

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19372

研究課題名(和文) HIF- α を介する炎症プロセスの活性化および終息機構の解明研究課題名(英文) The regulation of Inflammatory process via HIF- α

研究代表者

仙波 宏章 (Semba, Hiroaki)

東京大学・医学部附属病院・登録研究員

研究者番号：80747923

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：心不全などの心血管疾患の病変部は低酸素状態にある。マクロファージはこのような低酸素領域へ積極的に遊走し、炎症を惹起して心血管疾患の病態形成に関与している。低酸素に暴露された細胞は低酸素誘導型転写因子HIF-1 α を介して様々な遺伝子発現応答をしているが、低酸素シグナルがマクロファージの細胞機能にどのような役割を果たしているかは十分に解明されていなかった。本研究により、HIF-1 α - PDK1経路により制御されている代謝リプログラミングは低酸素におけるマクロファージの遊走能制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなり、マクロファージが心血管疾患の病態形成に関わる際の初動メカニズムが示された。

研究成果の概要(英文)：Hypoxia is a pathological condition in which the tissue is deprived of adequate oxygen supply, occurring in many cardiovascular diseases. Each cell exerts its own responses to hypoxia, and most of them are mediated through a transcription factor, hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α). Macrophages, a key mediator of inflammation, migrate to such hypoxic areas, and HIF-1 α - mediated hypoxic responses of macrophage strongly accelerate the inflammation processes. While we previously showed that HIF-1 α plays a key role in inflammatory mediator production in severely hypoxic areas, the role of hypoxia signaling in the migratory capacity of inflammatory cells remains unclear. In this study, I found a novel function of HIF-1 α - PDK1 - mediated glycolytic reprogramming in macrophage migratory capacity, and suggest that targeting the function of PDK1 could represent a potential therapeutic approach to suppressing inflammatory cell recruitment.

研究分野：循環器内科

キーワード：低酸素 炎症 マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

(1) 心血管疾患の未解決問題

未曾有の高齢化に伴って、本邦の心血管疾患症例は増加している。特に近年、心不全患者は増加の一途を辿り、本邦では約 200 万人にも及ぶとされている。当院も参画する東京都 CCU ネットワークのデータによれば、既に急性心筋梗塞の搬送者数よりも心不全の搬送者数が上回っている(年間約 5000 例 vs 4500 例)という。この心不全患者の急増は「心不全パンデミック」と呼ばれ、臨床の現場における最も重要な未解決問題の 1 つと考えられている。

心不全には、左室収縮機能の低下した収縮障害性の心不全(Heart Failure with reduced Ejection Fraction; HFrEF)のみならず、収縮機能が保たれた拡張障害性の心不全(Heart Failure with preserved Ejection Fraction; HFpEF)も高率に存在することが知られている。海外からの報告のみならず、近年の本邦からの循環器疾患コホート研究でも、心不全初診患者の半数以上が HFpEF であることが示されている。しかし現在、拡張不全性の心不全に対する治療は不十分であると言わざるを得ない。収縮障害性の心不全については、遮断薬・RAS 阻害薬などの有効な薬物療法が確立したことによって近年飛躍的に予後が改善した。一方で、拡張障害性の心不全の予後を改善する有効な治療法はいまだ無いのが現状である。すなわち、心不全症例の約半数は十分な治療が施されずに放置されてしまっているとも言えるだろう。心臓線維化は心臓の拡張障害を引き起こす主病態の 1 つである。我々循環器内科医はこの心臓線維化の分子細胞学的メカニズムをより詳細に解明し、拡張障害性の心不全に対する新規治療法を開発することが急務であると考えられる。

(2) 炎症プロセスとマクロファージ

近年、自然炎症プロセスの持続的な活性化が、心臓線維化・心不全の病態基盤として注目されている。心不全患者では、重症度に相関して炎症性サイトカイン(TNF- α など)の血中濃度が上昇している。また心臓移植患者の心筋組織には、線維化のみならず、CD68(+)マクロファージの集積が認められる。マクロファージは炎症プロセスを活性化するものとして古くから理解されてきたが、最近の研究から、マクロファージには炎症惹起型の M1・制御型の M2 などの多様な極性があり、炎症プロセスを病態基盤とした疾患の進展にはこれらのマクロファージ亜集団がそれぞれ固有の役割を果たしていることが分かってきた。しかし心不全に関して、マクロファージを介した炎症プロセスが心臓線維化の進展にどのような役割を果たしているのかは十分解明されていない。

(3)マクロファージにおける低酸素シグナル
また一方で、心不全の心臓組織は、供給低下・需要増大によって著しい低酸素状態にあることが知られている。低酸素に対して細胞はそれぞれ固有の遺伝子発現応答を示すが、その応答は主に Hypoxia inducible factor (HIF)という低酸素応答を示すが、その応答は主に Hypoxia inducible factor (HIF)という低酸素応答型転写因子によって調節されている。またこの低酸素シグナルは、細胞の低酸素応答を制御するのみならず、炎症性サイトカイン・NO 放出の調節を介して炎症プロセスの持続的活性化にも関与している。このような炎症プロセス×低酸素シグナルの協調的相互作用が、心臓線維化の進展に重要であると考えられる。

2. 研究の目的

上記の背景を受け、本研究は、低酸素環境(=病変部位)における HIF を介したマクロファージの機能制御メカニズムについて解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)マクロファージ

