

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460395

研究課題名(和文) 網膜における網羅的発現解析を端緒とする新規生理的血管新生関連シグナルの解明

研究課題名(英文) Identifying novel angiogenesis-related pathway from differentially expressed genes during retinal development obtained by the microarray analysis

研究代表者

中野 正和 (Nakano, Masakazu)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70381944

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの網膜では出生直後に血管新生が始まることから、生理的な血管新生の最適なモデルである。我々は、出生前後のマウス網膜を用いた網羅的発現解析により、これまでに報告のない複数の血管新生関連候補遺伝子を獲得している。

本研究では、独自に開発した高感度発現定量法(足立ら, Genes Cells, 2015)により網羅的発現解析の結果が再現された細胞接着関連遺伝子について、この遺伝子が血管新生に及ぼす機能的な影響を検討した。その結果、この遺伝子の発現を一過性に抑制した血管内皮細胞株では、血管新生の誘導が阻害された。

本遺伝子を起点とした血管新生の新たな分子メカニズムの解明が期待される成果である。

研究成果の概要(英文)：As angiogenesis of mouse retina begins at right after birth, developing mouse retina has been serving as an ideal model for investigating angiogenesis. We previously performed a comprehensive gene expression analysis using pre- and postnatal mouse retina, and obtained several candidate genes that were differentially expressed during retinal development.

We here analyzed whether these genes were functionally involved in the angiogenesis. After confirming the expression results by our highly sensitive qPCR system specialized for developmental retina (Adachi et al., Genes Cells, 2015), we analyzed the effect on angiogenesis of one gene encoding a cell adhesion molecule. When the expression of this gene was transiently suppressed in mouse endothelial cells, we found that the induction of angiogenesis was significantly inhibited.

The angiogenesis-related gene identified in this study should be a promising tool for discovering a novel molecular mechanism of angiogenesis.

研究分野：ゲノム医科学

キーワード：血管新生 網膜 網羅的遺伝子発現解析 マイクロアレイ シグナル伝達 血管内皮細胞 ノックダウン 細胞接着

1. 研究開始当初の背景

1960年代にFolkmanによって癌の抗血管新生治療が提唱されて以来 (Folkman, *N Engl J Med*, 1971), 血管新生領域における分子生物学研究が飛躍的に進展し、現在では主要な血管新生関連分子である血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) を標的とする抗血管新生療法が様々な癌腫や眼内血管新生に対して臨床応用されるまでに至っている。一方、2003年に網膜血管新生において血管内皮細胞の伸長方向を決定するtip (先端) 細胞の概念が新たに提唱された (Gerhardtら, *JCB*, 2003) ことを契機に、血管新生の過程で観察される血管内皮細胞の分化や遊走に関連する詳細な分子メカニズムを解明する基礎研究も急速に進展している。しかし、血管新生においては、複数のシグナル伝達系が多様な細胞を異なるタイミングで制御しており、依然その分子メカニズムの全容の解明には至っていない。

研究代表者らは、マウスの網膜の血管が出生直後に発達を開始することに着目し、出生前後のマウス網膜では血管新生に関連するシグナル伝達系を構成する遺伝子群の発現が顕著に変動していると考えた。また、遺伝的に均質な純系マウスの網膜は病的素因を現有せず、外部環境からの影響も極小であることから理想的な生理的血管新生モデルである。そこで本研究では、生理的血管新生に関連する分子メカニズムの全容の解明を目指し、出生前後のマウス網膜で生じている血管組織の微小な遺伝子発現を捉えるために、低発現の変動を高精度に検出できるように定評のあるマイクロアレイ (3D-Gene, 東レ) を用いて網羅的遺伝子発現解析を実施した。その結果、これまでに血管新生との関連性が報告されていないVEGF活性を制御するNotchシグナルの転写因子やmicroRNAの合成に関与する分子等の興味深い候補遺伝子の抽出に成功した。

2. 研究の目的

本研究では、出生前後のマウス網膜を用いた網羅的遺伝子発現解析により獲得した候補遺伝子のうち、細胞接着に関連する遺伝子についてマウス血管内皮細胞株に及ぼす機能的な影響を解析することによって、生理的血管新生に関連する新規分子ネットワークの同定を目指した。

