

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 20 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500488

研究課題名(和文)新規血管新生関連遺伝子の個体解析

研究課題名(英文)Analysis of physiological functions of novel endothelial-enriched genes

研究代表者

依馬 正次 (Ema, Masatsugu)

滋賀医科大学・動物生命科学研究センター・教授

研究者番号：60359578

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円、(間接経費) 1,140,000円

研究成果の概要(和文)：新規Rho関連遺伝子であるRhoJノックアウトマウスを樹立したところ、野生型と比較してノックアウトマウスにおいて血管新生が遅れが認められた。基底膜と細胞体を染色する実験から、動脈の一部で退縮が認められたため、RhoJが血管構造の安定化に寄与していることが示された。

Flk1プロモーターの制御によりGFPを発現し、Flt1プロモーターの制御によりtdsRedを発現するダブルトランスジェニックマウスを用いてイメージングを行った結果、Flk1-GFPはTip細胞や微小血管に優位に発現する一方で、Flt1-tdsRedは中・大動脈内皮細胞に優位に発現する傾向があることが分かった。

研究成果の概要(英文)： Blood vessels are therapeutic targets for cancer, ischemic diseases and diabetes-related diseases. Therefore, understanding the process of angiogenesis is important for not only intellectual but potentially development of medicine for such diseases. A novel Rho-related gene, RhoJ was investigated for its physiological function by knocking out. The RhoJ KO exhibited retarded angiogenesis in the retina. Since the retina showed empty sleeves, regression seems to be one of causes for the retarded angiogenesis.

Flk1-GFP :: Flt1-tdsRed BAC Tg mice were created to monitor the endogenous expression of Flk1 and Flt1. Based on the expression of Flk1-GFP and Flt1-tdsRed, Flk1 and Flt1 are expressed in micro capillaries and mid/major endothelial cells, respectively.

研究分野：実験動物学

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：血管新生

### 1. 研究開始当初の背景

現在、高齢化の進む日本での死因の第1位は癌である。癌の治療法として、癌を栄養する血管系を標的とした腫瘍血管抑制法が有効な治療法として注目を集め、腫瘍血管を標的とする最初の分子薬剤であるベバシツマブ(組換え型抗 VEGF 抗体)が、大腸癌に対する治療薬として我が国に於いても臨床使用されている。また、日本人の死因の2位は心臓疾患、3位は脳虚血性疾患であるが、その治療には、虚血部位での速やかな血管系の新生や再構築を誘導する方法が求められている。さらに、糖尿病性網膜症においては、新生血管系を退縮させることが治療法となるのに対して、糖尿病性下肢大動脈閉塞症においては、虚血部位における新たな血管新生が求められる。これらの疾患の治療法に共通して見られるのは、如何にして血管新生を促進または抑制するかという点である。このように血管系は、がん治療、虚血性疾患、さらには糖尿病の合併症においても最も重要な治療ターゲットの一つであり、血管の新生と抑制のバランスの分子基盤を理解することは、学問的に価値あるばかりでなく、それらの疾患に対する新たな分子薬剤の創出に繋がるものであり、医学的にも産業的にも大変価値が高いと考えられる。しかしながら、血管新生のメカニズムは未だ不明なところが多く残されている。その原因として、血管内皮細胞で発現している遺伝子についての個体レベルでの機能についての理解が不十分であることと、血管新生を可視化する適切なモデルマウスが少ないことが挙げられる。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、血管内皮細胞に高発現していることが申請者らの先行研究で判明している新規 Rho 関連遺伝子 (RhoJ) の個体レベルでの機能解析を行うとともに、血管新生を可視化するモデルマウスを作製し、他の研究者が使用できるリソースとすることを目的として研究を行うものである。

### 3. 研究の方法

血管新生のメカニズムは未だ不明なところが多く残されている。その原因として、血管内皮細胞で発現している遺伝子につ

いての機能が不十分に理解されていることと、血管新生を可視化する適切なモデルマウスが無いことが挙げられる。そこで申請者らの先行研究で血管内皮細胞に高発現していることが示されている新規 Rho 関連遺伝子(RhoJ)の生理機能を、ノックアウトマウスを作製することで解明する。一方、新規の血管新生可視化モデルマウスを作製し、がん・心臓疾患・脳虚血性疾患などの血管関連疾患を研究する研究者のための疾患モデルリソースとすることが本研究の目的である。

### 4. 研究成果

#### 1) 研究項目 1: 新規遺伝子群の血管新生における役割

新規 Rho 関連遺伝子である RhoJ ヘテロマウス同士を交配し、ノックアウトマウスを樹立したところ、生存可能であることが分かった。生後5日目の網膜血管新生について評価した所、野生型と比較してノックアウトマウスにおいて血管新生に遅れが認められた。Tip 細胞の数には有意差は認められなかった。さらに発生が進むと、動静脈の分岐数が低下していることも PECAM1 および SMA を用いた抗体染色実験から分かった。基底膜と細胞体を染色する実験から、動脈の一部で退縮が認められたため、RhoJ が血管構造の安定化に寄与していることが示された。

#### 2) 研究項目 2: 血管新生可視化マウスの樹立

Flk1 プロモーターの制御により GFP を発現し、Flt1 プロモーターの制御により tdsRed を発現するダブルトランスジェニックマウスを用いて、胎子や新生児 Retina、成獣腫瘍血管新生時の組織(あるいは全胚)を用いて、既存血管内皮細胞や Tip cell のイメージングを行った結果、Flk1-GFP は Tip 細胞や微小血管に優位に発現する一方で、Flt1-tdsRed は中・大動脈内皮細胞に優位に発現する傾向があることが分かった。また、各臓器における発現も評価した所、臓器によって、このような傾向にも差が認められることも分かった。臓器ごとの血管新生のイメージング研究に有用であることが示された。

