

平成21年3月23日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590281
 研究課題名 (和文) 血管内皮細胞における低酸素シグナルによる炎症誘発性応答機構の解明
 研究課題名 (英文) Characterization of the evoked inflammation via hypoxic response in endothelial cells
 研究代表者
 富田 修平 (TOMITA SHUHEI)
 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授
 研究者番号：00263898

研究成果の概要：

生体が低酸素環境に曝されたときには、生体の主要な酸素供給経路に位置する血管内皮細胞 (EC) は、様々な病態疾患に伴う低酸素応答の仲介的存在であると考えられる。研究代表者らは、ECに発現する低酸素応答性転写因子 ARNT 遺伝子を欠失させたマウスを作製・利用することにより、生体内の炎症に細胞内低酸素応答がどのように関与するのかを解析した。その結果、ECの低酸素応答は、生体の炎症惹起に寄与している可能性が示された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医科学一般

キーワード：高次生命医学

1. 研究開始当初の背景

生体が低酸素環境に曝されたときには、生体の主要な酸素供給経路に位置する血管内皮細胞 (EC) は、様々な病態疾患に伴う低酸素応答の仲介的存在であると考えられる。ECは低酸素条件下では、抗凝固性の性質は減少し、細胞の透過性と血球の接着性が増加し、結果的に血管内を炎症誘発性の環境に変化させることが報告されている。これまでにこれらのECに観られる個々の表現型の制御機構は解明されてきたが、低酸素環境がどのような制御メカニズムを介してこれら表現型の制御機構にリンクしているのかは明らかでない。その理由のひとつには、生体内低酸素環境にあるECを含め各細胞集団の低酸素応答の多様性にあるものと考えられる。そこで、我々は、独自に開発したEC特異的

ARNT 遺伝子欠失マウスを利用することにより、ECに限局した低酸素不応答性環境で炎症病態モデルを構築し、生体内環境でしかもECに限局した低酸素応答を評価することを試みた。本変異マウスでは、低酸素シグナルの要の転写因子である HIF-1 と HIF-2 の両シグナルの不活化を目的にそれぞれの alpha サブユニットと共有会合する ARNT 分子を EC 特異的に欠失させた。現在、このマウスの表現型の詳細な解析を進めている。

2. 研究の目的

本研究課題では、生体の低酸素応答において初期応答細胞のひとつとして EC に焦点を当て低酸素シグナルを介する様々な生体応答への変換システムを解明し、低酸素応答破綻に伴う病態の早期発見と治療に関する基

盤研究を行なう。具体的には、独自に開発した EC 特異的 ARNT 遺伝子欠失マウスを利用することにより、生体内環境における低酸素シグナルによる EC の炎症誘発性変化の発生機序を解明する。それらの結果をもとに低酸素応答の破綻に伴う様々な病態の新規治療法の分子基盤の確立を目指す。

3. 研究の方法

(1)血管内皮細胞 (EC) 特異的 ARNT 欠失マウス (Tie2-Cre;ARNT マウス) の表現型解析

胎生時期 (胎生 18 日) の EC の表現型の有無を解析するために、まず、EC のマーカー (Flk-1, CD34) および血液細胞のマーカー (CD45) にて EC 前駆細胞を同定し、造血組織 (胎仔肝臓) での EC 前駆細胞集団の分化・増殖および形態変化および胎仔血管形成について、FACS 解析および形態学的解析を行なう。

成体時期の EC の表現型について、まず骨髄での EC 前駆細胞集団の分化・増殖および形態変化を解析する。次に、これまでに既に明らかにしてきた表現型である肝臓・心臓・肺組織での炎症症状について、各組織周囲の EC の形態学的変化を中心に、①血管透過性変化 (VEGF, Angiopoietin など)、②細胞間の情報の変化 (cadherin, VCAM-1 などの接着分子群)、③活性酸素種・窒素種の発生 (8hydroxy2' deoxyguanosine 投与による N45.1 抗体による同定)、④多認識型受容体の発現 (scavenger receptor, TLRs など) について、免疫組織学的評価を行なう。また、抗 CD31 抗体の免疫学的単離により EC を肺組織から採取し、EC の分化・増殖について解析する。また、上記各項目マーカーについてその発現量を解析することにより EC の機能を評価する。

