

厚生労働省特定疾患調査研究事業

特定疾患の分子病態の解明に関する研究
(H11-特定-40)

平成12年度 研究報告書

平成13年3月

班長 永井 良三

厚生科学研究費補助金総括研究報告

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
総括研究報告書

特定疾患の分子病態の解明に関する研究

総括研究者 永井良三 東京大学大学院医学系研究科・循環器内科

研究要旨

特定疾患の基本病態として、原因不明の炎症、間質細胞の活性化、線維化、血管障害などが大きく関与する。本研究は特定疾患の病態解明と新しい治療法の開発を目指し、（１）神経、血球、心血管細胞の分化機構と幹細胞による再生療法の開発、（２）炎症のメカニズムと間質細胞の活性化および線維化の分子機構、（３）血管障害の分子機構と血管保護療法の開発を目的とする。

分担研究者氏名・所属施設名及び所属施設における職名

永井良三

東京大学大学院医学研究科・循環器内科、教授
西川伸一

京都大学医学研究科分子遺伝学部門・免疫学、発生学、教授

中福雅人

東京大学大学院医学系研究科神経生物学・分子神経生物学、助教授

千葉 滋

東京大学大学院医学系研究科・血液内科学、助手
宮園浩平

東京大学大学院医学系研究科・病理学、教授

中村敏一

大阪大学大学院医学系研究科附属バイオメディカル教育研究センター腫瘍医学部門分子細胞生物学、教授

上野 光

産業医科大学、教授

門脇 孝

東京大学大学院医学研究科糖尿病・代謝内科、助教授

小室一成

千葉大学医学部・第三内科、助教授

森下竜一

大阪大学大学院医学系研究科・遺伝子治療学、助教授

（研究協力者）

長田道夫

筑波大学臨床医学系・病理部、助教授

津田丈秀

東北大学医学研究科・神経科学・神経内科学

発を目指し、（１）神経、血球、心血管細胞の分化機構と幹細胞による再生療法の開発、（２）炎症のメカニズムと間質細胞の活性化および線維化の分子機構、（３）血管障害の分子機構と血管保護療法の開発を目的とする。

本研究は再生医学や血管医学の視点から、特定疾患の病態を解明すると共に、新しい治療法の開発を目指している。同時に、間質細胞の活性化や線維化、炎症の分子機構に基づいた治療法の開発も重要な目的とする。

B. 研究方法

・西川は、試験管内血管構築形成について検討した。昨年ES細胞から血管内皮細胞を誘導し、純化する方法については既に報告した。本年は、この細胞が様々なシグナルに対してどのような反応をするのかをモニターするために、GFP蛋白を導入したES細胞の作成を試みた。

・中福は、神経幹細胞を用いた神経組織の再生・修復のための新規治療の開発について検討した。成体ラット脊髄より神経前駆細胞を単離し、培養系ならびに損傷脊髄組織における挙動を明らかにすることを目的とする研究を行った。そのために、成熟ラットの脊髄より神経前駆細胞を単離し、Neurosphere法を用いて培養し、解析した。

・千葉は、Notchリガンドによる造血制御について検討した。具体的には、（１）Notch受容体のシグナル発生機転と（２）Notchによる造血細胞の分化抑制およびその機序を解析した。

・宮園は、TGF- β の細胞内シグナルについて検討した。そのために、Smadによるシグナルのメカニズムを明らかにし、特にTGF- β レセプターによって誘導される遺伝子を血管内皮細胞を用いてDNAマイクロアレイなどで調べた。またSmadシグナルの調節機構を抑制型Smadを中心に検討し、血管病変の新たな診断法や治療法の開発を目的とした基礎的研究を行った。

・中村は、器官再生と治療への応用について検討した。心筋梗塞に対する新しい治療法の確立を目的として、心筋梗塞モデルにおいてHGFの内因性心筋保護因子として機能、および心筋梗塞に対する発症予防・治療薬としての可能性を解析した。

・上野は、炎症と繊維化のメカニズムと防止につい

A. 研究目的

特定疾患の基本病態として、原因不明の炎症、間質細胞の活性化、線維化、血管障害などが大きく関与する。したがって線維化や血行障害、さらに細胞分化の分子機構を明かにし、これらの分子病態に基づいた治療法を開発することにより、特定疾患の新たな治療戦略の構築が可能となる。

本研究は特定疾患の病態解明と新しい治療法の開

て検討した。細胞外マトリクスの産生・分解を制御している最重要分子であるTGF- β に着目し、TGF- β 受容体の細胞内キナーゼ部分を欠失した変異型受容体 (Dominant-negative受容体として野生型受容体機能を特異的に抑制) および細胞外領域のみのTGF- β 受容体 (TGF- β を吸着して抑制) を作成しアデノウイルスベクターに組み込んだ (それぞれAdT β -TRおよびAdT β -ExR)。繊維化の動物モデル (肝臓繊維症、角膜繊維症) にて効果を検討した。

・門脇は、PPAR γ アゴニストを用いた炎症性腸疾患の新しい治療法の確立について検討した。昨年本剤の虚血再灌流腸傷害での防止効果を解明したのを受け、PPAR γ 発現のない胃の虚血再灌流での同分子の役割を解明し、またヒト腸炎のモデルの解析により治療法の確立を目指した。マウスの虚血再灌流胃傷害、dextran sulfate sodium (DSS)誘発腸炎で各々PPAR γ ヘテロノックアウト、3種のPPAR γ リガンド投与の傷害への影響をみた。

・小室は、心筋細胞分化と細胞移植について検討した。昨年TGF β スーパーファミリーの1つであるBMPの作用を阻害する分子であるnogginを発現させた細胞株(P19CL6noggin)を用い、BMP下流のキナーゼであるTAKと転写因子であるSmadがともに重要であることを示した。今回は、その2つの系路がどのように心筋分化に関与しているかについて検討した。

・森下は、動脈硬化形成における炎症の関与を解明し、治療法への応用を検討した。バルーン傷害によりブタ冠動脈バルーン傷害後再狭窄モデルを作製し、NF κ Bデコイの血管内投与を行い、新生内膜形成について検討した。

・長田は糸球体再生を目指した糸球体上皮細胞の分化機構について検討した。細胞周期制御因子と糸球体上皮細胞の分化の間に関連がある可能性が示されているが、これらの因子のderegulationがどのように糸球体障害に関与するのかについて検討した。

・津田は遺伝性脊髄小脳変成症における経頭蓋磁気刺激の治療効果について検討した。本年は、臨床症状と脳血流及び脳代謝変化を併せて病系別に検討した。

・永井は、血管障害の分子機構と血管保護療法の開発について検討した。1) 老化抑制遺伝子Klothoの遺伝子導入を血管障害モデル動物に投与し、血管機能が回復するかの検討、2) 動脈硬化性新生内膜の増殖性平滑筋細胞の起源を明らかにするために、マーカーマウスからの心移植を行い、新生内膜の細胞起源についての検討、3) 平滑筋分化関連因子IKLF/BTEB2の転写活性化機構を解明するために、相互作用因子を通した転写活性化制御機構の解明などについて検討した。

(倫理面への配慮)

長田の研究の場合、ヒト腎組織は生検、剖検で得られたものである。剖検の承諾は無論得られているが、ともに研究に使用するというインフォームドコンセントは過去の症例であるために得ていない。ノックアウトマウスはエーテル麻酔により安楽死さ

せた後、開腹して採取した。

C, D. 結果と考察

・西川は、今回VE-Cadherin陽性細胞をCAGプロモーターでactin-GFPを導入した細胞から調整し、それを様々な条件で調べ、アクチンの分布の様態から細胞の活性を推察した。今回の実験では、VE-cadherin陽性細胞を2-3日間培養した後、GFP陽性の円形コロニーを選び出し、上皮様コロニー内の内皮細胞の動態をモニターした。GFP融合分子で標識されたES細胞由来の血管細胞を用いて、個々の血管内皮細胞の動態をリアルタイムモニターする方法を開発した。これにより、これまで個体レベルの研究から想像してきたVEGFR3の機能を細胞レベルで確かめることが可能になった。同時に、VEGF-A等の内皮細胞の必須シグナルの細胞レベルでの効果を、現象論的ではあってもリストアップすることができた。

