

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月20日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590335

研究課題名（和文） 血管内皮細胞の低酸素誘導性形質変化の分子機序の解明

研究課題名（英文） Mechanisms of hypoxia-induced transformation 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（和文）：本研究課題遂行期間に、我々は EC 特異的な HIF-1 $\beta$  遺伝子欠失マウスを作製し、モノクローリン誘導性肺高血圧症モデルおよびその評価系の確立を行った。本変異マウスの肺高血圧症モデルでは、右心系負荷を示す右心室重量/左心室重量比率は減少し、組織学的解析による小肺動脈の血管周囲の筋層化も軽減されていた。そして、肺高血圧症の病態は、EC に発現する HIF-1 $\beta$  が、内皮由来血管収縮因子の一つである endothelin-1 の発現を介して、形成されることが分かった。

研究成果の概要（英文）：MCT-induced pulmonary arteries demonstrated binding of pimonidazole, a hypoxia detection agent that binds to regions of hypoxia in the region around vascular walls including lung epithelial cells. Indices of the PAH were significantly alleviated in the Hif-1 $\beta$ +/- mice compared to the control as the following data showed; the weight ratio of right ventricular to left ventricular with septum was significantly decreased; the number of pulmonary arteries was significantly increased; indices of the medial thickness was significantly decreased. The number of muscularized pulmonary arteries in MCT-treated Hif-1 $\beta$ +/- mice was significantly decreased compared to that of the control mice. In addition, interestingly, the PAH in wild type mice was ameliorated by administration of bosentan, an endothelin receptor blocker, to the same level of that in Hif-1 $\beta$ +/- mice. These results indicate that the development of MCT-induced PAH was mediated by HIF-1 $\beta$  in endothelial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011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：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子病態学、低酸素

## 1. 研究開始当初の背景

血管内皮細胞（EC）は、生体の低酸素シグナルの初期応答細胞のひとつであり様々な病態に関与している。血管再構築過程において EC では、細胞間の情報の破綻、血管の透過

性亢進、接着分子の発現、多認識型受容体や各種サイトカインの発現、活性酸素（ROS）発生などの様々なシグナルが変化する。これら表現型の分子メカニズムは解明されつつあるが、低酸素シグナルがどのように個々の

生体応答にクロストークしているかについては十分理解されていない。また、これまでに EC の低酸素応答シグナルの側面から生体応答への変換システムを系統的に解析した研究はほとんどない。

## 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して生体内の血管再構築モデルを作製し、EC の機能的・形態的低酸素応答に関わる分子機序を系統的に解明することを目指す。

## 3. 研究の方法

【実験 1】 EC 特異的 HIF-1 欠失マウス (Tie2-Cre;HIF-1 マウス) の確立

EC 特異的 HIF-1 遺伝子欠失マウスは、独自に開発した HIF-1 $\alpha/\beta$ -floxed マウスと Tie2-Cre Tg マウスとの交配により作製する。

【実験 2】 上記変異マウスを利用した肺高血圧症モデルの確立と EC に関する解析

血管再構築の観察モデルとして、肺動脈の血管再構築が観られる肺高血圧症モデルを採用する。肺高血圧モデルは、monocrotalin 投与あるいは低酸素暴露によるそれぞれ両方のモデルを採用する。病態モデルの病態組織内について低酸素マーカー Hypoxiprobe1 で低酸素領域を同定・確認する。肺組織の EC の形態学的変化を中心に、血管透過性変化、細胞間の情報の変化、活性酸素種・窒素種の発生、多認識型受容体の発現について、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・移動について解析する。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。本変異マウスが胎生致死などの表現型により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。

【実験 3】 変異マウスをベースとした EC 特異的標識マウスの確立と各細胞の形態学的解析

Cre-LoxP システムを利用して EC および SMC を細胞系譜特異的に標識するために、

【実験 1】 で構築した変異マウスと、GFP-stop-loxP Tg マウスを交配することにより変異マウスをベースとした EC および SMC 特異的標識マウスを確立する。確立したマウスを用いて、【実験 2】 の実験に加え、形態学的な変化について、EC・SMC 各種細

胞マーカーを含めた組織免疫染色法による解析を行う。また、試みとして、大腿動脈結紮・虚血モデルを作製することにより、生体内での時間経過を加味した目的細胞 (EC/SMC) の形態学的観察モデルの構築を行う。

