

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：24402
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2019
課題番号：17K08958
研究課題名(和文)線維化組織における新生血管誘導の試み

研究課題名(英文)Angiogenesis in renal fibrosis

研究代表者

三浦 克之(Miura, Katsuyuki)

大阪市立大学・大学院医学研究科・名誉教授

研究者番号：00183624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素誘導因子HIFは組織の低酸素に順応すべく、解糖系、血管新生、造血等を促す転写因子である。本研究はマウス腎線維化モデルを用い、HIFがVEGFを介して血管新生を促し、腎線維化抑制に働く可能性と共に線維化におけるHIFの役割を検討した。HIF活性化薬は健常腎のVEGF発現を促進したが、HIF-1遺伝子の欠損、HIF活性化薬はVEGFの遺伝子発現に効果はなく、腎線維化におけるHIF経路の血管新生の関与は示せなかった。HIF-1遺伝子欠損、HIF活性化薬は線維化に影響を与えなかったが、腎線維化促進因子のPAI-1とCTGFは線維化腎においてHIF依存性に一過性に亢進することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末期腎不全では腎の線維化に伴い造血因子エリスロポエチン産生が低下し、腎性貧血が生じるため、エリスロポエチン製剤の注射が必要となる。このエリスロポエチン産生には転写因子の低酸素誘導因子HIFが必要で、このHIF安定剤が腎性貧血の治療薬として臨床応用されるようになった。HIFは腎線維化がその成因に深く関わる可能性がある。今回の研究は腎線維化におけるHIFの働きについて、特に血管新生と関連するかについて検討した。腎線維化でのHIFと関連した血管新生の役割は解明できなかったが、HIFに関連した線維化関連分子の役割を示すことが出来た。この結果はHIF安定剤の腎性貧血の臨床適応において貴重な情報となる。

研究成果の概要(英文)：Hypoxia inducible factors (HIFs) are transcription factors that mediate cellular adaptation to hypoxia by regulating gene expression of glycolytic enzymes, angiogenesis and hematopoiesis. Present study was conducted to examine the role of HIF in renal fibrogenesis and also to test if HIF-dependent VEGF expression is involved in the mechanism. Although HIF stabilizer stimulated VEGF gene expression in the intact kidney, neither HIF-1 gene ablation nor HIF stabilizer affected VEGF expression in the fibrotic kidney, thus we failed to demonstrate the role of HIF-dependent VEGF expression in attenuating renal fibrosis. Even though HIF-1 gene ablation or HIF stabilizer did not affect renal fibrosis, HIF-dependent acceleration of gene expression of profibrogenic molecules, PAI-1 and CTGF can be seen transiently. It is suggested that HIF-dependent profibrogenic mechanisms are operating at the early onset of renal fibrosis but its contribution declines with the progression of renal fibrosis.

研究分野：薬効安全性学

キーワード：腎線維化 低酸素 低酸素誘導因子 HIF-PHD阻害薬 血管新生 PAI-1 CTGF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

低酸素誘導因子 (Hypoxia-inducible factor:HIF) は嫌氣的解糖系や血管新生、造血反応の促進を介して低酸素環境に適応する転写因子である。我々は組織リモデリング過程における血管形成に関する研究を進める中で、HIFの活性化により血管形成を促進し創傷治癒を高めることを示してきた。創傷の治癒過程で組織の線維化が見られる。しかしながら過度に組織の線維化が進展していくと臓器機能が進行性に低下するが、血管の希薄化が臓器の線維化に関わっていることが示唆されている。従って HIF 機能を増強することで血管形成を促進し組織の線維化が改善する可能性が考えられた。事実、慢性腎不全モデルにおいて、HIF の機能を増強する PHD (prolyl -4-hydroxylase domain) 阻害薬が腎線維化を抑制することが示されている。また腎線維化モデルである一側尿管閉塞 (UUO) を用い、マクロファージの HIF-1 の機能は腎線維化の改善に働くことを報告した。

2. 研究の目的

低酸素誘導性の転写因子、低酸素誘導因子 HIF は血管内皮増殖因子 (VEGF) 誘導により血管新生を促進する。本研究は HIF-1 の機能を増強すると血管新生を促進し腎線維化に抑制的に働くとの仮説を立て、腎線維化のモデルである一側尿管閉塞 (UUO) マウスを用いて腎線維化における HIF の役割を検討した。

