

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670391

研究課題名(和文) 心血管病の進展におけるマイクログリアの役割の解明と治療応用

研究課題名(英文) Role of microglia in the development of cardiovascular diseases

研究代表者

市来 俊弘 (Ichiki, Toshihiro)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：80311843

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではマイクログリアの低酸素応答系が心血管病の進展に果たす役割について検討を行った。

Hypoxia inducible factor を分解へ誘導する prolyl hydroxylase domain protein (PHD) 2 をマクロファージ特異的に欠損するマウスに、大動脈縮窄による圧負荷心肥大モデルを作成した。圧負荷による心肥大は PHD2 欠損マウスにおいて軽度抑制されていた。圧負荷は交感神経中枢の一つである室傍核のマイクログリアを活性化したが、野生型マウスと PHD2 欠損マウスで有意差はなかった。圧負荷心肥大の形成におけるマイクログリア低酸素応答系の役割は否定的であった。

研究成果の概要(英文)：Microglia is considered brain macrophage and is involved in immune response in the brain. Although macrophages play an important role in the development of cardiovascular diseases, contribution of microglia is not clear. We sought to determine whether the hypoxia response system in microglia plays any roles in the development of pressure overload-induced cardiac hypertrophy. We generated mice with macrophage-specific deletion of prolyl hydroxylase domain protein (PHD) 2 that induces degradation of hypoxia-inducible factor. Pressure overload by constriction of transverse aorta induced slightly less cardiac hypertrophy in PHD2-deficient mice. However, activation of microglia in the paraventricular nucleus, one of the nuclei that regulate sympathetic nerve activity, was not difference between PHD2-deficient and control mice. These results suggest that the hypoxia response system in microglia plays little role in the development of pressure overload-induced cardiac hypertrophy.

研究分野：循環器内科学

キーワード：低酸素応答系 マイクログリア 心肥大 圧負荷

1. 研究開始当初の背景

日本人の約4分の1が心疾患や脳血管障害などの循環器系の疾患で死亡する。動脈硬化に起因する心筋梗塞の発症や再発、心不全への進展を予防し、心血管病を有する患者の予後を改善するためには、新たな分子機序の解明、治療標的因子の同定が必要である。

動脈硬化や心肥大・心不全の発症と進展において、マクロファージの浸潤をともなう慢性炎症反応やレニン・アンジオテンシン系の活性化が共通の病態基盤として中心的な役割を果たす。慢性炎症は実質細胞の老化・アポトーシスを引き起こし、やがて臓器の線維化、個体の老化に至ると考えられている。

炎症細胞の浸潤や動脈硬化による酸素供給の低下、線維化は様々な臓器において低酸素状態を誘導する。低酸素状態では Hypoxia-inducible factor (HIF) と呼ばれる転写因子が活性化され、低酸素に拮抗するエリスロポイエチンや vascular endothelial growth factor の発現を誘導する。また、ミトコンドリアの酸化リン酸化が抑制され、解糖系が活性化される結果、酸素消費が減少する。HIF は正常酸素状態では prolyl hydroxylase domain protein (PHD) により水酸化を受け、水酸化をシグナルとしてユビキチンが付加され、プロテオソームで分解を受ける(Nat Rev Drug Discovery 2009;8:139)。そのため、HIF の発現は正常酸素濃度下においては、極めて低く抑えられている。低酸素状態になると PHD の活性が抑制され、HIF の発現が安定化し、遺伝子発現が誘導される。PHD には3種類のアイソフォームが報告されているが、PHD2 の発現量が最も多く、ほとんどの細胞、臓器に発現しているため主要なアイソフォームと考えられている。3種類の PHD アイソフォームの全身的なノックアウトマウスのうち、PHD2 欠損マウスのみが胎生致死になると報告されている。

マクログリアは脳内のマクロファージとして、活性酸素や炎症性サイトカインを産生し、脳内の免疫反応に関わる(Nat Rev Immunol 2011;11:775)。脳梗塞や認知症など様々な神経疾患の進展において活性化されたマクログリアがもたらす神経炎症が重要な役割を果たすことが近年注目されている。心筋梗塞後にマクログリアの活性化が生じると報告されているが(Auton Neurosci 2012;169:70)、その機序、役割は不明である。循環器疾患の進展における交感神経の役割に関しては既に数多くの研究があるが、マクログリアが交感神経の活性に関わるのか、あるいはサイトカインなどを介して心血管病の進展に直接関与する可能性があるのかなどは解明されていない。

本研究では骨髄系系の細胞に特異的に Cre recombinase を発現するトランスジェニックマウス(Lysozyme M/Cre)を用いて、骨髄系細

胞において選択的に遺伝子発現を欠損するマウスを作成し用いる(Myeloid-KO)。この方法で、活性化したマクログリアの70%に遺伝子組換えが生じ標的遺伝子が欠損すると報告されている(Brain 2008;131:3019)。出生後は血液脳関門のため、末梢の単球は脳内へ入れない。しかし中枢神経系に放射線照射を行うと末梢血単球が脳内へ遊走してマクログリアとなる事が報告されている(Nat Rev Immunol 2011;11:775)。レシピエントマウスの頭部を遮蔽して放射線照射を行い、野生型マウスの骨髄細胞を Myeloid-KO マウスへ移植すると脳内のマクログリアのみ遺伝子欠損したマウスが作成できる。一方 Myeloid-KO マウスの骨髄細胞を正常マウスへ移植すれば末梢の骨髄系細胞のみ遺伝子欠損となり、マクログリアは野生型の形質を保持する。マクログリア選択的な遺伝子欠損マウスを用いた研究は報告がない。

