

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08793

研究課題名(和文) 低酸素誘導性転写因子遺伝子多型による遺伝子制御異常がもたらす肺高血圧症の分子病態

研究課題名(英文) Gene dysregulation by single nucleotide polymorphism of hypoxia-inducible transcription factor in molecular pathology of pulmonary hypertension

研究代表者

牧野 雄一 (Makino, Yuichi)

旭川医科大学・医学部・教授

研究者番号：90345033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、IPAS/HIF-3 遺伝子多型が膠原病性肺高血圧症の発症進展に及ぼすメカニズムに寄与するか、特に標的遺伝子発現制御の破綻との関連から解明し、強皮症性肺高血圧症の病態におけるIPAS/HIF-3 の意義を究明することを目指す。肺高血圧症合併強皮症患者で認められたSNP保有HIF-3 は、酸素分圧によらず、炎症に関わる遺伝子群を誘導することが判明した。IPAS/HIF-3 遺伝子におけるSNPは、従来未知の遺伝子発現制御に関わる可能性が示された。一方、ゲノム編集法で作出したIPAS/HIF-3 遺伝子破壊マウスは、肺動脈ならびに肺胞間質構造のリモデリング異常をきたすことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IPAS/HIF-3 遺伝子多型は、従来未知の標的遺伝子の発現制御にかかわることが判明した。これらの遺伝子は慢性炎症病態、組織線維化制御との関連が知られており、強皮症における肺高血圧症に密接に関わる可能性がある。また、IPAS/HIF-3 遺伝子破壊マウスでは肺構造の異常が出現したことから、肺組織においては、IPAS/HIF-3 はこれまで未知の機能を有している可能性示唆された。IPAS/HIF-3 遺伝子とその標的遺伝子の解析により、膠原病性肺高血圧症のあらたな治療標的が提示されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary arterial hypertension (PAH) is a poor prognostic complication of connective tissue disease. We have identified non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs) of HIF3A gene in the patients with systemic sclerosis (SSc) associated with PAH. In this study, we aim to further investigate the pathophysiological roles of SNP-HIF3 to develop a novel therapeutic strategy targeting the hypoxia-inducible factors and the target genes. We found SSc-PAH related SNP-HIF3 potentially activates transcription of inflammation-related genes such as encoding interleukins or matrix degradation enzymes in an oxygen concentration-independent manner. On the other hand, we have generated HIF3 gene disrupted mice by means of a genome editing. Those mice showed abnormal vascular and alveolar remodeling in the lung. Analyses of the phenotype and adaptation capacity to the hypoxic environment of the mice are on the way.

研究分野：内科、膠原病学

キーワード：肺高血圧症 低酸素応答性転写因子 遺伝子転写制御 ゲノム編集法 遺伝子破壊動物

## 1. 研究開始当初の背景

膠原病性肺高血圧症は、従来、膠原病患者の予後改善を阻む難治性病態の一つであった。近年、早期診断、エンドセリン(ET)受容体拮抗薬、ホスホジエステラーゼ5阻害剤などの肺血管拡張薬の開発や治療戦略の進歩により、肺動脈性肺高血圧症の予後は改善しつつある。しかしながら一方で、強皮症で見られる間質性肺病変、心筋病変、肺静脈閉塞性病変を基盤に発生する肺高血圧症に対してはこれらの薬剤の効果は限局的であることも示されている。すなわち、強皮症に伴う肺高血圧症の多様性を理解し、個々の病因や病態の分子機構を把握し、それに基づいた治療法を開発することが極めて重要な課題である。

低酸素によって活性化される転写因子 Hypoxia-inducible factors (HIFs)は、HIF-1, HIF-2, IPAS/HIF-3 のいずれかのサブユニットとHIF-1サブユニットからなるヘテロ二量体であり、生体の低酸素適応に重要な多くの遺伝子の発現を転写レベルで制御する。近年、HIFsが肺高血圧症の発症・進展に關与する可能性が基礎的、臨床的解析により示され、注目されている。例えば、HIF-1は肺動脈血管内皮細胞において、ET1やVEGFの発現を誘導し、血管内皮細胞の制御を介して血管リモデリングの異常に寄与するらしい。HIF-1は肺動脈平滑筋における電位依存性カリウムチャンネルを抑制し、肺動脈の収縮を助長する。また、HIF-1遺伝子のヘテロノックアウトマウスでは、慢性低酸素暴露による肺高血圧症の発症が抑制されることが示されている。さらに、HIF-2の恒常的活性化が誘導される遺伝子変異を持つ家系では、多血症と共に肺高血圧症が発症することが報告されている。

