

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患克服研究事業)）
難治性血管腫・血管奇形についての調査研究班患者実態調査および治療法の研究

分担研究報告書

静脈奇形の原因であるTie2受容体の機能解析

研究分担者氏名 高倉伸幸 所属研究機関名 大阪大学微生物病研究所 職名 教授

研究要旨

血管内皮細胞に発現するレセプター型チロシンキナーゼTie2の恒常的活性化(CA-Tie2)は遺伝性静脈奇形の多くの患者で観察される先天性遺伝子異常である。本研究では、このTie2の恒常的活性化が静脈奇形の原因として正しいのかをマウスモデルを用いて実証を試みた。タモキシフェンによりVE-Cadherinプロモーター制御下にCreを発現するTgマウスとFlox-CA-Tie2—Tgマウスを交配させ、出生後にTie2を恒常的に活性化できるシステムを構築した。本マウスを用い、血管新生刺激が入った際にTie2が恒常的活性化していると血管奇形を呈する可能性が示唆されてきた。本マウスを用いることで、どのような理由で静脈奇形が頭頸部に集中するのか、そして静脈奇形に有効な治療法が解析できると考えられる。

A．研究目的

血管内皮細胞に発現しているレセプター型チロシンキナーゼTie2の点突然変異によるTie2恒常的活性化(CA-Tie2)が静脈奇形の患者の多くに観察される。しかし、この遺伝子変異が本当に静脈奇形の原因なのか、もし原因であればどのような機序で血管奇形を呈するのかは不明のままである。本研究では、マウスの血管内皮細胞に恒常的活性化型Tie2を特異的に発現させることで静脈奇形を呈するモデルマウスを作製することを目的とする。

B．研究方法

CAGプロモーター制御下にFlox-CAT-polyA-Flox-CA-Tie2 (Flox-CA-Tie2) を発現するトランスジェニック (Tg) マウスとTie2プロモーター制御下にCreを発現するTgマウスの交配による、内皮細胞に胎児期からCA-Tie2を発現するモデルマウスでは、脳内の異常血管部位からの出血で、生後2週ほどで致死となる為、詳細な病態解明には適さなかつた。そこで、タモキシフェンによりVE-

Cadherinプロモーター制御下にCreを発現するTgマウスとFlox-CA-Tie2—Tgマウスを交配させ、出生後にTie2を恒常的に活性化できるシステムを構築した。

(倫理面への配慮)

遺伝子組換えや実験動物に関しては、大阪大学の規定する種々の委員会において承認を受けた上で、研究を実施した。

C．研究結果

上記したシステムを用い、出生後8週の成体マウスにおいてCA-Tie2を発現させたところ、特に血管異常を来すことはなかった。そこで、本マウスの腹部皮下にvascular endothelial growth factor (VEGF; 血管内皮成長因子)を混和したマトリゲルを移植したところ、マトリゲル内に形成された血管では、管腔径が野生型マウスのもより拡張し、蛇行した血管が誘導され、静脈奇形の血管に類似することが判明した。また、血管新生が個体で生じている、出生後まもないマウスにおいてCA-Tie2を発現させても、

皮下において拡張して、走行性の無秩序な血管が誘導された。

D . 考察

静止期の安定した血管においてTie2が恒常的に活性化したとしても、静脈奇形が誘導されるわけではないことが判明した。遺伝子異常としてTie2の恒常的活性化をベースに有する状態で、そこに血管新生刺激が加わった際に始めて静脈奇形が誘導されることが判明した。しかし、ヒトの遺伝性静脈奇形の原因と考えられているCA-Tie2変異を有する患者では、血管奇形が頭頸部に集中していることと、今回血管新生刺激が入ることの因果関係は不明である。ただし、内皮細胞に恒常的活性化Tie2を発現させた場合、Tie2の下流でERKかAKTの選択的活性化が誘導されていることが判明してきた。AKTは内皮細胞では細胞死の抑制あるいは内皮細胞同士の接着による血管の安定化に寄与し、ERKの活性化は細胞運動の亢進により、血管新生を促進するシグナルとして機能する。つまり、Tie2の下流においてAKTではなくERKを優先的に活性化させる第2のシグナルが存在することで、血管奇形が誘導される可能性が考えられた。

E . 結論

レセプター型チロシンキナーゼTie2の点突然変異によるTie2恒常的活性化をマウスに発現させることで、静脈奇形のモデルが形成された。つまりこの遺伝子変異が本当に静脈奇形の原因であることが証明されたと考えられる。