2. 研究の目的

どのような心血管疾患の病態(モデル)においてマクログリアが活性化されるかを明らかにする。また、活性化の機序を明らかにする。

マクログリアの活性化が心血管病の進展に及ぼす役割を明らかにする。

マクログリアを標的とした心血管病の治療が可能か検討する。

3. 研究の方法

Lysozyme M 遺伝子プロモーター(骨髄系細胞特異的)の下流で、Cre recombinase を発現するトランスジェニックマウスと PHD2 の floxed マウスを交配して、骨髄細胞特異的な PHD2 欠損マウスを作製した。

マウスの胸部大動脈の縮窄による、圧負荷・心肥大モデルを作成した。ケタミン/キシラジン麻酔下に横行大動脈を 27G の針とともに結紮し、その後、針を抜去して縮窄を作成した。4週間後に解析を行った。

マウスにアンジオテンシン II (0.8 mg/kg/日:浸透圧ミニポンプによる:1週間投与)および一酸化窒素合成酵素阻害薬(L-NAME, 30mg/kg/日:飲水中に混入、2週間投与)の投与による高血圧・心肥大モデルを作成した。

交感神経中枢のひとつである室傍核のマクログリアに注目して活性化を評価した。活性化マクログリアは抗 CD11b 抗体による免疫染色により同定し、突起の短縮と減少などと合わせて活性化を評価した。

イソフルレン麻酔下に超音波検査を施行した。(VEVO 2100 Ultrasound System、40 MHz MS550D Transducer)

遺伝子発現は定量的PCR法により解析した。(ABI PRISM 7500 Sequence Detection System)

蛋白発現は通常のウエスタンブロット法により解析した。

4. 研究成果

Prolyl hydroxylase domain protein (PHD)の主要なアイソフォームであるPHD2のfloxedマウスとlysozyme M-Creマウスを交配することにより骨髄系細胞特異的なPHD2欠損マウスを作製した。このマウスの骨髄由来マクロファージおよび腹腔内マクロファージでは野生型マウスと比べて、PHD2の発現は90%以上減少し、HIF-1 α およびHIF-2 α の発現が増加していた。またIL-1 β やIL-6などの炎症性サイトカインの発現が減少していた。しかし骨髄系細胞特異的PHD2欠損マウスでは外見や主要臓器の組織に特別な異常を認めなかった。そこで、アンジオテンシンIIと一酸化窒素合成酵素阻害剤を投与したところ、野生型マウスと比べて骨髄系細胞特異的PHD2欠損マウスでは、心肥大、心臓線維化、左室収縮能の低下が軽減していた。また大動脈中膜の肥厚や外膜へのマクロファージの浸潤の程度も軽減していた。これらの結果はマクロファージにおけるPHD2の欠損(HIFの活性化)により、抗炎症、抗線維化作用が生じ、心血管リモデリングが抑制されることが示唆された。研究成果は論文として報告した (Ikeda J et al. *J Am Heart Assoc.* 2013)。

この骨髄細胞特異的 PHD2 欠損マウスを用いて、横行大動脈縮窄による圧負荷心肥大モデルを作成した。4 週間後に左室肥大について心臓超音波検査、心臓重量/脛骨長比、心臓の組織学的解析を行った。心臓超音波検査(左室前壁+後壁厚(mm)): Sham 群 1.90 野生型マウス 2.26、骨髄細胞特異的 PHD2 欠損マウス 2.14、心臓重量/脛骨長比(mg/mm): Sham 群 6.0、野生型マウス 7.91、骨髄系細胞特異的 PHD2 欠損マウス 7.85 であった。骨髄細胞特異的 PHD2 欠損マウスで肥大が若干軽度であったが有意差は認められなかった。その他、心筋細胞の横断面面積、線維化(Masson Trichrome 染色)の程度・炎症細胞の浸潤(免疫染色による MAC2 陽性細胞)の程度にも差を認めなかった。

骨髄細胞特異的 PHD2 欠損マウスおよび野生型マウスのいずれでも圧負荷により交感神経中枢の一つである室傍核におけるマイクログリアの軽度の活性化(CD11b 抗体陽性細胞数の増加)を生じたが、両群間に統計的な有意差はなかった。圧負荷を強化し、心肥大から心不全となるモデルを作成して同様の検討を行ったが、肥大の程度やマイクログリアの活性化に有意差は認められなかった。