・中福は、神経幹細胞を用いた神経組織の再生・修復のための新規治療の開発について検討した。成体脊髄組織に内在する神経前駆細胞の増殖、分化を効率よく再現する初代培養系を確立した。成体の神経前駆細胞は、脳室壁周囲にのみ存在すると従来は考えられていた。今回新たに開発した手法を用いることにより、脳室壁周囲以外の脊髄実質部にも、多数の神経前駆細胞が存在することを明らかにした。成体脊髄内には、従来考えられていたよりも多くの神経前駆細胞が残存しており、損傷に应答して増殖し得ることが明らかとなった。

・千葉は、Notchリガンドによる造血制御について検討した。DSL蛋白質がNotchのリガンドであることを直接的に証明し、さらにNotchシグナルは、各系統の造血細胞の分化を抑制することを示したことにより、造血システムにおいて生理的に重要な役割を担う可能性を示した。また、aNotch1はGATA2の発現・機能の維持を介して分化抑制を行うことが示唆された。よって、Notch受容体のシグナル発生機転を解明し、Notch活性化により造血細胞の分化が抑制されること、およびその機序の一端としてGATA2の発現・機能維持が重要であることを示した。

・宮園は、TGF- β の細胞内シグナルについて検討した。DNAマイクロアレイを用い、抑制型Smadがすでに知られているようにレセプター刺激で誘導され、負のフィードバックシステムによりシグナルが行き過ぎないように調節していることが確認された。また血管内皮細胞を用いることによって、endoglinもALK-1で誘導されるという新たなメカニズムが明らかとなった。さらに、抑制型Smadがレセプタータンパク質を分解してシグナルを抑制するという新しいメカニズムが明らかとなった。以上から、抑制型SmadはTGF- β のシグナルを制御し、血管の機能を維持するうえで極めて有用である可能性が示唆された。

・中村は、器官再生と治療への応用について検討した。心筋梗塞モデルにおいて再灌流後に素早く活性化されるHGFシステムが、重要な内因性心筋保護因子として機能すること、再灌流後におけるHGF蛋白

のすみやかな投与が心筋細胞のアポトーシスを抑制し、心筋梗塞のサイズを縮小することを明らかにした。心筋虚血再灌流により内因性HGFがすみやかに発現してくる事、HGFが重要な内因性心筋保護因子として機能する事、HGF蛋白のすみやかな補充が心筋梗塞に対して有効な治療法となる事をはじめ明らかにした。

・上野は炎症と繊維化のメカニズムと防止について検討した。TGF- β の抑制により正常肝における線維化の発症ばかりでなく、すでに確立した線維化の進展をも抑制できることが明確に示され、TGF- β の抑制で肝細胞の再生が促進することが判明した。また、線維化責任細胞(伊東細胞)の分化型への回帰が観察された。可溶性TGF- β 受容体の有用性が複数の線維化モデルで確認された。

・門脇は、PPAR γ アゴニストを用いた炎症性腸疾患の新しい治療法の確立について検討した。胃では通常PPAR γ 発現はないが、虚血再灌流後は上皮の細胞質に発現した。虚血再灌流後は上皮にiNOSが発現し、apoptosisも誘導された。PPAR γ リガンドを前投与すると傷害は用量依存的に抑制され、PPAR γ は上皮の核に移行した。iNOS発現やapoptosisは同剤投与で阻害された。DSS腸炎ではマウスは腸炎で10-14日で死ぬが、DSS投与前からの同剤投与は用量依存的に傷害を抑制した。リガンド治療群で腸のIL-4発現増加、IFN γ 、TNF α 発現抑制をみた。どちらの系でもPPAR γ 欠損マウスは傷害が強く、またリガンドの後治療では傷害抑制はなかった。上皮への侵襲で細胞質に誘導されるPPAR γ がリガンドにより核移行して炎症関連分子の誘導を抑制した。同剤によるapoptosis抑制も傷害抑制に働く。

・小室は、心筋細胞分化と細胞移植について検討した。P19CL6細胞を用いて、TAKとSmadがATF-2を活性化することにより心筋細胞分化を促進することを示唆する結果を得た。転写因子であるATF-2がTAKとSmadの共通標的分子として心筋細胞分化に関与していることが示唆された。

・森下は、動脈硬化形成における炎症の関与を解明し、治療法への応用を検討した。NF κ Bデコイ導入は、ブタ冠動脈バルーン傷害後再狭窄抑制をもたらした。動脈硬化の新しい治療戦略として重要であることが示唆された。

・長田は糸球体再生を目指した糸球体上皮細胞の分化機構について検討した。cyclin kinase inhibitor(CKIS)、ことにp27、p57が、糸球体硬化の初期病変においてdown-regulateされていることを見いだした。さらに、分化誘導に重要とされる転写因子PAX-2、WT-1の発現調節におけるCKISの役割をp27、p57、p27/p57ノックアウトマウスを用いて糸球体の分化と転写因子の発現について検討した結果、器官培養系においてp27/p57は糸球体上皮細胞の転写因子発現に関与する可能性が示された。

・津田は遺伝性脊髄小脳変成症における経頭蓋磁気刺激の治療効果について検討した。刺激療法後数例において体幹失調を中心とする症状の改善を認め

た。頭蓋磁気刺激が遺伝性脊髄小脳変成症の治療法となる可能性が示唆された。

・永井は、老血管障害の分子機構と血管保護療法の開発について検討した。1) 早期老化に関わる新規遺伝子Klotho遺伝子を血管障害を有するモデルマウスに遺伝子導入することで、Klothoが内皮機能の制御に関わることを見いだした。2) 動脈硬化性新生内膜の増殖性平滑筋細胞の起源を明らかにするためにLacZを発現する株と野生株のマウス間で心移植を行い、新生内膜の細胞がレシピエント由来の細胞であることを示し、流血中の細胞に起源があることを明らかにした。3) 平滑筋分化関連因子IKLF/BTEB2の転写活性化機構を解明するために、転写コファクターとの相互作用を検討し、クロマチン構造変換因子を含む転写コファクターと相互作用することを示したことで、IKLF/BTEB2の転写活性化に関わる分子間相互作用を明らかにした。

E. 結論

特定疾患の病態解明と新しい治療法の開発を目指し、(1) 神経、血球、心血管細胞の分化機構と幹細胞による再生療法の開発、(2) 炎症のメカニズムと間質細胞の活性化および線維化の分子機構、(3) 血管障害の分子機構と血管保護療法の開発を目的とした研究を行った。

本年度は、上記3プロジェクト全てについて成果をあげた。1) 神経、血球、心血管細胞の分化機構と幹細胞による再生療法の開発の場合、西川による血管の再構築系の確立、中福による神経幹細胞の試験管内での培養・維持、さらに小室による心筋分化パスウェイの解明等が主な成果である。2) 炎症のメカニズムと間質細胞の活性化および線維化の分子機構の場合、上野のSmadの調節を通じた繊維化の抑制、中村によるHGF投与による心筋梗塞再灌流障害の治療などが主な成果である。門脇による炎症性腸疾患、胃虚血再灌流障害に対するPPAR γ を用いた新しい治療法の開発も重要である。3) 血管障害の分子機構と血管保護療法の開発を目的とした研究の場合、森下による転写因子NF κ Bに対するデコイ導入によるバルーン傷害後再狭窄抑制、永井らによるklothoの遺伝子導入による血管機能の改善効果、動脈硬化性新生内膜の起源細胞の同定、さらに宮園によるTGF- β シグナルの血管機能維持における役割の解明などが主な成果である。以上のように、本年度は、特定疾患の分子病態の解明および治療の開発に関わる成果をあげることができた。