3. 研究の方法

まず、出生前後のマウス網膜由来のマイクロアレイデータから抽出した候補遺伝子の発現変動の再現性を検証するために、発生段階のマウス網膜における高感度な定量PCR法 (Adachiら, *Genes Cells*, 2015) を独自に開発した。次に、マウス血管内皮細胞株 (TKD2) において、これらの候補遺伝子の発現をsiRNAにより一時的に抑制 (ノックダウン) することが血管新生に与える影響を評

価するためのイメージングサイトメーター (IN CELL ANALYZER, GEヘルスケア) を用いた定量系を構築した。最終的には、候補遺伝子の一つである細胞接着関連遺伝子について、血管新生に与える機能的な影響を解析した。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果

発達段階のマウス網膜における高感度定量PCR法の開発と再現性データの取得

定量PCR法では、目的遺伝子の測定値をサンプル間で一定に発現しているリファレンス遺伝子の測定値で補正することによって目的遺伝子の発現量を定量する。リファレンス遺伝子として β -actin等のハウスキーピング遺伝子が汎用されているが、発達段階のマウス網膜ではこれらの遺伝子の発現が変動している可能性があり、目的遺伝子の発現量を誤測定することが危惧される。我々が複数のリファレンス遺伝子を検討した結果においては、例えば、網膜視細胞分化に関連する遺伝子*Crx*を*Sdha*により補正した場合、定量性に優れたSAGE法による遺伝子発現値と近似したが、 β -actinにより補正した場合には定量結果が著しく異なることが判明した (図1)。そこで本研究では、出生前後のマウス網膜におけるリファレンス遺伝子として*Sdha*を採用し、マイクロアレイデータから抽出した候補遺伝子の発現変動の再現性を検証した。その結果、定量PCR法による候補遺伝子の発現値はマイクロアレイデータと一致することが明らかになり、再現された微小な発現変動結果がマウスの網膜における血管新生に関連していることが期待される結果を得ることに成功した。

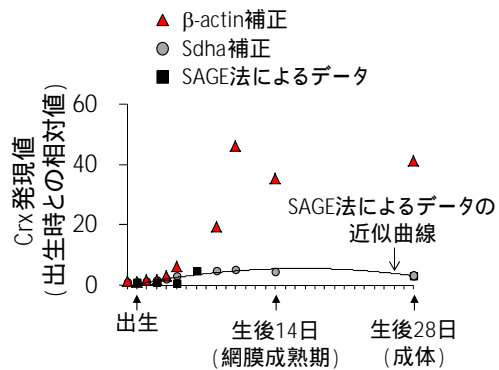


図1. 出生前後のマウス網膜における*Crx*発現値

マウス血管内皮細胞株を用いた血管新生評価系の構築

まず、TKD2をコラーゲンゲル上にて培養することで誘導された血管新生について、顕微鏡画像から細胞の面積や伸長量といった血管新生能を数値化するためのIN CELL ANALYZERのマクロを構築した。このマクロを用いた画像解析の結果、TKD2の細胞面積は播種密度に依存して増加した (図2, 3)。

また、細胞伸長量は播種密度が 2.5×10^5 cells/mL以上で飽和した(図3)ことから、TKD2の血管新生の評価に最適な播種密度を決定することができた。

次に、*Gapdh*に対するsiRNAを用いてTKD2におけるsiRNAの導入条件の至適化を試みた。その結果、 $1 \mu\text{M}$ のAccell siRNA(GEヘルスケア)をTKD2に導入した時に*Gapdh*の発現が約80%抑制されることが明らかになり、候補遺伝子のノックダウン解析を実施する際にも本条件を採用することとした。これらの画像解析とsiRNAによるノックダウンにより、TKD2において候補遺伝子の発現が血管新生に与える影響を評価するための定量系を構築することに成功した。

