

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461376

研究課題名(和文)血管石灰化の発症・進展における低酸素応答性転写因子HIF-1の役割に関する研究

研究課題名(英文) Roles of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) in progression of vascular calcification

研究代表者

塩井 淳 (SHIOI, ATSUSHI)

大阪市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：90260801

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：血管石灰化の発症・進展におけるマクロファージのHIF-1の役割について検討した。アポEノックアウトマウスにおいて動脈硬化病変内の低酸素領域にマクロファージが局在するとともにoncostatin M (OSM)の発現が確認された。OSMはJAK3-STAT3シグナル伝達経路を介して血管平滑筋細胞の骨芽細胞への分化を促進した。一方、HIF-1はマクロファージにおけるLPSによるOSMの誘導反応に対して抑制的に作用した。したがって、マクロファージにおけるHIF-1はOSMの発現を低下させることにより血管石灰化の発症に抑制的に作用する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the roles of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in the development of atherosclerotic plaque calcification. In apoE-deficient mice, immunohistochemical staining revealed that macrophages are localized in hypoxic areas of atherosclerotic plaque lesions and that oncostatin M (OSM) is expressed in these macrophages. Next, we investigated the stimulatory effects of OSM on osteoblastic differentiation of human vascular smooth muscle cells (HVSMC). OSM promoted osteoblastic differentiation of HVSMC through JAK3/STAT3 signaling pathway as evidenced by the experiments using specific inhibitor reagents and siRNAs. Finally, we examined the roles of HIF-1 in LPS-induced OSM expression in macrophages. The experiments utilizing inhibitors, hypoxia mimetics, and siRNA clarified that HIF-1 inhibits LPS-induced OSM expression in macrophages. These data suggest that HIF-1 in macrophages may play an inhibitory role in plaque calcification through inhibiting expression of OSM.

研究分野：血管病態学

キーワード：マクロファージ HIF-1 オンコスタチンM LPS 動脈硬化 血管石灰化

1. 研究開始当初の背景

血管石灰化は動脈硬化症の重要な病態のひとつと理解されており、冠動脈疾患の重症度を反映するだけでなく、心血管イベントの予測因子になることが明らかにされている。また、冠動脈インターベンションの妨げになることも指摘されている。したがって、血管石灰化の発症・進展機構を明らかにすることは、動脈硬化性疾患(冠動脈疾患、脳梗塞、閉塞性動脈硬化症など)の治療上きわめて重要な課題である。

血管石灰化は、骨・軟骨組織の生理的石灰化過程と多くの共通点を有する能動的なプロセスであると考えられている。その機序は血管壁に存在する間葉系細胞が軟骨細胞あるいは骨芽細胞に分化することによって理解されている。我々は、*in vitro*での研究により、血管平滑筋細胞(VSMC)が骨芽細胞様の性格を獲得し、血管石灰化の発症・進展に関与することを明らかにした。また、血管石灰化におけるマクロファージの役割を VSMC との共存培養を用いて検討し、VSMC の石灰化形質獲得に関与するマクロファージ由来の液性因子として TNF- α および oncostatin M (OSM) を同定した。最近、活性化マクロファージに由来する OSM が間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を促進することが報告されている。したがって、OSM は動脈硬化性プラークにおいて血管石灰化の発症に関与している可能性が示唆される。

低酸素応答性転写因子 HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) は α サブユニット (HIF-1 α) と β サブユニット (HIF-1 β) からなるヘテロ二量体であり、低酸素応答性は主に HIF-1 α の発現により調節されている。HIF-1 は低酸素環境への適応反応に中心的な役割を果たす分子であると考えられている。動脈硬化性プラークの形成・増大とともにプラークに低酸素領域が出現する。低酸素領域には主にマクロファージが局在しており、HIF-1 の発現誘導を介して血管新生、泡沫細胞の形成、アポトーシスの誘導、炎症性サイトカインの産生、炎症性細胞の動員、細胞外マトリックスの分解亢進などの反応が惹起され、プラークの進展(プラークの破綻、プラーク内出血、血栓形成など)に関与すると理解されている。