(2)本変異マウスを利用した病態モデルの確立とその解析

この変異マウスをもとに下記の病態モデルを確立して(1)と同様の実験を行なうことにより疾患病態に伴う低酸素環境下での EC の機能を評価する。同時に低酸素マーカー (Hypoxiaprobe-1) で低酸素領域を同定する。①創傷治癒実験: 抗 CD31 抗体による治癒後の形成された血管密度を免疫組織学的解析により評価する。②腫瘍移植実験: Lewis 肺癌細胞移植後の形成された腫瘍のサイズ、および EC の増殖と血管形成を評価する。③ARDS (adult respiratory distress syndrome) モデル実験: 抗 MHC I 抗体の投与による炎症モデルにて肺組織における EC の機能評価を同様に行なう。

(3)変異マウス骨髄キメラマウスの表現型解析

また、本変異マウス成体の表現型により(2)の病態解析が困難である場合には、放射線照

射後に変異マウス骨髄移植した正常成体マウスを用いることにより病態モデルを確立して同様の解析を行なう。

(4)分離 EC 培養の低酸素条件下における ARNT 機能解析

生体内での低酸素環境が直接 EC に作用することによりどのような炎症誘発性の低酸素応答を引き起こしているのかどうかを調べるために、抗 CD31 抗体を用いた免疫学的分離法により肺組織 EC を採取して、培養条件下の EC の ARNT 分子の機能を解析する。変異マウスからの EC が十分採取できない場合には、ARNT-floxed マウスから EC を採取後、アデノウイルスベクターによる Cre 遺伝子の導入した ARNT 遺伝子欠失 EC を得て本実験に使用する。採取された EC の培養では、コラーゲンコートした半透膜上に EC を単層培養したチャンバーを採用する。分離された EC を低酸素の培養条件で、機能獲得型解析

(HIF-1/2 および ARNT 遺伝子過剰発現系による) および機能欠失型解析 (HIF-1/2 遺伝子ノックダウンによる) を含めて下記の3点について解析を進める。①血管透過性変化および接着分子発現変化: 形態学的解析及び各種関連因子の発現 (VEGF, TNF α , IFN γ , Interleukin- α and - β , integrins, cadherins など) について網羅的に検討する。②活性酸素種・窒素種の測定: 蛍光プローブ (HydroxyphenylFluorescein (HPF)/Aminophenyl Fluorescein (APF)) を用いた蛍光イメージング解析、蛍光測定解析をする。③炎症関連の多認識型受容体の発現解析: 関連遺伝子 (scavenger receptor, TLRs など) の網羅的発現解析を行なう。これらの EC の低酸素応答変化が、HIF シグナルにおいてどのような位置付けにあるのかを検討する。

4. 研究成果

本変異マウスでは、低酸素シグナルの要の転写因子である HIF-1 と HIF-2 の両シグナルの不活化を目的にそれぞれの alpha サブユニットと共有会合する ARNT 分子を EC 特異的に欠失させた。申請者は、上記マウスを利用した肺高血圧症モデルを作製し、肺動脈の血管リモデリングの様子を解析した。

モノクロタリン (MCT) による肺高血圧症病態モデルでは、肺小動脈の炎症細胞浸潤を含む炎症と血管中膜肥厚を伴う血管リモデリングが観察された (図 1)。またそれに起因すると考えられる右心負荷を呈した (図 2)。一方、EC の ARNT 欠失は、肺性高血圧症に伴う血管リモデリングを起こしにくいことが明らかとなった。これらの結果より血管内皮細胞の ARNT 分子を介した情報伝達が肺高血圧症発症に関与していることが示唆された。

図 1

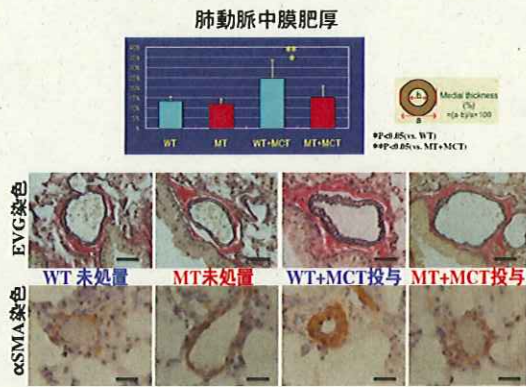
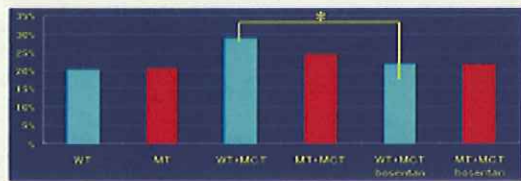


