

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20591513

研究課題名（和文） 乳癌抑制遺伝子イント6の阻害による低酸素誘導因子2の活性化と血管再生

研究課題名（英文） Silencing of Int6 Promotes Recovery of Blood Perfusion after Limb Ischemia via Stabilizing Hypoxia-Inducible Factor 2 α

研究代表者

木村 秀生 (HIDEO KIMURA)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60327070

研究成果の概要（和文）：

血管新生治療は、血管新生や側副血行路の発達を刺激して、虚血部の血流回復を促す治療法である。成熟した血管を誘導するために、転写調節因子として複数の血管新生因子をバランスよく発現させる低酸素応答因子（hypoxia inducible transcription factor: HIF）を利用する試みがある。本研究では、マウス下肢虚血モデルで筋組織中の Int6 を抑制することにより、低酸素応答因子 HIF-2 α を誘導し、下肢の血流回復に与える影響を検討した。マウス下肢虚血モデルにおけるプラスミド筋注による Int6 の抑制は、下肢血流と症状の改善を促した。その機序の一部として、筋細胞内での HIF-2 α の安定化を介して血管新生因子群が増強し、血管構成細胞への傍分泌効果を及ぼすことが考えられた。Int6 抑制による新たな血管新生治療の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Hypoxia-inducible factors (HIFs) are the key regulators of hypoxia-responding genes. In particular, the HIF-2 α plays an essential role in vascular remodeling, leading to mature angiogenesis by transcribing several angiogenic factors. The aim of current study is to test the hypothesis that silencing of Int6 and concomitant HIF-2 α stabilization may enhance the recovery of blood flow in tissue ischemia. Analysis of the effect of Int6 silencing in cultured muscle cells implied that silencing of Int6 led to up-regulation of several genes corresponding to angiogenic proteins, including basic fibroblast growth factor and platelet-derived growth factor-B through induction and stabilization of HIF-2 α . Moreover, tube formation analysis of endothelial cells revealed an increase in paracrine response to INT6-silenced muscle cells. In mouse models of hindlimb ischemia, intramuscular injection of small interfering RNA plasmid designed to inhibit Int6 led to significantly enhanced perfusion and functional recovery of damaged tissues. Int6 silencing in muscle leads to enhanced recovery of blood flow in ischemic limb. Int6 may serve as a valuable therapeutic target to control angiogenesis in ischemic diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000

2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：医学・外科系医学

キーワード：血管外外科一般、血管新生、低酸素応答因子

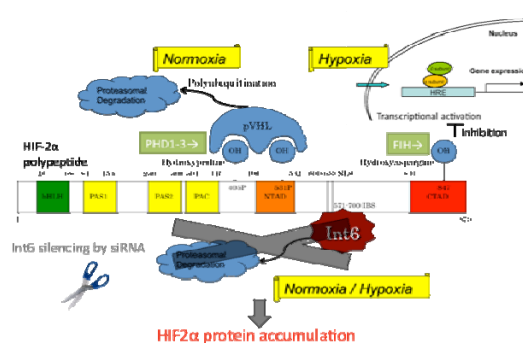
1. 研究開始当初の背景

血管新生治療は、血管新生や側副血行路の発達を刺激して、虚血部の血流回復を促す治療法で、その萌芽は Isner らが下肢動脈閉塞を対象として血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) 発現プラスミドを使用した 1996 年の非盲検試験に遡る。しかしながら、単独の血管新生因子の投与では、未成熟な血管形成による副作用や、治療効果の限界があることも明らかになってきた。

これに対し、成熟した血管を誘導するために、転写調節因子として複数の血管新生因子をバランスよく発現させる低酸素応答因子 (hypoxia inducible transcription factor: HIF) を利用する試みがある。なかでも HIF-2 α は、血管のリモデリングにおいて重要な役割を担っており、HIF-1 α に比較すると安定性に優れているため、虚血肢治療における臨床応用に、より適していると考えた。

HIF-1 α および HIF-2 α は共通して、常酸素下では特定のプロリン残基がプロリン水酸化酵素による水酸化を受ける。その部位がユビキチンリガーゼ複合体の一部である Von Hippel-Lindau 蛋白によりユビキチン化されるため、プロテアゾームによる分解を受ける。しかし、低酸素下ではプロリン水酸化酵素が失活するため、分解を免れた HIF- α 蛋白が HRE (hypoxia responsive element) に結合することにより、転写調節を行う。

HIF-2 α 蛋白に特有の分解因子として、Int6 が酵母 Two hybrid 法によるスクリーニングにより同定された。Int6 が HIF-2 α 蛋白の特定の部位に結合すると、HIF-2 α 蛋白は常酸素・低酸素のいずれの条件下でも蛋白分解を受ける (図 1)。マウスの創傷治癒モデルでは、Int6 遺伝子を抑制することにより、HIF-2 α 蛋白と各種血管新生因子が増加し、創傷治癒と局所の血管新生を増強した。しかし、虚血に陥っている筋組織において Int6 遺伝子抑制が血管新生に与える影響は明らかになっていなかった。



