

平成 22 年 5 月 17 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790536

研究課題名（和文）心血管系の PHD2 を標的とした血管新生誘導の試みと治療への応用

研究課題名（英文）Novel strategy with cardiovascular PHD2-targeted angiogenesis

研究代表者

武田宏太郎（TAKEDA KOTARO）

九州大学・医学研究院・客員助教

研究者番号：50467908

研究成果の概要（和文）：

我が国において、動脈硬化を背景とする虚血性心疾患や脳梗塞などは主な成人の死因であり、その機序の解明や治療法の確立が急がれる。生体は低酸素状態に反応して血管新生や造血を誘導する低酸素応答系を有している。酸素センサーである Prolyl hydroxylase (PHD)2 は酸素濃度を認識する分子で、低酸素誘導性転写因子 Hypoxia inducible factor (HIF) を負に調節する。低酸素応答系は血管新生、炎症、造血など多面的な調節作用を有するため、これらを調節することで治療として用いることができないかが着目されている。本研究では、低酸素感知システムを修飾することで、心血管系の血管新生の誘導、炎症抑制、レニン・アンジオテンシン系の抑制など心血管保護的に作用する可能性について、遺伝子組み換えマウスや培養細胞を用いて検討した。血管内皮特異的、血管平滑筋特異的ないし心筋細胞特異的 PHD2 欠損マウスを作成し、血管新生が誘導されるかを、全身性 PHD2 欠損マウスと比較検討した。これらのマウスでは血管新生は誘導されなかった。一方、全身性 PHD2 欠損は心臓の血管新生を誘導した。よって、血管新生誘導には全身性因子の関与が示唆された。PHD 阻害剤処置により、マクロファージの炎症反応が抑制され、血管平滑筋細胞のアンジオテンシン II 1 型受容体の発現が抑制された。これらの結果より、PHD2 は血管新生、炎症、レニン・アンジオテンシン系に多面的な影響を与え、心血管保護的に作用する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Ischemic diseases such as heart attack and stroke are important cause of death in the developed countries including Japan. Therefore, it is an urgent need to find the clue for the diseases and to establish the novel treatment strategy. Our body has a sophisticated system to adapt hypoxic/ischemic condition by inducing angiogenesis and erythrocytosis. Prolyl hydroxylase (PHD)2 is a key sensor for oxygen concentration and a negative regulator for hypoxia inducible factor (HIF) expression. This oxygen sensing system play a key role to adapt hypoxic/ischemic insults, thus modification of the system has gained an attention as a potential strategy. In this project, we studied that the modification of hypoxia pathway could be serve as a cardioprotective way by regulating angiogenesis, inflammation and renin-angiotensin system. We have developed endothelial cell-specific, vascular smooth muscle cell-specific, and cardiomyocyte-specific PHD2 knockout mice. While we did not find any significant angiogenic response in these mice, systemic PHD2 knockout mice did show significant angiogenesis, suggesting that some systemic factors mediate to induce angiogenesis. PHD inhibitors treatment suppresses acute inflammatory responses in cultured macrophages. PHD inhibitors also suppressed angiotensin II type 1 receptor expression in cultured vascular smooth muscle cells. Collectively, PHD2 regulates angiogenesis, inflammation and renin-angiotensin system, and hence has a great potential for the treatment of cardiovascular diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学 循環器内科学

キーワード：分子血管病態学

### 1. 研究開始当初の背景

我が国において、動脈硬化を背景とする虚血性心疾患や脳梗塞などは主な成人の死因であり、その機序の解明や治療法の確立が急がれる。既存の血管から新しい血管を形成していく血管新生を促進することは虚血性疾患の治療法として、広く検討されている。すでに血管新生因子局所投与や骨髄細胞移植が行われているが、治療効果や対費用効果など解決すべき点が多い。

生体は低酸素状態に反応して血管新生や造血を誘導する低酸素応答系を有しており、それを標的として用いる方法が注目されてきている。酸素センサーPHD2は酸素濃度を認識する分子で、低酸素誘導性転写因子HIFを負に調節する。