F . 研究発表

1 . 論文発表

1. Kinugasa Y, Matsui T, Takakura N. CD44 expressed on CAFs is a functional molecule supporting the stemness and drug resistance of malignant cancer cells in the tumor microenvironment. *Stem Cells* 32; 145-156, 2014
2. Wakabayashi T, Naito H, Takara K, Kidoya H, Sakimoto S, Oshima Y, Nishida K, Takakura N. Identification of vascular endothelial side population cells in the choroidal vessels and their potential role in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54; 6686-6693, 2013
3. Kawahara H, Naito H, Takara K, Wakabayashi T, Kidoya H, Takakura N. Tumor endothelial cell-specific drug delivery system using apelin-conjugated liposomes. *PLoS One* 8:e65499, 2013
4. Yamakawa D, Kidoya H, Sakimoto S, Jia W, Naito H, Takakura N. Ligand-independent Tie2 dimers mediate kinase activity stimulated by high dose Angiopoietin-1. *J Biol Chem* 288; 12469-12477, 2013
5. Jia W, Kidoya H, Yamakawa D, Naito H, and Takakura N. Galectin-3 accelerates M2 macrophage infiltration and angiogenesis in tumors. *Am J Pathol* 182; 1821-1831, 2013
6. Matsui T, Kinugasa Y, Tahara H, Kanakura Y, Takakura N. Possible role of mural cell covered mature blood vessels in inducing drug resistance in cancer-initiating cells. *Am J Pathol* 182; 1790-1799, 2013
7. Sakimoto S, Kidoya H, Kamei M, Naito N, Yamakawa, Sakaguchi H, Wakabayashi T, Nishida K, and Takakura N. An angiogenic role for adrenomedullin in choroidal neovascularization. *PLoS One* 8: e58096, 2013
8. Sawane M, Kajiya K, Kidoya H, Takagi M, Muramatsu F, Takakura N. Apelin inhibits diet-induced obesity by enhancing lymphatic and blood vessel integrity. *Diabetes* 62; 1970-1980, 2013
9. Satoh T, Kidoya H, Naito H, Yamamoto M, Takemura N, Nakagawa K, Yoshioka Y, Morii E, Takakura N, Takeuchi O, Akira S. Critical role of Trib1 in differentiation of tissue-resident M2-like macrophages. *Nature* 495:524-528, 2013
10. Muramatsu F, Kidoya H, Naito H, Sakimoto S, Takakura N. microRNA-125b inhibits tube formation of blood vessels through translational suppression of VE-cadherin. *Oncogene* 32:414-421, 2013
11. Maruyama K, Fukasaka M, Vandenbon A, Saitoh T, Kawasaki T, Kondo T, Yokoyama

- KK, Kidoya H, Takakura N, Standley D, Takeuchi O, Akira S. The Transcription Factor Jdp2 Controls Bone Homeostasis and Antibacterial Immunity by Regulating Osteoclast and Neutrophil Differentiation. *Immunity* 37: 1024-1036, 2012
12. Yoshioka K, Yoshida K, Cui H, Wakayama T, Takuwa N, Okamoto Y, Du W, Qi X, Asanuma K, Sugihara K, Aki S, Miyazawa H, Biswas K, Nagakura C, Ueno M, Iseki S, Schwartz RJ, Okamoto H, Sasaki T, Matsui O, Asano M, Adams RH, Takakura N, Takuwa Y. Endothelial PI3K-C2 α , a class II PI3K, has an essential role in angiogenesis and vascular barrier function. *Nat Med* 18: 1560-1569, 2012
13. Kidoya H, Kunii N, Naito H, Muramatsu F, Okamoto Y, Nakayama T, Takakura N. The apelin/APJ system induces maturation of the tumor vasculature and improves the efficiency of immune therapy. *Oncogene* 31: 3254-3264, 2012
14. Sakimoto S, Kidoya H, Naito H, Kamei M, Sakaguchi H, Goda N, Fukamizu A, Nishida K, Takakura N. A role for endothelial cells in promoting the maturation of astrocytes through the apelin/APJ system in mice. *Development* 139: 1327-1335, 2012
15. Kajiya K, Kidoya H, Sawane M, Matsumoto-Okazaki Y, Yamanishi H, Furuse M, Takakura N. Promotion of Lymphatic Integrity by Angiopoietin-1/Tie2 Signaling during Inflammation. *Am J Pathol* 180, 1273-1282, 2012
- 2 . 学会発表
該当なし
- G . 知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）**
- 1 特許取得
該当なし
- 2 実用新案登録
該当なし
- 3 その他
該当なし