チオグリコレート腹腔内投与により浸出誘導されるマウスの腹腔マクロファージを主に本研究の解析対象とした。

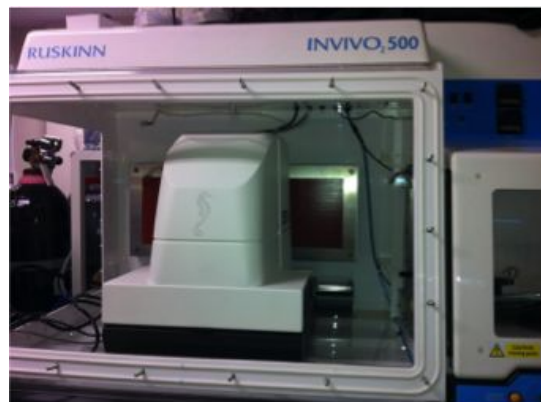
(2)マウス

Cre-loxp システムを用いた遺伝子改変技術により解析対象である HIF を欠失したマウスを樹立し、本研究の各実験に使用することとした。

(3)代謝解析

我々は低酸素細胞培養チャンバー内部に細胞内代謝解析装置を設置し、マウス腹腔マクロファージについて低酸素環境下における代謝状態をリアルタイムに解析する実験系を新たに確立した(下図)。

また乳酸など特定の物質については、ラベル体グルコースを用いた質量分析法によってその産生量を評価した。



(4)マクロファージの機能的解析

マクロファージの機能解析については、in vitro ではポイデンチャンバーを用いた遊走能解析を選択した。また in vivo では、腫瘍細胞およびマトリゲルに対するマクロファージの浸潤を遊走能として評価した。

(5)その他

遺伝子発現解析や蛋白質発現解析などは、それぞれ従来の標準的なプロトコルを用いて行った。

4. 研究成果

(1)低酸素におけるマクロファージの代謝

前述のリアルタイム代謝解析系を応用することにより、マクロファージは低酸素環境下において、自身の細胞内代謝をミトコンドリアにおける好氣的呼吸から嫌氣的な解糖系へとシフトしている(代謝リプログラミングが起きている)ことを明らかにした。

またこのマクロファージ代謝リプログラミングは、ミトコンドリアの呼吸機能が需要する酸素濃度よりも高い濃度で既に開始されていることが分かった。

すなわち、低酸素によってミトコンドリアの呼吸機能が受動的に抑制されていくのではなく、それよりも早い段階で積極的に嫌氣的解糖へシフトさせていると考えられた。

(2)HIF-1 を介した代謝リプログラミング

マクロファージ特異的な HIF-1 欠失マウスの腹腔マクロファージの解析により、上記の低酸素による代謝リプログラミングには HIF-1 が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

また HIF には HIF-1、HIF-2 という2つの代表的なアイソフォームが知られているが、HIF-2 欠失マウスの解析により、HIF-2 はこの代謝リプログラミングには必須ではないことも確認された。

(3)HIF-1 -PDK1 経路

さらに我々は HIF-1 の下流遺伝子の中から Pdk1(Pyruvate dehydrogenase kinase 1)に着目し、HIF-1 を介した Pdk1 の発現誘導こそが低酸素環境における代謝リプログラミングを制御していることを見出した。

(4)代謝リプログラミングと遊走能

低酸素環境下におけるマクロファージの遊走には、基質として特にグルコースが重要であり、代謝リプログラミングを阻害するとこの遊走能は有意に低下することが明らかとなった。また免疫染色の解析から、低酸素においてマクロファージの細胞内では lamellipodia, filopodia においてアクチンと解糖系酵素が近接して存在しており、遊走

能を発揮するには解糖系の亢進のみならず局在性も重要である可能性が示唆された。

また、腫瘍細胞やマトリゲルを用いた in vivo の実験系においても、グルコースの代謝リプログラミングを阻害することでマクロファージの浸潤が有意に低下することから、代謝リプログラミングがマクロファージの遊走能に重要な役割を果たしていることが示された。

(5)まとめ

本研究から、HIF-1 -PDK1 経路を介したグルコースの代謝リプログラミングが、マクロファージの機能制御に重要な役割を果たしていると考えられた。

以上の新規知見は、下記 5. の論文として発表した。

前述の如く、心血管病変は低酸素環境にあり、マクロファージはそのような低酸素領域へ遊走・集積して炎症性プロセスを惹起し、病態を進展させている。本研究はそのメカニズムの初動について明らかにしたものであり、現在はさらに研究を発展的させて、病的な心臓におけるマクロファージの役割について解析を進めている。本研究およびその関連研究は、拡張障害性の心不全治療の発展における基盤的研究となることが期待される。

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1件)

Semba H, Takeda N, Isagawa T, Sugiura Y, Honda K, Wake M, Miyazawa H, Yamaguchi Y, Miura M, Jenkins DM, Choi H, Kim JW, Asagiri M, Cowburn AS, Abe H, Soma K, Koyama K, Katoh M, Sayama K, Goda N, Johnson RS, Manabe I, Nagai R, Komuro I. "HIF-1 -PDK1 axis-induced active glycolysis plays an essential role in macrophage migratory capacity." *Nat Commun.* 7:11635. 2016. 査読あり

〔学会発表〕(計1件)

仙波宏章、HIF-1 -PDK1 経路を介した代謝リプログラミングによるマクロファージ遊走制御、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 25 日～27 日、仙台国際センター(宮城県仙台市)

〔図書〕(計1件)

仙波宏章、武田憲彦、慢性炎症と低酸素シグナル、炎症と免疫、2016 年 7 月号(Vol24 No.4)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）
該当事項なし
取得状況（計0件）
該当事項なし

〔その他〕

ホームページ等
特記事項なし

6．研究組織

(1)研究代表者

仙波 宏章（SEMBA, Hiroaki）
東京大学・医学部附属病院・登録研究員
研究者番号：80747923

(2)研究分担者

該当事項なし

(3)連携研究者

該当事項なし

(4)研究協力者

該当事項なし