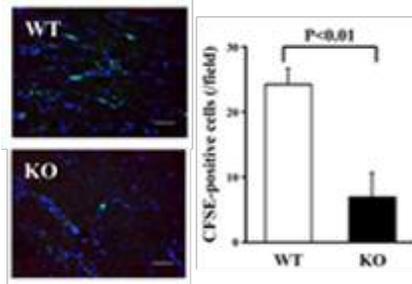
(2) WT マウスに比べ HSF1-KO マウス由来の骨髄細胞では、フィブロネクチンに対する接着能、SDF-1 誘導性の細胞遊走能および細胞生存率の低下が認められた。



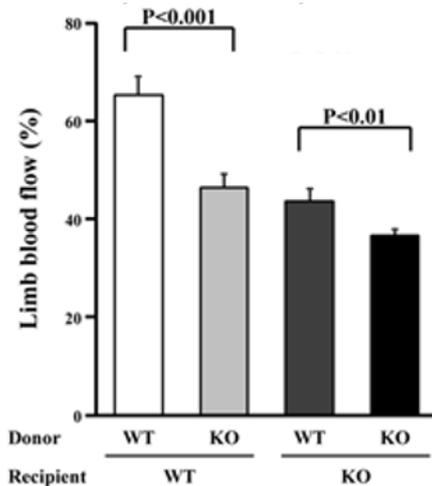
(3) 虚血 3 日後では、HSF1-KO マウスにおいて c-kit および Sca-1 陽性骨髄由来細胞の末梢血中への動員が有意に減少したが、骨髄細胞における c-kit および Sca-1 陽性細胞の割合は両者間で有意差を認めなかった。



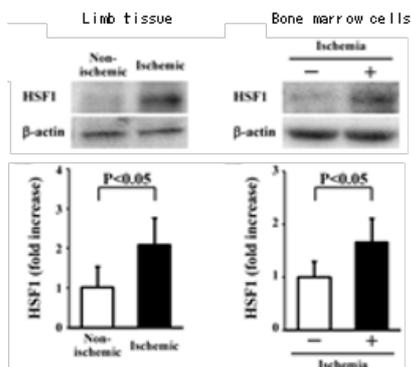
(4) HSF1-KO マウスにおいて経静脈的に投与された骨髄細胞 (CFSE 蛍光標識) の虚血下肢への集積の減少が蛍光顕微鏡を用いて観察された。核は DAPI で染色 (青色) された。



(5) HSF1-KO マウス由来の骨髄細胞に置換した WT マウスの虚血下肢では血流量の回復が低下し、WT マウス由来の骨髄細胞に置換した HSF1-KO マウスの虚血下肢では血流量の回復が増強した。



(6) WT マウスの虚血後の下肢および骨髄細胞では非虚血群に比べて有意に HSF1 発現量の増加が認められた。



(7) 本研究によって、HSF1 が虚血組織での血管再生の標的分子になることが示され、HSF1 誘導が血管再生の新規の治療戦略となることが期待される。現在、既に HSF1 誘導効果をもつ薬が臨床で用いられており、臨床応用につながる可能性も考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Kubo M, Li TS, Kurazumi H, Takemoto Y, Ohshima M, Yamamoto Y, Nishimoto A, Mikamo A, Fujimoto M, Nakai A, Hamano K. Heat shock factor 1 contributes to ischemia-induced angiogenesis by regulating the mobilization and recruitment of bone marrow stem/progenitor cells. PLoS One. 2012, 7(5): e37934. (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 久保正幸, 李 桃生, 藏澄宏之, 大島真子, 美甘章仁, 藤本充章, 中井 彰, 濱野公一. マウス下肢虚血モデルでの血管新生および骨髄幹細胞の動態制御における熱ショック転写因子 HSF1 の役割. 第 11 回日本再生医療学会総会 2012 年 6 月 14 日 パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ② 久保正幸, 李 桃生, 大島真子, 西本 新, 山本由美, 美甘章仁, 藤本充章, 中井 彰, 濱野公一. 熱ショック転写因子 HSF1 欠損マウスでは骨髄幹細胞の動態が障害されることで、虚血組織での血管新生が低下する. 第 53 回日本生化学会中国・四国支部例会 2012 年 5 月 18 日 岡山大学 創立五十周年記念館 (岡山県)

- ③ 久保正幸, 李 桃生, 美甘章仁, 藤本充章, 中井 彰, 濱野公一. 熱ショック転写因子 HSF1 は骨髄幹細胞の動態制御を介して、虚血組織での血管新生に関与する. 第 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 13 日 パシフィコ横浜 (神奈川県)

[その他]

ホームページ

山口大学大学院器官病態外科

<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~surg-1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

美甘 章仁 (MIKAMO AKIHITO)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：30372709

(2)研究分担者

久保 正幸 (KUBO MASAYUKI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
助教
研究者番号：60420519