

200/0849

厚生科学研究研究費補助金

特定疾患対策研究事業

特定疾患の分子病態の解明に関する研究

(H11-特定-40)

平成 13 年度 総括研究報告書

主任研究者 永井 良三

平成 14 (2002) 年 3 月

# 目 次

<b>I. 総括研究報告書</b>	3
特定疾患の分子病態の解明に関する研究 永井 良三	
<b>II. 分担研究報告</b>	
血管障害の分子機構と血管保護療法の開発に関する研究 永井 良三	11
ES 細胞を用いた試験管内血管形成に関する研究 西川 伸一	14
神経幹細胞を用いた神経組織の再生と修復のための新規治療法の開発に関する研究 中福 雅人	17
効率的造血再生を目指すための基礎的検討に関する研究 千葉 滋	19
Smad による血管内皮細胞の増殖分化調節機構に関する研究 宮園 浩平	21
HGF 蛋白ならびに HGF 遺伝子による難治性疾患の治療とその作用機構に関する研究 中村 敏一	24
臓器繊維症の病態解明と新規治療法の開発に関する研究 上野 光	29
動脈硬化形成における炎症の関与の解明と治療への応用に関する研究 森下 竜一	31
PPAR $\gamma$ 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関する研究 門脇 孝	33
BMP による心筋細胞分化誘導の機序に関する研究 小室 一成	34
<b>【研究協力者】</b>	
糸球体再生を目指した糸球体上皮細胞の分化機構に関する研究 長田 道夫	35
遺伝性脊髄小脳変性症における呼吸機能障害の究明に関する研究 津田 丈秀	37
<b>III. 研究成果の刊行に関する一覧表</b>	39

# 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

主任研究者 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が目的である。

本年度は上記３プロジェクトを通して、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た。

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・腫瘍内科、講師  
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  
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  
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  
千葉大学大学院医学研究院・循環病態医科学、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  
国立山形病院・神経内科

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

永井は、血管障害の分子機構と血管保護療法について検討した。西川は、ES細胞を用いた試験管内血管形成について検討した。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。千葉は、効率的造血再生を目指すための基礎について検討した。宮園は、Smadによる血管内皮細胞の増殖分化調節機構について検討した。中村は、HGF蛋白ならびにHGF遺伝子による難治性疾患の治療とその作用機構について検討した。上野は、臓器繊維症の病態解明と新規治療法について検討した。森下は、動脈硬化形成における炎症の関与の解明と治療への応用について検討した。門脇は、PPAR $\gamma$ 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。小室は、BMPによる心筋細胞分化誘導の機序について検討した。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。津田は、遺伝性脊髄小脳変性症における呼吸機能障害について検討した。

（倫理面への配慮）

動物実験については、動物愛護を配慮し、ガイドラインに従って取り扱った。組換えDNA、アデノウイルスは当該施設の許可・承認を得て、ガイドラインを遵守し行った。津田は、ヒトを対象とした研究を実施したが、東北大学倫理委員会の承認を得、本人同意のうえ施行した。

C, D. 結果と考察

・永井：血管障害の分子機構と血管保護療法について

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発を目指し、（１）神経、血球、心血管細胞の分化

て検討した。血管細胞と間質細胞に発現し、血管病態、血管新生、炎症に関与する転写因子 BTEB2/IKLFのノックアウトマウスを作製・解析し、同因子は心血管系を中心としたリモデリング（臓器繊維化、炎症・修復）に関与することが明らかになった。PDGF-A、TGF $\beta$ が下流遺伝子に位置する。また、レチノイド系化合物で形質が回復し、治療への発展の糸口となる。さらにBTEB2/IKLFの相互作用制御因子を精製・同定の結果、癌関連制御因子SETが含まれ、同因子はBTEB2/IKLFによるPDGF-Aの転写活性を抑えた。また、klothoと血管新生の関係について検討した。klotho欠損マウスの下肢虚血モデルでは血管新生能が低下しており、klothoが血管新生に関与していることを示した。

- ・西川：試験管内血管構築形成について検討した結果、血管内皮と平滑筋共通の前駆細胞を同定し、平滑筋非存在下で内皮のリモデリングを誘導する実験系を確立した。また、ES細胞由来の血管内皮を移植し血管ネットワークを作成し、GFPを結合させた各種キメラ遺伝子を導入したES細胞から分化した内皮細胞を用いて、Ang1, VEGF-cの細胞レベルでの機能を明らかにした。
- ・中福：成体中枢神経組織に内在する神経幹細胞、前駆細胞を操作することにより損傷組織の修復、再生について検討した。脊髄切断損傷および大脳海馬領域の虚血性損傷における内在性神経前駆細胞の再生能について検討した結果、神経前駆細胞が成体脊髄実質部に広範に存在することを明らかにし、神経前駆細胞が損傷に反応して組織内で増殖することを見出した。ニューロン新生の制限機構にNotch受容体のシグナル伝達系が関与していた。
- ・千葉：Notchリガンドによる造血制御について検討した結果、活性型Notchによる造血細胞の分化抑制を観察し、Notch1による造血細胞の分化抑制は、GATA2の発現維持を介していた。Notch1ノックアウトマウスで造血細胞の発生におけるNotchの役割を解析した結果、P-Spより血管内皮細胞は形成されたが、造血細胞は形成されなかった。しかし、YS細胞の血球コロニー形成能は保たれていた。Notchシグナル分子であるHES-1導入造血幹細胞は、造血再構築可能な造血幹細胞を、試験管内で短期間維持した。
- ・宮園：Smadの転写活性について検討した結果、抑制型SmadであるSmad6とSmad7のうち、TGF- $\beta$ シグナルの抑制はSmad7の方が強力であった。内皮細胞にTGF- $\beta$ のI型レセプターALK-1とALK-5をそれぞれ発現させたところ抑制型Smadとendoglin(ALK-1の場合)が誘導された。BMP II型レセプターの細胞外領域や細胞内キナーゼ領域に変異を導入するとシグナルの喪失が見られた。一方、C末端のtail領域の変異ではシグナル伝達能の変化は少なかった。
- ・中村：難治性疾患モデル動物にリコンビナントHGFタンパク質ならびにHGF遺伝子発現プラスミドを投与し、その治療効果とその作用機構の解析を行った。急性疾患としては劇症肝炎と心筋梗塞に関してリコンビナントHGF投与により、ドラマチック

な発症阻止と治療効果が得られた。この治療効果はHGFの強力な抗アポトーシス作用と実質細胞の再生促進効果によることが明らかになった。一方、慢性疾患では肝硬変、慢性腎不全/腎硬化症、拡張型心筋症に対してリコンビナントHGFならびにHGF遺伝子治療が顕著な進行阻止と治療効果を発揮した。