一方、血管石灰化は動脈硬化性プラークの進展に伴う血管壁の炎症と密接に関連した動的なプロセスであると考えられており、プラークの破綻、プラーク内出血、血栓形成などの炎症性細胞浸潤を伴う病理学的変化に続く修復過程において石灰化が引き起こされる。したがって、HIF-1 はプラークの進展に関与するだけでなく、血管石灰化の発症・進展にも重要な役割を果たしている可能性が推察される。

2. 研究の目的

本研究は、血管石灰化の発症・進展におけるマクロファージに発現する HIF-1 の役割を

明らかにすることを主な目的としている。*in vitro*において HIF-1 を介するマクロファージ由来の血管石灰化促進因子の発現調節機構とこれらの因子の血管平滑筋細胞に対する作用機序を明らかにする。また、*in vivo*においてマクロファージ特異的に HIF-1 α を欠損させた動脈硬化モデルマウスを用いて血管石灰化に対するマクロファージ HIF-1 の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) apoE ノックアウトマウスの動脈硬化病変における低酸素領域の同定とマクロファージの局在および OSM の発現に関する解析:
apoE ノックアウトマウスの動脈硬化病変における低酸素領域を pimonidazole 染色により同定し、同部位にマクロファージが局在することを Mac-3 の免疫染色により検討する。また、これらのマクロファージにおける OSM の発現を免疫染色により評価する。

(2) マクロファージにおける OSM の発現調節機構における HIF-1 の役割に関する解析:
ヒト単球様細胞株(THP-1)における OSM の発現、特に LPS による OSM の発現誘導反応に対する HIF-1 の影響について検討する。HIF-1 活性化促進因子として塩化コバルト(CoCl_2)を、HIF-1 活性抑制因子として 2-deoxyglucose、LW6 を用いる。OSM mRNA および OSM 蛋白の発現はそれぞれ real time RT-PCR 法および ELISA 法により評価する。

マウスマクロファージ様細胞株

(RAW264.7)における LPS による OSM の誘導反応に対する HIF-1 の影響について上記と同様の方法で検討する。HIF-1 活性化は、低酸素培養、Dimethylallylglycine (DMOG) の添加により誘導する。一方、HIF-1 活性抑制には、chetomin および siRNA を用いる。

(3) 血管平滑筋細胞の骨芽細胞への分化に対するマクロファージ由来の OSM の作用とその機序の解析:

種々のヒト動脈(大動脈、冠動脈、臍帯動脈)由来の血管平滑筋細胞に対する OSM の骨芽細胞への分化促進作用について検討する。骨芽細胞への分化マーカー遺伝子の発現解析として、Runx2 および alkaline phosphatase (ALP) の発現を real time RT-PCR 法により検討する。さらに、ALP 活性および *in vitro* での石灰化能を測定する。

血管平滑筋細胞における OSM の骨芽細胞への分化促進作用に関わるシグナル伝達経路として JAK3-STAT3 系の関与について JAK3 阻害剤(WHI-P154)、siRNA による JAK3/STAT3 のノックダウンにより検討する。

(4) マクロファージ特異的に HIF-1 α 遺伝子を欠損したマウスを用いた血管石灰化におけるマクロファージ HIF-1 の *in vivo* での役割の検討: マクロファージ特異的に HIF-1 α を欠損させたマウス(Mac-HIF-1 α KO)と動脈硬化モデルマウス(apoEKO)とを交配して、apoEKO/Mac-HIF-1 α KO マウスを作製し、こ

のマウスにおける動脈硬化病変および血管石灰化病変の解析を行う。

4. 研究成果

(1) apoEKO マウスの動脈硬化病変および血管石灰化病変における低酸素領域を抗 pimonidazole 抗体により同定した。pimonidazole 染色陽性の低酸素領域に Mac-3 陽性のマクロファージが局在することが明らかにされた。また、これらの細胞は OSM の発現も陽性を示した。したがって、動脈硬化病変および血管石灰化病変に局在するマクロファージにおける HIF-1 活性と OSM が病変の進展に関与している可能性が示唆された。