(図 1) HIF-2 α 蛋白分解のメカニズム

2. 研究の目的

マウス下肢虚血モデルを用いて Int6 を抑制することにより、虚血組織において内因性 HIF-2 α が増加させた場合の下肢血流への影響と機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

I. Int6 抑制が筋細胞に与える影響の検討

(1) Int6 抑制プラスミドベクターの作製
siRNA (small interfering RNA) を発現するプラスミドベクターである pSilencer (Ambion) を用い、マウス Int6 遺伝子の抑制は 5-AAgAACCCACAgTTgTTgCg-3, ヒト Int6 遺伝子の抑制は 5-AAgAACCCACAgTggTTgCA-3 の配列により行った。コントロールとしては、ランダム配列を有する siRNA プラスミドベクターを用いた。

(2) 初代筋芽細胞の培養と遺伝子導入

マウス初代筋芽細胞は、専用培地とともにプライマリーセル社から購入して使用した。ヒト初代筋芽細胞は、10% FBS を含む DMEM 中で培養した。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells: HUVECs) は 2% FBS, bFGF を含む 200S 培養液中で培養した。いずれも 37°C, 5% 二酸化炭素の存在下で培養され、遺伝子導入は、細胞 1.5 x 10⁶ 個あたり 5 μ g のプラスミド DNA を用い AMAXA Nucleofector で行った。

(3) Int6 抑制下における初代筋芽細胞の蛋白解析

遺伝子導入後の細胞から溶解抽出し、同量・同濃度に調整した蛋白溶液を電気泳動分離後にセミドライ法で転写した。HIF-2 α と

Int6 に対する一次抗体はポリクローナルで作製した。二次抗体は抗ラビットまたは抗マウス HRP を使用し、化学蛍光法で検出した。

(4) Int6 抑制下における初代筋芽細胞の mRNA 発現解析

遺伝子導入後に RNA を抽出し、cDNA を合成した。各種血管新生因子の測定は Taqman を用いたリアルタイム RT-PCR 法にて行なった。

(5) HUVEC を用いた管腔形成実験

96 穴プレート上で固相化したマトリゲル上で 1.5×10^4 個の HUVEC 細胞を 12 時間培養した。その後、 4×10^5 個のヒト初代筋芽細胞に Int6 抑制プラスミドもしくはコントロールプラスミド $4 \mu\text{g}$ を遺伝子導入して 24 あるいは 48 時間後に回収した培養液上清を加えた。経時的に HUVEC 細胞の管腔形成を観察し、管腔長を解析した。

II. Int6 抑制が下肢血流回復に与える影響の検討

(1) マウス下肢虚血モデルの作製とプラスミドの投与

8 週齢の BALB/c マウスの左大腿動脈を結紮、切離した後、Int6 抑制プラスミドもしくはコントロールプラスミド $400 \mu\text{g}$ を大腿内転筋群に 3 カ所に分けて筋肉内投与した (n=9)。

(2) 肢機能と組織障害の評価

虚血肢の肢機能と組織障害の 2 項目を経時的にスコアリングした。肢機能に関しては、正常= 0 点、尻尾を引っ張ると足趾は効かないが、足首で踏んばる= 1 点、下肢をひきずってはいないが、足首が効かない= 2 点、下肢全体をひきずる= 3 点で評価し、組織障害に関しては、変化なし= 0 点、皮膚色変化= 1 点、1-2 趾脱落= 2 点、3-5 趾脱落= 3 点、足部以上の肢脱落= 4 点、で評価した。

(3) レーザードプラー測定装置を用いた下肢血流量の評価

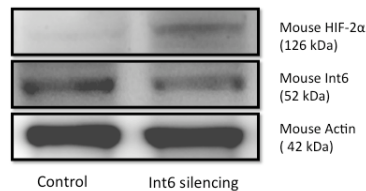
各マウスにおける足関節以下の血流量を経時的に全麻下で測定し、虚血肢/非虚血肢の相対比を算出した。

4. 研究成果

I. Int6 抑制が筋細胞に与える影響の検討

Int6 抑制下における初代筋芽細胞の蛋白解析

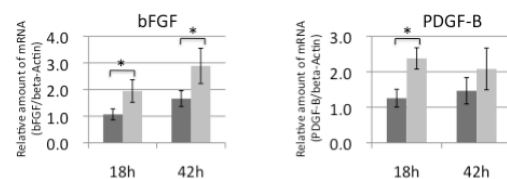
Int6 抑制プラスミドを導入した 24 時間後のマウス初代筋芽細胞で、コントロールと比較して、内因性 Int6 蛋白の減少とともに内因性 HIF-2 α 蛋白が増加していた (図 2)。