本申請者は全身性PHD2コンディショナル欠損マウスにおいて血管新生が生じることを明らかとした(Circulation 2007;116:774)。よって、PHD2を抑制することで低酸素応答系を活性化し血管新生を誘導できることがわかる。しかし、このマウスでは血管新生と同時に多血が生じるため、標的部位局所のみでのPHD2抑制し、血管新生のみを誘導する必要がある。

さらには低酸素応答系は血管新生のみならず、代謝、炎症、レニン・アンジオテンシン系などにも影響を与える可能性が示唆されており、低酸素応答系が今後重要な治療標的の一つになり得る可能性が期待されていた。

### 2. 研究の目的

PHD2抑制を心血管病の治療に応用することを長期目標とした上で、本研究はPHD2の心血管系における役割、とくに心血管局所におけるPHD2欠損により、血管新生を特異的に誘導できないかを検討した。Cre-loxP機構による遺伝子組み換えシステムを利用し

た血管内皮ないし平滑筋細胞特異的PHD2欠損マウスを作成した。また、PHDの炎症、レニン・アンジオテンシン系に対する効果にも焦点を当て研究を行った。

#### (1) 血管におけるPHD2の役割の検討

我々の予備実験で肝細胞や皮膚角質細胞特異的PHD2を欠損させても、肝臓や皮膚に血管新生が誘導されなかったことを踏まえ、我々はその原因は「血管自体のPHD2が正常に存在するため血管新生がおこらない」という仮説を立てた。よって、血管のPHD2を抑制するため、内皮細胞特異的PHD2欠損マウス、血管平滑筋細胞特異的PHD2欠損マウスを作成し、血管新生が誘導されるかを検討した。

#### (2) PHD2欠損の虚血病変改善効果の検討

これまでの研究で、血管新生が心筋虚血を改善する可能性が示されている。全身性PHD2欠損により血管新生が誘導されるため、このマウスモデルを用いて心筋梗塞作成し、心筋梗塞サイズが縮小するかを検討した。

#### (3) 心筋細胞におけるPHD2の役割の検討

心筋細胞自体におけるPHD2の役割を調べるため、心筋細胞特異的PHD2欠損マウスを作成し、心臓における低酸素シグナル分子の発現を検討した。心機能や血管新生に対する効果を検討した。

#### (4) PHD2阻害剤の炎症への効果の検討

炎症は心血管病進展の重要な原因であるため、炎症を調節することは大きな治療的意義がある。そこで、我々はマクロファージを用いて、in vitroでPHD2阻害剤を投与して、炎症を抑制する効果があるかを検討した。

#### (5) PHD2阻害剤のレニン・アンジオテンシン系への影響の検討

心血管病進展に重要な役割を果たすレニン・アンジオテンシン系に与える影響を検討した。培養血管平滑筋細胞を用いて、アンジオテンシ

ン II 1 型受容体の発現を評価した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 血管における PHD2 の役割の検討

血管特異的に PHD2 を欠損させるため、Tie2Cre マウスを用いて内皮細胞特異的 PHD2 欠損マウス、次に SM22Cre マウスを用いて血管平滑筋細胞特異的 PHD2 欠損マウスを作成した。心臓、肝臓、肺、腎臓など主要臓器を回収し、血管内皮特異的免疫染色 (CD31 染色) により、血管新生が認められるかを検討した。

#### (2) PHD2 欠損の虚血病変改善効果の検討

全身性 PHD2 コンディショナル欠損マウスを用いた。タモキシフェン投与後 1 週間で冠動脈結紮による急性心筋梗塞を作成した。梗塞後 1 週間後に安楽死せしめ、心臓を回収し、マッソントリクローム染色を行い梗塞範囲を定量評価した。