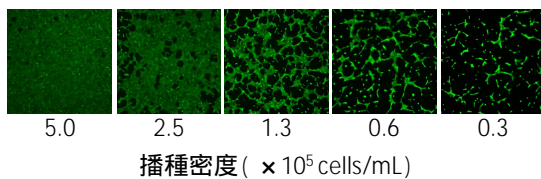


図2. 24時間コラーゲンゲル上で培養したTKD2

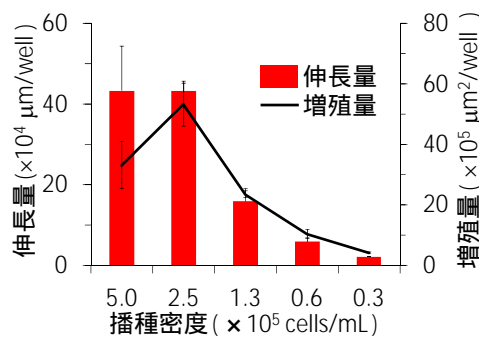


図3. 24時間コラーゲンゲル上で培養したTKD2の伸長量および増殖量

候補遺伝子が血管新生に及ぼす影響

研究代表者らが取得した候補遺伝子の一つである細胞接着に関連する遺伝子について、血管新生に与える機能的な影響を評価した。まず、この候補遺伝子に対するsiRNAをTKD2に導入し、遺伝子発現のノックダウン効率を検討した。その結果、マウスの既知遺伝子の配列とは一致しないsiRNA(コントロールsiRNA)を導入したTKD2と比較して候補遺伝子の発現量は約80%抑制された(図4)。

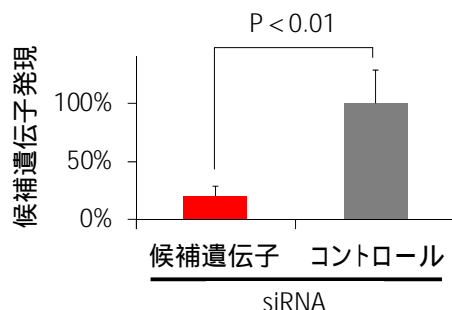


図4. 細胞接着関連遺伝子の発現(コントロールとの相対値)

次に、候補遺伝子の発現が抑制されたTKD2をコラーゲンゲル上で24時間培養することにより誘導された血管新生の増殖量と伸長量を定量した。その結果、コントロールsiRNAを導入したTKD2と比較して候補遺伝子の発現を抑制したTKD2では血管新生の増殖量及び伸長量が共に有意に($P < 0.01$)抑制されることが明らかになった(図5)。従って、本研究で同定された細胞接着に関連する遺伝子はこれまでに報告されていない新規血管新生関連遺伝子であると考えられた。

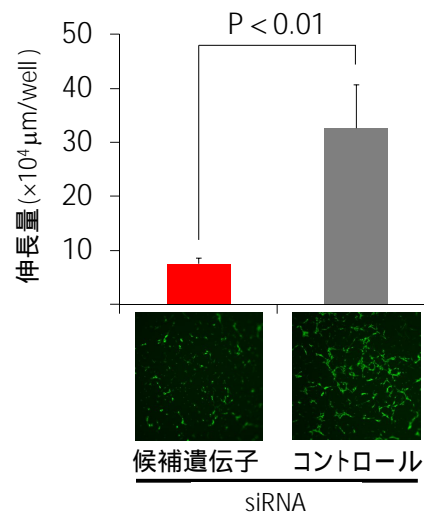


図5. 候補遺伝子が抑制されたTKD2から誘導された血管新生(下写真)の伸長量

(2) 国内外における位置づけとインパクト

2007年に、VEGFに対するヒト化中和抗体であるベバシズマブが本邦で認可されて以来、複数の抗血管新生抗体薬が広く臨床応用されている。一方、症例によっては治療効果が低いことや重篤な有害事象も報告されていることから、血管新生を制御する分子標的を新たに同定することは今後も重要な課題である。本研究において初めて血管新生と関連付けられた細胞接着関連遺伝子は、VEGFシグナルとは異なる経路から血管新生を制御している可能性が考えられる。従って、本遺伝子を起点とした血管新生における分子メカニズムが明らかになれば、既存の抗血管新生治療薬の課題を克服する新たな分子標的薬の開発が期待される。

