

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790679

研究課題名 (和文) 血管新生病の病態解明と新規治療法開発

研究課題名 (英文) Understanding of pathophysiology of angiogenesis-mediated diseases and development of novel therapy

研究代表者

岡本 健作 (OKAMOTO KENSAKU)

旭川医科大学・医学部 助教

研究者番号：80396879

研究成果の概要：マウス由来の培養細胞で、HIF-1 $\alpha$ の低酸素・Fe キレート剤や CoCl<sub>2</sub> による時間依存的安定化を確認し、HIF-1 $\alpha$ を特異的にノックダウンする siRNA の発現系を構築中。Real-time PCR による HIF-1 標的遺伝子発現の定量的解析、HIF-1 $\alpha$ をノックダウンする siRNA、構成的活性型 HIF-1 $\alpha$ 、およびドミナント・ネガティブ HIF-1 $\alpha$  のアデノウイルスを用いた発現系構築を行っている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	0	1,700,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：リウマチ・膠原病学内分泌・代謝学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：リウマチ学、血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

動脈硬化、脳血管障害、虚血性心疾患、固形腫瘍、慢性炎症性疾患をはじめとする幅広い疾患の病態形成に血管新生が重要な意義を有することが示唆されている。とくに、関

節リウマチ (RA) の病変の主座である関節滑膜では血管新生の亢進、滑膜の増殖がおこり軟骨・骨の破壊へ進展し関節機能を障害することが知られている。RA の治療は抗炎症薬、抗リウマチ薬、さらに最近の遺伝子工学的技術の進歩によって抗サイトカイン療法であ

る抗 TNF- $\alpha$ 療法が臨床使用されるようになり、RA 治療が現在転換期を迎えていると言って差し支えない状況と思われる。一方、抗 TNF- $\alpha$ 療法には感染症の合併や無効例、効果減弱などの問題もあり、治療抵抗性 RA 症例における治療のためにも新規治療法の開発は必須の課題であると考えられる。これまで、抗炎症薬、抗リウマチ薬、抗サイトカイン療法においては RA の病態形成に重要な役割を有する血管新生にはあまり焦点が当てられてこなかった。

## 2. 研究の目的

申請者は RA をモデルとして血管新生病における HIF-1 の役割を明確にし、HIF-1 を標的とした血管新生病の新規治療法を開発することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 1. HIF-1 $\alpha$ 特異的 siRNA 発現系の確立

HIF-1 $\alpha$  (あるいは HIF- $\alpha$  isoform) を効率良くノックダウンできる siRNA の配列を決定しスムーズにアデノウイルスベクターを構築するため、プラスミドによる siRNA 発現系を作成する。

### 2. HIF-1 $\alpha$ 特異的 (および HIF- $\alpha$ isoform 特異的) siRNA、構成的活性型 (CA-) HIF-1 $\alpha$ 、ドミナント・ネガティブ (DN-) HIF-1 $\alpha$ 発現組み換えアデノウイルスの構築

1 で得られた siRNA 発現系をアデノウイルスを用いた発現系に移行させることにより多様な組織に効率よく導入することを可能にする。この際、CA-HIF-1 $\alpha$ 、DN-HIF-1 $\alpha$  を発現する組み換えアデノウイルスも構築し抗 HIF-1 $\alpha$  による作用を多面的に解析す

ることを可能にする。また、この CA-HIF-1 $\alpha$  は HIF-1 $\alpha$  の oxygen-dependent degradation domain を欠失し、その C 端側に VP16 の転写活性化領域を結合させたもの (HIF-1 $\alpha$  1-396-VP16) および HIF-1 $\alpha$  の酸素依存性タンパク質分解に必須な 2 つのプロリン (Pro402、Pro564) をアラニンに変異させたもの (HIF-1 $\alpha$  P402A/P564A) を作成する。これら 2 者の違いから HIF-1 $\alpha$  の転写活性化領域特異的な遺伝子発現制御を明らかにできると考えられる。DN-HIF-1 $\alpha$  は HIF-1 $\alpha$  の C 端に存在する転写活性化領域を欠失した HIF-1 $\alpha$  1-330 を用いる。これらの変異体が構成的活性型、ドミナント・ネガティブとして作用することは培養細胞を用いた実験ですでに確認されている。アデノウイルスベクターは Cre/loxP システムによって発現を制御できるようにし、アデノウイルス感染による非特異的な影響と抗 HIF-1 $\alpha$  作用 (あるいは HIF-1 $\alpha$  作用の増強) による影響を区別できるようにする。HIF-1 $\alpha$  を特異的にノックダウンすることが可能な siRNA 発現系を構築する。siRNA の配列が決定でき次第、その siRNA および、構成的活性型 HIF-1 $\alpha$  (CA-HIF-1 $\alpha$ 、ドミナント・ネガティブ HIF-1 $\alpha$  (DN-HIF-1 $\alpha$ )) を発現する組み換えアデノウイルスを構築し、その characterization (HIF-1 $\alpha$  mRNA およびタンパク質のノックダウン、目的タンパク質の発現、HIF-1 $\alpha$  依存性遺伝子発現に与える影響の検討など) を行う。この際、使用するアデノウイルスは Cre/loxP による発現制御が可能なアデノウイルスベクターを用い、siRNA、あるいは CA-および DN-HIF-1 $\alpha$  を必要なタイミングで発現させることを可能にするとともにアデノウイルス感染に伴う非特異的な影響と CA-および DN-HIF-1 $\alpha$  による影響を区別可能にする。