そこで、アンジオテンシン II と一酸化窒素合成阻害薬の投与による心肥大モデルでも同様の検討を行った。アンジオテンシン II と一酸化窒素合成阻害薬の投与は、非投与群に比べ室傍核のマイクログリアを活性化した。しかし、このモデルにおいても骨髄細胞特異的 PHD2 欠損マウスと野生型マウスの間で室傍核におけるマイクログリアの活性化に有意差は認められなかった。

残念ながら研究の仮説は支持されず、心臓肥大の形成過程において脳内マイクログリアの低酸素応答系が果たす役割に関しては否定的であった。骨髄細胞特異的 PHD2 欠損マウスで認められた、心肥大の抑制は、主に心臓へ浸潤したマクロファージの変化によるものと考えられた。しかしながら、現時点では骨髄細胞特異的な PHD2 欠損マウスのみしか検討ができておらず、今後、HIF や炎症性サイトカインなどをマクロファージ特異的に欠損するマウスを用いてマイクログリアの心肥大形成における役割を検討する必要があると考えられた。

また、今後、マイクログリアの培養系を確立し、その形質、遺伝子発現がマクロファージと同様であるのかも確認の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 5 件)

① Ichiki T, Sunagawa K.

Novel roles of hypoxia response system in glucose metabolism and obesity. *Trends Cardiovasc Med.* 2014;24(5):197-201. doi: 10.1016/j.tcm.2014.03.004. 査読あり

② Hashimoto T, Ichiki T, Watanabe A, Hurt-Camejo E, Michaëlsson E, Ikeda J, Inoue E, Matsuura H, Tokunou T, Kitamoto S, Sunagawa K.

Stimulation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor by AR-R17779 suppresses atherosclerosis and aortic aneurysm formation in apolipoprotein E-deficient mice.

Vascul Pharmacol. 2014;61(2-3):49-55. doi: 10.1016/j.vph.2014.03.006. 査読あり

③ Watanabe A, Ichiki T, Sankoda C, Takahara Y, Ikeda J, Inoue E, Tokunou T, Kitamoto S, Sunagawa K.

Suppression of abdominal aortic aneurysm formation by inhibition of prolyl hydroxylase domain protein through attenuation of inflammation and extracellular matrix disruption.

Clin Sci (Lond). 2014;126(9):671-8. doi: 10.1042/CS20130435. 査読あり

④ Ikeda J, Ichiki T, Matsuura H, Inoue E, Kishimoto J, Watanabe A, Sankoda C, Kitamoto S, Tokunou T, Takeda K, Fong GH, Sunagawa K.

Deletion of *phd2* in myeloid lineage attenuates hypertensive cardiovascular remodeling.

J Am Heart Assoc. 2013;2(3):e000178. doi: 10.1161/JAHA.113.000178. 査読あり

⑤ Matsuura H, Ichiki T, Inoue E, Nomura M, Miyazaki R, Hashimoto T, Ikeda J, Takayanagi R, Fong GH, Sunagawa K.

Prolyl hydroxylase domain protein 2 plays a critical role in diet-induced obesity and glucose intolerance.

Circulation. 2013 May 28;127(21):2078-87. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001742.

査読あり

[学会発表] (計 6 件)

① Toshihiro Ichiki, Toru Hashimoto, Kenji Sunagawa.

Activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor suppressed atherosclerosis

81st European Atherosclerosis Society Congress (2013 年 6 月 2-5 日, Lyon, France)

② Jiro Ikeda, Toshihiro Ichiki, Kenji Sunagawa

Deletion of *Phd2* in Myeloid Lineage Attenuates Hypertensive Cardiovascular Remodeling

35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society (2013 年 7 月 3-7 日大阪市)

③ Toshihiro Ichiki, Jiro Ikeda, Kenji Sunagawa.

Myeloid-Specific Deletion of Prolyl Hydroxylase Domain Protein 2 Attenuates Hypertensive Cardiovascular Remodeling

High Blood Pressure Research Scientific Sessions 2013 (2013 年 9 月 11 日-14 日, New Orleans, USA)

④ 市来俊弘

Myeloid-Specific Deletion of Prolyl Hydroxylase Domain Protein 2 Attenuates Hypertensive Cardiovascular Remodeling

第17回日本心不全学会学術集会 (2013年11月28日-29日、埼玉県さいたま市)

⑤ Aya Watanabe, Toshihiro Ichiki, Chikahiro Sankoda, Yusuke Takahara, Jiro Ikeda, Eriko Inoue, Tomotake Tokunou, Shiro Kitamoto, Kenji Sunagawa

Inhibition of Prolyl Hydroxylase Domain Protein Suppresses the Formation of Abdominal Aortic Aneurysm

第 7 8 回日本循環器学会学術集会 2013 年 3 月 21 日-23 日 東京都

⑥ 市来俊弘、

Cross talk between the hypoxia response system and angiotensin II receptor

第 92 回 日本生理学会大会 2015 年 3 月 21-23 日 神戸市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

市来俊弘 (ICHIKI, Toshihiro)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：80311843

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者

研究者番号：

砂川 賢二(SUNAGAWA, Kenji)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：50163043

北本 史郎(KITAMOTO, Shiro)

九州大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：00380436

得能 智武(TOKUNOU, Tomotake)

九州大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号：50567378