(3) 今後の展望

血管新生では、血管内皮細胞が出芽・増殖・伸長・分岐・管腔形成などのイベントを繰り返しながら二次元・三次元のネットワーク構造を形成する。本研究では、血管内皮細胞の増殖と伸長に焦点を当てて解析を行ったが、他のイベントにおける影響を評価することでこの細胞接着関連遺伝子による血管新生制御機序を明らかにしていきたい。さらに、この遺伝子を起点とする遺伝子ネットワークが血管新生に与える影響を詳細に解析

することによって、生理的血管新生の分子メカニズムの全容を解明していきたいと考えている。

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12件)

Aung T, Nakano M, Kinoshita S, Tashiro K, et al. Genetic association study of exfoliation syndrome identifies a protective rare variant at LOXL1 and five new susceptibility loci. *Nat. Genet.*, 査読有. 2017 in press.

DOI:

Takagaki M, Kinoshita M, Nishino K, Nakano M, Adachi H, Ueno M, Kitamura M, Fujimoto Y, Tashiro K, Tomita Y, Imamura F, Yoshimine T. Downregulation of EGFR in a metastatic brain lesion of EGFR-mutated non-small cell lung cancer using a tyrosine kinase inhibitor: A case report. *Oncol. Lett.*, 査読有. 13: 2085-2088, 2017.

DOI: 10.3892/ol.2017.5677

Omi N, Tokuda Y, Ikeda Y, Ueno M, Mori K, Sotozono C, Kinoshita S, Nakano M, Tashiro K. Efficient and reliable establishment of lymphoblastoid cell lines by Epstein-Barr virus transformation from a limited amount of peripheral blood. *Sci. Rep.*, 査読有. 7: 43833, 2017.

DOI: 10.1038/srep43833

Mori K, Nakano M, Tokuda Y, Ikeda Y, Ueno M, Sotozono C, Kinoshita S, Tashiro K. Stronger association of CDKN2B-AS1 variants in female normal-tension glaucoma patients in a Japanese population. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 査読有. 57: 6416-6417, 2016.

DOI: 10.1167/iovs.16-20417

Khor CC, Nakano M, Kinoshita S, Tashiro K, et al. Genome-wide association study identifies five new susceptibility loci for primary angle closure glaucoma. *Nat. Genet.*, 査読有. 48: 556-562, 2016.

DOI: 10.1038/ng.3540

池田陽子, 中野正和. 緑内障遺伝子ハンティングの最前線, あたらしい眼科, 査読無. 33: 267-268, 2016.

Nakano M, Okumura N, Nakagawa H, Koizumi N, Ikeda Y, Ueno M, Yoshii K, Adachi H, Aleff RA, Butz ML, Highsmith WE, Tashiro K, Wieben ED,

Kinoshita S, Baratz KH. Trinucleotide repeat expansion in the *TCF4* gene in Fuchs' endothelial corneal dystrophy in Japanese. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 査読有. 56: 4865-4869, 2015.

DOI: 10.1167/iovs.15-17082

Adachi H, Tominaga H, Maruyama Y, Yoneda K, Maruyama K, Yoshii K, Kinoshita S, Nakano M, Tashiro K. Stage-specific reference genes significant for quantitative PCR during mouse retinal development. *Genes Cells*, 査読有. 20: 625-635, 2015.

DOI: 10.1111/gtc.12254

Li Z, Nakano M, Kinoshita S, Tashiro K, et al. A common variant near *TGFBR3* is associated with primary open angle glaucoma. *Hum. Mol. Genet.*, 査読有. 24: 3880-3892, 2015.

DOI: 10.1093/hmg/ddv128

Aung T, Nakano M, Kinoshita S, Tashiro K, et al. A common variant mapping to CACNA1A is associated with susceptibility to exfoliation syndrome. *Nat. Genet.*, 査読有. 47: 387-392, 2015.

DOI: 10.1038/ng0615-689c

中野正和, 池田陽子. 落屑症候群 / 落屑緑内障に関連する新規遺伝子, あたらしい眼科, 査読無. 32: 1147-1148, 2015.

