

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861231

研究課題名(和文)動脈硬化性病変における色素上皮由来因子(PEDF)の機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in atherosclerotic lesions

研究代表者

久良木 亮一 (Kyuragi, Ryoichi)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：20631592

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：色素上皮由来因子(PEDF)はこれまでに神経保護作用と強力な血管新生抑制作用を有しているとの報告がある。そこで我々はPEDFを組織特異的に過剰発現させるトランスジェニックマウス作製後、各種血管病変モデルを用いた解析により、PEDFの各種血管病変への関連性を検討しようと試みた。しかし、トランスジェニックマウス用コンストラクトは作製できたが、ES細胞への導入はできなかった。受精卵への遺伝子導入も試みたが、マウス作製には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：There were several reports of the pigment epithelium-derived factor (PEDF) has a neuroprotective effect and strong anti-angiogenic effect so far. We therefore tried to product the tissue-specific overexpression of PEDF transgenic mice. We attempted to analysis interaction between PEDF and various vascular lesions through using vascular animal model. However, the transgenic mouse constructs have been able to prepare, which was not introduced into the ES cells. Gene transfer into fertilized eggs were also tried but did not reach PEDF transgenic mouse production.

研究分野：血管外科

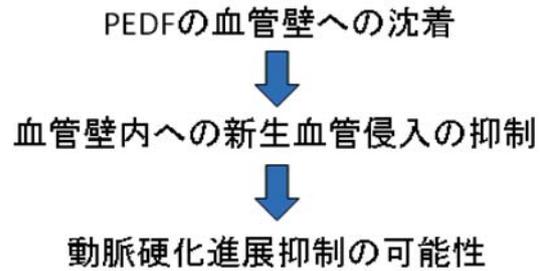
キーワード：血管新生抑制 色素上皮由来因子

### 1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞や脳梗塞などの動脈硬化性疾患は日本のみならず世界の死因としても重要な基礎疾患となっている。その素地となる動脈硬化は最近の研究を通して“血管新生病”と認識されており、ヒト冠動脈では新生血管を認め、動脈硬化巣プラークの進展に関与していると推測される。この際、血管内皮増殖因子 (VEGF) が血管新生において重要な役割を果たしていると考えられており、VEGF-A 発現量と動脈硬化巣や新生内膜の程度との間に相関があるなどの報告がある。しかしながら血管新生抑制因子と動脈硬化巣との関連性に関する報告は皆無である。

色素上皮由来因子 (PEDF; pigment epithelium-derived factor) は、網膜色素上皮細胞より分離された約 50kD のセルピンファミリー蛋白であり、神経保護作用と血管新生抑制作用を有することが報告されている。また PEDF は色素上皮細胞から光受容体間マトリックスに分泌され、光受容体細胞上で作用し、PEDF 受容体は光受容体上に局在し、光誘導型のダメージやアポトーシスから保護されている。PEDF は、これまでに哺乳動物の眼球で発見された最も強力な血管新生インヒビターであり、抗アポトーシス因子及び神経栄養因子の発現を誘導す  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  が活性化すると、ニューロンの生存を促進する。最近の研究で、眼球における PEDF レベルの減少が、糖尿病性網膜症や他の網膜神経萎縮症に関連があることが示されている。さらに、PEDF の神経向性や抗血管新生の性質から、このタンパク質が、腫瘍の成長に関与する血管新生をコントロールする能力を持つことも示唆されている。一方、ヒト動脈硬化巣では PEDF の沈着が不均一な部位に特異的に血管新生が発生し、その進展に関与することを明らかになっている。しかしながら、PEDF が種々の血管病変に関与するという直接的証明は、未だなされていないのが現状である。

【図1 PEDF の新生血管抑制作用】



### 2. 研究の目的

色素上皮由来因子 (PEDF; pigment epithelium-derived factor) は、網膜色素上皮細胞より分離された約 50kD のセルピンファミリー蛋白であり、神経保護作用と血管新生抑制作用を有することが報告されているが、PEDF が種々の血管病変に関与するという直接的証明は、未だなされていないのが現状である。本研究は、血管新生抑制作用を有する色素上皮由来因子 (PEDF; pigment epithelium-derived factor) が各種血管病変形成に関与していることを証明し、PEDF の発現調整を通して動脈硬化性疾患の予防が可能かどうか、解明することを目的としている。