- ・上野：炎症と繊維化のメカニズムと防止について検討した結果、TGF- $\beta$ の作用を特異的に抑制する変異型TGF- $\beta$ 受容体を作成したアデノウイルスを導入すると、線維化の発症さらに進展も抑制され、かつ臓器機能の保存と生存がみられた。肝線維化の他、腎硬化症、角膜混濁、肺線維症そして糖尿病性動脈硬化症の各モデルでも同様の効果が観察された。
- ・森下：バルーン障害によりブタ冠動脈バルーン障害後再狭窄モデルを作成し、NFkB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。NFkBデコイの投与は、新生内膜の形成を有意に抑制した。また、他の炎症性疾患への応用を進め、慢性関節リウマチサルモデルにおいて、NFkBデコイの関節内投与による腫脹の軽減・骨破壊抑制を明らかにした。更に、アトピー性皮膚炎モデルマウスに対して軟膏製剤を開発した結果、著明な皮膚症状の改善を認めた。
- ・門脇：虚血再灌流腸管傷害におけるPPAR $\gamma$ の役割について検討した結果、PPAR $\gamma$ リガンド前投与で虚血再灌流胃・腸管傷害が抑制された。機序としてNF-kB活性化阻害が示された。DSS誘発腸炎でも同剤前投与は傷害を抑制し、治療群で腸でのTh1抑制、Th2活性化をみた。PPAR $\gamma$ 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認めなかった。
- ・小室：in vitro心筋細胞分化系によりBMPが心筋細胞分化を促進する機序、心筋特異的転写因子Csx/Nkx2.5の分化した心筋細胞における役割について検討した。BMP阻害分子nogginを過剰発現させて心筋分化能を失活させたP19CL6noggin細胞はBMP、TAK、smad1/4の強制発現により心筋に分化した。BMP、BMPの下流に存在するTAK、smad、その下流のATF-2の役割について検討した結果、ATF-2はTAK、smad1/4と協調的に $\beta$ MHCプロモーター活性を上昇させた。変異Csx/Nkx2.5を過剰発現させたP19CL6細胞、Csx/Nkx2.5変異マウスでは酸化ストレスによるapoptosisが増加した。BMPの心筋細胞分化機構とCsx/Nkx2.5の心筋保護作用が明らかになった。
- ・長田：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結果、糸球体上皮細胞の分化には細胞周期因子、とくにcyclin-dependent kinase inhibitor (CKIs, p27, p57)が重要であり、これらの因子の調節不全によって糸球体上皮細胞の脱分化と細胞死・増殖が惹起され糸球体障害が進展することを明らかにした。糸球体上皮細胞分化誘導因子の探索を、マウス発達期の腎臓を用いてサブトラクションハイブリダイゼーション法で行った結果、糸球体発生期に高発現する56個の遺伝子群を同定した。

・津田：CAGリピートの異常伸長を病因遺伝子とする遺伝性脊髄小脳変性症の呼吸機能障害を病型別に検討した。予後不良であるSpinocerebellar ataxia type1 (SCA1)では高炭酸ガスに対する感受性の有意な低下を認めた。この結果は本疾患の死亡原因に関与し生命予後に影響する可能性を示唆した。

#### 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。

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 $\gamma$ 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 $\kappa$ 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- $\beta$ 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、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。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

分担報告書参照

##### 2. 学会発表

分担報告書参照

#### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）。

##### 1. 特許取得

永井：BTEB2/IKLF欠損による病態に対する特定のレチノイド系化合物の回復作用（申請予定）

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

# 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に関する研究  
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

我々は、血管病変形成の分子機構解明と診断・治療法開発に関して特に遺伝子転写レベルと、液性因子に関して研究を進めた。遺伝子転写に関しては血管平滑筋細胞や線維芽細胞の活性化に重要な BTEB2/IKLF の *in vivo* における役割をノックアウトマウスを作成することによって解析した。BTEB2/IKLF ヘテロノックアウトマウスでは血管傷害に対する著明な組織の反応性低下が認められた。また BTEB2/IKLF は心血管系組織傷害において主要な因子であるアンジオテンシン II によって誘導され、PDGF-A や TGF- $\beta$  等のオートクライン・パラクライン因子を調節することを明らかとした。これらの結果は BTEB2/IKLF が心血管系へのストレスに応じて、血管病変、組織再構築を進める重要な転写因子であることをしめす。さらに我々は BTEB2/IKLF の機能を修飾する薬剤の同定に成功し、これらの薬剤が個体でも心血管系組織再構築に作用することを明らかとした。また、液性因子に関しては老化関連因子 Klotho を中心として研究を進めた。Klotho は血管新生促進作用および保護作用を持つこと、また Klotho の細胞内情報伝達経路を明らかとした。これらの結果は液性因子による血管保護療法の開発に有用な情報を与えると考えられる。

A. 研究目的

血管病変は代謝的ならびに物理的傷害に細胞が反応することによって形成される。従って、ストレスに応答する細胞の分子機構を解明することは、新しい治療法の開発に結びつくと考えられる。本研究では、特に細胞の応答を最終的に決定付ける転写因子レベルの分子機構と、細胞外からのシグナルに関しては血管保護作用を示す老化関連因子 Klotho に着目して検討を進めた。これらの因子の機能を遺伝子改変動物を用いて解析し、さらに薬剤開発を開始した。

B. 研究方法

1. BTEB2/IKLF の機能解析と薬剤開発

我々が研究を続けてきている血管平滑筋細胞や線維芽細胞の活性化に重要な Krüppel 型 zinc finger 転写因子 BTEB2/IKLF の個体での機能を解析するために、ノックアウトマウスを作成した。このノックアウトマウスを用いて各種心血管系傷害モデルにおける BTEB2/IKLF の機能を解析した。

2. Klotho 因子の血管保護作用の検討

Klotho 因子の血管への作用に関して、Klotho 遺伝子ノックアウトマウス、Klotho 因子アデノウイルス、センダイウイルスを用いて、腎障害モデル、虚血モデルによって個体レベルで、また培養細胞によってさらに分子機構に関して検討した。

（倫理面への配慮）

上記研究は培養細胞および実験動物を用いて行われた。動物実験に関しては当施設のガイドラ

インに厳密に従い、動物愛護の観点に配慮して行われた。また、培養細胞で代替可能な実験に関しては培養細胞を積極的に用いた。

D. 研究結果

1. BTEB2/IKLF の *in vivo* での機能と薬剤開発

BTEB2/IKLF 遺伝子ノックアウトマウスを作成した。BTEB2 遺伝子欠損マウスのホモ個体は胎生早期に死亡するが、ヘテロ接合体においては種々の臓器傷害に対する平滑筋細胞や線維芽細胞の反応性の著明な低下が認められた(図1参照)。すなわち血管傷害時の平滑筋細胞増殖、血管外膜の反応、アンジオテンシン II 慢性投与時の心筋線維化と心肥大および腎肥大、皮下組織や血管周囲に留置された異物に対する肉芽形成、腫瘍への細胞浸潤と血管新生、等が著明に低下していた(Nature Medicine 投稿中)。これらの結果は転写因子 BTEB2/IKLF が、血管傷害後に誘導される線維芽細胞、平滑筋細胞、免疫系細胞の活性化と増殖、その結果としての血管リモデリング、炎症、血管新生に重要な役割を果たしていることを示す初めての知見である。さらに我々は BTEB2 が、臓器リモデリングに重要な役割を担うアンジオテンシン II の細胞内シグナルの下流に位置すること、BTEB2 が活性化するシグナルの下流には間葉系細胞の増殖や血管新生に重要な PDGF や TGF- $\beta$  遺伝子が存在することを明らかにした。これらの結果は BTEB2/IKLF が外界からのストレスに応じて血管病変の形成、組織構築を進める主要な転写因子であることを明らかにした。



