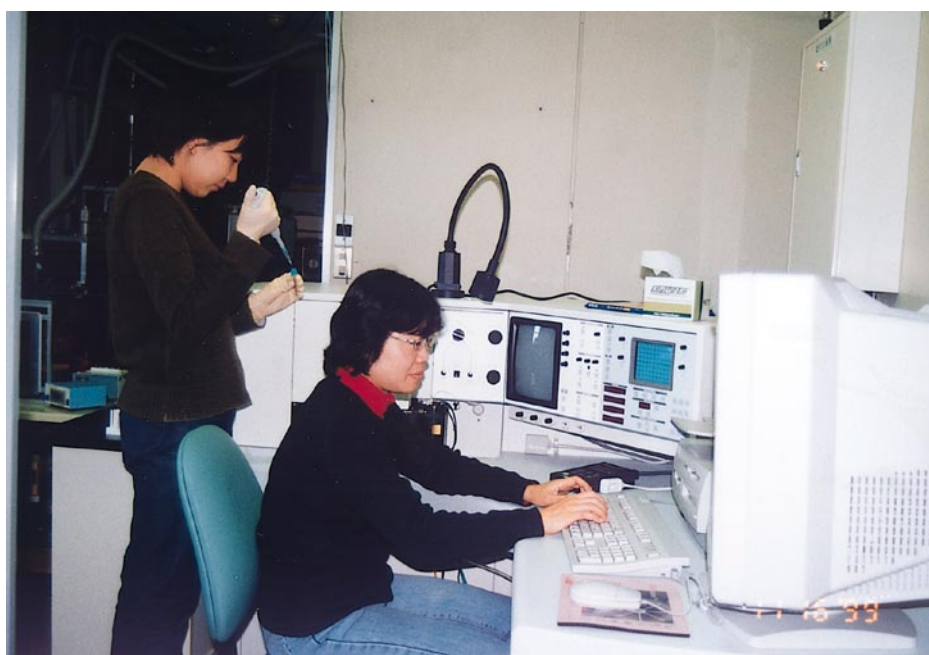


Isolation and characterization of genes involved in endothelial cell differentiation and angiogenesis

血管内皮細胞の分化と血管新生に関わる 遺伝子群の同定とその機能解析

プロジェクトリーダー 佐 藤 靖 史

東北大学 加齢医学研究所 教授



1. 研究の目的

血管は、全ての臓器に分布し、その機能を維持する必須の構造であることから、血管形成の分子機序の解明は、あらゆる臓器の発生に関わる重要な情報を与えると期待される。また、成熟個体における血管新生は、癌、糖尿病性網膜症をはじめとした失明に至る多くの眼科的疾患、関節リウマチ、粥状動脈硬化などさまざまな疾患の進展と密接に関連することから、抗血管新生療法の臨床導入が計画されている。一方、狭心症・心筋梗塞や閉塞性動脈硬化症などの虚血性疾患においては、血管を再生して虚血部位をサルベージする治療法の開発が期待されている。

中胚葉系の血球血管芽細胞や血管芽細胞に由来する血管内皮細胞は、脈管形成と血管新生とによって全身の血管系を構築する。これらの過程において、血管内皮細胞に作用して血管形成を調節する因子群と、血管内皮細胞に発現する受容体についての解析は進められているが、それら因子が作用した際、血管内皮細胞にどのような遺伝子の発現を誘導して血管形成を調節しているのかということについては不明な点が多い。本研究は、脈管形成や血管新生の過程で血管内皮細胞に発現する遺伝子群を解析し、それら遺伝子産物の機能を解析することで血管形成の分子メカニズムを明らかにすることを目的としている。さらに、本研究は、血管新生制御や血管再生を目標とする新規治療法の開発するための基盤研究として極めて重要な意義を有しているものと考えている。



2. 研究の内容

血管新生はさまざまな因子によって調節されているが、中でも VEGF (vascular endothelial growth factor) は、血管内皮細胞に選択的に作用し、血管新生を促進する主要な因子として知られている。ところが、VEGF が血管内皮細胞に作用した際、どのような標的遺伝子群の誘導を介して血管新生を調節しているかについては断片的な情報しかなく、その作用の全貌は明らかとなっていない。