(2) THP-1 および RAW264.7 細胞において LPS を添加すると用量依存的に OSM の mRNA および OSM 蛋白の分泌が上昇した。

THP-1 細胞において、2-deoxyglucose の添加により HIF-1 α 蛋白の発現を抑制すると、LPS による OSM の誘導反応は有意に増強された。また、HIF-1 の阻害剤である LW6 の添加により LPS による OSM の発現誘導は有意に上昇した。一方、CoCl₂ により HIF-1 α 蛋白の発現を上昇させると、LPS による OSM 誘導反応は有意に抑制された。

RAW264.7 細胞において、DMOG の添加により HIF-1 α 蛋白の発現を上昇させると、LPS による OSM の発現誘導が有意に抑制された。さらに、RAW264.7 細胞を低酸素下(1% O₂)で培養すると、HIF-1 α 蛋白の発現が上昇するとともに LPS による OSM 誘導反応は有意に抑制された。一方、chetomin により HIF-1 の転写活性を阻害すると、LPS による OSM の発現誘導は有意に促進された。最後に、siRNA を用いて HIF-1 α の発現をノックダウンすると、LPS による OSM の誘導反応は有意に促進された。

以上の結果から、HIF-1 はマクロファージにおける OSM の発現に対して抑制的に作用する可能性が示唆された。

(3) 臍帯動脈、大動脈および冠動脈のいずれの動脈に由来する血管平滑筋細胞においても OSM は ALP 活性を上昇させるとともに in vitro での石灰化を促進した。また、骨芽細胞の分化マーカーである Runx2 および ALP 遺伝子の発現も上昇させた。

OSM が血管平滑筋細胞において STAT3 のリン酸化を引き起こすことを確認した。この OSM による STAT3 のリン酸化は JAK3 の阻害剤である WHI-P154 により用量依存的に抑制された。WHI-P154 は OSM による ALP 活性の誘導を用量依存的に抑制し、10 μ M で OSM による石灰化をほぼ完全に抑制した。WHI-P154 は OSM による ALP mRNA の発現誘導を有意に抑制したが、OSM による Runx2 mRNA の発現誘導は抑制しなかった。一方、STAT3 を siRNA によりノックダウンしたところ、ALP 活性、ALP 遺伝子の発現および in vitro での石灰化はほぼ完全に抑制された。

以上の結果から、OSM は JAK3-STAT3 シグナル経路を介して血管平滑筋細胞において骨芽細胞への分化を促進することが示唆された。

(4) マクロファージ特異的に HIF-1 α を欠損した動脈硬化モデルマウスである apoEKO/Mac-HIF-1 α KO マウスを作製した。このマウスに由来する腹腔マクロファージにおいて HIF-1 α 蛋白の著明な発現低下がウエスタンブロットで確認された。動脈硬化病変および血管石灰化病変に対するマクロファージ HIF-1 α 欠損の影響については現在検討中である。

本研究により、マクロファージにおける HIF-1 は血管石灰化促進作用を有する OSM の発現誘導に抑制的に作用することにより、血管石灰化特に動脈硬化性石灰化の発症・進展に対して抑制作用を示す可能性が示唆された。

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 6 件)

塩井 淳、稲葉雅章、血管石灰化の病態、腎と透析、査読無、80 巻、2016、17-21
DOI: なし

塩井 淳、血管石灰化の発症機、CLINICAL CALCIUM、査読無、25 巻、2015、635-643
DOI: CliCa

Kakutani Y, Shioi A, Shoji T, Okazaki H, Koyama H, Emoto M, Inaba M. Oncostatin M promotes osteoblastic differentiation of human vascular smooth muscle cells through JAK3-STAT3 pathway. J Cell Biochem, 査読有、116、2015、1325-1333
DOI: 10.1002/jcb.25088