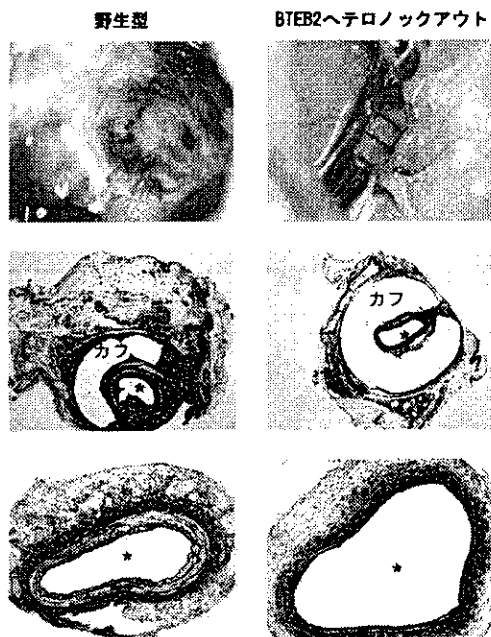


図1 BTEB2 遺伝子欠損ヘテロマウスは大腿動脈カフ傷害モデルで著明な血管外膜・新生内膜肥厚、カフ周囲の間質反応の減弱を示す

野生型およびヘテロマウスの大腿動脈をカフで傷害した。野生型マウスではカフ周囲が厚い肉芽組織で覆われていたが、ヘテロマウスでは菲薄であった。また傷害された動脈壁は野生型では肥厚したが、ヘテロマウスでは逆に菲薄化した。すなわち、BTEB2は組織傷害に対する間葉系細胞の活性化に重要な転写因子と考えられる。

さらに我々は BTEB2/IKLF の機能を修飾する薬剤の同定に成功した。BTEB2/IKLF の転写機能を活性化する薬剤は組織再構築や血管新生を進めること、逆に抑制する薬剤は再構築を著明に抑制することが明らかとなり、BTEB2/IKLF に対する薬剤開発の有効性を示すものと考えられる。

## 2. Klotho の血管保護作用

アンジオテンシン II 負荷マウスでは腎臓における Klotho 因子の発現が低下しており、同負荷マウスに Klotho 因子発現アデノウイルスを投与すると腎障害が改善した。

Klotho 遺伝子ヘテロノックアウトマウスに下肢虚血モデルを作成したところ、血管新生能が低下していた。さらに Klotho 因子の細胞に対する作用の分子機構を解明するために Klotho が惹起する細胞内シグナル経路を検討した。Klotho 因子をアデノウイルスおよびセンダイウイルスで強制発現すると分泌された Klotho 因子が内皮細胞の eNOS のリン酸化を進めた。

## D. 考察

我々は血管細胞の活性化の観点から転写因子 BTEB2/IKLF の単離同定、機能解析を進めてきたが、今回のノックアウトマウスの解析結果は、BTEB2/IKLF が単に血管障害だけではなく、心肥大、炎症性疾患や血管新生においても重要な役割を果たすことを示す。また、BTEB2/IKLF に対する薬剤スクリーニングの成功と、これらの薬剤の個体での作用は、BTEB2/IKLF の機能を修飾する薬剤が血管新生や炎症の調節、臓器保護といった新しい治療法の発展に大きく貢献すると期待できる。

一方、我々の研究結果は Klotho 因子が液性因子として血管内皮細胞に作用し、内皮細胞機能を保護することを示す。個体レベルの解析で、

Klotho 因子は腎保護や血管新生低下抑制に働いた。Klotho 因子は腎・血管細胞の寿命決定や生理機能を調節する因子であり、腎・血管のホメオスターシスに寄与すると考えられる。Klotho 遺伝子ならびにそのタンパクの投与や機能修飾する薬剤が、血管障害や個体老化の防止に有用であると考えられる。

## E. 結論

心血管系疾患の基本病態として、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が、その中でも重要な役割を果たすと考えられる転写因子 BTEB2/IKLF ならびに老化抑制因子 Klotho を解析した。これらの因子を標的とした治療戦略の開発が、心血管系の新しい治療法、さらには様々な慢性炎症性疾患や老化に伴う組織再構築、臓器機能障害に対する新しい治療法の開発につながると期待できる。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

• Mitani H, et al. Angiotensin II downregulates renal expression of anti-aging gene, klotho, and klotho gene transfer ameliorates angiotensin II-induced renal damage. Hypertension in press.

• Fukino K, et al. Regulation of Angiogenesis by the Aging Suppressor Gene klotho. Biochem Biophys Res Commun in press.

• Sata M, et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular progenitor cells that contribute to atherosclerosis. Nature Med in press.

• Oyama Y, et al. PPAR $\gamma$  ligand inhibits osteopontin gene expression through interference with binding of nuclear factors to A/T-rich sequence in THP-1 cells. Circ Res. 90:348-355, 2002.

• Maeno T, et al. Stimulation of vascular endothelial growth factor gene through Sp1 and Sp3 sites in human bronchioloalveolar carcinoma cells. Am J Respir Cell Mol Biol. 26: 246-253, 2002.

• Aizawa T, et al. Angiotensin II and catecholamines increase plasma levels of 8-epi-prostaglandin F(2 $\alpha$ ) with different pressor

dependencies in rats. *Hypertension*. 39: 149-154, 2002.

• Ishizaka N, et al. Regulation and localization of HSP70 and HSP25 in the kidney of rats undergoing long-term administration of angiotensin II. *Hypertension*. 39: 122-128, 2002.

• Ishizaka N, et al. Abnormal iron deposition in renal cells in the rat with chronic angiotensin II administration. *Lab Invest*. 82: 87-96, 2002.

• Sato M, et al. Inducible expression of endothelial PAS domain protein-1 by hypoxia in human lung adenocarcinoma A549 cells. Role of Src family kinases-dependent pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 26: 127-134, 2002.

• Iwasaki T, et al. Immunoscintigraphy of aortic dissection with 99mTc-labeled murine anti-smooth muscle myosin monoclonal antibody in rats. *J Nucl Med* 42: 130-137, 2001.

