

平成21年 5月18日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790078

研究課題名（和文） 低酸素で誘導されるマクロファージへの分化と活性化

研究課題名（英文） Hypoxia stimulates the differentiation from monocytes into macrophages, increasing to phagocytosis activity

研究代表者 岡 真優子 (OKA MAYUKO)
 大阪市立大学・大学院医学研究科・研究員
 研究者番号 40347498

研究成果の概要：

単球からマクロファージへの分化は、macrophage colony-stimulating factorの分化因子により誘起されることが知られているが、分化因子をマクロファージ自身が産生するなど、その分化機構には不明な点が多い。そこで、今回、マクロファージの集積する部位が低酸素であることに着目し、低酸素状態でのhypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)の発現と単球の化学的性質の変化や単球からマクロファージへの分化の機構との関連について検討した。その結果、低酸素によりHIF-1 α 依存的な分化に関わる遺伝子の誘導が明らかになった。また、マクロファージだけでなく単球においても低酸素状態で食作用が促進された。これらの結果は、低酸素による単球からマクロファージへの分化の可能性を示唆する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	0	2,000,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：低酸素、マクロファージ、hypoxia-inducible factor-1 α 、分化、PPAR- γ 、
動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

低酸素ストレスは、癌や炎症などの進展に関与することが知られており、特に低酸素状

態下で引き起こされる血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) やサイトカインなどの遺伝子の誘導がその病態の進展に寄与していると考え

えられている。低酸素状態では、これら以外にも多くの遺伝子が誘導されるが、この誘導には hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) の転写因子が関与している。HIF-1 は、HIF-1 α と HIF-1 β のヘテロ二量体からなり、核に常在する HIF-1 β に対して、低酸素での安定化により発現が増大して核内へ移行する HIF-1 α が転写調節の重要な役割を担っている。

癌・炎症および動脈硬化巣に見られる共通点は、低酸素であることに加えてマクロファージの存在である。マクロファージは、侵入した微生物を貪食して感染を防御する作用や、老化した細胞を取り除く重要な役割をもつ。一方、動脈硬化病巣部に存在するマクロファージは、脂質を貪食して泡沫細胞となり脂質コアを形成するため、病態の悪化因子として働く。また、炎症巣のマクロファージは、このような貪食作用に加え、サイトカインなどを分泌する細胞として働くことにより、正常の組織細胞にも障害作用を示す。これまでマクロファージによる病態の進展について多くの研究が行われてきたが、低酸素状態にある病巣部に侵入し集積する単球とマクロファージの生態について十分に明らかにされていない。単球からマクロファージへの分化は、macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)により誘起されることが知られているが、分化因子をマクロファージが産生するなど、その分化機構には不明な点が多い。

申請者は、動脈硬化の病巣部が低酸素であり、マクロファージが集積する部位であることに着目し、マクロファージへの分化に酸素濃度が関与しているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、単球系の培養細胞を用い、低酸素下での遺伝子の発現・貪食作用を評価して単球からマクロファージへの分化の機構を明らかにすることである。“マクロファージの分化と活性化のメカニズム”を明らかにすることにより、病巣部に蓄積するマクロファージの活性化をコントロールすることができ、マクロファージの分化を抑制することで病態の悪化を軽減できる可能性が考えられる。そこで、今回、ヒト単球系 THP-1 細胞と THP-1 由来マクロファージを用いて低酸素状態での HIF-1 α の発現と単球の化学的性質の変化や単球からマクロファージへの分化の機構との関連について検討した。これらを明らかにすることは、組織に浸潤した単球のマクロファージへの分化を引き金として発症する様々な病態の進展機構を解明する手がかりとなる。

3. 研究の方法

ヒト白血病由来単球系細胞 (THP-1) を hypoxia (1% O₂, 5% CO₂) で培養し、遺伝子の

発現変化をマイクロアレイ法および RT-PCR 法にて解析した。また、THP-1 細胞での低酸素下による HIF-1 α の活性化を siRNA 法で抑制し、遺伝子の発現への影響を検討した。さらに、蛍光ビーズ (Zymosan) を用いて低酸素下でのマクロファージの貪食作用を FACS 法で解析した。