図 2

右室重量比 RV/(LV+IVS)



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 13 件)

1. Motobayashi Y, Izawa-Ishizawa Y, Ishizawa K, Orino S, Yamaguchi K, Kawazoe K, Hamano S, Tsuchiya K, Tomita S and Tamaki T: Adiponectin inhibits insulin-like growth factor-1-induced cell migration via the suppression of extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation, but not Akt in vascular smooth muscle cells. *Hypertens Res* 32:188-193 (2009) 査読あり.
2. Sultana DA*, Tomita S*, Hamada M, Iwanaga Y, Kitahama Y, Nguyen VK, Hirai S, Ohigashi I, Nitta S, Amagai T, Takahashi S and Takahama Y (*These two authors equally contributed to this work.): Gene expression profile of third pharyngeal pouch reveals role of mesenchymal MafB in embryonic thymus development. *Blood in press* (2009) 査読あり.
3. Ishizawa K, Izawa-Ishizawa Y, Ohnishi S, Motobayashi Y, Kawazoe K, Hamano S, Tsuchiya K, Tomita S, Minakuchi K, and Tamaki T: Quercetin Glucuronide Inhibits Cell Migration and Proliferation by Platelet-Derived Growth Factor in Vascular Smooth Muscle Cells. *J Pharmacol Sci* 109:257-264 (2009) 査読あり.
4. Ishizawa K, Yamaguchi K, Horinouchi Y,

Fukuhara Y, Tajima S, Hamano S, Tomita S, Tsuchiya K, and Tamaki T: Drug discovery for overcoming CKD: Development of drugs on endothelial cell protection for overcoming CKD. *J Pharmacol Sci*. 109:14-19 (2009) 査読あり.

5. 富田修平, 玉置俊晃 『低酸素応答転写因子の組織リモデリングへの関与』, *日薬理誌* 133:298 (2009) 査読なし.

6. Sato, S., Shirakawa, H., Tomita, S., Ohsaki, Y., Haketa, K., Tooi, O., Santo, N., Tohkin, M., Furukawa, Y., Frank J. Gonzalez and Komai, M. Low-dose dioxins alter gene expression related to cholesterol biosynthesis, lipogenesis, and glucose metabolism through the aryl hydrocarbon receptor-mediated pathway in mouse liver. *Toxicol Appl Pharmacol* 229:10-19 (2008) 査読あり.

7. Iwanaga Y, Ueno M, Ueki M, Huang CL, Tomita S, Okamoto Y, Ogawa T, Ueda N, Maekawa N and Sakamoto H: The expression of osteopontin is increased in vessels with blood-brain barrier impairment. *Neuropathol Appl Neurobiol* 34:145-154 (2008) 査読あり.

8. Shibata A, Nakagawa K, Sookwong P, Tsuduki T, Tomita S, Shirakawa H, Komai M, and Miyazawa T: Tocotrienol inhibits angiogenic factors secretion from human colorectal adenocarcinoma cells via suppressing hypoxia inducible factor-1 α . *J Nutr* 138:2136-2142 (2008) 査読あり.

9. Kanematsu Y, Yamaguchi K, Ohnishi H, Motobayashi Y, Ishizawa K, Izawa Y, Kawazoe K, Kondo S, Kagami S, Tomita S, Tsuchiya K and Tamaki T: Dietary doses of nitrite restore the circulating nitric oxide level and improve renal injury in L-NAME-induced hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 295:F1457-1462 (2008) 査読あり.

10. Ohnishi H, Iwanaga S, Kawazoe K, Ishizawa K, Orino S, Tomita S, Tsuchiya K, Kanematsu Y, Harada N, Mori K, Ishikawa Y and Tamaki T: Effect of iron-quercetin complex on reduction of nitrite in vitro and in vivo system. *J Agric Food Chem* 56:10092-10108 (2008) 査読あり.

11. 石澤啓介, 三木恵里加, 石澤有紀, 大西秀樹, Narantungalag Dorjsuren, 元林有紀, 山口邦久, 土屋浩一郎, 富田修平, 玉置俊晃 『PDGF によるメサンギウム細胞遊走に対するオルメサルタンの抑制効果とその分子機構』, *血管* 31:59-64 (2008) 査読あり.