• Saijura A, et al. Circulating smooth muscle progenitor cells contribute to atherosclerosis. *Nature Med* 7: 382-383, 2001.

• Ogata T, et al. Inducible expression of basic transcription factor binding protein 2 plays a potential role in the development of the allograft vascular disease. *J Heart Lung Transplant* 20: 228, 2001

• Morita H, et al. Lack of association between the platelet glycoprotein Ia C807T gene polymorphism and myocardial infarction in Japanese: An approach entailing melting curve analysis with specific fluorescent hybridization probes. *Thromb Haemost* 85: 226-230, 2001

• Nakajima A, et al. Endogenous PPAR $\gamma$  mediates anti-inflammatory activity in murine ischemia-reperfusion injury. *Gastroenterology* 120: 460-469, 2001

• Sekiguchi K, et al. Homeobox protein hex induces SMemb/Nonmuscle myosin heavy chain-B gene expression through the cAMP-responsive element. *Circ Res* 88: 52-28, 2001

• Kanai H, et al. Transforming growth factor- $\beta$ /Smads signaling induces transcription of the cell type-restricted ankyrin repeat protein CARP gene through CAGA motif in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 88: 30-36, 2001

• Morita H, et al. Diet-induced hyperhomocysteinemia exacerbates neointima formation in rat carotid arteries after balloon injury. *Circulation* 103: 133-139, 2001

• Nagai R, et al. Phenotypic modulation of vascular smooth muscle cells: dissection of transcriptional regulatory mechanisms. *Ann N Y Acad Sci*. 947: 56-66, 2001

• Yamagishi T, et al. Troglitazone improves endothelial function and augments renal klotho mRNA expression in Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) rats with multiple atherogenic risk factors. *Hypertens Res*. 24:705-9, 2001.

• Manabe N, et al. Connection between B lymphocyte and osteoclast differentiation pathways. *J Immunol*. 167:2625-31, 2001.

## 2. 学会発表

• 2001.4.4 The 6th Saratoga International Conference on Atherosclerosis (第6回サラトガ国際動脈硬化カンファレンス) Symposium II "Signal Transduction, Angiogenesis" 「Smooth muscle phenotypic modulation; dissection of transcriptional regulatory mechanisms」 Tokyo, Japan

• 2001.8/30-9/2 9th Australian Vascular Biology Society (AVBS) Meeting, Noosa Lakes Resort, Queensland Plenary Lecture "Role of IKLF/BTEB2 in transcriptional regulation of smooth muscle phenotypic modulation"

• 永井良三。2001.5.27 第44回日本腎臓学会学術集会 教育講演(1) 「klotho 遺伝子と腎臓・血管機能」東京

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

## 1. 特許取得

BTEB2/IKLF 欠損による病態に対する特定のレチノイド系化合物の回復作用(申請中)

## 2. 実用新案登録

なし

## 3. その他

なし

## ES細胞を用いた試験管内血管形成に関する研究

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これまで解析した VEGF、VEGF-C の内皮細胞への作用に加え、Angiopoietin1 の内皮細胞レベルでの作用も明らかにした。

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。

昨年度までの研究で、ES細胞から血管内皮を誘導し、その内皮を試験管内で培養する際に、様々な因子を加え、細胞レベルでの内皮の動態をモニターする実験システムを完成させた。これにより、VEGFが内皮の強い形態変化を誘導するとともに、細胞間接着装置の強度を低下させる事、これに対し、逆に VEGF-C/VEGFR3 シグナルは細胞間接着装置を安定化させる方向のシグナルであることを示してきた。本年は、この系を用いて、これまで細胞レベルでの機能が不明であった Angiopoietin1 (Ang1)の機能を明らかにすることを目指した。

血管リモデリングは内皮と周囲細胞の相互作用をベースとして進むことが想定されているが、これまでの実験システムは周囲細胞と血管内皮を切り離して研究できなかったため、

内皮だけでどの程度の形態形成が可能かが不明であった。この問題を解決するため、網膜血管形成システムを利用し、周囲細胞の非存在下での血管形成を可能にする実験系構築を目指した。

### B.研究方法

昨年作成した GFP-actin を導入した ES 細胞株に加えて、GFP-VE-cadherin, GFP-Arp(p41) を導入した ES 細胞を作成し、細胞内の動態がより詳細にモニターできるシステムを完成させた。

一方網膜血管形成を周囲細胞非存在下で形成させるために、周囲細胞の動員を阻害すると考えられている PDGFR $\beta$  に対するモノクローナル抗体を作成し、それを新生時期に投与した。期待通り、周囲細胞の血管叢への動員は完全に阻害することができた。

### C.研究結果

#### 1) 周囲細胞非存在下でのリモデリングと Ang1 の機能

新生児期のマウスに PDGFR $\beta$  に対する抗体を一日おきに投与し 7-10 日目に眼球を摘出、whole-mount immunostaining を行った。対照群網膜血管は、新生血管できると速やかに周囲細胞がその周りに動員され、動脈周囲では更に smooth muscle actin(SMA)陽性細胞へと分化していくが、抗体投与群では全く動員が認められなかった。走査型電顕で調べると、全ての血管が周囲細胞に裏打ちされることな

く、直接外の組織に露出している像がみられ、周囲細胞が毛細管から動脈まで全てのレベルで存在していない事が確認された(図1)。

周囲細胞が欠損していても血管新生は進むが、血管の構築は、動静脈が毛細管によりつながり、動脈周囲では毛細管の直接吻合が減少する正常の構築と比べると(図1)、大小血管、動静脈の区別が不明瞭な構築に終わってしまい、明らかにリモデリング異常が起こっているのがわかる。このことは、リモデリングプロセスが、確かに内皮と周囲細胞との相互作用を基礎として進むことを意味している。

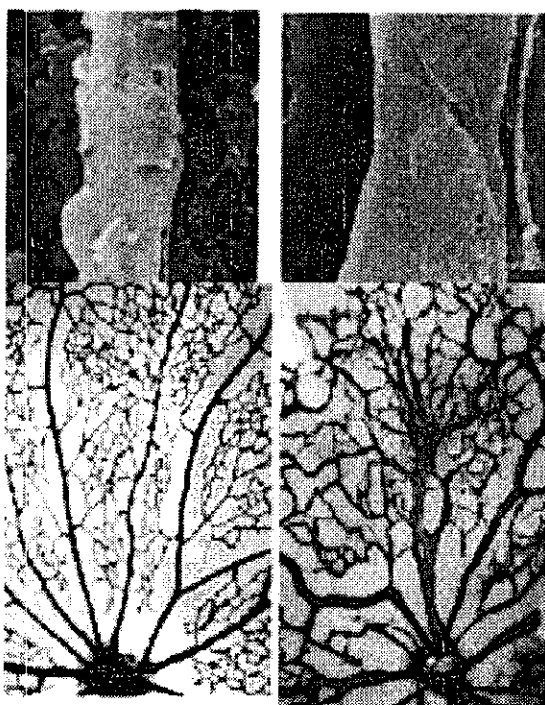


図1 抗 PDGFR $\beta$ 抗体投与による周囲細胞動員の阻害と血管リモデリングの異常。 左上は正常動脈、右上は抗体投与動脈。投与群では血管が拡張し、また周囲細胞が欠損していることがわかる。周囲細胞非存在下でも血管新生は起こるが、正常(左下)と比べると、動静脈の区別が不明で、明らかなリモデリング障害が認められる(右下)。