厚生科学研究費補助金分担研究報告

血管障害の分子機構と血管保護療法の開発
分担研究者 永井良三 東京大学大学院医学系研究科・循環器内科

研究要旨

血管障害の分子機構と血管保護療法の開発を目的に、我々は次の3つのテーマに関する研究を行ってきた。1) 早期老化に関わる新規遺伝子Klotho遺伝子を血管障害を有するモデルマウスに遺伝子導入することで、Klothoが内皮機能の制御に関わることを見いだした。2) 動脈硬化性新生内膜の増殖性平滑筋細胞の起源を明らかにするためにLacZを発現する株と野生株のマウス間で心移植を行い、新生内膜の細胞がレシピエント由来の細胞であることを示し、流血中の細胞に起源があることを明らかにした。3) 平滑筋分化関連因子IKLF/BTEB2の転写活性化機構を解明するために、転写コファクターとの相互作用を検討し、クロマチン構造変換因子を含む転写コファクターと相互作用することを示したことで、IKLF/BTEB2の転写活性化に関わる分子間相互作用を明らかにした。このように、分子、細胞、個体の多局面から血管障害の分子機構を明らかにし、血管保護療法を開発している。

A. 研究目的

急速に高齢化が進む我が国において、動脈硬化をはじめとする血管疾患への対策は医療上の最重要課題である。血管疾患の発症機序や成因を解明し、治療法を開発すれば、医学のみならず社会全体に大きく貢献する。

この課題に対し、我々は次の3つの研究テーマを設定した。1) 老化抑制遺伝子Klothoの遺伝子導入を血管障害モデル動物に投与し、血管機能が回復するかを検討すること、2) 動脈硬化性新生内膜の増殖性平滑筋細胞の起源を明らかにするために、マーカーマウスからの心移植を行い、新生内膜の細胞起源を明らかにすること、3) 平滑筋分化関連因子IKLF/BTEB2の転写活性化機構を解明するために、相互作用因子を通じた転写活性化制御機構を明らかにすることをテーマに設定した。分子、細胞、個体の多局面から血管障害の分子機構を明らかにし、血管保護療法を開発している。

B. 研究方法

1. Klotho遺伝子導入：動脈硬化の複数の症状（高血圧、肥満、高血糖、高脂血症）を示す動物モデル（Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rat)においてklothoの遺伝子導入が内皮機能を改善するかを検討した。
2. 細胞起源：LacZを発現するマウスと野生株マウスから交互へ心移植を行い、動脈硬化性新生内膜の細胞起源について検討した。
3. 転写活性化機構：平滑筋分化関連因子IKLF/BTEB2の相互作用制御因子を単離するために平滑筋セルラインの核抽出液をエピトープ・タグを付加したIKLF/BTEB2のリコンビナント蛋白質との結合アッセイ、アフィニティ精製を行い、2次元ゲル展開後にTOF-MAS質量分析法で相互作用因子を同定した。

C. 研究結果

1. Klotho遺伝子導入

アデノウイルスベクターにklotho遺伝子を導入したコンストラクトを作製し、OLETFラットに筋注射し、遺伝子導入した。アデノウイルス筋注射の結果、刺入部においてklothoの発現をノザンプロット法で認めた。内皮機能の改善を大動脈リング標本を用いたアセチルコリン負荷実験を行った結果、コントロールのLETOラットに比し、20%の拡張能の改善を認めた。また、コントロールとしてLacZを導入したアデノウイルスを導入した場合、未導入のOLETFラットと差を認めなかった。また、klothoの遺伝子導入によって、OLETFラットで尿中一酸化窒素代謝物の有意な上昇を認めた。さらに、klothoの遺伝子導入によって、大動脈や冠動脈周囲の繊維化が減少した。

2. 細胞起源

LacZを発現するROSA26マウスと野生株間で心移植を行い、30日後にLacZ染色で細胞起源について検討した。LacZマウスに野生株の心臓を移植した場合、新生内膜の平滑筋細胞はLacZを発現することからレシピエント由来であることを明らかにした。また、逆に野生株のマウスにLacZマウスの心臓を移植した場合、新生内膜の平滑筋細胞の多くはLacZで染まらないことからレシピエント由来であることを明らかにした。よって、新生内膜の平滑筋細胞はレシピエント由来であることを示した。

3. 転写活性化機構

IKLF/BTEB2のリコンビナント蛋白質をhexa-histidineタグを付加したコンストラクトとして作製し、平滑筋細胞のセルラインの核抽出液を結合させ、さらに相互作用した蛋白質をアフィニティ精製した。相互作用因子をさらに2次元電気泳動で展開し、TOF-MAS質量分析法で解析した結果、クロマチン構造変換因子が複数含まれていることを明らかにした。

D. 考察

1. Klotho遺伝子導入

高血圧、肥満、高血糖、高脂血症等の複数の成人

病の症状（いわゆる死の四重奏といわれる成人病の組み合わせ）を示す実験動物モデルOLETFラットにおいて、klotho遺伝子をアデノウイルスを用いて導入した結果、内皮機能の改善、尿中一酸化窒素代謝物の上昇がみられ、さらに血管周囲の繊維化の減少がみられた。Klotho遺伝子導入の本研究を通して、klothoは内皮機能を制御し、これには一酸化窒素のパスウェイが関与することが示唆される結果であった。さらに、血管リモデリング等マクロレベルでの血管の制御にもklothoが関わることも明かにした。

2. 細胞起源

マーカーマウスと野生株マウス間で心移植を行うことで新生内膜の平滑筋細胞はレシピエント由来であることを示した。従来から、平滑筋細胞は中膜から遊走すると考えられていたが、今回の結果は平滑筋細胞の起源（少なくともひとつ）は流血中の平滑筋幹細胞にあることを示した。

3. 転写活性化機構

平滑筋分化関連因子IKLF/BTEB2の相互作用因子を単離・同定することで同因子の転写活性化機構を部分的に明らかにした。クロマチン構造変換因子が含まれていたことから、IKLF/BTEB2が生体内で作用する際に、クロマチン構造を解除するうえで協調的に働く分子が明らかになった。分子間相互作用ならびに制御を明らかにすることで、IKLF/BTEB2の転写活性化機構、さらに特異性を決定する機構の理解につながると期待できる。

E. 結論

血管障害の分子機構と血管保護療法の開発を目的に、我々は次の3つのテーマに関する研究を行ってきた。1) 早期老化に関わる新規遺伝子Klotho遺伝子を血管障害を有するモデルマウスに遺伝子導入することで、Klothoが内皮機能の制御に関わることを見いだした。Klotho遺伝子ならびにその蛋白の投与は、血管障害や個体老化の防止に有用であると考えられるため、Klothoを標的とした新しい治療戦略の構築が今後期待される。2) 動脈硬化性新生内膜の増殖性平滑筋細胞の起源を明らかにするためにLacZを発現する株と野生株のマウス間で心移植を行い、新生内膜の細胞がレシピエント由来の細胞であることを示し、流血中の細胞に起源があることを明らかにした。流血中に病変起源の細胞が一部存在するため、流血中の起源細胞を対象にした治療（除去、治療因子の導入等）を行うことで動脈硬化性病変の治療法が可能であることを示唆する結果である。3) 平滑筋分化関連因子IKLF/BTEB2の転写活性化機構を解明するために、転写コファクターとの相互作用を検討し、クロマチン構造変換因子を含む転写コファクターと相互作用することを示したことで、IKLF/BTEB2の転写活性化に関わる分子間相互作用を明らかにした。IKLF/BTEB2の転写活性化に関わる分子間相互作用の理解は、創薬の対象となる分子や制御反応の解明につながると期待できる。このように分子、細胞、個体の多局面から血管障害の分子機構を明らかにし、血管保護療法を開発している。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Saito Y, et al. In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;276:767-72.
2. Nagai R, et al. Endothelial dysfunction in the klotho mouse and downregulation of klotho gene expression in various animal models of vascular and metabolic diseases. *Cell Mol Life Sci* 2000;57:738-46.
3. Utsugi T, et al. Decreased insulin production and increased insulin sensitivity in the klotho mutant mouse, a novel animal model for human aging. *Metabolism* 2000;49:1118-23.
4. Suga T, et al. Disruption of the klotho gene causes pulmonary emphysema in mice. Defect in maintenance of pulmonary integrity during postnatal life. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2000;22:26-33.
5. Saiura A, et al. Circulating smooth muscle progenitor cells contribute to atherosclerosis. *Nature Med* 2001;7:382-3.
6. Ogata T, et al. Inducible expression of basic transcription factor-binding protein 2 (BTEB2), a member of zinc finger family of transcription factors, in cardiac allograft vascular disease. *Transplantation*. 2000;70:1653-7.
7. Ogata T, et al. Inducible expression of BTEB2, a member of the zinc-finger family of transcription factors, in cardiac allograft arteriosclerosis. *Transplant Proc*. 2000;32:2032-2033.
8. Hoshino Y, et al. Regulated expression of the BTEB2 transcription factor in vascular smooth muscle cells: analysis of developmental and pathological expression profiles shows implications as a predictive factor for restenosis. *Circulation*. 2000;102:2528-34.
9. Wada Y, et al. Expression of the transcriptional factor egr-1/BTEB2 in cardiac xenograft vascular remodeling. *Transplant Proc*. 2000;32:1089-91.
10. Nagai R, et al. Transcriptional regulation of smooth muscle phenotypic modulation. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;902:214-22.
11. Ogata T, et al. Inducible expression of basic transcription element-binding protein 2 in proliferating smooth muscle cells at the vascular anastomotic stricture. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2000;119:983-9.