Nakano M, Ikeda Y, Tokuda Y, Fuwa M, Ueno M, Imai K, Sato R, Omi N, Adachi H, Kageyama M, Mori K, Kinoshita S, Tashiro K. Novel common variants and susceptible haplotype for exfoliation glaucoma specific to Asian population. *Sci. Rep.*, 査読有. 4: 5340, 2014.

DOI: 10.1038/srep05340

[学会発表](計12件)

足立博子, 富永洋之, 丸山悠子, 米田一仁, 丸山和一, 外園千恵, 木下茂, 中野正和, 田代啓. 新規生理的血管新生関連候補遺伝子が血管新生に与える影響の解析. 第6回4大学連携研究フォーラム, 京都, 2016年12月7日.

中野正和. 緑内障を最新ゲノム解析技術で解き明かす, 第11回緑内障若手研究者の会, 京都, 2016年11月5日.

中野正和. Fuchs角膜内皮ジストロフィのゲノムワイド関連解析, 第17回眼科DNAチップ研究会, 京都, 2016年11月3日.

Nakano M, Adachi H, Tokuda Y, Nakagawa H, Ikeda Y, Ueno M, Sotozono C, Kinoshita S, Tashiro K. Genome-wide association study of Fuchs endothelial corneal dystrophy

in a Japanese population. 66th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, Vancouver, Oct. 18-22, 2016.

足立博子, 富永洋之, 丸山悠子, 米田一仁, 丸山和一, 木下茂, 中野正和, 田代啓. マウス血管内皮細胞株を用いた管腔形成能評価系の確立. 第5回4大学連携研究フォーラム, 京都, 2015年11月25日.

中野正和. 遺伝子からゲノムへ -ポストゲノム時代のゲノム医学研究-. 東京理科大学長万部キャンパス「現代科学セミナー」, 長万部, 2015年7月4日.

Nakano M. Genetics study of Fuchs' endothelial corneal dystrophy: What we have learned from glaucoma genetics study. The 1st Advanced Biomedical Engineering Research Center Symposium, Kyotanabe, Feb. 21, 2015.

Nakano M. Genetics study of exfoliation syndrome/exfoliation glaucoma. Kyoto International Workshop in Visual Science 2015, Kyoto, Feb. 20, 2015.

足立博子, 富永洋之, 丸山悠子, 米田一仁, 丸山和一, 吉井健悟, 木下茂, 中野正和, 田代啓. 発達段階の異なるマウス網膜を用いた相対定量PCR法の確立. 第4回4大学連携研究フォーラム, 京都, 2014年12月2日.

Nakano M, Ikeda Y, Tokuda Y, Adachi H, Ueno M, Imai K, Sato R, Omi N, Mori K, Kinoshita S, Tashiro K. Genome-wide association study of exfoliation syndrome/exfoliation glaucoma in a Japanese population. 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, Oct. 18-22, 2014.

中野正和. 大規模データに基づくゲノム医学研究. 宇宙航空研究開発機構 (JAXA) バイオインフォマティクス勉強会, 筑波, 2014年9月17日.

Nakano M. Exfoliation glaucoma-associated gene possibly related to autophagy. Special Interest Group: Genetics, Autophagy, and Glaucoma. World Ophthalmology Congress, Tokyo, Apr. 2-6, 2014.

〔図書〕(計1件)

池田陽子, 中野正和. 緑内障に関連する遺伝子. 緑内障診療クローズアップ. 木内良明 編. メジカルビュー社, 東京: pp6-11, 2014.

〔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

中野 正和 (NAKANO MASAKAZU)
京都府立医科大学・大学院医学研究科
・准教授
研究者番号: 70381944

(2) 研究分担者

田代 啓 (TASHIRO KEI)
京都府立医科大学・大学院医学研究科
・教授
研究者番号: 10263097

(3) 連携研究者

木下 茂 (KINOSHITA SHIGERU)
京都府立医科大学・大学院医学研究科
・教授
研究者番号: 30116024

(4) 連携研究者

佐藤 隆一 (SATO RYUICHI)
京都府立医科大学・大学院医学研究科
・助教
研究者番号: 30717533

(4) 研究協力者

()