また、周囲細胞が存在しない血管は、diabetes retinopathyと同じで機能が低下するため、生後1週を過ぎると浮腫、出血が進み、最後は網膜剥離を起こす。

PDGFR $\beta$ は周囲細胞のみに発現していることから、上に述べた血管の障害は、血管に周囲細胞が動員されないことにより引き起こされると結論できるが、この周囲細胞の機能を周囲細胞が分泌するサイトカインで置き換えることが可能かどうかを次に検討した。

遺伝子 KO マウスの解析などから、Ang1は周囲細胞由来の分子の中でもリモデリング

に直接関わる重要な分子として考えられてきており、新しく確立した実験システムを確かめる目的には最適の分子であると言えるため、この分子がどこまで周囲細胞自体の機能を代替できるのかについて検討した。

新生児期に抗 PDGFR $\beta$ 抗体を投与し、周囲細胞の動員を阻害した後、リコンビナント Ang1を片方の眼球内に投与し、非投与眼球と比べることで Ang1 の作用を調べた。

結果は予想以上で、Ang1を投与したほうの眼球でのみ毛細管、動静脈という区別がはっきりした血管構築が回復した。同時に、浮腫や出血も生後10日までの追跡では完全に抑制された。このことは、1) Ang1が血管内皮細胞に対する周囲細胞自体の作用の最も重要なものであり、リコンビナント分子を眼球全体に投与するだけでリモデリングが進むこと、2) 内皮同士の接着は Ang1 そのものにより調節されており、このシグナルの破綻が浮腫や出血につながる事、3) 周囲細胞そのものが存在しなくとも、内皮細胞のみで形態形成を進み、リモデリングが起こること、を示している。

今回の結果は、Ang1が直接内皮に作用しそのリモデリングを調節していることを示した最初のものであると言ってよいだろう。一方、Ang1投与で血管の構築が完全に正常化するわけではないことも重要である。通常、毛細管は静脈本管と吻合を保つ一方、動脈本管とは急速に吻合を減らす。しかし、Ang1によって回復した血管構築では、動脈とも同じ程度の吻合が保たれたままになっている。この結果は、動脈との吻合を整理する過程を調節する Ang1 以外の分子が存在することを示唆している。

## 2) 血管内皮自体に対する Ang1 の作用

これまで、リモデリングは細胞相互作用を基礎とした局所的な分子の発現の差、或いは濃度勾配等により形成されると考えられてきた。しかし、リコンビナント Ang1を眼球全体に投与することで、かなりの程度リモデリングが進むと言う我々の結果は、Ang1により誘導される内皮自体の動態の変化がリモデリングにとって重要であることがわかる。

しかしながら、in vivo の実験系からは Ang1が内皮自体にどのような作用を及ぼしているのかについて明らかにすることはできない。そこで、昨年度に報告した ES 細胞由来の血管内皮動態をモニターする実験系を利

用して、Ang1の内皮に対する作用を検討した。

まず、GFP-actinを導入したES細胞から血管内皮を誘導、精製し、OP9フィーダー細胞上で培養し、内皮細胞コロニーが形成した後、Ang1を添加した。Ang1はまず、1時間程度続く、細胞の収縮を誘導した。その後の経過では、対照群と比べ、Ang1添加群ではコロニー内の細胞の移動が強く抑制されている点が特徴的であった。この原因を更に解析する目的で、actin nucleationの核になるp41-Arp-GFPを誘導したES細胞を作成し、それから誘導した内皮を同じようにモニターした。通常、コロニー内での内皮細胞の移動においては、p41が移動方向に集中するのが観察されるが、この極性を持ったp41の分布がほとんど起こらないことが明らかになった。同様に、GFP-VE-cadherinを用いて細胞間接着部位をモニターすると、接着面がAng1添加群でよりぎざぎざした構築を取ることがわかった。

#### D. 考察

本年の結果は、これまでAng1の作用について唱えられてきた仮説の根本的再検討を迫るものであった。特に、局所的なAng1の発現が重要ではなく、血管新生部位全体にAng1が存在するだけでリモデリングが進むこと、またAng1が内皮に直接作用しその動きを調節することでリモデリングを進めていること、そして内皮のchemotaxisや生存を調節するというAng1のこれまで考えられてきた作用に対し、実際には内皮の極性を持った動きを抑制するという結果などは全く新しい概念であると言える。ただ、個々の内皮の動態がこのように明らかになってきても、その動きがどのようにリモデリングにつながるのかについては、まだまだ研究が必要である。このためには、同じ細胞を使って生化学的解析を進めることが必要になる。従って、最も重要な課題は、1オーダー多い数の細胞を扱うための技術開発であり、現在高速ソーティングの導入など、セットアップを行っている。

#### D. 結論

周囲細胞非存在下に血管形成を誘導する実験系を完成させ、周囲細胞由来のサイトカインの作用を血管内皮の形態形成現場で調べるための実験システムを確立した。この新しい系で、Ang1が血管内皮に直接作用してリモデリングに関わることを明らかにできた。最後

に、ES細胞由来の内皮細胞を用いてAng1の作用を検討し、Ang1が内皮細胞に極性を持って細胞骨格を再構成をするプロセスを抑制していることを明らかにした。今後は、この細胞レベルでの結果をいかに生化学的解析へとつなげていくのかについて更に検討する。

#### E. 研究発表

##### 口頭発表

海外のみ

招待講演 5件

そのうち主なもの

ドイツ発生物学会

コロンビア大アーデンハウス会議

国際免疫学会

##### 論文発表

海外のみ

原著論文 12編

総説 2編

原著論文のうち主なもの

1. Stacker SA et al. *Nature Med* 7, 186, 2001
2. Makinen T et al. *Nature Med* 7, 199, 2001
3. Hashi H et al. *J.Immunol.* 166, 3702, 2001
4. Honda K et al. *J.Exp.Med* 193, 621
5. Ishikawa T et al. *Development* 128, 25, 2001
6. Sano H et al, *Circulation*103, 2955, 2001
7. Yoshida et al, *J.Immunol* 167, 2511, 2001
8. Nishimura et al. *Nature* in press, 2002