#### (3) 心筋細胞における PHD2 の役割の検討

心筋細胞特異的 Myh6Cre/Esr1 マウスを用いて、心筋細胞特異的 PHD2 欠損マウスを作成した。この Cre には不活性型エストロゲン受容体と融合させてあり、タモキシフェン投与にて初めて Cre が活性化する誘導型ノックアウトマウスである。このマウスの心臓を用いて、HE 染色により心臓の形態学的評価、心臓超音波により左室駆出率など心機能の評価、RNA を回収し HIF 標的遺伝子の発現レベルを検討した。

#### (4) PHD 欠損による炎症への効果の検討

培養マクロファージ RAW264.7 細胞を用いて、リポ多糖で刺激し、代表的炎症性サイトカイン腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) の発現レベルをリアルタイム PCR や ELISA を用いて評価した。PHD 阻害剤は dimethylallyl glycine (DMOG) や塩化コバルトを用いた。shRNA による PHD1, PHD2 ノックダウン細胞を作成した。

(5) PHD 阻害剤のレニン・アンジオテンシン系への影響の検討

ラット大動脈由来の血管平滑筋細胞を用いて、PHD 阻害剤のアンジオテンシン II 1 型受容体の発現への効果をノーザンブロットやウエスタンブロットにて評価した。PHD 阻害剤は塩化コバルトおよび DMOG を用いた。AngII 持続注入マウスモデルを用いて、塩化コバルトの心筋細胞間質の線維化抑制効果について検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 血管における PHD2 の役割の検討

内皮細胞特異的 PHD2 欠損マウスの心臓、肝臓、腎臓など重要臓器を HE 染色で観察、また血管内皮特異的 CD31 染色を行ったが、血管新生は認められなかった。次に、血管平滑筋細胞特異的 PHD2 欠損マウスの心臓、肝臓など重要臓器を PECAM 染色したが、こちらも血管新生は認められなかった。我々の仮

説である、「血管自体の PHD2 が正常に存在するため血管新生がおこらない」は立証されず、血管の PHD2 を局所的に欠損させるだけでは、血管新生を誘導することはできないことが明らかとなった。一方、全身性 PHD2 欠損マウスは血管新生が誘導されることより、この差異は局所の因子以外に何らかの全身的な因子が関与していること強く示唆された。

#### (2) PHD2 欠損の虚血病変改善効果の検討

全身性 PHD2 欠損マウスを用いて急性心筋梗塞モデルを作成した。全身性 PHD2 欠損マウスは血管新生以外に多血を誘導するため、多血が明らかとなる前に冠動脈結紮による心筋梗塞を作成し、1 週間後に安楽死せしめ、心筋梗塞サイズを計測した。コントロールは  $33.1 \pm 13.6\%$ 、全身性 PHD2 欠損マウス  $42.5 \pm 8.3\%$  で、PHD2 欠損によっても梗塞サイズに有意な改善は認められなかった。

#### (3) 心筋細胞における PHD2 の役割の検討

心筋細胞特異的 PHD2 欠損マウスの心臓より RNA を回収し遺伝子発現を検討したところ、HIF の標的遺伝子である解糖系酵素 phosphoglycerol kinase やヘムオキシゲナーゼ 1 などの遺伝子発現が増加していた。

当初、このマウスを用いて、心筋梗塞モデルを作成することを予定していた。しかし、研究経過中 Myh6Cre/Esr1 自体がタモキシフェンを投与により心筋障害を生じさせ拡張型心筋症様の重篤な心機能低下が生じることが明らかとなったため、この計画は中止せざるを得なかった。なお、2009 年に我々と同様の観察が、別のグループより報告された (Circulation Research. 2009;105:12)。