### 3. 研究の方法

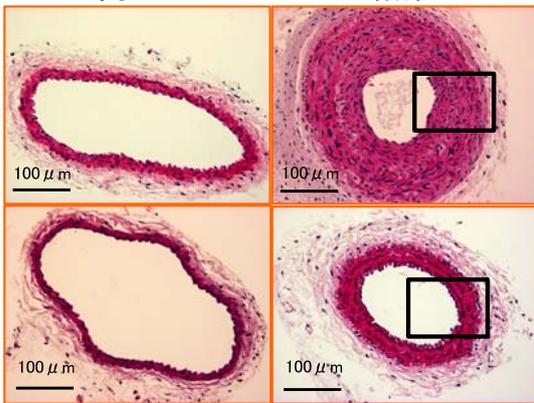
「PEDF は各種血管病変形成に関与する重要な因子である」という仮説のもと、以下のことを明らかにする。

(1) 組織特異的 PEDF 過剰発現マウスを作製し、動脈硬化性疾患のモデルマウスである ApoE 欠損マウスと交配させる。得られたマウスに高脂肪食負荷した後、各週数に応じ動脈組織を採取し、経時的な動脈硬化性病変の病理学的変化を明らかにする。

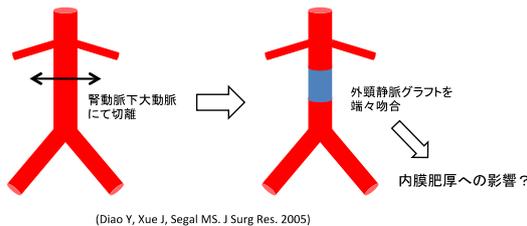


【図2 組織特異的 PEDF 過剰発現マウスの作製方法】

(2) 組織特異的 PEDF 過剰発現マウスの動脈ワイヤー傷害モデルを作製し、内膜肥厚への影響を検討する。



(3) 組織特異的 PEDF 過剰発現マウスの静脈グラフトモデルを作製し、内膜肥厚への影響を検討する。

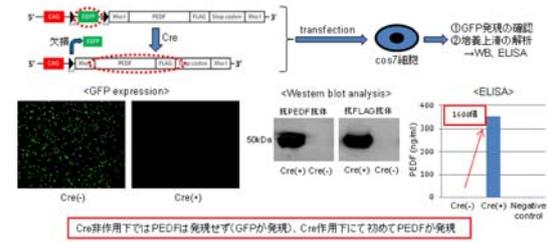


(Diao Y, Xue J, Segal MS. J Surg Res. 2005)

#### 4. 研究成果

(1) PEDF を有するコンストラクトの作製および培養細胞での発現確認】

遺伝子組み換え技術を用いて PEDF コンストラクトを作製した。当該遺伝子を過剰発現させる性質を有した CAG プロモーター下に Cre-loxP システムを機能させるためのスタッフアーを挿入、その両端に loxP を配置させた。スタッフアーには EGFP 遺伝子を配置させ、PEDF 発現の有無を視覚的にも確認できるような工夫を行った。



#### (2) PEDF トランスジェニックマウスの作製

トランスジェニックマウス作製にさいしては、コンストラクトを制限酵素処理し、精製後、ES 細胞にエレクトロポレーション法にて遺伝子導入することとした。ES 細胞へのコンストラクト導入の確認は抗生剤耐性遺伝子によるセレクションにて行ったが、陽性コロニーは得ることができなかった。そのため、受精卵へのコンストラクトインジェクション後、偽妊娠マウスへの移植を行い方針とした。この方法もコンストラクト導入できず、トランスジェニックマウス作製はできなかった。

#### 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)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕  
○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

久良木 亮一 (KYURAGI, Ryoichi)  
九州大学・医学研究院・共同研究員  
研究者番号：20631592

(2) 研究分担者  
なし

(3) 連携研究者  
なし