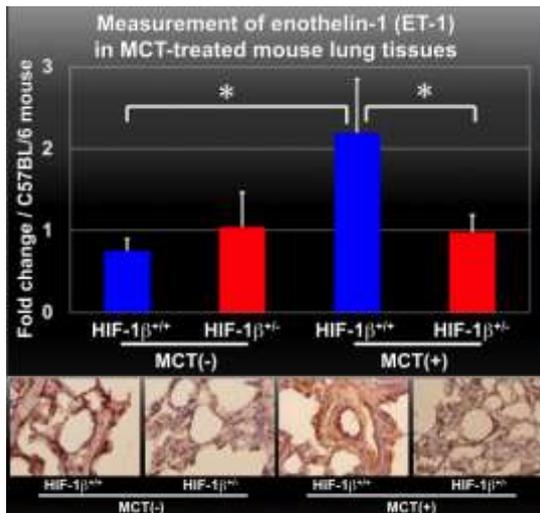
【実験 4】 分離 EC 培養の低酸素条件下における HIF 機能解析

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血管再構築に関する細胞応答を引き起こしているのかどうかを分子レベルで調べるために、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 HIF-1 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、HIF-1-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、機能獲得型解析および機能欠失型解析を含めて下記の 3 点について解析を進める。(a) 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について網羅的に検討する。(b) 活性酸素種・窒素種の測定：蛍光プローブを用いた蛍光イメージング解析、蛍光測定解析をする。(c) 炎症関連の多認識型受容体の発現解析：関連遺伝子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。

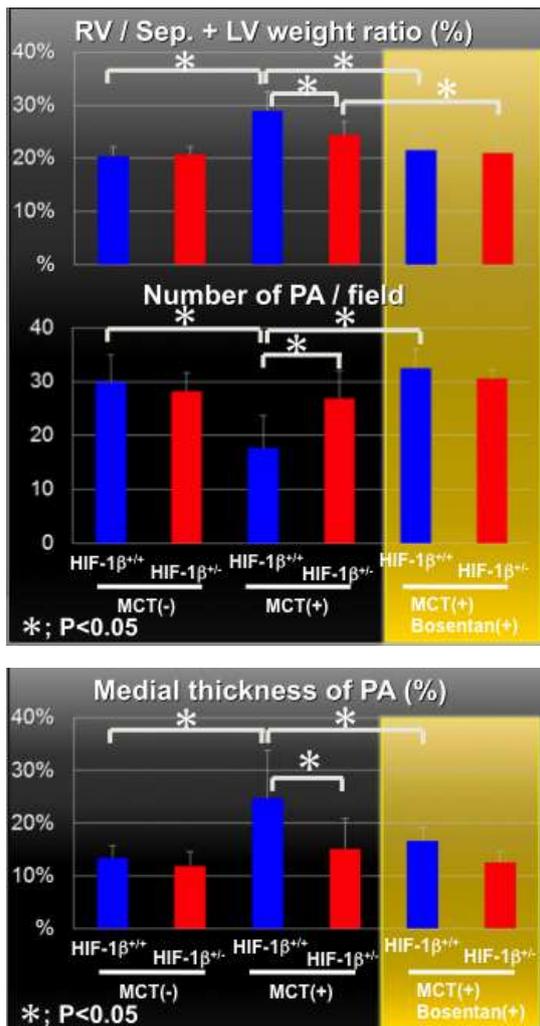
## 4. 研究成果

本研究課題遂行期間に、我々は EC 特異的な HIF-1 $\beta$  遺伝子欠失マウスを作製し、モノクロタリン誘導性肺高血圧症モデルおよびその評価系の確立を行った。本変異マウスの肺高血圧症モデルでは、右心系負荷を示す右心室重量/左心室重量比率は減少し、組織学的解析による小肺動脈の血管周囲の筋層化も軽減されていた。そして、肺高血圧症の病態は、EC に発現する HIF-1 $\beta$  が、内皮由来血管収縮因子の一つであるエンドセリン-1 分子の発現が、転写産物レベルで上昇していた。また、それは、免疫組織化学的解析によって確認された (図 1)。さらに、エンドセリン受容体阻害剤であるボセンタンの投与により、対照群マウスモデルにおいて、ノックアウト群と同様レベルまで病態は改善された (図 2)。以上の結果より、モノクロタリン誘導性肺高血圧症モデル病態は、肺血管内皮細胞の HIF-1 $\beta$  更にその下流のエンドセリン-1 を介して形成されることが示唆された。