総説のうち主なもの

1. Nishikawa SI et al, *Curr Op Cell Biol* 14, 249, 2001

#### F. 知的所有権の取得状況

なし。

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：成体神経組織に多数の神経前駆細胞が残存していることを明らかにした。また、外傷性損傷後の脊髄内で、内在性前駆細胞からのニューロン新生を誘導する手法を開発した。さらに、脳室内への増殖因子投与により内在性前駆細胞を活性化し、虚血性損傷後の海馬において著明なニューロン再生を誘導する手法を開発した。本研究により、外傷性脊髄損傷、虚血性脳損傷をはじめとする種々の神経疾患に対する新しい再生誘導療法の開発に道が開けた。

#### A. 研究目的

パーキンソン病を代表とする神経変性疾患に対する有効な治療法として、神経幹細胞の脳内移植法が期待されている。しかしながら、脳卒中、外傷など、比較的広範な領域の多様なニューロンが同時に傷害される疾患に対しては、細胞移植療法は必ずしも効果が期待できない。そこで本研究では、成体中枢神経組織に内在する神経幹細胞・前駆細胞を人為的に操作することにより損傷組織の修復をおこなう、新しい再生治療法の開発を目指している。

#### B. 研究方法

種々の神経疾患モデルの作成が容易なラットを用いて、脊髄切断損傷および大脑海馬領域の虚血性損傷における内在性神経前駆細胞の再生能について検討した。成体に残存する神経前駆細胞を、特異的な転写因子の発現を指標として、免疫組織化学染色法により同定した。また、神経前駆細胞を neurosphere 法を用いて培養し、その性質を分子レベルで詳細に解析した。尚、実験動物の使用にあたっては全て学内実験動物取扱い規定を遵守した。

#### C. 研究結果

まず、神経前駆細胞が成体脊髄実質部に広範に存在することを明らかにした。さらに、ラット胸髄完全切断モデルを用いた解析から、神経前駆細胞が損傷に反応して組織内で増殖することを見出した。しかし、損傷組織内では前駆細胞からのニューロン新生は観察されなかった。この組織内でのニューロン新生の制限機構に Notch 受容体を介したシグナル伝達系が関与することを明らかにした。さらに、この抑制を解除するために、ニューロン分化促進機能をもつ転写因子 Neurogenin2 を組み換えレトロウイルスを用いて脊髄内で強制発現させ、損傷組織内でニューロン新生を誘導することに成功した。

一方、成体脳内の神経前駆細胞の再生能を明らかにするため、一過性全脳虚血ラットをモデルとした解析をおこなった。虚血損傷に反応して脳内の神経前駆細胞は増殖、移動、分化し、特に海馬領域では CA1 錐体ニューロンを一部再生することを見出した。さらに、脳室内への増殖因子の投与により内在前駆細胞の増殖を亢進させ、海馬ニューロンの再生を著明に促進することに成功した。最適条件では、損傷で一旦ほぼ全てが死滅する CA1 錐体ニューロンを、虚血後1ヶ月で正常レベルの40%程度まで再生させることが可能であった。この再生ニューロン

はシナプス形成を介して既存の神経回路に組み込まれ、虚血によって傷害される海馬依存的な空間学習・記憶機能の回復に貢献していることを明らかにした。

#### D. 考察

本研究により、成体に残存する神経前駆細胞の同定、制御機構といった、これまで不明のままであった基礎的かつ重要な課題について、分子レベルでの研究が大きく進んだ。また、外傷性脊髄損傷、虚血性脳損傷における内在性前駆細胞の挙動とその再生能に関する研究で、成果を得ることが出来た。これは国内外の他の研究に先駆けた大きな成果であると考えている。

脳卒中、外傷、変性など、中枢神経系の疾患はいずれも現時点で根治的治療法のない難病である。本研究によって、成体中枢神経組織に内在する神経幹細胞・前駆細胞を人為的に操作することにより損傷組織の修復をおこなう、新しい再生誘導療法の開発に向けて大きな前進があったと考えている。

#### E. 結論

動物モデルを用いて、内在性神経前駆細胞の活性化による損傷神経組織の機能的再建をおこなう、新たな再生治療法の可能性を開いた。

#### F. 健康危険情報

特になし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Mizuguchi R, Sugimori M, Takebayashi H, Kosako H, Nagao M, Yoshida S, Nabeshima Y, Shimamura K, Nakafuku M. (2001) Combinatorial roles of Olig2 and Neurogenin2 in the coordinated induction of pan-neuronal and subtype-specific properties of motoneurons. *Neuron* 31, 757-771.

2) Yamamoto S, Yamamoto N, Kitamura T, Nakamura K, Nakafuku M. (2001) Proliferation of parenchymal neural progenitors in response to injury in the adult rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 172, 115-127.

3) Yamamoto N, Yamamoto S, Inagaki F, Kawaichi M, Fukamizu A, Kishi N, Matsuno K, Nakamura K, Weinmaster G, Okano H, Nakafuku M. (2001) Role of

Deltex-1 as a transcriptional regulator downstream of the Notch receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 45031-45040.

4) Yamamoto S, Nagao M, Sugimori M, Kosako H, Nakatomi H, Yamamoto N, Takebayashi H, Nabeshima Y, Kitamura T, Weinmaster G, Nakamura K, Nakafuku M. (2001) Transcription factor expression and Notch-dependent regulation of neural progenitors in the adult rat spinal cord. *J. Neurosci.* 21, 9814-9823.

5) Kato M, Seki N, Sugano S, Hashimoto K, Masuho Y, Muramatsu M, Kaibuchi K, Nakafuku M. (2001) Identification of Sonic hedgehog-Responsive Genes by Using cDNA Microarray. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 289, 472-478.

6) Kobayashi D, Kobayashi M, Ogura T, Nakafuku M., Shimamura K. (2002) Early subdivisions in the neural plate define distinct competence for inductive signals. *Development* 129, 83-93.

7) Imai T, Tokunaga A, Yoshida T, Hashimoto M, Mikoshiba K, Weinmaster G, Nakafuku M., Okano H. (2001) The neural RNA-binding protein Musashi 1 translationally regulates the *m-numb* gene expression by interacting with its mRNA. *Mol. Cell Biol.* 21, 3888-3900.

8) Nakashima K, Takizawa T, Ochiai W, Yanagisawa M, Hisatsune T, Nakafuku M., Miyazono K, Kishimoto T, Kageyama R, Taga T. (2001) BMP2-mediated alteration in the developmental pathway of fetal mouse brain cells from neurogenesis to astrocytogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 5868-5873.

9) Fu H, Qi Y, Tan M, Cai J, Takebayashi H, Nakafuku M., Richardson W, Qiu M. (2002) Dual origin of spinal oligodendrocyte progenitors and evidence for the cooperative role of Olig2 and Nkx2.2 in the control of oligodendrocyte differentiation. *Development* 129, 681-693.