3. 研究の方法

腎線維化を評価するに当たり線維化モデルとしてマウス UUO モデルを用いた。

(1) HIF-1 欠損マウスを用いた検討

HIF-1 分子の遺伝子欠損は胎性致死であるため、Ubc-cre+/-;HIF-1 α ^{fllox/fllox} マウスを用いてタモキシフェン誘導性に HIF-1 α 遺伝子を全身性に欠損させたマウスを用いた。UUO 後、3 日目、7 日目、14 日目における腎組織遺伝子発現ならびに腎線維化の程度を評価した。なお、腎線維化は腎組織切片の collagen I または collagen III の免疫組織染色を行うことで評価した。

(2) PHD 阻害薬を用いて HIF 機能の増強の効果の検討

PHD 阻害薬 FG4592 を 12.5 mg/kg または 50 mg/kg 経口投与し、約 5 時間後に UUO モデルを作製、同用量を連日投与し、3 日目、7 日目における FG4592 の効果を検討した。

4. 研究成果

(1) HIF-1 欠損マウスを用いた検討

タモキシフェン投与により遺伝子改変マウスにおいて HIF-1 α mRNA 発現が消失したことから HIF-1 欠損マウスの確立を確認した。このマウスを用いて UUO を作製し経過を観察したところ、閉塞腎での VEGF の遺伝子発現は術後 3、7、14 日の何れの時点においても低下し、HIF-1 α 遺伝子欠損の影響は認めなかった。一方、HIF-1 α 欠損により術後 3 日目においては UUO 腎に見られた線維化促進因子の PAI-1、CTGF の遺伝子発現の亢進が減弱したが、その後、減弱効果は消失し HIF-1 α 欠損により腎線維化は影響を受けなかった (図 1)。線維化促進因子である PAI-1 および CTGF は既知の HIF 依存性遺伝子であるので、閉塞腎では早期に HIF-1 が活性化することにより、PAI-1、CTGF 遺伝子発現を促進することが考えられた。一方、VEGF の発現は HIF-1 欠損によっても変化が見られず、HIF-1 依存的な発現促進効果は認められなかった。また、腎線維化の早期に一過性に HIF-1 依存的な線維化促進因子の遺伝子発現促進効果が認められるものの腎線維化における HIF-1 の関与は明かではなかった。そして、当初、想定していた HIF-1 依存的な VEGF 発現は認められなかったことから、本モデルでは HIF-1 依存的な VEGF を介する血管形成促進効果を認めることは出来なかった。

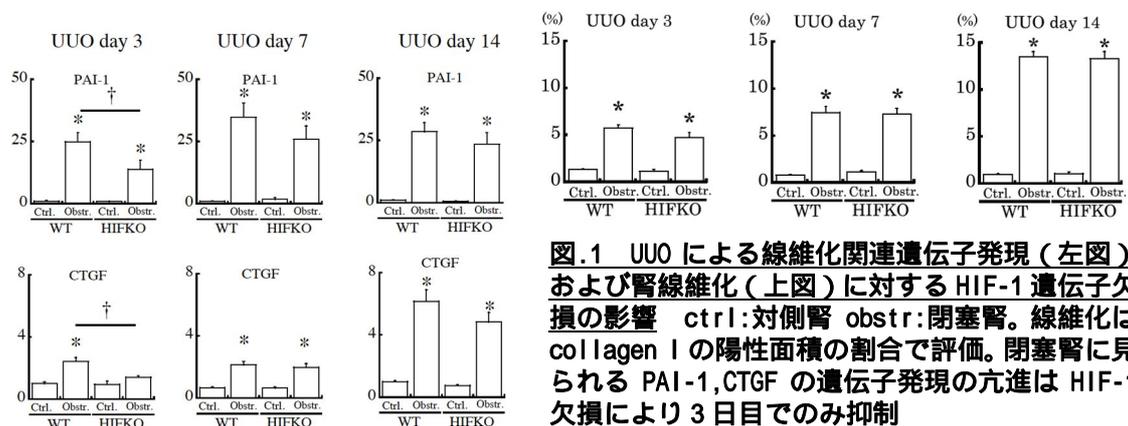


図 1 UUO による線維化関連遺伝子発現 (左図) および腎線維化 (上図) に対する HIF-1 遺伝子欠損の影響 ctrl: 対側腎 obstr: 閉塞腎。線維化は collagen I の陽性面積の割合で評価。閉塞腎に見られる PAI-1、CTGF の遺伝子発現の亢進は HIF-1 欠損により 3 日目でのみ抑制