4. 研究成果

今回、マイクロアレイ法によりヒト遺伝子 (54,675) の発現変化について調べた。細胞の分化に関わる 1,473 遺伝子のうち 32 遺伝子の発現が、6 時間の低酸素により増大した。この中には、マクロファージの機能に重要な役割を持つスカベンジャー受容体 CD36 と、その発現制御に関わる peroxisome proliferator activated receptor- γ (PPAR- γ) が含まれていた。さらに、Western blot 法で解析したところ、両タンパク質量が共に 6 時間および 12 時間の低酸素により増大していた。そこで、HIF-1 α 発現抑制 THP-1 細胞での CD36 と PPAR- γ の発現におよぼす低酸素の影響を調べた。野生株細胞に比べて HIF-1 α 発現抑制 THP-1 細胞における低酸素下での 2 つの遺伝子 (CD36 および PPAR- γ) の mRNA 発現は低かった。このことから、2 つの遺伝子の mRNA は HIF-1 α 依存的に誘導されていることが示唆された。次に、12 時間および 24 時間の低酸素状態では常酸素状態にくらべ、単球系 THP-1 細胞による Zymosan の貪食作用が促進された。THP-1 由来マクロファージもまた、低酸素により貪食能が促進された。

本研究結果から、酸素状態では、マクロファージの分化マーカーである PPAR- γ が HIF-1 α 依存的に誘導されることが明らかになった。また、低酸素は、単球からマクロファージへの分化を誘導し、貪食作用を促進する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 8 件)

1. Osada-Oka M, Ikeda T, Akiba S, Sato T. Hypoxia stimulates the autocrine regulation of migration of vascular smooth muscle cells via HIF-1 α -dependent expression of thrombospondin-1. *J Cell Biochem.*, 104, 1918-1926 (2008)

2. Suzuki S, Ogura A, Osada-Oka M, Funae Y, Imaoka S. Epoxyeicosatrienoic acids and/or their metabolites promote hypoxic response of cells. *J Pharmacol Sci.*, 108, 79-88 (2008)

3. Ii H, Hontani N, Toshida I, Oka M, Sato T, Akiba S. Group IVA phospholipase A₂-associated

production of MMP-9 in macrophages and formation of atherosclerotic lesions. *Biol. Pharm. Bull.*, 31, 363-368 (2008)

4. Li H, Oka M, Yamashita A, Waku K, Uozumi N, Shimizu T, Sato T, Akiba S. Inhibition of cytosolic phospholipase A₂ suppresses production of cholesteryl ester through the reesterification of free cholesterol but not formation of foam cells in oxidized LDL-stimulated macrophages. *Biol. Pharm. Bull.*, 31, 6-12 (2008)

5. Osada-Oka M, Ikeda T, Imaoka S, Akiba S, Sato T. VEGF-enhanced proliferation under hypoxia by an autocrine mechanism in human vascular smooth muscle cells. *J Atheroscler Thromb.*, 15, 26-33 (2008)

6. Takahashi M, Osada-Oka M, Ikeda T, Akiba S, Sato T. Role of thrombospondin-1 in hypoxia-induced migration of human vascular smooth muscle cells. *Yakugaku Zasshi*, 128, 377-383 (2008)

7. Sawada T, Kubo T, Osada-Oka M, Imaoka S. Effects of ligands for Ah receptor on hypoxic response of cells. *Organohalogen Compounds*, 69, 1916-1919 (2007)

8. Akiba S, Yamaguchi H, Kumazawa S, Oka M, Sato T. Suppression of oxidized LDL-induced PDGF receptor β activation by Ginkgo Biloba extract reduces MMP-1 production in coronary smooth muscle cells. *J Atheroscler Thromb.*, 14, 219-225 (2007)

[学会発表](計 16件)

1. 岡 真優子, 小林和夫, 松本壮吉: 結核菌感染マクロファージにおける hypoxia-inducible factor-1 α の作用機構. 第82回日本細菌学会総会 (名古屋), 2009. 3. 13

2. 岡 真優子, 高塚正樹, 尾関百合子, 吉村満美子, 小林和夫, 松本壮吉: Mycobacterial DNA-binding protein-1の新機能 - 鉄の酸化活性と貯蔵性 -. 第7回感染症沖縄フォーラム (那覇), 2009. 2. 12