2. 学会発表

1. Yuichiro Saito, Tetsuya Nakamura, Yoshio Ohyama, Hiroyuki Sumino, Makoto Kuro-o, Masahiko Kurabayashi, Makoto Kuro-O, Yo-ichi Nabeshima, Ryoza Nagai. In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in multiple risk factor syndrome. Annual scientific sessions of American Heart Association, 2000.
2. Keiko Kawai Kowases, Yasushi Aihara, Ryoza Nagai. BTEB2, a Kruppel-like transcription factor, regulate expression of the platelet-derived growth factor

(PDGF)-A Chain Gene. Annual scientific sessions of American Heart Association, 2000.

3. 斎藤勇一郎、中村哲也、大山良雄、武田真一、佐藤真人、黒尾誠、鍋島陽一、倉林正彦、永井良三. In vivo klotho gene delivery protects against endothelial dysfunction in Dahl salt-sensitive hypertensive rats. 第65回日本循環器学会学術集会

4. 小和瀬桂子、永井良三、倉林正彦. BTEB2, a Kruppe-like transcription factor, regulates expression of the platelet-derived growth factor (PDGF)-A chain gene in vascular smooth muscle cells. 第65回日本循環器学学術集会

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

特に無し

2. 実用新案登録

特に無し

3. その他

特に無し

試験管内血管構築形成に関する研究

分担研究者 西川 伸一 京都大学医学研究科

研究要旨

血管構築のリモデリングのプロセスを明らかにし、試験管内での組織化された血管構築の再現を目指す。これを実現するために、網膜血管新生をモデルにリモデリングプロセスの現象論的解析を行うとともに、血管内皮の個々の動態についてモニターできる実験システムの構築を行い VEGF, VEGF-C 等の細胞学的機能を明らかにした。

西川伸一・京都大学医学研究科教授

A. 研究目的

血管はあらゆる組織に必須の、しかし独立した組織である。従って、再生医学やガンの治療等は、血管構築についての理解無しに構想できない。組織自体は内皮と周囲細胞（平滑筋も含む）より構成される比較的単純なものであるが、それにより形成される構築には大きなバリエーションが認められ、現在なお試験管内で組織化された血管構築を再現することは困難である。本研究では、血管構築の組織化の原理を明らかにし、その知識に基づき組織化された血管構築をデザインし、試験管内で再現することを目的とする。

昨年度の研究で、VEGFR2 を発現している側版中胚葉を 3 次元培養中で血管構築へと発展させられることを示した。しかし、網膜血管やガン周囲血管発生について個体レベルでの仕事を続ければ続けるほど、血管構築のリモデリングが極めて複雑なプロセスであること、またそこでの個々の分子の役割を解明するには、それらの細胞レベルでの機能を調べる方法がほとんどないことに気付いた。

従って、本年は最初に計画した研究と平行して、ES 細胞から誘導した血管内皮細胞の挙動を細胞レベルで調べることのできるシステムの確立を目指した。

B. 研究方法

昨年 ES 細胞から血管内皮細胞を誘導し、純化する方法については既に報告した。本年は、この細胞が様々なシグナルに対してどのような反応をするのかをモニターするために、GFP 蛋白を導入した ES 細胞の作成を試みた。これにより、ストローマ細胞を用いた培養システムでも、対象とする内皮細胞を追跡すること

が可能になる。この目的のためには、GFP 分子を導入するだけでよいが、細胞自体の挙動をより明確にするために、我々は actin と GFP の融合蛋白などの、様々な分子との融合蛋白として発現させることを試みた。これにより、細胞内での様々な動きをモニターすることが可能になる。

今回は、主に GFP-actin を用いて、細胞間接着部位等をモニターした。そのため、GFP-actin を導入した ES 細胞を作成した。この細胞は OP9 ストローマ細胞上で VEGFR2 陽性中胚葉、ついで VE-CADHERIN 陽性の血管内皮へと分化できる。この細胞をファクスでソートした後、様々な条件で培養を行うときに、高感度 CCD カメラを装着した倒立蛍光顕微鏡、或いは共焦点顕微鏡で 5 分毎にモニターした。

C. 研究結果

今回 VE-Cadherin 陽性細胞を CAG プロモーターで actin-GFP を導入した細胞から調整し、それを様々な条件で調べ、アクチンの分布の様態から細胞の活性を推察した。今回の実験では、VE-cadherin 陽性細胞を 2-3 日間培養した後、GFP 陽性の円形コロニーを選び出し、上皮様コロニー内での内皮細胞の動態をモニターした。

1) ストローマ細胞上での動態。

昨年度の研究により、OP9 ストローマ細胞は VEGF-A、VEGF-C、Ang-1 等の血管形成に関わる様々な分子を発現し、また VE-cadherin 陽性細胞を高率にクローン増殖させるために必要な活性を持っている (図 1)。この条件下で培養できる内皮細胞の単層上皮様構造内での個々の細胞の動態を調べた。

VE-cadherin 発現を指標にソートした細胞は 2-3 日間で図に見られるような円形の細

胞シートを形成する。この集団を蛍光顕微鏡下で24時間観察を続けた。

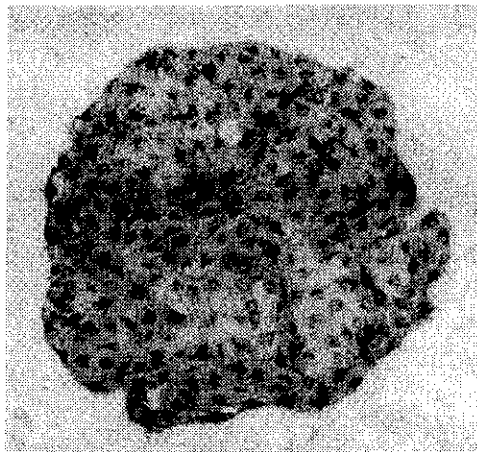


図1 ストローマ細胞上での内皮コロニー

多くの上皮構造では、アクチンが細胞間接着部位(AJ)に強く濃縮されるのに対して、図に示すコロニー内の細胞では、共焦点顕微鏡でようやく認められる程度のアクチンのAJへの濃縮は見られなかった。ただ、この単層構造内でそれぞれの細胞は増殖を繰り返すだけでなく、活発に位置を変えることも明らかになった。即ち、内皮細胞層で細胞が活発に動いている可能性が示された。

2) VEGF-A に対する反応

VEGF-A は血管内皮の発生、血管新生、或いは血管の透過性の調節等に重要な働きを演じている。しかし、正常血管内皮が VEGF にどのように反応するのかはこれまで不明であった。図に示した細胞層に 100ng/ml VEGF-A を加える実験で以下のことが明らかになった。

- VEGF-A 添加により、個々の細胞は線維芽細胞の様な紡錘形の細胞へ変化した。
- 個々の細胞の形態が大きく変化するにもかかわらず、集団全体は比較的安定な形状を示した。
- ストローマ細胞上では、集団の周辺への偽足等の投射はほとんど見られないが、ストローマ細胞の代わりにマトリックスを使うと、投射が見られる。このことは、ストローマ細胞が存在することで内皮細胞集団の安定性が上昇していることを示している。
- VEGF-A 添加によって単層の細胞層が多層化する。しかし、これによっても集団が壊れることはない。

3) VE-cadherin の機能

内皮細胞層は VE-cadherin によって細胞同士が接着することで集団としての構築を維持している。この VE-cadherin の機能を調べる目的で阻害抗体を内皮細胞集団に添加する実験を行った。既に形成された細胞層抗 VE-cadherin 抗体を添加しても大きな変化をすぐには示さない。しかし、集団内の細胞の移動がほとんど見られなくなることから、内皮単層内での細胞の移動には VE-cadherin が重要な役割を演じていることが示唆される。一方、この抗体と同時に VEGF-A を添加することで血管内皮自体を刺激すると、紡錘形への形態変化は変わりなく起こるものの、細胞同士の接着が徐々に消失する。この結果は、VE-cadherin が確かに血管内皮同士の接着維持に重要であること、そしてこの接着力が VEGF-A によって影響される事を示した。

4) VEGFR3 の機能

昨年 VEGFR 3 に対する阻害抗体を担ガン動物に投与する実験より、VEGFR3 シグナルは VEGFR2 の刺激により活性化した内皮細胞集団の安定性を保つためのシグナルとして機能していることが示唆された。この可能性を細胞レベルで確かめる目的で、VE-cadherin 陽性細胞集団を形成させた後、VEGFR 3 機能阻害抗体を添加しモニターした。

抗体添加により、細胞集団全体が不安定になり、あたかも VE-cadherin の機能阻害を行ったような像を示した。このことは、VEGFR3 シグナルが血管内皮細胞層全体の安定性を保たせるために重要な役割を演じていることを示している。

D. 考察

本年の研究は、正常血管成分を用いて血管リモデリングの細胞生物学を行うためのシステム整備に時間を費やした。従って、何かの結論が出るというよりは、様々な問題点が研究の進展に従ってどんどんでてくるということになってしまった。

そのような中でも、しかし、VEGFR3 が、内皮同士の接着力の維持、そして最終的には内皮から形成される細胞層の安定性の維持に関わっていることが細胞レベルで示すことができた。この結果は、昨年の研究から我々が提案していた可能性に一致しており、この実験システムの有用性を示している。

もちろん、それぞれの現象の意味を理解するには生化学的研究へと進んでいくことが必

要であるが、今回開発した実験系は、個々の血管内皮細胞の様々な因子に対する反応をとりあえずリストしていくための重要な方法であることは明らかである。これにより、VEGF-A の新たな作用、例えば内皮細胞の紡錘形への形態変化誘導等が示されたが、同時に内皮細胞がストローマ細胞のような他の細胞集団と接着して存在するとき（実際の血管ではほとんどの内皮は周囲細胞に裏打ちされて存在している）と、細胞成分に接していないときとは振る舞いが全く異なることなど、血管形成を考えていく上で重要な知見も数多く得られた。今後、生化学的手法を導入してこの研究システムがリストしてきた問題点を一個一個解決していく必要がある。ただこの実験システムを、生化学的研究に結び付けていくためには、解決すべき様々な問題がある。中でも、現在 FACS を用いて短時間に得られる細胞数は 100 万台であるが、これではなかなか生化学的研究は困難である。従って、高速細胞ソーティングを導入するなどを行っていく必要がある。

また、GFP-actin を使うだけでは、接着部位の動態をより詳細に調べることはできない。従って、様々な分子との GFP 融合産物を導入した細胞を用い、様々な細胞活性がモニターできるように準備することも重要である。

メカニズムの解明という点ではこれからますますの研究が必要ではあるが、この研究システム自体は既知、或いは未知の様々なシグナルの内皮細胞における機能をスクリーニングするというような translational research としての利用も可能で、この方向の研究も進めていきたいと考えている。

E. 結論

GFP 融合分子で標識された ES 細胞由来の血管細胞を用いて、個々の血管内皮細胞の動態をリアルタイムモニターする方法を開発した。これにより、これまで個体レベルの研究から想像してきた VEGFR3 の機能を細胞レベルで確かめることが可能になった。同時に、VEGF-A 等の内皮細胞の必須シグナルの細胞レベルでの効果を、現象論的ではあってもリストアップすることができた。これら細胞レベルの結果は、一方は生化学的研究へと進める必要があるが、同時に試験管内で血管構築をデザインし、構成させるという方向の研究にも重要なデータを与えるものと考えている。従って、次年度も同じ系を用いて様々なシグ

ナルが内皮細胞に誘導できる様々な挙動を現象論的に調べると共に、それぞれの機能を生化学的に検討できる実験系へと発展させたいと考えている。

F. 研究発表

1. Kikuchi T et al. *J. Immunol. Meth.* 240, 15-22, 2000
2. Narumi O et al. *J Biol Chem*, 275: 3510-3521, 2000
3. Kataoka H et al. *Nucl. Acid Res.* 28: 626-633, 2000
3. S.-I. Nishikawa et al. *Immunol Rev.* 175, 112-119, 2000
4. Nishikawa SI et al. *Curr Opin Immunol* 12 342-345, 2000
5. Kubo H et al. *Blood* 96, 546-553, 2000
6. Yamashita J et al. *Nature* 408, 92-96, 2000
7. Kawasaki H et al. *Neuron* 28, 31-40, 2000
8. Mori, S et al. *The EMBO J.* 19, 5772-5781, 2000
8. Stacker SA et al. *Nature Med* in press, 2001
9. Makinen T et al. *Nature Med* in press, 2001
10. Hashi H et al. *J. Immunol.* In press, 2001
11. Honda K et al. *J. Exp. Med* in press.

G. 知的所有権の取得状況

なし。

神経前駆細胞を用いた神経組織の再生・修復のための新規治療法の開発

分担研究者 中福雅人 東京大学大学院医学系研究科 助教授

研究要旨：成体ラット脊髄に内在する神経前駆細胞について、培養系ならびに損傷組織における挙動を解析した。その結果、成体脊髄内には従来考えられていたよりも多くの神経前駆細胞が残存し、損傷に应答して増殖し得ることを明らかにした。

A. 研究目的

近年、成体神経組織内に増殖能と多分化能を有する神経前駆細胞が存在することが明らかとなり、再生医学の点から注目を集めている。損傷組織の再生・修復には、培養した前駆細胞を移植する手法とともに、内在前駆細胞を活性化することによって組織の再生能を高める手法が考えられる。いずれの場合も、成体前駆細胞の性質の詳細を明らかにすることが不可欠であるが、従来の研究では多くの点が不明のままであった。そこで本研究では、成体ラット脊髄より神経前駆細胞を単離し、培養系ならびに損傷脊髄組織における挙動を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

成熟ラットの脊髄より神経前駆細胞を単離し、Neurosphere法を用いて培養した。成体前駆細胞の増殖能、分化能を胎児由来細胞と比較した。また、胸髄レベル(T10)で脊髄を完全切断した損傷モデルラットを作製し、内在性の神経前駆細胞の挙動を、種々の分子マーカーを用いた組織染色により解析した。以上の実験動物の使用にあたっては、学内実験動物取扱い規定を遵守した。

C. 研究結果

成体脊髄組織に内在する神経前駆細胞の増殖、分化を効率よく再現する初代培養系を確立した。成体の神経前駆細胞は、脳室壁周囲にのみ存在すると従来は考えられていた。しかし、今回我々が新たに開発した手法を用いることにより、脳室壁周囲以外の脊髄実質部にも、多数の神経前駆細胞が存在することが明らかになった。

成体前駆細胞は約8週間にわたって増殖能を維持し、またニューロン、グリアへと分化する多分化能を保持していた。しかし、胎児脊髄由来の前駆細胞と比較してその増殖能は著しく劣っていた。また、成体前駆細胞は増殖因子存在下でも自発的にグリアへと分化することが判明した。従って、成体由来の前駆細胞の増殖能・分化能は大きく制限されていた。

次に、胸髄切断モデルラットを用いた個体レベルでの解析を行った。損傷脊髄内では、実質に存在する多数の前駆細胞が反応性に増殖することが、前駆細胞の分子マーカーであるネスチンおよび特異的転写因子Pax6, Pax7の免疫組織化学染色により明らかとなった。これに一致して、損傷組織からは、正常組織よりも多数の神経前駆細胞が単離された。また、損傷脊髄内で増殖する前駆細胞が、確かにニューロンへの分化能を持つことを証明した。

D. 考察

成体脊髄内には、従来考えられていたよりも多くの神経前駆細胞が残存しており、損傷に应答して増殖し得ることが明らかとなった。しかし、これら前駆細胞は培養下にはニューロンへと分化する能力を持つにも関わらず、生体内ではニューロンの新生は観察されなかった。従って、損傷組織の外界環境は神経前駆細胞のニューロン分化に対して阻害的に働いており、このことが損傷脊髄の再生能が低い要因となっていると考えられた。

E. 結論

成体脊髄内には多くの神経前駆細胞が残存している。今後は生体内で前駆細胞からのニューロン新生を阻害している環境要因を明らかにし、それを克服することによって、成体神経組織の再生能を高める手法の開発に繋げていきたいと考えている。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takebayashi H, Yoshida S, Kominami R, Nakafuku M, Nabeshima Y. Olig family of basic helix-loop-helix factors includes Olig1 and Olig2 implicated in oligodendrogenesis and the third paralogous gene, Olig3. *Mech. of Dev.* 99, 143-148 (2000).
- 2) Yamamoto S, Yamamoto N, Kitamura T, Nakamura K, Nakafuku M. Proliferation of parenchymal neural progenitors in response to injury in the adult rat spinal cord. *submitted for publication.*
- 3) Yamamoto S, Nagao M, Kitamura T, Nakatomi H, Sugimori M, Kosako H, Yamamoto N, Takebayashi H, Yoshida S, Weinmaster G, Nakamura K, Nakafuku M. Molecular property and regenerative potential of neural progenitors in the adult rat spinal cord. *submitted for publication.*
- 4) 中福雅人 神経幹細胞—脳の再生医学への応用脳神経外科の最先端NO.2 先端医療技術研究所, 192-199 (2000).

2. 学会発表

- 1) 中福雅人 脳神経系の幹細胞とその分化制御 第63回日本生化学会シンポジウム (2000)
- 2) 中福雅人 脳の発生から再生へ—神経幹細胞の分子生物学 第43回日本神経化学会シンポジウム (2000)

G. 知的所有権の取得状況

なし

厚生科学研究費補助金（特定疾患対策研究事業）
分担研究報告書

Notch による造血制御に関する研究

分担研究者 千葉 滋 東京大学医学部附属病院無菌治療部助手

[研究要旨]

造血や免疫構築における Notch 受容体を介するシグナルの重要性が明らかにされつつある。我々は今回、Notch リガンド結合が結合することによる Notch2 の分子内切断と核内移行およびリン酸化について明らかにし、Notch2 を介する細胞内の転写制御をも示して、両者の関連を考察した。一方、活性化型 Notch1(aNotch1)が、赤芽球系・顆粒系への血球分化を抑制することを示した。32D 細胞における分化モデル系において、GATA2 が本来分化刺激で発現が低下すべきところ、aNotch1 により発現が維持されることを見だし、aNotch1 による造血細胞の分化抑制は、GATA2 の発現・機能の維持を介することを提案した。

A. 研究目的

Notch 分子（細胞表面受容体）を介するシグナルは、種々の動物種の個体発生の他、哺乳動物の造血や免疫構築においても重要であることが明らかにされつつある。本研究では、（1）Notch 受容体のシグナル発生機転と（2）Notch による造血細胞の分化抑制およびその機序の解明を目的とした。

B. 研究方法

（1）DSL 蛋白質と総称される Delta1, Jagged1, Jagged2 のそれぞれを発現する CHO 細胞を作成し、これとマウス未熟 B 細胞系の細胞株である BaF3 細胞とを共培養する系を用いた。Notch2 の細胞内領域に対する特異的抗体を用いた免疫沈降・western 法により、BaF3 に内因性に発現する Notch2 の切断について、共培養後時間経過を追って調べた。さらに BaF3 より抽出した蛋白質を、核成分とそれ以外の成分に分画し、Notch2 分子の細胞内移行を調べた。また、脱リン酸化酵素を用いて抽出蛋白質を脱リン酸化し、Notch2 断片のリン酸化を調べた。
（2）マウス赤芽球系細胞株 F5-5 およ

び骨髓系細胞株 32D に活性化型 Notch1 (aNotch1) を導入し、ActivinA あるいは G-CSF 刺激後の分化に与える aNotch1 の影響を調べた。一方、血球分化や増殖に関与する転写因子（HTF）について分化刺激による発現の変化を半定量 RT-PCR 法により調べた。さらに、aNotch1 を導入した 32D 細胞（32D/aN1）に dominant-negative 型 GATA（DN-GATA）および PU.1 を発現させ、分化刺激に対する反応を観察した。

C. 研究結果

（1）(i) DSL 蛋白質（Delta1, Jagged1, Jagged2）のいずれかが Notch2 に結合することにより、Notch2 分子内に切断が生じ、Notch2 分子の細胞内部分が短時間で核内に移行した。(ii) この際、核内に移行する Notch2 分子断片はリン酸化された。(iii) 同時に、DSL 分子は Notch2 を介して細胞内の転写制御を行った。
（2）(i) aNotch1 は、赤芽球系・顆粒系への血球分化を抑制した。(ii) 分化刺激により種々の HTF の発現が変化した。GATA2 以外の HTF の発現変化は aNotch1 の有無による修飾を受けなかった。しか

し GATA2 のみは、野生型 32D では G-CSF 刺激によって発現量が著明に減少したのに対し、32D/aN1 では発現が維持されていた。GATA2 機能を抑制することによって、aNotch1 による分化抑制のキャンセルが可能かどうかを知る目的で、32D/aN1 に DN-GATA および PU.1 を発現させたところ、32D/aN1 は G-CSF 刺激による分化能を再獲得した。

D. 考案

(1) DSL 蛋白質が Notch のリガンドであることが直接的に証明された。

(2) Notch シグナルは、各系統の造血細胞の分化を抑制することが示唆され、造血システムにおいて生理的に重要な役割を担う可能性が示唆された。また、aNotch1 は GATA2 の発現・機能の維持を介して分化抑制を行うことが示唆された。

E. 結論

Notch 受容体のシグナル発生機転を解明した。Notch 活性化により造血細胞の分化が抑制されること、およびその機序の一端として GATA2 の発現・機能維持が重要であることを示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) Shimizu K, Chiba S, Hosoya N, Kumano K, Saito T, Kurokawa M, Kanda Y, Hamada Y, Hirai H. Binding of Delta1, Jagged1, and Jagged2 to Notch2 rapidly induces cleavage, nuclear translocation, and hyperphosphorylation of Notch2. Mol Cell Biol 20:6913-6922, 2000.

(2) Shimizu K, Chiba S, Saito T, Kumano K, Hirai H. Physical interaction of Delta1, Jagged1 and Jagged2 with Notch1

and Notch3 receptors. Biophys Biochem Res Commun, 276:385-389, 2000.

2. 学会発表

42nd Annual American Society of Hematology Meeting
Notch inhibits differentiation of hematopoietic cells through sustaining GATA-2 expression. Kumano K, Chiba S, Shimizu K, Yamagata T, Hosoya N, Saito T, Takahashi T, and Hirai H.