【図1】モノクロタリン誘導性肺高血圧症モデルにおける肺組織内のエンドセリン-1の発現量



【図2】エンドセリン受容体阻害剤ボセンタンによる肺高血圧症病態への影響



## 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 Tajima S, Ikeda Y, Sawada K, Yamano N, Horinouchi Y, Kihira Y, Ishizawa K, Izawa-Ishizawa Y, Kawazoe K, Tomita S, Minakuchi K, Tsuchiya K, and Tamaki T: Iron reduction by deferoxamine leads to amelioration of adiposity via the regulation of oxidative stress and inflammation in obese and type 2 diabetes KKAY mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302:E77-E86 (2011).

doi:10.1152/ajpendo.00033.2011

② Kihira Y, Yamano N, Izawa-Ishizawa Y, Ishizawa K, Ikeda Y, Tsuchiya K, Tamaki T, Tomita S: Basic fibroblast growth factor regulates glucose metabolism through glucose transporter 1 induced by hypoxia-inducible factor-1  $\alpha$  in adipocytes. *Int J Biochem Cell Biol* 43:1602-1611 (2011).

doi.org/10.1016/j.biocel.2011.07.009

③ Fukuhara Y, Tsuchiya K, Horinouchi Y, Tajima S, Kihira Y, Hamano S, Kawazoe K, Ikeda Y, Ishizawa K, Tomita S and Tamaki T: Protective effect of photodegradation product of nifedipine against tumor necrosis factor alpha-induced oxidative stress in human glomerular endothelial cells. *The Journal of Medical Investigation* 59:118-126 (2011).

doi:10.2152/jmi.58.118

④ Ikeda Y, Tajima S, Yoshida S, Yamano N, Kihira Y, Ishizawa K, Aihara K, Tomita S, Tsuchiya K and Tamaki T: Deferoxamine promotes angiogenesis via the activation of vascular endothelial cell function. *Atherosclerosis* 215:339-347 (2011).

doi:10.1016/j.atherosclerosis.2011.01.009

⑤ Horinouchi Y, Tsuchiya K, Taoka C, Tajima S, Kihira Y, Matsuda Y, Shishido K, Yoshida M, Hamano S, Kawazoe K, Ikeda Y, Ishizawa K, Tomita S, Tamaki T: Antioxidant effects of photodegradation product of nifedipine. *Chem Pharm Bull* 59:208-214 (2011).

doi:10.1248/cpb.59.208

⑥ Tajima S, Tsuchiya K, Horinouchi Y, Ishizawa K, Ikeda Y, Kihira Y, Shono M, Kawazoe K, Tomita S, Tamaki T: Effect of angiotensin II on iron-transporting protein expression and subsequent intracellular labile iron concentration in human glomerular endothelial cells. *Hypertens Res* 33:713-721 (2010).

[doi:10.1038/hr.2010.63](https://doi.org/10.1038/hr.2010.63)

⑦ Kurobe H, Urata M, Ueno M, Ueki M, Ono S, Izawa-Ishizawa Y, Fukuhara Y, Lei Y, Ripen AM, Kanbara T, Aihara K, Ishizawa K, Akaike M, Gonzalez FJ, Tamaki T, Takahama Y, Yoshizumi M, Kitagawa T, Tomita S: Role of Hif-1 $\alpha$  in T cells as a negative regulator in development of vascular remodeling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 30:210-217 (2010).

[doi:10.1161/ATVBAHA.109.192666](https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.192666)

⑧ Ishizawa K, Izawa-Ishizawa Y, Dorjsuren N, Miki E, Kihira Y, Ikeda Y, Hamano S, Kawazoe K, Minakuchi K, Tomita S, Tsuchiya K and Tamaki T: Angiotensin II receptor blocker attenuates PDGF-induced mesangial cell migration in a receptor-independent manner. *Nephrol Dial Transpl* 25:364-372 (2010).

[doi:10.1093/ndt/gfp520](https://doi.org/10.1093/ndt/gfp520)

[学会発表] (計 21 件)

① Takaku M, Tomita S, Kihira Y, Hashimoto I, Nakanishi H, Tamaki T. Preconditioning of mice with prolyl hydroxylase inhibitor, dimethylxalylglycine, prevents skin flap necrosis. AHA scientific sessions 2011, Orlando, Florida, USA, November 16, 2011.