(1) VEGF によって血管内皮細胞に誘導される遺伝子群の同定と機能解析

ゲノムプロジェクトによって従来全く知られていなかった数多くの遺伝子の存在が提示され、生物学上のあらゆる問題に対して、包括的で偏見に捕らわれない新たな解析法の必要性が指摘されている。そのような背景から、本研究はマイクロアレー法を用いて VEGF の刺激によって血管内皮細胞に誘導される遺伝子群の発現パターンを包括的に解析し、さらに血管内皮細胞の分化と血管新生に関して従来全く知られていない遺伝子の同定とその機能を明らかにすることを計画した。ヒト臍帯静脈内皮細胞を VEGF で刺激して、変動する遺伝子の発現を DNA チップを用いて解析した。約 7000 個の遺伝子について発現変動をモニターしたところ、約 150 個の遺伝子の発現が 2 倍以上に増加、約 200 個の遺伝子が 2 分の 1 以下に減少した。そこで 2 倍以上に増加した遺伝子群の中で、転写因子か、あるいはそれに類する構造を有するものを選出した。現在、それらの中でも、特に発現増加の著しかった DSCR1 (Down syndrome critical region 1) に注目して解析を進めている。DSCR1 遺伝子は 21q22.1-22.2 にコードされ、7 つのエキソンから成り、その遺伝子産物は DNA 結合ドメイン様の構造を持つが、機能は全く不明である。本遺伝子の transcript には variant が存在することが知られているが、エキソン 4、5、6、7 の transcript が VEGF によって誘導される血管内皮細胞特異的なものであることが判明した。そこで、本遺伝子の培養ヒト血管内皮細胞における機能解析を行うと共に、mouse DSCR1 homolog をクローニングし、マウスの個体レベルでの解析を進める。

(2) 血管内皮細胞の分化の伴って発現する新規アミノペプチダーゼの機能解析

マウス ES 細胞から試験管内において血管内皮細胞への分化をモニターする細胞培養系が確立された。そこで血球血管芽細胞と血管内皮細胞の 2 つの population をソーティングし、これら 2 つの population に発現している遺伝子群をサブトラクトすることによって、血管内皮細胞の分化に伴って発現する複数のクローンを得た。さらに、それらの中から VEGF 刺激によって血管内皮細胞での遺伝子発現が誘導されるものとして新規アミノペプチダーゼに分類される遺伝子を同定した。この新規アミノペプチダーゼの発現を免疫染色で解析した結果、in vivo における血管新生部位の血管内皮細胞に発現していることが確認された。また、培養系においてその発現を特異的に阻害すると、血管内皮細胞の血管新生能が有意に障害されることが明らかとなった。以上のことから、この新規アミノペプチダーゼは血管新生において必要であることが示された。今後は、血管新生における機能の詳細を解明するとともに、ES 細胞を用いた試験管内における解析やマウスの個体レベルでの解析から、血管内皮細胞の分化における意義についても解析を進める。

3. 研究の体制

期 間：1999 年 8 月～2004 年 3 月

構 成：プロジェクトリーダー：佐藤靖史（東北大学加齢医学研究所・腫瘍循環研究分野・教授）コアメンバー：3 名、研究協力者：9 名、研究分担者：小川峰太郎（京都大学大学院医学研究科・遺伝医学講座分子遺伝学・助手）

実施場所：東北大学加齢医学研究所 仙台市青葉区星陵町 4-1

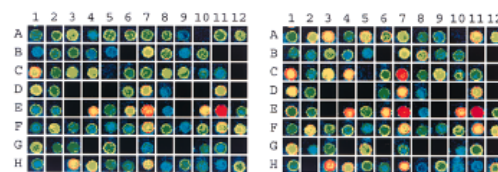


図 1

DNA チップによる解析の結果、C7 にプロットされている DSCR1 の発現が VEGF 刺激前 (左) に比較して、刺激後 2 時間 (右) で著明に増加していることが判明した。

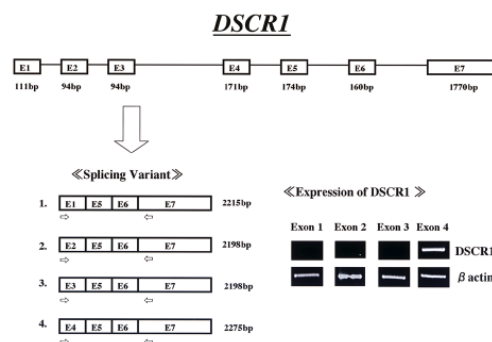


図 2

DSCR1 のヒト血管内皮細胞における発現様式を RT-PCR で検討した結果、ヒト血管内皮細胞は E4,5,6,7 の transcript のみを発現していることが判明した。

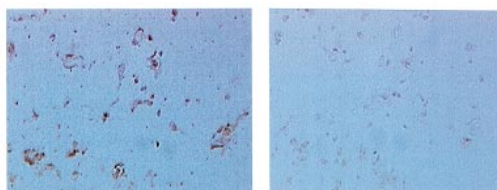


図 3

我々が同定した新規アミノペプチダーゼの血管新生部位における局在を免疫染色で検討したところ、血管新生部位の内皮細胞に一致して局在していることが示された (左)。右は同部位の preimmune serum による免疫染色像である。