TGF- β の細胞内シグナル

分担研究者 宮園 浩平 東京大学大学院医学系研究科・教授

研究要旨 TGF- β シグナルは血管の機能維持に重要な役割を果たしていることが示唆されている。本研究ではTGF- β レセプターであるALK-1とALK-5によって誘導される遺伝子をDNAマイクロアレイで調べた。ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞にALK-1とALK-5を発現させるとSmad6やSmad7などの抑制型Smadが誘導された。また遺伝性出血性毛細血管拡張症type Iの原因遺伝子であるendoglinもALK-1で誘導された。またSmadシグナルの調節機構を検討したところSmad7はE3ユビキチンリガーゼであるSmurf1と結合した。Smurf1はSmad7と結合したTGF- β レセプターを分解することによってTGF- β シグナルの抑制に関与していることが明らかとなった。以上から、抑制型Smadは血管の恒常性の維持のために重要であると考えられた。

A. 研究目的

TGF- β (transforming growth factor- β)は増殖抑制因子であると同時に組織の線維化を強力に促進する因子である。TGF- β は細胞内でSmadを介してシグナルを伝える。TGF- β やTGF- β レセプターのノックアウトマウスの解析からTGF- β シグナルは血管の機能維持に重要な役割を果たしていることが示唆されている。本研究ではSmadによるシグナルのメカニズムを明らかにし、特にTGF- β レセプターによって誘導される遺伝子を血管内皮細胞を用いてDNAマイクロアレイなどで調べた。またSmadシグナルの調節機構を抑制型Smadを中心に検討し、血管病変の新たな診断法や治療法の開発を目的とした基礎的研究を行った。

B. 研究方法

(1) 市販の臍帯静脈由来血管内皮細胞HUVECにTGF- β のI型レセプターであるALK-5とALK-1をアデノウイルスベクターを用いて導入し、誘導される遺伝子をDNAマイクロアレイで調べた。さらにノーザンブロット法により、その発現をmRNAレベルで確認した。(2) 抑制型

Smadのシグナルを調節する因子としてSmurf1の作用に注目し、Smad7の作用との関連を分子生物学的方法で調べた。以上の実験はすべてin vitroの培養細胞を用いた実験であり、倫理面の問題はないと考える。

C. 研究結果

(1) ALK-5は増殖抑制に関わるレセプターであるのに対しALK-1の作用は明らかとなっていない。ALK-1は遺伝性出血性毛細血管拡張症（HHT: hereditary hemorrhagic telangiectasia type II）の原因遺伝子である。HUVECにALK-1とALK-5をそれぞれ発現させたところSmad6やSmad7などの抑制型Smadが誘導された。またHHT type Iの原因遺伝子となることが知られているendoglinもALK-1で誘導されることが明らかとなった。

(2) 抑制型SmadであるSmad7はE3ユビキチンリガーゼであるSmurf1と結合した。Smurf1はSmad7と結合したTGF- β レセプターをユビキチン化することによって分解し、TGF- β シグナルの抑制に関与していた。

D. 考察

DNAマイクロアレイを用いた研究は近年急速に進歩しているが、今回の研究で、血管内皮細胞を用いることによって、いくつかの重要な情報が得られた。すなわち、抑制型 Smad がすでに知られているようにレセプター刺激で誘導され、負のフィードバックシステムによりシグナルが行き過ぎないように調節していることが確認された。また血管内皮細胞を用いることによって、endoglin も ALK-1 で誘導されるという新たなメカニズムが明らかとなった。

また Smurf1 の作用のメカニズムの研究により、抑制型 Smad がレセプタータンパク質を分解してシグナルを抑制するという新しいメカニズムが明らかとなった。以上から、抑制型 Smad は TGF- β のシグナルを制御し、血管の機能を維持するうえで極めて有用である可能性が示唆された。

E. 結論

TGF- β シグナルが ALK-1 や ALK-5 を介して血管の機能維持に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。また抑制型 Smad の新たな作用メカニズムが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Oh, S.P., Seki, T., Goss, K.A., Imamura, T., Yi, Y., Donahoe, P.K., Li, L., Miyazono, K., ten Dijke, P., Kim, S., and Li, E.: Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor-beta 1 signaling in the regulation of angiogenesis Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97: 2626-2631, 2000.

2) Miyazono, K.: Positive and negative regulation of TGF-beta signaling. J. Cell Sci., 113: 1101-1109, 2000.

3) Beppu, H., Kawabata, M., Hamamoto, T., Chytil, A., Minowa, O., Noda, T., and Miyazono, K.: BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos. Dev. Biol., 221: 249-258, 2000.

4) Ebisawa, T., Fukuchi, M., Murakami, G., Chiba, T., Tanaka, K., Imamura, T., and Miyazono, K.: Smurf1 interacts with transforming growth factor-beta type I receptor through Smad7 and induces receptor degradation. J. Biol. Chem., in press, 2001.

5) Akiyoshi, S., Ishii, M., Miyazono, K., Aburatani, H., and Kawabata, M.: Targets of transcriptional regulation of transforming growth factor-beta: Expression profile analysis using oligonucleotide arrays. Jpn. J. Cancer Res., in press, 2001.

6) Miyazono, K., Kusanagi, K., and Inoue, H.: Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling. J. Cell. Physiol. in press, 2001.

G. 知的所有権の取得状況

特になし

厚生科学研究費補助金（特定疾患調査研究事業）
分担研究報告書

器官再生と治療への応用

分担研究者 中村敏一 大阪大学大学院医学系研究科教授

研究要旨

心筋梗塞に代表される虚血性心疾患による心不全は先進国における最たる死因であり、虚血性心疾患の病因論に根ざした根本治療の確立は世界的に重要な研究課題の一つである。本研究においては、心筋梗塞の発症後速やかに発現誘導される内因性 HGF システムが重要な心筋保護因子として機能する一方、HGF 蛋白の速やかな補充が心筋梗塞サイズの縮小、心不全の阻止につながることを初めて明らかにした。これらの成果は再生医学に根ざした心筋梗塞の治療研究における先駆例であり、近い将来の HGF 蛋白および遺伝子による前臨床試験の成績をもとに、できるだけ早期に HGF による虚血性心疾患の治療が実践されるよう準備をする必要があると思われる。

A. 研究目的

心筋梗塞に代表される虚血性心疾患による死亡は全世界で年間 600 万人にも達し、先進国における死因の第 1 位を占める。また、2020 年には世界的にも死因のトップとなることが予想されている。したがって心筋梗塞に対する有効な治療法の確立は世界的な急務であり、かつ厚生科学のはたすべき医療課題といえる。私達は HGF を培養肝細胞の増殖活性を指標に発見・単離・クローニングしたが、これまでに HGF が肝再生をはじめとして各種臓器の再生を担うとともに傷害に対する発症予防・治癒作用を有する事を示してきた。平成 12 年度においては、心筋梗塞に対する新しい治療法の確立を目的として、心筋梗塞モデルにおいて HGF の内因性心筋保護因子として機能、および心筋梗塞に対する発症予防・治療薬としての可能性を解析した。この成果により虚血性心疾患の HGF からみた病因論および根本治療の確立を目指す。

B. 研究方法

以下の動物実験はすべて大阪大学医学部付属動物実験施設ガイドラインに沿って倫理的、愛護的に行われた。

(1) 心筋梗塞モデルにおける内因性 HGF の役割

ラット左冠状動脈の 20 分間閉塞に引き続き 48 時間再灌流を行い、ヒト心筋梗塞と類似のモデルを作成し、血漿中 HGF レベルを ELISA にて、肝、腎、肺などにおける HGF mRNA の発現を定量的 RT-PCR 法により測定した。虚血心筋における c-Met/HGF レセプターの発現を定量的 RT-PCR および免疫組織染色により観察した。同モデルにおいて HGF 中和 IgG を 500 $\mu\text{g}/\text{body}$ の容量で再灌流 20 分前および再灌流 12 時間毎に計 4 回投与し、再灌流 48 時間後の梗塞サイズを α -sarcomeric actin 免疫組織染色像で、心筋細胞のアポトーシスを TUNEL 法で評価した。

(2) HGF による心筋梗塞の治療効果

ラット心筋梗塞モデルに対してリコンビナント

ヒト HGF を 160 $\mu\text{g}/\text{body}$ の容量で再灌流直後から 12 時間毎に計 4 回投与し、梗塞サイズ、心筋細胞のアポトーシスに対する作用を(1)と同様の方法で調べた。さらに心筋細胞における Bcl-xL の発現を解析した。