塩井 淳、血管石灰化のメカニズム、最新医学、査読無、69 巻、2014、1650-1657
DOI: 無し

Sonoda M, Shoji T, Kimoto E, Okute Y, Shima H, Naganuma T, Motoyama K, Morioka T, Mori K, Fukumoto S, Shioi A, Koyama H, Emoto M, Inaba M. Kidney function, cholesterol absorption and remnant lipoprotein accumulation in patients with diabetes mellitus. J Atheroscler Thromb, 査読有、21、2014、346-354
DOI: なし

Shoji T, Kakiya R, Hayashi T, Tsujimoto Y, Sonoda M, Shima H, Mori K, Fukumoto S, Tahara H, Shioi A, Tabata T, Emoto M, Nishizawa Y, Inaba M. Serum n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acid profile as an independent predictor of cardiovascular events in hemodialysis patients. Am J Kidney Dis, 査読有、62、2013、568-576

〔学会発表〕(計 9件)

角谷佳則、塩井 淳、森岡与明、庄司哲雄、岡崎博一、小山英則、絵本正憲、稲葉雅章、血管石灰化におけるマクロファージ低酸素誘導因子の役割：Oncostatin M の発現調節、第 47 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2015 年 7 月 10 日、仙台国際センター（宮城県仙台市）
塩井 淳、透析患者と血管石灰化、第 60 回日本透析医学会学術集会・総会（招待講演）、2015 年 6 月 26 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

Kakutani Y, Morioka T, Imamura S, Yamasaki Y, Numaguchi R, Motoyama K, Mori K, Fukumoto S, Shioi A, Shoji T, Emoto M, Inaba M. Plasma polyunsaturated fatty acid profile is associated with vascular endothelial function in patients with type 2 diabetes. American Diabetes Association 75th Scientific Sessions (国際学会) 2015 年 6 月 8 日、ボストン（アメリカ合衆国）

Sonoda M, Shoji T, Okute Y, Kuwamura N, Shima H, Motoyama K, Morioka T, Mori K, Fukumoto S, Shioi A, Emoto M, Inaba M. Association between silent cerebrovascular disease and cognitive impairment in patients with chronic kidney disease and diabetes mellitus. ERA-EDTA 52nd Congress(国際学会) 2015 年 5 月 30 日、ロンドン（イギリス）

角谷佳則、塩井 淳、庄司哲雄、岡崎博一、小山英則、絵本正憲、稲葉雅章、活性化マクロファージにおける oncostatin M の発現調節機構と血管石灰化における役割、第 46 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2014 年 7 月 11 日、京王プラザホテル（東京都新宿区）

塩井 淳、角谷佳則、庄司哲雄、稲葉雅章、血管石灰化におけるマクロファージの役割、第 87 回日本内分泌学会学術総会（招待講演）2014 年 4 月 24 日、福岡サンパレス（福岡県福岡市）

Shioi A, Kakutani Y, Shoji T, Emoto M, Inaba M. Roles of macrophage-derived oncostatin M in atherosclerotic calcification. The 18th International Vascular Biology Meeting (招待講演) 2014 年 4 月 15 日、みやこめっせ（京都府京都市）

Kakutani Y, Shioi A, Shoji T, Okazaki H, Koyama H, Emoto M, Inaba M. Oncostatin M promotes osteoblastic differentiation of human vascular smooth muscle cells. American Society for Bone and Mineral Research, 2013 年 10 月 5 日、ボルチモア（アメリカ合衆国）

角谷佳則、塩井 淳、庄司哲雄、小山英則、稲葉雅章、Oncostatin M はヒト血管平滑筋細胞の骨芽細胞への分化を促進する、第 45 回日本動脈硬化学会総会・学術集会、2013 年 7 月 18 日、京王プラザホテル（東京都新宿区）

〔図書〕(計 2件)

塩井 淳 他、医薬ジャーナル社、最新透析医療：先端技術との融合、2016、859
塩井 淳 他、医薬ジャーナル社、ピタミン K と疾患、2014、287

6. 研究組織

(1) 研究代表者

塩井 淳 (SHIOI, Atsushi)
大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号：90260801

(2) 研究分担者

庄司哲雄 (SHOJI, Tetsuo)
大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：40271192