申請者らは、低酸素応答抑制分子 IPAS/HIF-3 遺伝子のノックアウトマウス(KO)を作成した(Mol Cell Biol, 2008)。IPAS/HIF-3 KOマウスは、正常に誕生するが徐々に右室拡大、径30 $\mu$ m未満の肺細動脈の筋性動脈化、さらに肺血管内皮細胞でのET1産生の亢進など、ヒト肺動脈性肺高血圧症に極めて類似した形質を示した。申請者は、このIPAS/HIF-3遺伝子異常がもたらすヒト肺高血圧症類似の形質に着目し、東京女子医科大学病院が保有するサンプルを用いて膠原病性肺高血圧症患者におけるIPAS/HIF-3遺伝子の一塩基多型(SNP)の有無を解析した結果、肺高血圧症を有する強皮症患者において(肺高血圧症を有さない強皮症患者および正常人に比べ)有意に高頻度で認められるSNPを複数同定した。(平成26年~28年度基盤研究C、平成29年度~31年度基盤研究C)。これらのSNPを導入した変異IPAS/HIF-3では、ET1遺伝子を含む低酸素誘導性遺伝子の発現が増強した。当初、SNPを導入した変異IPAS/HIF-3では、低酸素誘導性ET1発現の「脱抑制」によりET1遺伝子発現が増強したものと理解していた。しかしながら、その後の精査でSNP導入IPAS/HIF-3は通常型IPAS/HIF-3に比べ、①ヘテロ二量体形成パートナーHIF-1とより強く結合し、②ET1遺伝子プロモーターに高い親和性で結合し、③ET1遺伝子転写を強く活性化する可能性が示された。SNP導入IPAS/HIF-3は、通常型IPAS/HIF-3には見られない機構として、HIF結合配列のみならず、他のCIS配列を介してET1遺伝子プロモーターに強く活性化することが示唆された。すなわち、IPAS/HIF-3遺伝子に特定のSNPを有する強皮症患者においては、特に低酸素誘導性の遺伝子発現が変調をきたしている可能性を示す。申請者は、かかる遺伝情報発現制御の破綻が、強皮症に伴う肺高血圧症の多様性の分子基盤を形成するのではないかと、この作業仮説をもとに本研究を開始した。

## 2. 研究の目的

IPAS/HIF-3 遺伝子の SNP あるいは変異が、強皮症性肺高血圧症の発症進展にどの程度寄与するか、いかなるメカニズムで疾患を引き起こすのか、について標的遺伝子制御の歪みの視点から解明し、膠原病性肺高血圧症の病態におけるIPAS/HIF-3シグナルの意義を究明することとする。特に、強皮症特有の難治性肺高血圧症の病理像との関わりを明らかにする。最終的にはIPAS/HIF-3 KOマウスを用い、IPAS/HIF-3シグナルを標的とした肺高血圧症治療の可能性をin vivoで検証し、新規治療法開発の基盤を確立することを目指す。

## 3. 研究の方法

本研究の具体的な遂行計画は、強皮症性肺高血圧症関連IPAS/HIF-3遺伝子多型が分子機能、特に標的遺伝子制御能に与える影響の解析、IPAS/HIF-3遺伝子多型がもたらす病的形質のin vivo解析とその是正法開発の分子基盤の構築、を到達目標として展開する。

(1) 強皮症性肺高血圧症関連IPAS/HIF-3遺伝子SNPが分子機能に与える影響の解析  
前年度までの基盤研究Cで、強皮症に伴う肺高血圧症患者で検出されたSNPはIPAS/HIF-3の二量体形成能を変化させ、ET1遺伝子プロモーターにHIF結合配列ならびに他のCIS配列の2箇所を介して結合させ、強力にET1遺伝子発現を誘導する可能性を示した。SNP保有IPAS/HIF-3の機能について、以下のごとく解析する。

### 1-1) SNP導入IPAS/HIF-3が低酸素誘導性遺伝子発現に与える影響の解析

SNPを導入したヒト、マウスIPAS/HIF-3発現プラスミドは既に作成されている。ヒト、マウ

ス由来の血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、肺胞上皮細胞等に SNP 導入 IPAS/HIF-3 遺伝子を導入し、低酸素暴露時の ET 1、VEGF、NOS2 をはじめとする HIF-1、HIF-2 標的遺伝子および各種サイトカインや接着分子などの炎症関連標的遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法で解析する。