(図 2) Int6 抑制に伴う HIF-2 α 蛋白の増加

Int6 抑制下における初代筋芽細胞の遺伝子解析

マウス初代筋芽細胞に Int6 抑制プラスミドを導入した場合には、コントロールと比較して、18 時間後において、細胞中の bFGF および PDGF-B (platelet-derived growth factor-B) の mRNA がそれぞれ 1.8 倍、1.9 倍と有意に発現が増加していた (n=3)。bFGF に関しては 42 時間後においても有意な発現の亢進が持続していた (図 3)。



(図 3) Int6 抑制に伴う各血管新生因子の遺伝子発現相対量の推移

HUVEC を用いた管腔形成実験

Int6 抑制プラスミドの遺伝子導入後 48 時間のヒト筋芽細胞培養液上清中で培養した HUVEC ではコントロールと比べると管腔形成が目立ち、管腔長の計測でも 5 時間後において 1.7 倍、7 時間後において 2.3 倍といずれも有意差を認めた。また、同じく Int6 抑制プラスミド導入後 24 時間の筋芽細胞培養液上清を用いた場合も、培養開始 7 時間後においてコントロールの 2.2 倍、12 時間後において 2.3 倍といずれも管腔長に有意差を認めた。

II. Int6 抑制が下肢血流回復に与える影響の検討

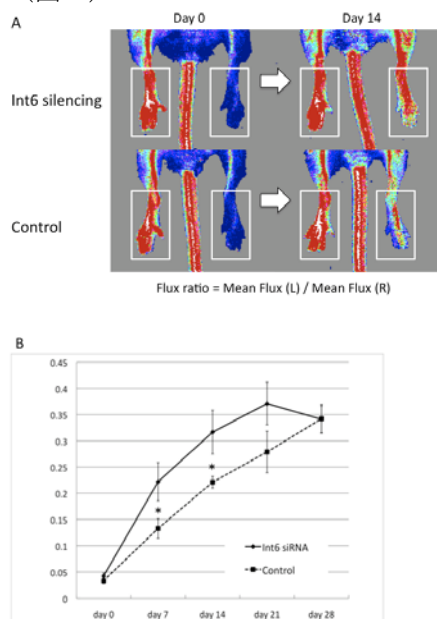
肢機能と組織障害の評価

肢機能は Int6 抑制群で良好に推移し、7, 14, 21 日後においては、それぞれコントロール群 2.17 ± 0.19 , 1.94 ± 0.23 , 1.14 ± 0.31 に対して、Int6 siRNA 群 1.67 ± 0.20 , 0.97 ± 0.23 , 0.50 ± 0.16 と有意に低値であった。組織障害についても、観察期間中に一貫して症状が悪化したコントロール群に対して、Int6 抑制群では 7 日後以降に症状が回復に転じ、28 日後ではコントロール群 0.81 ± 0.45 に対して、Int6 抑制群では 0 ± 0 と組織障害が完全に消失した。

レーザードプラー測定装置を用いた下肢血流量の評価

両群とも手術直後が最も血流が乏しく、7 日以降は回復傾向にあるのは同様であった。

が、特に Int6 抑制群で回復が良好であり、7 日後と 14 日後において、コントロール群と有意差を認めた (Int6 抑制群 vs. コントロール群の血流比: 7 日後, 0.22 ± 0.33 vs. 0.13 ± 0.04 ; 14 日後, 0.32 ± 0.04 vs. 0.22 ± 0.07) (図 4).



(図 4) レーザードプラー法を用いた足部血流の評価

Aは左大腿動脈結紮切離直後と14日後の代表的なレーザードプラー画像. Bはflux ratio (虚血肢/非虚血肢足部の血流量の比)の経時的変化

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0件)

[学会発表] (計2件)

- ① 橋本拓弥ら、マウス下肢虚血モデルにおける Int6 抑制による下肢血流の改善 -低酸素応答因子 HIF-2 α の誘導を介した血管新生の可能性、第 49 回日本脈管学会総会、口演、2008 年 10 月 24 日、東京
- ② 橋本拓弥ら、マウス下肢虚血モデルにおける Int6 抑制による下肢血流の改善、The 7th Cell Biology Summer Meeting、ポスター、2008 年 7 月 5 日、鴨川、京都

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 秀生 (KIMURA HIDEO)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 60327070

(2) 研究分担者

小山 博之 (KOYAMA HIROYUKI)

東京大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号: 10241994

宮田 哲郎 (MIYATA TETSURO)

東京大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号: 70190791

重松 邦広 (SHIGEMATSU KUNIHIRO)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 20215966

岡本 宏之 (OKAMOTO HIROYUKI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 60348266