10) Kamimori K, Machide M, Tomita K, Nakafuku M., Kohsaka S. Cell-type specific expression of protein tyrosine kinase-related receptor RYK in the central nervous system of the rat. *Mol. Brain Res.* 2002; *in press.*

11) Heins N, Malatesta P, Cecconi F, Nakafuku M., Tucker K L, Hack M A, Chapouton P, Barde Y-A, Götz M. Glial cells generate neurons: The role of the transcription factor Pax6. *Nat. Neurosci.* 2002; *in press.*

## 2. 学会発表

1) Nakafuku M. Molecular biology of neural stem cells: generation and regeneration of specific neuronal subtypes in the embryonic and adult brain. In: The 4th Annual Meeting of the Korean Society for Brain and Neural Sciences. 2001 (Seoul) 招待講演

2) Nakafuku M. Generation of specific neuronal subtypes in the embryonic and adult nervous system: Mechanisms and implications. In: The Laudat Conference on: Neural stem cells: From development to the Clinic. (organized by INSERM, France) 2002 (Aix-Les-Bains) 招待講演

3) Nakafuku M. Adult neural progenitors and their latent regenerative potential in the spinal cord. In: Motor neuron development and Amyotrophic lateral Sclerosis. (organized by the ALS Association, the USA) 2002 (Boston) 招待講演

4) 中富浩文、山本真一、杉森道也、川原信隆、桐野高明、中福雅人 成体脳に内在する神経幹細胞、前駆細胞の動態解析 -中枢神経組織の再生を目指して- 日本脳外科学会総会 2001 (岡山)

5) 加藤真樹、中福雅人、菅野純夫、橋本雄之、村松正明、増保安彦、貝淵弘三、関直彦 領域特異的転写制御因子群による発生期脳における特異的神経回路形成の制御機構 第24回日本分子生物学会 2001 (横浜)

6) 水口留美子、杉森道也、小迫英尊、竹林浩秀、吉田松生、鍋島陽一、中福雅人 Olig2 と Neurogenin2 の運動ニューロン発生における協調的役割 第24回日本分子生物学会 2001 (横浜)

7) 長尾元史、山本真一、北村俊雄、中福雅人 Notch シグナルによる神経幹細胞の増殖と分化の制御機構の解析 第24回日本分子生物学会 2001 (横浜)

H. 知的所有権の出願・登録状況  
なし

効率的造血再生を目指すための基礎的検討に関する研究

分担研究者：千葉 滋（東京大学医学部附属病院血液・腫瘍内科講師）

A. 研究目的

Notch は細胞膜受容体型の糖蛋白質であり、細胞の分化を抑制するシグナルを伝達する。このため、造血幹細胞を未分化なまま体外で増幅する技術の開発につながるのではないかと期待されている。本年度は、(1) Notch の造血発生における役割を検討すること、(2) Notch のシグナルによる造血幹細胞の体外増幅の可能性を検討すること、の二つを目的とした。

B. 研究方法

(1) 胎生 9.5 日の Notch1 ノックアウトマウスより paraaortic splanchnopleures (P-Sp) および yolk sac (YS) を採取し、組織培養による造血細胞の発生、P-Sp および YS 形成細胞によるコロニー形成能と同系マウス造血再構築能を検討した。(2) Notch シグナル分子である HES-1 を、レトロウイルスベクターによりマウス骨髄造血幹細胞分画 (Lin-Sca1+c-Kit+CD34-) に導入し、これを放射線照射同系マウスに移植することにより、造血幹細胞が試験管内およびレシピエントマウス個体内で、コントロールウイルスを導入した場合に比べ、より維持されるか否かを検討した。

C. 研究結果

(1) Notch1<sup>-/-</sup>マウスの P-Sp より血管内皮細胞は形成されたが、造血細胞は形成され

なかった。また、野生型または Notch1<sup>+/-</sup>マウスの YS 細胞は、新生児マウスに移植することにより造血を再構築したが、Notch1<sup>-/-</sup>マウスの YS 細胞は再構築しなかった。しかし、Notch1<sup>-/-</sup>マウス YS 細胞は、血球コロニー形成能が保たれていた。(2) HES-1 導入造血幹細胞は試験管内で 2 日間、および移植されたマウス個体で 3 ヶ月、コントロールウイルス導入細胞に比較してより維持され、全ての系統の造血細胞を再構築した。

D. 考案

(1) Notch1 は YS における造血前駆細胞の発生（1次造血）には必要でなく、2次造血、特に血管内皮・造血幹細胞共通の前駆細胞が、造血構築能を獲得する過程に必須であると推測された。(2) HES-1 シグナルは、造血幹細胞の体外増幅に有用と考えられた。今後は遺伝子を導入することなく、Notch リガンドを用いて造血幹細胞の体外増幅を検討する

E. 結論

(1) Notch1 は、血管内皮・造血幹細胞共通の幹細胞が、造血構築能を獲得する過程に必須である。(2) Notch シグナル分子 HES-1 により、移植により全ての系統の造血を再構築可能な造血幹細胞が、試験管内およびレシピエントマウス個体内で維持された。



F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. Yamaguchi E, Chiba S, Kumano K,

Kumisato A, Takahashi T, Takahashi T, Hirai

H. Expression of Noct ligand, Jagged1,

Jagged2 and Delta1 in antigen-presenting cells

in mice. Immunol Letter 81:59-64, 2002.

2. Shimizu K, Chiba S, Saito T, Takahashi T,

Kumano K, Hamada Y, Hirai H. Integrity of

intracellular domain of Notch ligand is

indispensable for cleavage required for release

of Notch2 intracellular domain. EMBO J

21:294-302, 2002.

3. Kumano K, Chiba S, Shimizu K, Yamagata

Y, Hosoya N, Saito T, Takahashi T, Hamada Y,

Hirai H. Notch1 inhibits differentiation of

hematopoietic cells by sustaining GATA-2

expression. Blood 98:3283-3289, 2001.

4. Shimizu K, Chiba S, Saito T, Kumano K,

Takahashi T, Hirai H. Manic fringe and lunatic

fringe modify different sites of the Notch2

extracellular region, resulting in different

signaling modulation. J Biol Chem 276:25753-

8, 2001.