12. Sano M, Minamino T, Toko H, Miyachi H, Orimo M, Qin Y, Akazawa H, Tateno K,

Kayama Y, Harada M, Shimizu I, Asahara T, Hamada H, Tomita S, Molkentin JD, Zou Y and Komuro I: p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature* 446:444-448 (2007) 査読あり.

13. Izawa Y, Yoshizumi M, Ishizawa K, Fujita Y, Kondo S, Kagami S, Kawazoe K, Tsuchiya K, Tomita S and Tamaki T: Big Mitogen-Activated Protein Kinase 1 (BMK1)/extracellular signal regulated kinase 5 (ERK5) is involved in platelet-derived growth factor (PDGF)-induced vascular smooth muscle cell migration. *Hypertens Res* 30:1107-1117 (2007) 査読あり.

〔学会発表〕(計22件)

1. 浦田将久、福原弥生、富田修平、黒部裕嗣、吉田 誉、石澤啓介、北川哲也、玉置俊晃 肺高血圧症モデルマウスにおける血管内皮細胞の低酸素応答転写因子(HIF1- β)の役割(2009)第38回日本心臓血管作動物質学会 岡山
2. 富田修平、黒部裕嗣、玉置俊晃 動脈硬化病態進展におけるT細胞の低酸素応答性因子の役割(2009)第5回宮崎サイエンスキャンプ 宮崎
3. 富田修平、山口邦久、石澤啓介、今村優子、福原弥生、土屋浩一郎、玉置俊晃 Hypoxia-inducible factor-1の機能不全は腎虚血再灌流障害の回復を妨げる(2009)第82回日本薬理学会年会 横浜
4. 福原弥生、石澤啓介、堀ノ内裕也、山口邦久、富田修平、土屋浩一郎、玉置俊晃 ヒト血管内皮細胞における細胞接着分子発現に対するnifedipine代謝物の影響(2008)第51回日本腎臓学会学術総会 福岡
5. 黒部裕嗣、富永崇司、来島敦史、北市隆、早瀬康信、長嶋光樹、富田修平、江川善康、高浜洋介、北川哲也 乳児期早期心臓・大血管手術時の胸腺摘除による術後免疫細胞発生の検討(2008)第27回日本胸腺研究会 さいたま
6. 土屋浩一郎、大西秀樹、岩永智史、堀之内裕也、田島壮一郎、三口弘介、石澤啓介、山口邦久、浜野修一、富田修平、玉置俊晃 食餌性亜硝酸による生体内NO生成における鉄イオンの役割(2008)第113回日本薬理学会近畿支部会 岡山
7. 恒石鉄平、石澤啓介、福原弥生、Narantungalag Dorjsuren、大野呂知浩、山口邦久、富田修平、土屋浩一郎、玉置俊晃 高血圧ラットモデルにおけるnifedipine代謝物による臓器保護作用の検討(2008)第113回日本薬理学会近畿支部会 岡山
8. 浦田将久、富田修平、黒部裕嗣、吉田 誉、石澤啓介、Frank Gonzalez、北川哲也、玉置

俊晃 肺高血圧症モデルマウスにおける血管内皮細胞の低酸素応答転写因子(HIF1- β)の役割(2008)第29回日本炎症再生医学会年会 東京

9. 富田修平 腎虚血再灌流障害における低酸素応答性転写因子の分子解析の試み(2008)第16回大阪市大フォーラム 大阪

10. 富田修平、黒部裕嗣、浦田将久、福原弥生、石澤有紀、神原保、石澤啓介、土屋浩一郎、北川哲也、玉置俊晃 動脈硬化の病態進展におけるT細胞のHIF-1 α の役割(2008)第114回日本薬理学会近畿支部会 神戸

11. 濱本磨以、久住祥子、富澤彩智、田島壮一郎、石澤啓介、富田修平、山口邦久、庄野正行、吉村好之、滝口祥令、土屋浩一郎、玉置俊晃 蛍光色素PhenGreenSKを用いた細胞内遊離Ca²⁺測定法(2008)第20回腎とフリーラジカル研究会 大阪

12. 石澤啓介、福原弥生、堀ノ内裕也、恒石鉄平、山口邦久、富田修平、土屋浩一郎、玉置俊晃 L-NAME慢性投与ラットにおける臓器障害に及ぼすnifedipine代謝物の影響(2008)第18回日本循環薬理学会 千葉