C. 研究結果

(1) 心筋梗塞モデルにおける内因性 HGF の役割

ラット左冠動脈を 20 分間結紮後再灌流すると、血漿中 HGF レベルは再灌流 3 時間後に約 6 倍、24 時間後に約 12 倍に増加する 2 峰性パターンを呈した。この際肝、腎、肺などの遠隔無傷臓器における HGF mRNA の発現が再灌流後 3 時間で著増しており、傷害に反応してこれらの臓器において HGF がすみやかに産生・供給されている事がわかった。一方、c-Met/HGF レセプター mRNA および蛋白質の発現が虚血領域の心筋細胞において増加した。内因性 HGF の意義を明らかにするため、ラット HGF 中和抗体を投与すると、血中 HGF の約 80%は immunocomplex を形成し中和された。HGF 中和抗体を投与されたラット (αHGF グループ) 心においては、正常 IgG を投与したコントロール心に比べて梗塞サイズの拡大、TUNEL 陽性心筋細胞の増加を認めた。さらにコントロールでは 48 時間以内の死亡は認めなかったのに対し、 αHGF グループにおいては 50%のラットが心不全により死亡した。

(2) HGF による心筋梗塞の治療効果

上記と同様のモデルにおいて HGF を投与すると梗塞サイズは約 1/3 に縮小し、梗塞サイズを反映する血中 creatine phosphokinase (CPK) 活性も約 1/3 に低下した。また TUNEL 陽性心筋細胞の減少を認めた。虚血心筋においては正常ラット心に比

べて抗アポトーシス因子である Bcl-xL 蛋白質の発現がすみやかに増加したが、HGF を投与したラット心筋においては Bcl-xL の発現が著しく増加していた。

D. 考察

心筋梗塞は冠動脈血行不全による心筋細胞死とそれに引き続く心機能不全によって特徴づけられるが、様々な複雑なプロセスが関与しその病態が修飾される。最も注目すべきものの一つに、冠血行再建後の虚血-再灌流傷害があげられる。これは虚血後の心筋において様々なサイトカイン、活性酸素、接着因子などが活性化され、虚血に引き続く二次的な心筋ダメージを誘発する病態である。したがってこの病態をブロックすることにより、心筋梗塞治療後の心筋傷害を最小限に食い止め、心筋梗塞による mortality を著明に改善できる可能性がある。

今回の心筋梗塞モデルにおいて再灌流後に素早く活性化される HGF システムが、重要な内因性心筋保護因子として機能すること、再灌流後における HGF 蛋白質のすみやかな投与が心筋細胞のアポトーシスを抑制し、心筋梗塞のサイズを縮小することを明らかにした。一方、HGF は心筋細胞に対して直接的な抗アポトーシス作用を持つことに加え、HGF は強力な血管内皮増殖活性・血管新生作用を有している。私達はこれまで HGF 遺伝子の投与が心筋においても血管新生を誘導することを明らかにしている。HGF 蛋白質の投与あるいは HGF 遺伝子治療は、心筋梗塞の急性および慢性いずれの病態に対しても強力な治療効果をもつことが考えられる。これらの成果は再生医学に根ざした心筋梗塞治療の先駆例であり、今後、前臨床相実験を行うとともに、HGF による心筋梗塞治療の

早期実現に向けた準備をする必要がある。

E. 結論

心筋虚血再灌流により内因性 HGF がすみやかに発現してくる事、HGF が重要な内因性心筋保護因子として機能する事、HGF 蛋白のすみやかな補充が心筋梗塞に対して有効な治療法となる事をはじめて明らかにした。

F. 研究発表

論文発表

1. S. Hiscox, C. Parr, T. Nakamura, K. Matsumoto, R. E. Mansel and W. G. Jiang (2000) Inhibition of HGF/SF-induced breast cancer cell motility and invasion by the HGF/SF variant, NK4. *Breast Cancer Res. & Treat.* 59, 245-54.
2. M. Nakano, Y. Yasunami, T. Maki, S. Kodama, Y. Ikehara, T. Nakamura, M. Tanaka and S. Ikeda (2000) Hepatocyte growth factor is essential for amelioration of hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic mice receiving a marginal mass of intrahepatic islet grafts. *Transplantation* 69, 214-21.
3. S. Mizuno, K. Matsumoto, T. Kurosawa, Y. Mizuno-Horikawa and T. Nakamura (2000) Reciprocal balance of hepatocyte growth factor and transforming growth factor- β 1 in renal fibrosis in mice. *Kidney Intern.* 57, 937-948.
4. K. Beppu, A. Uchiyama, T. Morisaki, K. Nakamura, H. Noshiro, K. Matsumoto, T. Nakamura, M. Tanaka and M. Katano (2000) Elevation of serum hepatocyte growth factor concentration in patients with gastric cancer is mediated by production by tumor tissue. *Anticancer Res.* 20, 1263-8.
5. M. Aoki, R. Morishita, Y. Taniyama, I. Kida, A. Moriguchi, K. Matsumoto, T. Nakamura, Y. Kanda, J. Higashi and T. Ogihara (2000) Angiogenesis induced by hepatocyte growth factor in non-infarcted myocardium and infarcted myocardium: up-regulation of essential transcription factor for angiogenesis, ets. *Gene Therapy* 7, 417-27.
6. T. Yamada, M. Hisanaga, Y. Nakajima, S. Mizuno, K. Matsumoto, T. Nakamura and H. Nakano (2000) Enhanced expression of hepatocyte growth factor by pulmonary ischemia reperfusion injury in the rat. *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 162, 707-15.
7. Y. Taniyama, R. Morishita, H. Nakagami, A. Moriguchi, H. Sakonjo, S. Kim, K. Matsumoto, T. Nakamura, J. Higaki and T. Ogihara (2000) Potential contribution of a novel anti-fibrotic factor, hepatocyte growth factor, to prevention of myocardial fibrosis by angiotensin II blockade in cardiomyopathic hamster. *Circulation* 102, 246-52.
8. T. Kunisada, H. Yamazaki, T. Hirobe, S. Kamei, M. Omoteno, H. Tagaya, U. Koshimizu, T. Nakamura and S. Hayashi (2000) Keratinocyte expression of transgenic hepatocyte growth factor (HGF) affects melanocyte development, leading to dermal melanocytosis. *Mech.Dev.* 94, 67-78.
9. S. Radaeva, T. Nakamura and A. E. Sirica (2000) Unique epithelial cell production of hepatocyte growth factor/scatter factor by putative pre-cancerous intestinal metaplasias and associated "intestinal-type" of biliary cancer chemically-induced in rat liver. *Hepatology* 31, 1257-65.
10. J. M. Otte, F. Schmitz, K. Kiehne, H. U. Stechele, T. Banasiewicz, P. Krokowicz, T. Nakamura, U. R. Folsch and K. H. Herzig (2000) Functional expression of HGF and its receptor in human colorectal. *Cancer. Digestion* 61, 237-46.
11. O. Muto, Y. Sato, Y. Umeki, K. Yoshida, T. Yoshioka, Y. Nishikawa, T. Nakamura, M. Mori, K. Koyama and K. Enomoto (2000) HGF/SF-induced spreading of MDCK cells correlates with disappearance of barnmotin/7H6, a tight junction-associated protein, from the cell membrane. *Cell Biol. Intern.* 24, 439-446.
12. T. Kikuchi, T. Abe, M. Yaekashiwa, Y. Tominaga, H. Mitsuhashi, K. Satoh, T. Nakamura and T. Nukiwa (2000) Secretory leukoprotease inhibitor augments hepatocyte growth factor production in human lung fibroblasts. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 23, 364-370.
13. K. Hayashi, S. Nakamura, R. Morishita, A. Moriguchi, M. Aoki, K. Matsumoto, T. Nakamura, Y. Kaneda, N. Sakai and T. Ogihara (2000) In vivo transfer of human hepatocyte growth factor gene accelerates re-endothelization and inhibition of neointimal formation after balloon injury in rat model. *Gene Therapy* 7, 1664-71.
14. H. Nakagami, R. Morishita, K. Yamamoto, Y. Taniyama, M. Aoki, S. Kim, K. Matsumoto, T. Nakamura, J. Higaki and T. Ogihara (2000) Anti-