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

## Smad による血管内皮細胞の増殖分化調節機構に関する研究

分担研究者 宮園 浩平 東京大学大学院医学系研究科・教授

共同研究者 渡部 徹郎 東京大学大学院医学系研究科・助手

**研究要旨** TGF- $\beta$ や骨形成因子（BMP）は血管内皮細胞に作用し、その増殖や分化を調節する。これらのレセプターである ALK-1 と BMR-II の異常はそれぞれ遺伝性出血性毛細血管拡張症（HHT）と原発性肺高血圧症（PPH）の原因となる。本研究ではこれらの因子のシグナル分子 Smad が血管内皮細胞の増殖や分化にどのような影響を与えるかを調べた。その結果、① ALK-1 によって特異的に発現誘導される遺伝子を DNA chip で検討し、Id ファミリーの転写因子や Eph-B4 などを同定した。また ALK-5 では claudin-5 の発現が低下した。② PPH の患者において同定された BMPR-II 変異体の全てが BMP シグナル伝達能を失っているわけではないこと、BMP シグナル伝達能を失った変異体が異常な細胞内局在によりシグナル伝達能が欠損していることを明らかにした。

### A. 研究目的

TGF- $\beta$ や骨形成因子（BMP）は血管内皮細胞に作用し、その増殖や分化を調節する。最近、これらの因子のレセプターである ALK-1 と BMR-II の異常がそれぞれ遺伝性出血性毛細血管拡張症と原発性肺高血圧症（PPH）の原因となることが明らかとなった。そこで我々は ALK-1 や TGF- $\beta$  type I receptor (ALK-5)によってどのような遺伝子が発現されるかを系統的に調べることによって、これらのシグナルの血管病変に与える影響を明らかにすることを目的に研究を行った。一方、血管系の発生において TGF- $\beta$ シグナルが重要な役割を果たすことは示されてきたが、そのスーパーファミリーメンバーである BMP の役割については不明な部分が

多い。PPH は肺動脈の過剰な細胞増殖を伴う原因不明の難治性疾患であるが、PPH の患者において BMP タイプ II 受容体(BMPR-II)遺伝子のさまざまな変異が同定された。我々は肺血管系の維持における BMP シグナルの役割を解明するため、どの BMPR-II 変異体が機能的に欠損しているか、どのような機構により BMPR-II 変異体はその機能を失うか、といった疑問の解明を試みた。

### B. 研究方法

① ヒト臍帯静脈由来血管内皮細胞(HUVEC)に ALK-1 や TGF- $\beta$  type I receptor (ALK-5)の恒常的活性型の遺伝子をアデノウイルスベクターに組み込んでこれらの遺伝子を発現させ、どのような遺伝子が発現される

かを DNA chip を用いて系統的に調べた。得られた遺伝子については Northern blotting などですらに詳細に解析した。

② 肺の血管内皮、平滑筋初代培養細胞における BMP シグナル因子の発現を RT-PCR 法により検討した。PPH の患者において同定された BMPR-II 変異体が R-mutant 細胞において BMP シグナルに応答するプロモーターを活性化できるか、COS-7 細胞において細胞内 BMP シグナル因子である Smad5 を活性化できるかを検討した。各種 BMPR-II 変異体の細胞内局在を免疫細胞染色により、タイプ I 受容体(ALK3)との結合を免疫沈降法により検討した。

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-1 は遺伝性出血性毛細血管拡張症の原因遺伝子の一つである。HUVEC に ALK-1 をそれぞれ発現させたところ、すでに報告した Smad6 や Smad7 などの抑制型 Smad や endoglin に加えて、Id ファミリーの転写因子、STAT1、Eph-B4 なども ALK-1 で誘導されることが明らかとなった。一方、ALK-5 では claudin-5 の発現の著明な抑制が見られ、タイトジャンクションの形成に TGF- $\beta$  が抑制的に作用することが示唆された。

② 肺の血管内皮、平滑筋初代培養細胞において TGF- $\beta$ /BMP シグナル因子 (リガンド、タイプ II 受容体、タイプ I 受容体、Smad) の発現が見い出された。PPH の患者において同

定された BMPR-II 変異体はその変異の領域によってタイプ E (細胞外リガンド結合領域)、タイプ K (細胞内キナーゼ領域)、タイプ T (細胞内カルボキシ末端領域) に分類される。タイプ E、K の変異体が p3TP プロモーターの活性化能、Smad5 のリン酸化能を失っていたのに対し、タイプ T の変異体はそれらの能力を保持していた。これらの結果より PPH の患者において同定された変異体の全てが BMP シグナル伝達能を失っているわけではないことが示唆された。COS-7 細胞において正常 BMPR-II とタイプ T の変異体が細胞膜上に局在して、分子量の大きな (翻訳後修飾を受けた) ALK3 と結合するのに対し、タイプ E、K の変異体は細胞質内に局在して分子量の小さな ALK3 と結合することが示された。これらの結果からタイプ E、K 変異体の BMP シグナル伝達能の欠損の機構の一部として異常な細胞内局在が示唆された。

### D. 考察

TGF- $\beta$  シグナルが血管の発生や構造維持に重要な役割を果たすことはその受容体である ALK-1 や endoglin の遺伝子異常が遺伝性出血性毛細血管拡張症の原因であることから示唆されていた。TGF- $\beta$  は ALK-5 を介して Smad2/3 を活性化し、細胞の増殖を抑制する。一方 TGF- $\beta$  は ALK-1 を介して BMP シグナルの伝達因子でもある Smad1/5/8 を活性化するが、血管における Smad1/5/8 経路の生理的意義については明らかとなっていなかった。本研究の結果によって、ALK-1 と ALK-5 の標的遺伝子

が明らかとなったことから、今後、これらのシグナルを調節する方策を検討するうえで極めて重要な情報となることと考えられる。

また、今回の研究で肺の血管細胞においては BMP シグナルが活性化されていること、PPH の患者において同定された BMPR-II 遺伝子の変異により生じた BMP シグナルの低下が血管を構成する細胞の過剰な増殖を引き起こすことが示唆されたことにより、血管において TGF- $\beta$ /BMP シグナルによる Smad1/5/8 経路の活性化が血管構造の恒常性を維持するために重要な役割を果たすことが示唆された。

#### E. 結論

本研究の結果によって ALK-1 や ALK-5 によって調節される標的遺伝子があらたにいくつか同定された。PPH の患者において同定された BMPR-II 遺伝子の変異の一部により生じた BMP シグナルの低下により PPH が発症するが、タイプ T の変異体を持つ PPH の患者においては BMP シグナルは保持されており、他の遺伝的・環境的要因が PPH の発症に寄与していることが示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

(1) Furuhashi, M., Yagi, K., Yamamoto, H., Furukawa, Y., Shimada, S., Nakamura, Y., Kikuchi, A., Miyazono, K., and Kato, M. (2001) Axin facilitates Smad3 activation in the transforming growth factor- $\beta$  signaling pathway. *Mol. Cell. Biol.* 21(15), 5132-5141.

(2) Hanyu, A., Ishidou, Y., Ebisawa, T., Shimanuki, T., Imamura, T., and Miyazono, K. (2001) The N-domain of Smad7 is essential for specific inhibition

of transforming growth factor- $\beta$  signaling. *J. Cell Biol.* 155(6), 1017-1028.

(3) Yagi, K., Furuhashi, M., Aoki, H., Goto, D., Kuwano, H., Sugamura, K., Miyazono, K., and Kato, M. (2002) c-myc is a downstream target of Smad pathway. *J. Biol. Chem.* 277 (1): 854-861.

#### G. 知的所有権の取得状況

特になし