#### 1-2) SNP 導入 IPAS/HIF-3 特異的標的遺伝子の網羅的解析と意義付け

SNP 導入 IPAS/HIF-3 は炎症関連標的遺伝子も制御する可能性が高い。ヒト肺動脈内皮細胞などにヒト SNP 保有 HIF-3 遺伝子を導入し、低酸素、サイトカインなどの刺激下で遺伝子発現プロファイルの変化を網羅的に解析する。遺伝子発現については、RNA Ampliseq 法を用い、gene ontology 解析、パスウェイ解析を加えて SNP 導入 IPAS/HIF-3 特異的標的遺伝子の生物学的意義を明確にする。

#### (2) IPAS/HIF-3 遺伝子異常がもたらす肺動脈性肺高血圧症類似形質の解析

IPAS/HIF-3 KO マウスでは、ヒト肺動脈性肺高血圧症類似の形質を示す。しかしながら、KO マウスの表現型の低酸素など肺高血圧症増悪刺激下での病理学的、生化学的解析はされていない。本パートでは、IPAS/HIF-3 遺伝子欠損がもたらす形質について解析する。

#### 2-1) IPAS/HIF-3 KO マウスの形質の解析

KO マウスの肺循環動態、肺(血管)病理等を詳細に解析するとともに、肺血管や肺胞局所における ET 1、肺胞関連蛋白質などの発現を mRNA、タンパク質のレベルで解析する。さらに、マイクロアレイを用いて、KO マウス肺での遺伝子発現の変化を網羅的に解析する。

#### 2-2) IPAS/HIF-3 KO マウスにおける肺高血圧症モデル負荷とその解析

IPAS/HIF-3 KO マウスにおいて、7-10%酸素の慢性低酸素暴露による肺高血圧モデルを作成し、2-1) 同様に肺病変の生理学的病理学的解析、ならびに ET 1、肺胞関連蛋白質などの発現について経時的に詳細に解析する。網羅的解析も同様に行う。

#### 2-3) SNP 保有 IPAS/HIF-3 発現マウスの形質の解析

IPAS/HIF-3 KO マウスに SNP 保有 IPAS/HIF-3 遺伝子をトランスジェニック法で発現させる。その後のマウスの肺循環動態、肺(血管)病理を詳細に解析する。また、肺血管や肺胞局所における ET 1、NO、プロスタグランジン I<sub>2</sub> などの発現を 3-1) 同様に解析する。さらに、マイクロアレイを用いて、KO マウス肺での遺伝子発現の変化を網羅的に解析する。

## 4. 研究成果

### (1) 強皮症性肺高血圧症関連 IPAS/HIF-3 遺伝子 SNP が分子機能に与える影響の解析

#### 1-1) SNP 導入 IPAS/HIF-3 が低酸素誘導性遺伝子発現に与える影響の解析

強皮症性肺高血圧症関連 IPAS/HIF-3 遺伝子 SNP はエクソン 5 と 6 に存在した。レンチウイルスシステムを用いて、HeLa 細胞、ヒト肺動脈内皮細胞系での SNP 導入 IPAS/HIF-3 高発現細胞を作成し、タグ付き野生型、SNP 導入 IPAS/HIF-3 の発現量をほぼ同等にするシステムを樹立した。低酸素など各種培養条件下で同細胞抽出液、RNA を調整し、低酸素誘導性遺伝子の発現様相を qPCR 法で解析した。タグ付き野生型、SNP 導入 IPAS/HIF-3 の高発現系では内因性 IPAS/HIF-3 の 3000 倍程度の発現を認め、導入両遺伝子の発現量は同等であった。SNP 導入 IPAS/HIF-3 高発現細胞では、正常酸素分圧下において ET-1 発現が約 2 倍に増強していた。低酸素応答性遺伝子については、VEGF などの限られた遺伝子の低酸素誘導性発現はみとめるものの、高発現させた野生型と SNP 導入 IPAS/HIF-3 による低酸素誘導性発現への影響は観察されなかった。すなわち、SNP 導入 IPAS/HIF-3 は、低酸素誘導性遺伝子発現以外の遺伝子発現制御に関わる可能性が示唆された。