#### (4) PHD 阻害剤の炎症への効果の検討

心血管病変の進展において重要な役割を担わずマクロファージにおける急性炎症反応に対する PHD 阻害の影響を検討した。培養マクロファージ RAW264.7 細胞を急性炎症誘発物質であるリポ多糖で刺激すると、著しい TNF- $\alpha$  を代表とする急性炎症物質産生が誘導される。PHD 阻害剤であるコバルトや DMOG などを前処置しておく、リポ多糖による TNF- $\alpha$  の発現を有意に抑制させることを見いだした。PHD1 と PHD2 特異的 shRNA もリポ多糖による TNF- $\alpha$  の産生を抑制した。PHD 阻害がもつ抗炎症作用を新たに見いだしたのもであり、この成果は、Takeda K, et al. Inhibition of prolyl hydroxylase domain-containing protein suppressed lipopolysaccharide-induced TNF- $\alpha$  expression. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009;29(12):2132-2137. に報告した。

#### (5) PHD 阻害剤のレニン・アンジオテンシン系への影響の検討

心血管病進展に重要な役割を果たすレニン・アンジオテンシン系に与える影響を、培養血管

平滑筋細胞を用いて検討した。PHD 阻害剤であるコバルトや DMOG を処置すると、アンジオテンシン II 1 型受容体の発現を有意に抑制することを見いだした。また、AngII 持続注入マウスモデルに、PHD 阻害剤であるコバルトを投与すると、血圧非依存性に心筋細胞間質の線維化を有意に抑制することを見いだした。

以上より、本研究において、我々は PHD2 を阻害することで、血管新生が誘導できること、炎症が抑制されること、アンジオテンシン II 1 型受容体が抑制されることを、遺伝子組み換えマウスや培養細胞を用いて明らかにした。PHD2 を代表とする低酸素応答系は上記の様々な面に影響を与え、心血管保護的に作用する可能性が示唆された。今後、さらに効果的に血管新生を誘導させる方法を探求していく必要があると考えられた。

#### 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4件)

Li X, Sutherland S, Takeda K, Fong GH, Lee FS. Integrity of the prolyl hydroxylase domain protein 2: erythropoietin pathway in aging mice. Blood Cells Mol Dis. 査読有、2010.(in press)

Takeda K, Ichiki T, Narabayashi E, Inanaga K, Miyazaki R, Hashimoto T, Matsuura H, Ikeda J, Miyata T, Sunagawa K. Inhibition of prolyl hydroxylase domain-containing protein suppressed lipopolysaccharide-induced TNF-alpha expression. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 査読有、2009;29(12):2132-2137.

Takeda K, Aguila HL, Parikh NS, Li X, Lamothe K, Duan LJ, Takeda H, Lee FS, Fong GH. Regulation of adult erythropoiesis by prolyl hydroxylase domain proteins. Blood. 査読有、2008;111(6):3229-3235.

Fong GH, Takeda K. Role and regulation of prolyl hydroxylase domain proteins. Cell Death Differ. 査読無、2008;15(4):635-641.

[学会発表](計3件)

第73回日本循環器学会総会 (平成21年3月20-22日、大阪) Kotaro Takeda, Toshihiro Ichiki, Keita Inanaga, Ryohei Miyazaki, Toru Hashimoto, Hirohide Matsuura, Kenji Sunagawa : Cardiovascular Pharmacology (Basic): Prolyl hydroxylase inhibitors attenuated acute inflammatory responses hypoxia-inducible factor dependent manner  
第45回高血圧関連疾患モデル学会総会

(平成21年9月4日、東京) 武田宏太郎 低酸素応答系の心血管系における役割

第74回日本循環器学会総会 (平成21年3月5-7日、京都) Kotaro Takeda, Toshihiro Ichiki, Keita Inanaga, Ryohei Miyazaki, Toru Hashimoto, Hirohide Matsuura, Jiro Ikeda, Eriko Narabayashi, Kenji Sunagawa : PHD2 Inhibition may be a Novel Strategy for the Treatment of Obesity and Glucose Intolerance.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

武田 宏太郎 (TAKEDA KOTARO)  
九州大学・医学研究院・客員助教  
研究者番号: 50467908

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

研究協力者

市来 俊弘 (ICHIKI TOSHIHIRO)  
九州大学・医学研究院・客員准教授  
研究者番号: 80311843