② Ikeda Y, Tajima S, Yamano N, Kihira Y, Ishizawa K, Tomita S, Tsuchiya K, Tamaki T. Estrogen action on iron metabolism. The Endocrine Society 2011, Boston, USA, November 4, 2011.

③ Yamaguchi K, Kihira Y, Yamano N, Izawa-Ishizawa Y, Ishizawa K, Ikeda Y, Tsuchiya K, Tomita S, Tamaki T. Glucose Metabolism of Adipocytes is Regulated by Basic Fibroblast Growth Factor via Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$ . High Blood Pressure Research Scientific Sessions 2011 Scientific Sessions, Orlando, Florida, USA, September 28, 2011.

④ Tajima S, Ikeda Y, Yamano N, Tsuchiya

K, Ishizawa Y, Kihira Y, Ishizawa K, Kawazoe K, Tomita S, Minakuchi K, Tamaki T. Inhibition of Adipocyte Hypertrophy by Deferoxamine Diabetic KKAY mice. High Blood Pressure Research Scientific Sessions 2011 Scientific Sessions, Florida, USA, September 28, 2011.

⑤ Imanishi M, Ishizawa K, Kihira Y, Ikeda Y, Yamano Y, Ishizawa Y, Tsuchiya K, Tamaki T, Tomita S. Smooth Muscle Cell-Specific Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  Deficiency Attenuates Angiotensin II-Induced Vascular Remodeling in Mice. AHA scientific sessions 2011, Orlando, Florida, USA, September 28, 2011.

⑥ Ikeda Y, Aihara KI, Yoshida S, Kihira Y, Ishizawa K, Izawa-Ishizawa Y, Tomita S, Sata M, Akaike M, Kato S, Matsumoto T, Tamaki T. Heparin Cofactor II Promotes Angiogenesis via an AMPK-eNOS Signaling Pathway. High Blood Pressure Research Scientific Sessions 2011 Scientific Sessions, Orlando, Florida, September 28, 2011.

⑦ Imanishi M, Ishizawa K, Kihira Y, Ikeda Y, Yamano N, Ishizawa Y, Tsuchiya K, Tamaki T, Tomita S. Hypoxia-inducible Factor-1 $\alpha$  Deficiency in Smooth Muscle Cells Suppresses Angiotensin II-induced Vascular Remodeling in Mice. High Blood Pressure Research Scientific Sessions 2011 Scientific Sessions, Orlando, Florida, September 28, 2011.

⑧ Ishizawa K, Sakurada T, Imanishi M, Fujii S, Ishizawa Y, Kihira Y, Ikeda Y, Tomita S, Tsuchiya K, Tamaki T: Nitrosonifedipine is a new class drug to improve angiotensin II-induced vascular remodeling. European Society of Cardiology Congress 2011, Paris, France, August 27, 2011.

⑨ Takaku M, Tomita S, Kurobe H, Hashimoto I, Nakanishi H, Tamaki T. Preconditioning of mice with a PHD inhibitor, dimethylxalylglycine, prevent skin flap necrosis. ISSOT (International Society on Oxygen Transport to Tissue) 2011, Washington DC, August 25, 2011.

⑩ Imanishi M, Tajima S, Kihira Y, Ishizawa K, Ikeda Y, Kondo S, Kagami S,

Tomita S, Ikeda Y, Tsuchiya K, Tamaki S. Increment intracellular labile iron enhances angiotensin-induced intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in human glomerular endothelial cells. World Congress of Nephrology 2011, Vancouver, April 10, 2011.

⑪ Ishizawa K, Imanishi M, Horinouchi Y, Fukuhara Y, Izawa-Ishizawa Y, Ikeda Y, Kihira Y, Tomita S, Tsuchiya K, Tamaki T: Nitroso-Nifedipine is A New Class Drug to Protect Endothelial Function for Overcoming Organ Damage. The 23rd Scientific Meeting of the International Society of Hypertension GLOBAL CARDIOVASCULAR RISK REDUCTION, Vancouver, November 23, 2010.