13. 佐藤祥子、白川仁、富田修平、駒井三千夫 低容量ダイオキシンによる脂質代謝に関する遺伝子の発現変化(2008)第31回日本分子生物学会第81回日本生化学会合同大会 神戸

14. Inoue, M., Takeda, T., Endo, H., Tomita, S. Hypoxia-inducible factor-1 α is a tumor suppressor in early stages in a mouse model of multi-step islet carcinogenesis. Keystone Symposia (Molecular, Cellular, Physiological, and Pathogenic Responses to Hypoxia), Vancouver, British Columbia, 2008.

15. Yamaguchi K, Ishizawa K, Tomita S, Tsuchiya K, Kondo S, Kagami S, Tamaki T. Hypoxia-Inducible Factor-1 α Ameliorates Ischemic Acute Renal Failure and Has a Relation with a Recovery from Acute Tubular Necrosis. Annual meeting for American Society of Nephrology, Philadelphia, Pennsylvania, 2008.

16. 黒部裕嗣、富永崇司、来島敦史、早瀬康信、長嶋光樹、富田修平、江川善康、北川哲也、高浜洋介 新生児期胸腺摘除が免疫形成に与える影響(2007)第26回日本胸腺研究会 徳島

17. 平井宗一、富田修平、Nguyen Van Khang、高浜洋介 胸腺初期発生における低酸素応答の役割(2007)第6回四国免疫フォーラム 愛媛

18. 富田修平、Dil Afroz Sultana、平井宗一、Nguyen Van Khan、濱田理人、高橋智、

高浜洋介 第三咽頭嚢発現遺伝子の探索から明らかになった MafB の胸腺発生への関与 (2007) Kyoto T Cell Conference 京都

19. TOMITA Shuhei, SULTANA DilAfroz, HIRAI Shuichi, KHANG Nguyen Van, TAKAHASHI Satoru, TAKAHAMA Yousuke Role of MafB in the development of the thymus (2007) 第37回日本免疫学会総会 品川

20. HIRAI Shuichi, TOMITA Shuhei, NGUYEN Van Khang, TAKAHAMA Yousuke The role of HIF-1 in fetal thymus development (2007) 第37回日本免疫学会総会 品川

21. 佐藤祥子、白川仁、富田修平、駒井三千夫 ヒトメタロチオネイン 2A 遺伝子の転写制御に関する Ah レセプターとグルココルチコイドレセプターの相互作用 (2007) 第30回日本分子生物学会第80回日本生化学会合同大会 横浜

22. Kurobe, H., Urata, M., Izawa, Y., Fukuhara, Y., Kanbara, T., Aihara, K. I., Akaike, M., Gonzalez, F., Matsumoto, T., Tamaki, T., Kitagawa, T., Yoshizumi, M., Tomita, S., Hif-1 α in T cells plays a crucial role in the progression of arteriosclerosis and artery intimal thickening. AHA Scientific Sessions, Orlando, Florida, 2007.

〔図書〕 (計3件)

1. 大西秀樹, 土屋浩一郎, 田島壮一郎, 堀ノ内裕也, 山口邦久, 石澤啓介, 富田修平, 玉置俊晃 『ハイドロエチジウム蛍光分析法による細胞内スーパーオキシド検出法の評価』, 腎とフリーラジカル 9:37-41 (2008).

2. 石澤啓介, 三木恵里加, 石澤有紀, 大西秀樹, Narantungalag Dorjsuren, 元林有紀, 山口邦久, 土屋浩一郎, 富田修平, 玉置俊晃 『オルメサルタンは PDGF によるメサンギウム細胞遊走を抑制する』, 腎とフリーラジカル 9:172-175 (2008).

3. 富田修平 『中枢神経系と血管形成』 Vascular Biology Update, 医学のあゆみ 223:1219-1223 (2007).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 修平 (TOMITA SHUHEI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号: 00263898

(2) 研究分担者

玉置 俊晃 (TAMAKI TOSHIAKI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号: 80179879

(3) 研究協力者

石澤 啓介 (ISHIZAWA KEISUKE)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号: 60398013

浦田 将久 (URATA MASAHISA)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・大学院生

福原 弥生 (FUKUHARA YAYOI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・大学院生