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 8 件)

1. Kudo T, Sato T, Hagiwara K, Kozuma Y, Yamaguchi T, Ikehara Y, Hamada M, Matsumoto K, Emma M, Murata S, Ohkohchi N, Narimatsu H, Takahashi S. Clgalt1-deficient mice exhibit thrombocytopenia due to abnormal terminal differentiation of megakaryocytes. *Blood*. 122:1649-1657. (2013) (査読有)
2. Lebrun C., Avci HX., Wehrle R., Doulazmi M., Jaudon F., Morel MP., Rivals I., Emma M., Schmidt S., Sotelo C., Vodjdani G., Dusart I. Klf9 is necessary and sufficient for Purkinje cell survival in organotypic culture. *Mol Cell Neurosci*. 54:9-21. (2013) (査読有)
3. Katsumata T, Oishi H, Sekiguchi Y, Nagasaki H, Daassi D, Tai PH, Emma M, Kudo T, Takahashi S. Bioluminescence imaging of  $\beta$  cells and intrahepatic insulin gene activity under normal and pathological conditions. *PLoS One*. 8:e60411. (2013) (査読有)
4. Oishi H, Itoh S, Matsumoto K, Ishitobi H, Suzuki R, Emma M, Kojima T, Uchida K, Kato M, Miyata T, Takahashi S, Delayed cutaneous wound healing in Fam129b/Minerva-deficient mice. *J. Biochem*. 152:549-555. (2012) (査読有)
5. Sano K., Katsuta O., Shirae S., Kubota Y., Emma M., Suda T., Nakamura M., Hirashima M. Flt1 and Flk1 mediate regulation of intraocular pressure and their double heterozygosity causes the buphthalmia in mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 420:422-427 (2012) (査読有)
6. Avci HX., Lebrun C., Wehrle R., Doulazmi M., Chatonnet F., Morel MP., Emma M., Vodjdani G., Sotelo C., Flamant F., Dusart I. Thyroid hormone triggers the developmental

loss of axonal regenerative capacity via thyroid hormone receptor  $\alpha 1$  and kruppel-like factor 9 in Purkinje cells.

*Proc Natl Acad Sci U S A*.

109:14206-14211 (2012) (査読有)

7. Takase H., Matsumoto K., Yamadera R., Kubota Y., Otsu A., Suzuki R., Ishitobi H., Mochizuki H., Kojima T., Takano S., Uchida K., Takahashi S., Emma M. Genome-wide identification of endothelial cell-enriched genes in the mouse embryo. *Blood* 120:914-923. (cover に採用された) (査読有)
8. Matsumoto K., Azami T., Otsu A., Takase H., Ishitobi H., Tanaka J., Miwa Y., Takahashi S., Emma M. Study of normal and pathological blood vessel morphogenesis in Flt1-tdsRed BAC Tg mice. *Genesis*. 50:561-571. (2012) (cover に採用された) (査読有)

[学会発表] (計 7 件)

1. Masatsugu Emma, Ayaka Otsu, Takuya Azami, Masanori Hirashima、Kazuko Koshiba-Takeuchi、Jun Takeuchi、Masabumi Shibuya, Janet Rossant, Satoru Takahashi, Tomomi Nishie Origin of cardiovascular cells and heart development controlled by VEGF-Flk1 signaling 第91回生理学会大会、シンポジウム講演、2014年、鹿児島
2. 西江 友美、大津 彩香、平島 正則、小柴 和子、竹内 純、渋谷 正史、Janet Rossant、高橋 智、依馬 正次、VEGF-Flk1による心臓発生のメカニズム、第36回分子生物学会年会、ポスター発表、2013年、神戸
3. 依馬 正次、心血管系細胞の起源と血管による心臓発生制御、第36回分子生物学会年会(ワークショップ)オーガナイザー、講演、2013年、神戸
4. 依馬 正次、血管内皮細胞関連遺伝子の網羅的探索による血管形成機序の解明、第21回日本血管生物医学学会学術集会、2013年、大阪
5. Masatsugu Emma, Genome-wide identification of angiogenesis-related

genes in the mouse embryo. 第21回日本血管生物医学会学術集会、2012年、徳島

6. 松本 健、高瀬 春華、山寺 里枝、大津 彩香、石飛 博之、小島 崇宏、内田 和彦、高橋 智、依馬 正次、新規血管内皮細胞特異的遺伝子群の網羅的探索、第34回分子生物学会年会、2011年、横浜
7. 高瀬 春華、松本 健、山寺 里枝、大津 彩香、石飛 博之、小島 崇宏、内田 和彦、高橋 智、依馬 正次、新規血管内皮細胞特異的遺伝子群の網羅的探索、第34回分子生物学会年会、2011年、横浜

〔図書〕（計1件）

依馬 正次、吉原 雅大「発生期における血管形成制御因子の網羅的探索」、メディカルレビュー社、2013年12月号

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

依馬 正次 (EMA MASATSUGU)  
滋賀医科大学・動物生命科学センター・教授  
研究者番号：60359578

### (2)研究分担者

高橋 智 (TAKAHASHI SATORU)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号：50271896

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：