⑫ Tajima S, Ikeda Y, Yamano N, Tsuchiya K, Kihira Y, Ishizawa K, Kawazoe K, Tomita S, Minakuchi K, Tamaki T: IRON DERIVATION AMELIORATES GLUCOSE TOLERANCE THROUGH REDUCTION OF OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATION IN DIABETIC KKAY MICE. 2010 American Physiological Society Conference Inflammation, Immunity and Cardiovascular Disease, Colorado, November 7, 2010.

⑬ Tomita S, Urata M, Fukuhara Y, Kihira Y, Ikeda Y, Ishizawa K, Tsuchiya K, Kitagawa T, Tamaki T: Endothelial-targeted hypoxia-inducible factor-1b (HIF-1b) loss-of function alleviates the monocrotaline-induced pulmonary hypertension in mice. American Heart Association Scientific Sessions 2010, Chicago, Illinois, November 4, 2010.

⑭ Ikeda Y, Tajima S, Yamano N, Kihira Y, Ishizawa K, Tomita S, Tsuchiya K, Tamaki T. Iron elimination ameliorated glucose tolerance through suppression of oxidative stress and inflammation on fat in diabetic mice. American Heart Association Scientific Sessions 2010, Chicago, Illinois, November 4, 2010.

⑮ Ikeda Y, Tajima S, Yamano N, Kihira Y, Ishizawa K, Tomita S, Tsuchiya K, Tamaki T. Deferoxamine, an iron chelator, enhances angiogenesis through Akt-eNOS pathway in endothelial cells. American Heart Association Scientific Sessions 2010, Chicago, Illinois, November 4, 2010.

⑯ Tamaki T, Yamaguchi K, Kihira Y, Ikeda Y, Ishizawa K, Tsuchiya K, Kondo S, Kagami S and Tomita S: Global gene expression analyses in renal ischemia-reperfusion injury (IRI) from mice lacking Hif-1a gene. Annual meeting for American Society of Nephrology, Colorado, September 18, 2010.

⑰ Tajima S, Ikeda Y, Kihira Y, Ishizawa K, Kawazoe K, Tomita S, Minakuchi K, Tamaki T, Tsuchiya K: Deferoxamine, an iron chelator, promotes angiogenesis after ischemic hind limb through Akt-eNOS-dependent pathway. The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, Kyoto, June 14, 2010.

⑱ Tamaki T, Yamaguchi K, Kihira Y, Ikeda Y, Ishizawa K, Tsuchiya K, Tomita S. Amelioration of acute tubular necrosis in ischemic acute renal failure was impaired in mice lacking hypoxia inducible factor-1 gene. International Society of Nephrology Nexus symposium 2010, Kyoto, May 18, 2010.

⑲ Ikeda Y, Kihira Y, Ishizawa K, Tomita S, Tsuchiya K, Tamaki T: Deferoxamine, an iron chelator, promotes angiogenesis after ischemic hind limb through Akt-eNOS-dependent pathway. XX World Congress ISHR 2010 KYOTO, Kyoto, May 14, 2010.

⑳ Fukuhara Y, Tomita S, Imamura Y, Horinouchi Y, Imanishi M, Sakurada T, Kitagawa T, Tamaki T: Role of HIF-1b in endothelial cells in monocrotaline-induced pulmonary hypertension in mice. The 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology WorldPharma 2010, Copenhagen, March 14, 2010.

㉑ Kihira Y, Tomita S, Ikeda Y, Ishizawa K, Tsuchiya K and Tamaki T: Basic fibroblast growth factor upregulates hypoxia inducible factor 1 and glucose transporter 1 in adipose cells. The 16th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology WorldPharma 2010, Copenhagen, March 14, 2010.

[図書] (計1件)

① 田島壯一郎, 土屋浩一郎, 濱本磨以, 久住祥子, 堀ノ内裕也, 八木祐子, 櫻田巧, 石澤啓介, 池田康将, 木平孝高, 富田修平, 玉置

俊晃 『アンジオテンシン II 刺激による細胞内遊離鉄を介した酸化ストレス増強機構』, 腎とフリーラジカル 10:59-63 (2010).

〔その他〕

ホームページ URL:

<http://150.59.76.31/university/servlet/index?&level=4&reference=0/10001/3/30005/20012>

## 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

中山 泰介 (NAKAYAMA TAISUKE)

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

今西 正樹 (IMANISHI MASAKI)

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