### 3. コラーゲン誘導関節炎モデルマウスにおける遺伝子発現制御と抗HIF-1 $\alpha$ 療法の効果の検討

RA と類似の滑膜増殖、パンプス形成、軟骨・骨の破壊を呈することが知られているコラーゲン誘導関節炎モデルマウスを用いて 1、2 で作成した組み換えアデノウイルスを感染させた際の遺伝子発現変化、炎症所見、X線所見、病理所見などに与える影響を検討する。

### 4. RA患者由来の関節液細胞、滑膜細胞を用いた抗HIF-1 $\alpha$ 療法の有用性の検討

RA と多くの点で類似性を示すことが知られているアジュバント誘導関節炎モデルマウスを作成し、HIF-1 $\alpha$  siRNA、CA-HIF-1 $\alpha$ 、あるいは DN-HIF-1 $\alpha$  をアデノウイルスベクターによって発現させた際の炎症所見、X線変化、組織学的変化を比較するとともに、罹患関節内の炎症細胞および関節滑膜における遺伝子発現変化を DNA microarray 法で網羅的にスクリーニングする。得られた結果をもとに炎症・免疫機能に重要な遺伝子に関してその発現変化をノーザンブロット法、RT-PCR 法で確認し、関節炎における HIF-1 $\alpha$  による遺伝子発現制御の重要性を明らかにする。得られた結果をもとに、RA 患者より得られた関節液細胞あるいは滑膜細胞を材料とし、上記の HIF-1 $\alpha$  siRNA、CA-HIF-1 $\alpha$ 、DN-HIF-1 $\alpha$  を発現するアデノウイルスベクターを用いて抗 HIF-1 療法の有用性について検討する。

## 4. 研究成果

マウス由来の培養細胞を用い HIF-1 $\alpha$  タンパク質の低酸素による時間依存的安定化をウエスタンブロット法により確認した。また、

これまで HIF-1 $\alpha$  を安定化することが知られている Fe キレート剤や CoCl<sub>2</sub> でも同様に HIF-1 $\alpha$  タンパク質が時間依存的に安定化されることを確認した。さらに、HIF-1 $\alpha$  を特異的にノックダウンすることが可能な siRNA を合成し、amaxa biosystem 社の Nucleofector を用いて transfection 後、ウエスタンブロット法を用いてその効率を検討した。最もノックダウン効率の良かった siRNA の配列をもとにプラスミドによる siRNA 発現系を構築中である。この siRNA 発現系が構築でき次第、その siRNA の characterization を行う (HIF-1 $\alpha$  mRNA のノックダウン、HIF-1 $\alpha$  タンパク発現の抑制、標的遺伝子発現の抑制など)。また、HIF-1 標的遺伝子の発現を定量的に検討するため、Real-time PCR システムを導入し、VEGF、TGF- $\beta$ 、PAI-1 などの HIF-1 標的遺伝子発現の検討を行っている。さらに、構成的活性型 HIF-1 $\alpha$  とドミナント・ネガティブ HIF-1 $\alpha$  がマウス由来の細胞でも機能することをプラスミド発現系で確認した。現在、HIF-1 $\alpha$  をノックダウンする siRNA、構成的活性型 HIF-1 $\alpha$ 、およびドミナント・ネガティブ HIF-1 $\alpha$  のアデノウイルスを用いた発現系を構築中であるが、採用した発現システムでは HIF-1 標的遺伝子の誘導効率あるいは抑制効率が低いため問題点を検討中である。アデノウイルスを用いた発現系の問題点解決と並行し関節リウマチのモデルであるアジュバント誘導関節炎モデルマウスの作成を行っている。モデルマウスの作成後、関節リウマチにおける低酸素応答性遺伝子発現、HIF-1 による遺伝子発現調節の意義について検討する予定である。また、細胞の接着に重要な E-cadherin の発現が低酸素により増強されることを見だし、平成 20 年 1 月にカナダ・バンクーバーで行われた Keystone

symposium (Molecular, Cellular, Physiological, and Pathogenic Responses to Hypoxia) で報告した。

#### 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 2 件)

1. 牧野雄一、岡本健作、羽田勝計、レドックスシグナルと酸化ストレス応答の分子機構を探る、分子消化器病、5、6-11、2008、査読無

2. Makino, Y., Uenishi, R., Okamoto, K., et al. Transcriptional up-regulation of inhibitory PAS domain protein gene expression by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), J. Biol. Chem., 282, 14073-14082, 2007、査読有

[学会発表] (計 1 件)

1. Okamoto, K., Makino, Y., Haneda, M., Hypoxia induces E-cadherin expression in primary renal proximal tubular epithelial cells, Keystone symposium, 2008.1.15~20, Vancouver, Canada

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

岡本健作 (OKAMOTO KENSAKU)

旭川医科大学・医学部 助教

研究者番号：80396879

##### (2) 研究分担者

無し

##### (3) 連携研究者

無し