(2) 腎線維化に対する PHD 阻害薬の影響

HIF 分解抑制薬である FG4592 の高用量の投与においてのみ UUO 腎に見られた PAI-1 および CTGF 遺伝子発現亢進は術後 3 日目で増強したが、7 日目にはこれらの増強作用は消失した。また何れの用量の FG4592 も腎線維化に影響しなかった (図 2)。

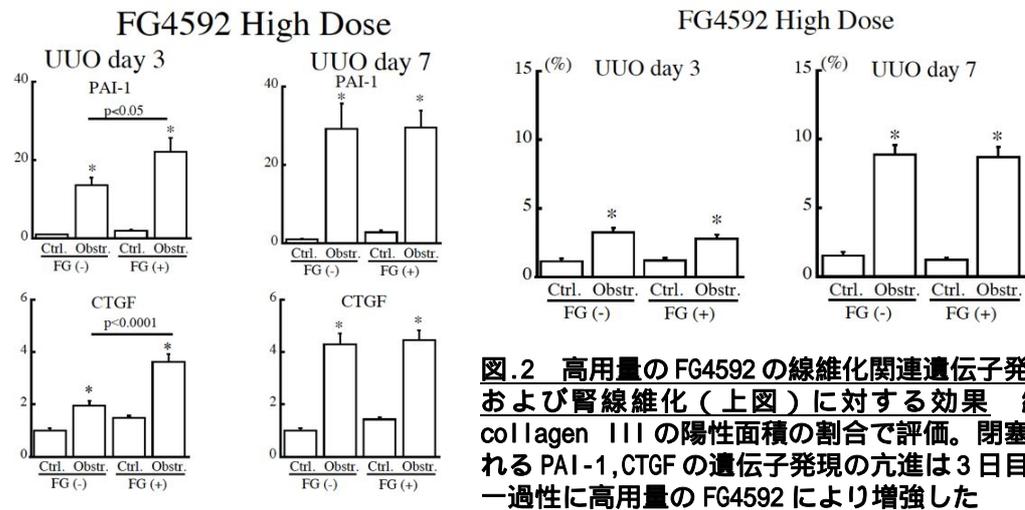


図.2 高用量のFG4592の線維化関連遺伝子発現(左図)および腎線維化(上図)に対する効果 線維化はcollagen IIIの陽性面積の割合で評価。閉塞腎に見られるPAI-1,CTGFの遺伝子発現の亢進は3日目において一過性に高用量のFG4592により増強した

高用量のFG4592による腎線維化促進因子PAI-1, CTGF 遺伝子発現の増強効果はHIF-1 欠損マウスにおける結果と時期的にも鏡像的であった。また何れの用量のFG4592 投与も腎線維化の指標であるcollagen Iの発現量には影響しなかった。一方、健常側の腎におけるVEGFの遺伝子発現は術後3日、7日共に高用量のFG4592によりのみ増強したが、UUO腎におけるVEGFの遺伝子発現には全く影響を与えなかった。従ってUUOにおける腎線維化の初期には一過性にHIF活性化が生じ、線維化促進因子のCTGF, PAI-1の発現が亢進すること、これらの効果はHIF分解抑制薬であるFG4592で増強することが明らかとなった。一方、HIF-1の活性化は線維化の進行と共に減弱することが示唆された(図3)。今回のモデルでは対側の正常腎では高用量のFG4592によりHIF依存性的にVEGFの発現亢進が認められるものの線維化腎ではHIF依存性的VEGF発現促進作用は認められなかった。このようにVEGFによる腎線維化の抑制効果は認めず、むしろHIF依存性的CTGF, PAI-1発現亢進により線維化促進性に働く可能性が示唆された。

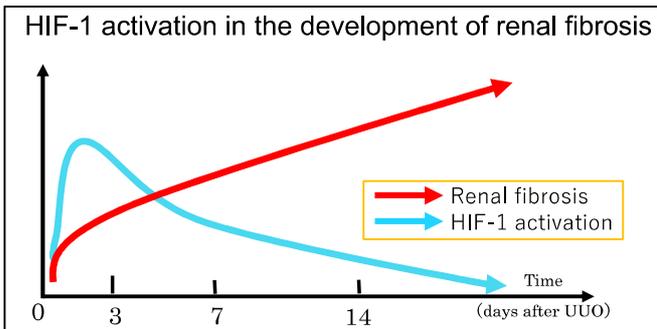


図.3 UUO腎における腎線維化の進行とHIFの活性化 線維化は経時的に進行するがHIF-1の活性化は一過性で時間経過と共に抑制される

FG4592は最近、腎性貧血の治療薬として臨床応用が開始されたが、今回、用いたFG4592の低用量は臨床で用いる最大用量に相当する。この用量では線維化促進因子の遺伝子発現には全く影響しなかった。さらに4倍量のFG4592

によっても一過性に線維化関連分子の発現亢進は認められるものの線維化の程度には影響しなかったことは安全性への懸念に貴重な情報となると考える。今回のモデルではFG4592の血管新生に対する効果を示すことは出来なかった。また、別のモデルによる実験として、我々はFG4592が脆弱で未熟構造をもつ腫瘍血管を構造的および機能的に正常に近い血管を変化させることを明らかにしている。腫瘍血管が正常化する機序には、Ly6C陰性マクロファージが寄与することも明らかにした。このことから病態によってHIF依存性的血管新生の制御や役割が異なるのかも知れない。本研究を通して、PHDの阻害を介してHIFの機能を増強するFG4592が線維化腎におけるVEGFの発現抑制機序については明らかでない。さらに腎組織線維化環境ではどのようにPHD-HIFシグナルの活性化が抑制させるのかについても引き続き今後の検討課題となる。

引用文献

Morimoto A. et al. Plast Reconstr Surg Glob Open 2: e132.(2014)
 Takaku M. et al. PLoS One 7: e42964.(2012)
 Tanaka, T. et al. Lab Invest 85: 1292-1307.(2005)
 Tateishi Y et al. J Pharmacol Sci 127: 181-189.(2015)
 Kabei K. et al.Y. J Pharmacol Sci 136: 31-38.(2018)
 Kabei K. et al. J Pharmacol Sci 142: 93-100.(2020)
 Beck, J. et al. Int J Toxicol 36: 427-439.(2017)
 Nishide S. et al. iScience 19: 940-954.(2019)

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 7件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Osada-Oka Mayuko, Hirai Sayaka, Izumi Yasukatsu, Misumi Kazuhiro, Samukawa Keiichi, Tomita Shuhei, Miura Katsuyuki, Minamiyama Yukiko, Iwao Hiroshi | 4. 巻 136 |
| 2. 論文標題 Red ginseng extracts attenuate skin inflammation in atopic dermatitis through p70 ribosomal protein S6 kinase activation | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences | 6. 最初と最後の頁 9~15 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2017.11.002 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Kabei Kazuya, Tateishi Yu, Nozaki Masakazu, Tanaka Masako, Shiota Masayuki, Osada-Oka Mayuko, Nishide Shunji, Uchida Junji, Nakatani Tatsuya, Tomita Shuhei, Miura Katsuyuki | 4. 巻 136 |
| 2. 論文標題 Role of hypoxia-inducible factor-1 in the development of renal fibrosis in mouse obstructed kidney: Special references to HIF-1 dependent gene expression of profibrogenic molecules | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences | 6. 最初と最後の頁 31~38 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2017.12.004 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Yamaguchi Takehiro, Watanabe Ayano, Tanaka Masako, Shiota Masayuki, Osada-Oka Mayuko, Sano Soichi, Yoshiyama Minoru, Miura Katsuyuki, Kitajima Shojiro, Matsunaga Shinji, Tomita Shuhei, Iwao Hiroshi, Izumi Yasukatsu | 4. 巻 139 |
| 2. 論文標題 A dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitor, linagliptin, attenuates cardiac dysfunction after myocardial infarction independently of DPP-4 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences | 6. 最初と最後の頁 112~119 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2018.12.004 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Kabei Kazuya, Tateishi Yu, Shiota Masayuki, Osada-Oka Mayuko, Nishide Shunji, Uchida Junji, Nakatani Tatsuya, Matsunaga Shinji, Yamaguchi Takehiro, Tomita Shuhei, Miura Katsuyuki | 4. 巻 142 |
| 2. 論文標題 Effects of orally active hypoxia inducible factor alpha prolyl hydroxylase inhibitor, FG4592 on renal fibrogenic potential in mouse unilateral ureteral obstruction model | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences | 6. 最初と最後の頁 93~100 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.12.002 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Osada-Oka Mayuko, Goda Nobuhito, Saiga Hiroyuki, Yamamoto Masahiro, Takeda Kiyoshi, Ozeki Yuriko, Yamaguchi Takehiro, Soga Tomoyoshi, Tateishi Yu, Miura Katsuyuki, Okuzaki Daisuke, Kobayashi Kazuo, Matsumoto Sohkiichi | 4. 巻 31 |
| 2. 論文標題 Metabolic adaptation to glycolysis is a basic defense mechanism of macrophages for Mycobacterium tuberculosis infection | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 International Immunology | 6. 最初と最後の頁 781 ~ 793 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxz048 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Nishide Shunji, Matsunaga Shinji, Shiota Masayuki, Yamaguchi Takehiro, Kitajima Shojiro, Maekawa Yoichi, Takeda Norihiko, Tomura Michio, Uchida Junji, Miura Katsuyuki, Nakatani Tatsuya, Tomita Shuhei | 4. 巻 19 |
| 2. 論文標題 Controlling the Phenotype of Tumor-Infiltrating Macrophages via the PHD-HIF Axis Inhibits Tumor Growth in a Mouse Model | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 iScience | 6. 最初と最後の頁 940 ~ 954 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.08.033 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Nishide Shunji, Uchida Junji, Matsunaga Shinji, Tokudome Kentaro, Yamaguchi Takehiro, Kabei Kazuya, Moriya Taiki, Miura Katsuyuki, Nakatani Tatsuya, Tomita Shuhei | 4. 巻 143 |
| 2. 論文標題 Prolyl-hydroxylase inhibitors reconstitute tumor blood vessels in mice | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences | 6. 最初と最後の頁 122 ~ 126 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2020.02.010 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kabei K., Osada-Oka M., Nozaki M., Shiota M., Tanaka M., Tomita S. and Miura K. |
| 2. 発表標題 The role of HIF-1 in the development of renal fibrosis in mouse UUO model with special reference to HIF-1 dependent gene expression. |
| 3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, July1-6, 2018, Kyoto, Japan (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kabei K., Uchida J., Tateishi Y., Nishide S., Kosoku A., Iwai T., Kuwabara N., Nakatani T. and Miura K. |
| 2. 発表標題 The new role of HIF-1 in the development of renal fibrosis in mouse UUO model |
| 3. 学会等名 27th International Congress of the Transplantation Society, June 30-July 5, Madrid (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Miura K., Kabei K., Tateishi Y., Osada-Oka M., Shiota M., Matsunaga S., Nishide S., Yamaguchi T. and Tomita S. |
| 2. 発表標題 Effects of hypoxia inducible factor alpha prolyl hydroxylase inhibitor on the development of renal fibrosis in mouse unilateral ureteral obstruction model. |
| 3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会 2019年3月14 - 16日、大阪 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kabei K., Nozaki M., Uchida J., Nakatani T., Tomita S. and Miura K. |
| 2. 発表標題 The role of HIF-1 in the development of renal fibrosis with special reference to HIF-1 dependent gene expression. |
| 3. 学会等名 ISN Frontiers Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Nishide S, Matsunaga S, Yamaguchi T, Takeda N, Uchida J, Miura K, Nakatani T and Tomita S |
| 2. 発表標題 Alteration the phenotype of tumor-infiltrating macrophages via the PHD-HIF axis inhibits tumor growth in mice. |
| 3. 学会等名 Keystone Symposia -Hypoxia: Molecules, Mechanisms and Disease- (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Matsunaga S, Nishide S, Shiota M, Yamaguchi T, Kitajima S, Miura K and Tomita S |
| 2. 発表標題 Prolyl Hydroxylase inhibitor repaired chemo-sensitivity through tumor blood vessel normalization in tumor mouse model. |
| 3. 学会等名 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 松永慎司、西出峻治、北島正二郎、山口雄大、塩田正之、三浦克之、富田修平 |
| 2. 発表標題 がん微小環境変化が抗癌剤感受性に与える影響の検討 |
| 3. 学会等名 第132回日本薬理学会近畿部会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 松永 慎司、西出 峻治、塩田 正之、山口 雄大、三浦 克之、富田 修平 |
| 2. 発表標題 瘍環境改変によるマクロファージ活性化機構の解明 |
| 3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 西出 峻治、松永 慎司、塩田 正之、山口 雄大、内田 潤次、仲谷 達也、三浦 克之、富田 修平 |
| 2. 発表標題 腫瘍における自然免疫系に対するPHD阻害薬の効果検討 |
| 3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/departments/bunshi-apt.shtml>
<http://www.med.osaka-cu.ac.jp/dept-pharmacology/>

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 | 富田 修平 (Tomita shuhei) (00263898) | 大阪市立大学・大学院医学研究科・教授 (24402) | |