#### 1-2) SNP 導入 IPAS/HIF-3 特異的標的遺伝子の網羅的解析と意義付け

野生型、SNP 導入 IPAS/HIF-3 を過剰発現する HeLa 細胞を正常酸素分圧あるいは低酸素分圧下で 24 時間培養後 total RNA を抽出した。得られた RNA を Ion AmpliSeq™ Transcriptome Human Gene Expression Kit を用いて逆転写、増幅処理した後、次世代シーケンシングにより標的遺伝子を同定した。

SNP 導入 IPAS/HIF-3 発現細胞において、正常酸素分圧下で野生型 IPAS/HIF-3 発現細胞に比し 2 倍以上発現が増減した遺伝子は約 880 遺伝子であった。同様に低酸素分圧下では、約 390 遺伝子の発現が 2 倍以上に増減した。特に、正常酸素分圧あるいは低酸素分圧下で SNP 導入 IPAS/HIF-3 が野生型に比し 2 倍以上に発現を増強させた遺伝子群について、reactome を用いて pathway 解析を行なった。正常酸素分圧あるいは低酸素分圧下で発現増強を認めた遺伝子群で構成される pathway の上位 30 のうち、酸素分圧条件によらず共通していた pathway には、IL-10, 4, 13, 6 などの炎症性サイトカイン遺伝子群、NFκB シグナル伝達に関連する遺伝子群、線維化の病態に関与することが示されている遺伝子群、などが含まれていた。すなわち、SNP 導

入 IPAS/HIF-3 は酸素分圧によらず、炎症にかかわる遺伝子群を誘導することが判明した。IPAS/HIF-3 は、SNP により標定遺伝子の歪みが生じ、従来未知の遺伝子発現制御にかかわる可能性が示された。

## (2) IPAS/HIF-3 遺伝子異常がもたらす肺動脈性肺高血圧症類似形質の解析

- 2-1) IPAS/HIF-3 遺伝子破壊マウスの形質の解析
- 2-2) IPAS/HIF-3 遺伝子破壊マウスにおける肺高血圧症モデル負荷とその解析
- 2-3) SNP 保有 IPAS/HIF-3 発現マウスの形質の解析

平成 29 年～平成 31 年実施の基盤研究 C に引き続き、ゲノム編集法により作出した IPAS/HIF-3 遺伝子破壊マウスの形質解析を行なった。2008 年公表 (Mol Cell Biol, 2008) の先行研究では、Cre-loxP システムによる遺伝子組み換えにより IPAS/HIF-3 遺伝子エクソン 2 に GFP 遺伝子を挿入した IPAS/HIF-3 遺伝子破壊マウスを作出したが、今回は、ゲノム構造の障害を最小限に留めるよう、IPAS/HIF-3 遺伝子エクソン 2 に indel を生じさせ、同部に一塩基欠失、一塩基挿入編集がなされた計 2 系統のマウスを作出している。一塩基欠失マウスは、エクソン 3 にストップコドンを生じ、一塩基挿入マウスはエクソン 4 でストップコドンが生じており、いずれの系統も IPAS/HIF-3 蛋白の発現は消失していた。

この新たな IPAS/HIF-3 遺伝子破壊マウス形質の解析において、前回モデル (Mol Cell Biol, 2008) 同様の肺細動脈の筋性動脈化に加え、肺胞間質の肥厚を認め、IPAS/HIF-3 遺伝子欠損により肺動脈ならびに肺胞間質構造のリモデリング異常をきたすことが示された。マウス肺から抽出した RNA を用いた遺伝子発現の網羅的解析では、従来の低酸素応答性遺伝子以外に、エラスターゼなどのタンパク質分解酵素の発現異常が多数確認されている。さらに、IPAS/HIF-3 遺伝子破壊マウスの出生数は野生型の出生数と有意な差はないが、出生後マウスの遺伝型はメンデルの法則に則っていないなど、従来の IPAS/HIF-3 遺伝子破壊マウスの表現型と異なることが示唆されている。

実験計画では、特に IPAS/HIF-3 遺伝子破壊マウスを用いて慢性低酸素誘導肺高血圧症モデルを、国立循環器病センターの協力により作成する予定であったが、新型コロナウイルス感染症拡大の影響により動物移送等が困難となり遂行できなかった。IPAS/HIF-3 遺伝子破壊マウスへの SNP 保有 IPAS/HIF-3 ノックインにより SNP 保有 IPAS/HIF-3 発現マウスを作出する実験とともに、今後の研究展開の課題となった。

## (3) 結論と展望

肺高血圧症合併強皮症患者で高頻度に認められた SNP 保有 HIF-3 は、酸素分圧によらず、炎症にかかわる遺伝子群を誘導することが判明した。IPAS/HIF-3 は、SNP により標的とする遺伝子群が野生型のものとは変化することで、従来未知の遺伝子発現制御にかかわる可能性が示された。

一方、ゲノム編集法で作出した IPAS/HIF-3 遺伝子破壊マウスは、肺動脈ならびに肺胞間質構造のリモデリング異常をきたすことが示された。IPAS/HIF-3 遺伝子破壊マウスの肺組織において、従来の低酸素応答性遺伝子以外に、タンパク質分解酵素の発現異常が多数確認され、肺組織における IPAS/HIF-3 の従来未知の機能の存在が示唆された。

今後、IPAS/HIF-3 遺伝子破壊マウスを用いた慢性低酸素負荷肺高血圧症モデル及び SNP 保有 IPAS/HIF-3 発現マウスを作成し、肺高血圧症における IPAS/HIF-3 遺伝子異常の病理学的意義の解明に引き続き取り組みたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Motoyama Ryo, Higuchi Tomoaki, Hirahara Shinya, Konda Naoko, Yamada Risa, Watanabe Kotaro, Fujisaki Mayuko, Yamaguchi Rei, Katsumata Yasuhiro, Kawaguchi Yasushi, Harigai Masayoshi	4. 巻 7
2. 論文標題 A case of systemic lupus erythematosus having concurrent Evans syndrome and acquired thrombotic thrombocytopenic purpura	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology Case Reports	6. 最初と最後の頁 383 ~ 387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/mrcr/rxad011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takagi Kae, Kawamoto Manabu, Higuchi Tomoaki, Tochimoto Akiko, Hirose Hikaru, Harigai Masayoshi, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 24
2. 論文標題 Characteristics of Japanese patients with systemic sclerosis complicated with calcinosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 803 ~ 808
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1756-185X.14121	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Utsunomiya Akira, Hasegawa Minoru, Oyama Noritaka, Asano Yoshihide, Endo Hirahito, Fujimoto Manabu, Goto Daisuke, Ishikawa Osamu, Kawaguchi Yasushi, Kuwana Masataka, Ogawa Fumihide, Takahashi Hiroki, Tanaka Sumiaki, Sato Shinichi, Takehara Kazuhiko, Ihn Hironobu	4. 巻 31
2. 論文標題 Clinical course of Japanese patients with early systemic sclerosis: A multicenter, prospective, observational study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 162 ~ 170
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/14397595.2020.1751408	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takagi Kae, Kawamoto Manabu, Higuchi Tomoaki, Tochimoto Akiko, Harigai Masayoshi, Kawaguchi Yasushi	4. 巻 23
2. 論文標題 Single nucleotide polymorphisms of the HIF1A gene are associated with susceptibility to pulmonary arterial hypertension in systemic sclerosis and contribute to SSc PAH disease severity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Rheumatic Diseases	6. 最初と最後の頁 674 ~ 680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1756-185X.13822	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tani Yumi, Kishi Takayuki, Miyamae Takako, Kawamoto Manabu, Kawaguchi Yasushi, Taniguchi Atsuo, Yamanaka Hisashi	4. 巻 39
2. 論文標題 The evaluation of gene polymorphisms associated with autoinflammatory syndrome in patients with palindromic rheumatism complicated by intermittent hydrarthrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Rheumatology	6. 最初と最後の頁 841 ~ 845
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10067-019-04883-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kishibe Mari, Takeda Keiko, Honma Masaru, Makino Yuichi, Ishida Yamamoto Akemi	4. 巻 49
2. 論文標題 Effectiveness of anti interleukin 17 receptor antibody for hydroxychloroquine induced generalized pustular psoriasis in a patient with systemic lupus erythematosus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Dermatology	6. 最初と最後の頁 428-429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1346-8138.16514	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Vilys Laurynas, Peciuliene Inga, Jakubauskiene Egle, Zinkeviciute Ruta, Makino Yuichi, Kanopka Arvydas	4. 巻 399
2. 論文標題 U2AF - Hypoxia-induced fas alternative splicing regulator	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 112444 ~ 112444
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2020.112444	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	川口 鎮司  (Kawaguchi Yasushi)  (90297549)	東京女子医科大学・医学部・臨床教授    (32653)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------