3. 吉村満美子, 仁木 誠, 岡 真優子, 尾関百合子, 原田 誠, 田丸亜貴, 立石善隆, 西内由紀子, 小林和夫, 松本壮吉: 抗酸菌の休眠誘導と遺伝子発現解析. 第7回感染症沖縄フォーラム (那覇), 2009. 2. 13

4. 岡 真優子, 寺坂美咲, 夏目優太郎, 松本壮吉, 佐藤隆司: 低酸素状態におけるマクロファージへの分化と hypoxia-inducible factor-1 α の役割. 第6回がんとハイボキシア研究会 (広島), 2008. 11. 29

5. Osada-Oka M, Terasaka M, Natsume Y, Akiba S, Sato S: Hypoxia stimulates the differentiation into macrophages, increasing to PPAR- γ expression and phagocytosis activity in THP-1 cells. International Society on Oxygen Transport to Tissue 2008 (Sapporo), 2008. 8. 3

6. 岡 真優子, 高橋 稔, 秋葉 聡: 低酸素による転写因子 hypoxia-inducible factor-1 α の核移行を制御するホスホリパーゼ A₂ 分子種の同定. 第55回日本生化学会近畿支部例会 (大阪), 2008. 5. 24

7. 岡 真優子, 新田千徳, 高台真太郎, 南山幸子, 竹村茂一, 秋葉 聡, 佐藤隆司: 低酸素状態での肝星細胞の活性化と肝線維化促進因子の誘導. 日本薬学会第128年会 (横浜), 2008. 3. 27

8. 八木聖子, 岡 真優子, 喜多春菜, 秋葉 聡, 佐藤隆司: 酸化LDLによるAT1受容体を介したEGF受容体のトランスアクチベーション作用. 日本薬学会第128年会 (横浜), 2008. 3. 27

9. 塩尻正俊, 岡 真優子, 矢野桃子, 橋本香織, 佐藤健司, 秋葉聡, 佐藤隆司: 緑豆ペプチドによる血管平滑筋細胞遊走阻害効果に関する検討. 日本薬学会第128年会 (横浜), 2008. 3. 26

10. Osada-Oka M, Takahashi M, Akiba S, Sato T: Role of iPLA₂ γ in the translocation of hypoxia-inducible factor-1 α to the nucleus. Keystone symposia: Molecular, cellular, physiological and pathogenic responses to hypoxia. (Vancouver, Canada), 2008. 1. 18

11. Osada-Oka M, Takahashi M, Akiba S, Sato T: Role of iPLA₂ γ in the translocation of hypoxia-inducible factor-1 α to the nucleus under normoxic and hypoxic conditions. JST-ERATO Yamamoto Environmental Response Project International Symposium "The environmental response" (つくば), 2007. 12. 21

12. 新田千徳, 岡 真優子, 秋葉 聡, 佐藤隆司: 低酸素状態での星細胞の活性化と hypoxia-inducible factor-1 α に依存した肝線維化促進因子の誘導. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 (横浜), 2007. 12. 12

13. 岡 真優子, 秋葉 聡, 佐藤隆司: 低酸素により誘導されるマクロファージへの分化と hypoxia-inducible factor-1 alpha の役割. 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 (横浜), 2007. 12. 12

14. 八木聖子, 岡 真優子, 喜多春菜, 秋葉 聡, 佐藤隆司: 酸化LDLのAT1受容体を介したトランスアクチベーション作用によるマクロファージ

の泡沫化 . 第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会 (横浜), 2007. 12. 11

15. 岡 真優子、池田貴子、秋葉 聡、佐藤隆司: 低酸素によるNADPH-P450 reductase依存的なVEGFの発現と血管平滑筋細胞の増殖 . 第39回日本動脈硬化学会総会・学術集会 (大阪), 2007. 7. 13

16. 岡 真優子、喜多春菜、八木聖子、秋葉聡、佐藤隆司: 酸化LDLによるマクロファージの泡沫化におけるAT1受容体の役割 . 第8回Pharmacology-Hematology シンポジウム (金沢), 2007. 6. 7

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

岡 真優子 (OKA MAYUKO)

大阪市立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号 40347498

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし