

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592039

研究課題名(和文) 肺高血圧症における ARNT-HIF1系を介する低酸素応答機構の解明

研究課題名(英文) Role of ARNT-Hypoxia Inducible Factor 1 in development of pulmonary arterial hypertension

研究代表者

菅野 幹雄 (SUGANO, Mikio)

徳島大学・大学病院・医員

研究者番号：70563807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：肺血管内皮細胞の異常が肺高血圧症発症のkey pointである可能性が高く、それを制御するには肺動脈内皮細胞のHIF2- とヘテロダイマーを成すHIF1- (ARNT)を制御するのが有利ではないかと考え、その役割について研究した。その結果、肺高血圧症の増悪には血管内皮HIF1- を介したエンドセリンシグナルが関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hypoxia-inducible factor (HIF) specifically in endothelial cells of the pulmonary artery seems to play an important role in development of pulmonary arterial hypertension. Role of HIF was investigated using monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension model mice lacking Hif-1 beta. The endothelin upregulation through HIF may be one of the potential pathways for the pulmonary artery remodeling in the lung tissue.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・胸部外科学

キーワード：肺高血圧症 ARNT-HIF1 低酸素応答

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ

生体の低酸素応答は、すべての細胞にみられる基本的な低酸素応答と細胞系列特異的にみられる低酸素応答に分けられる。細胞系列特異的な低酸素応答が、細胞系列によって異なる様々な機能発現に結びつくと考えられる。

われわれの施設では、共同研究者である Tomita が作製した、HIF-1 および ARNT 遺伝子 floxed マウスといった Cre-loxP システムを利用した細胞系列特異的遺伝子欠失法が確立しており、これまでに神経系、免疫系、代謝系の細胞系列における分子制御機構について解析してきた。

(2) これまでの研究成果を踏まえ、着想に至った経緯

カフ傷害による血管リモデリングにおいて、T 細胞中の Hif-1 が動脈周囲でおこる免疫反応に対して「負の制御」を担っていた。低酸素環境下で Hif/ARNT 転写システムを制御することにより、動脈硬化の進行などを制御できることを示した。(Kurobe H, Kitagawa T, Tomita S, et al. Role of Hif-1 in T cells as a negative regulator in development of vascular remodeling. *ATVB*. 2010 Feb; 30(2):210-7.)

肺高血圧肺の血管内皮細胞は低酸素環境下にあり、細胞透過性や血球接着性がたかまり、それらの結果として血管壁に炎症類似反応を誘発しやすい状態に変化していることが推測された。

2. 研究の目的

“肺高血圧症における ARNT-HIF1 系を介する低酸素応答機構の解明” 研究を行った。Hypoxia Inducible Factor-1 (HIF-1) および HIF-1 即ち Arylhydrocarbon receptor nuclear translocator (ARNT) は HIF-1 シグナルを構成する細胞の低酸素応答発動に必須の転写因子であり、エネルギー代謝をはじめ増殖や制御を介して細胞の維持に寄与している。

(1) Tie2 陽性細胞(血管内皮)特異的 ARNT 遺伝子ノックアウトマウス(ARNT-KO)を用いて低酸素不応答の、そして ARNT(+)マウスを用いて低酸素応答の monoclonal line 肺高血圧モデルを作製する。

(2) 上記2系統のマウス肺高血圧肺の低酸素応答変化に関連する諸因子を比較し、ARNT-HIF1 系を介する低酸素応答機構を明らかにする。

(3) ARNT-HIF1 系を介する低酸素応答機構の標的遺伝子を探索し、シグナル抑制薬の可能性を検討することにより、新たな治療法の確立をめざす。

3. 研究の方法

(1) モデル...野生型マウスと共同研究者で

ある Tomita が作製した ARNT 遺伝子 floxed マウスを用いた。

(2) モノクロタリン(MCT)を 80mg/kg 腹腔内投与して肺高血圧モデルマウスを作製した。肺高血圧症の程度は MCT 投与 4 週後に、右室心筋重量比 Right Ventricle/(Left Ventricle+Ventricular Septum) RV/(LV+S)、肺小細動脈(<100 μm)の筋性血管の割合中膜肥厚度(中膜厚/血管径: %medial thickness)と、肺胞組織像で行った。

(3) MCT 投与後の肺高血圧症を伴う肺組織の肺小細動脈周辺の低酸素の程度は Pimonidazole を hypoxyprobe として評価した。

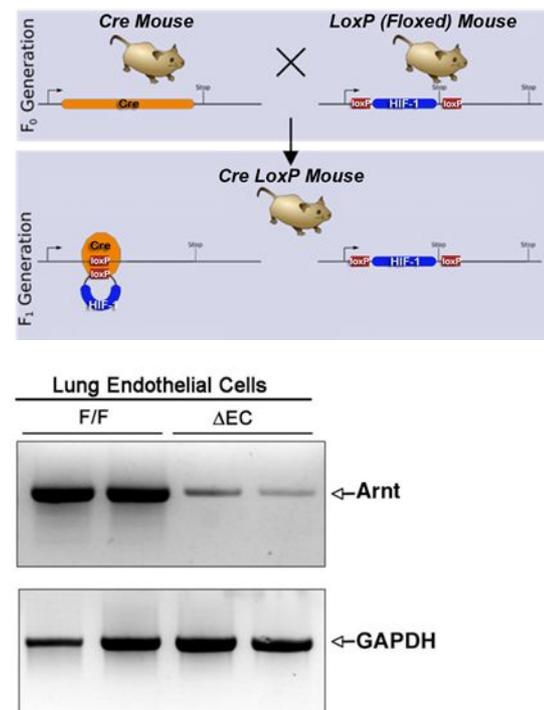
(4) MCT 投与肺高血圧モデルにおける肺組織でのエンドセリン-1 (ET-1)の変化 MCT 肺高血圧モデルに対する Bosentan (Endothelin receptor blocker) 投与の影響を明らかにするため、MCT 投与の 2 日後より Bosentan (100mg/kg.day)を 6 週間にわたり連日経口投与した。

4. 研究成果

(1) Cre-loxP system によって、下図のように Tie2 陽性血管内皮細胞で、特異的に HIF-1 (Arnt) が欠失しているノックアウトマウス(MT)を作製した。

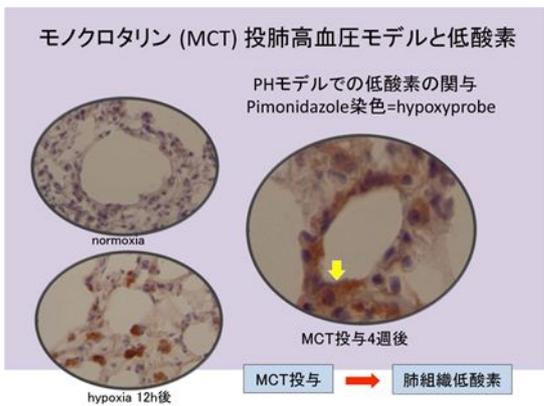
野生型 ...Tie2 Cre HIF1- (+/+)

Arnt KO ...Tie2Cre HIF1- (loxP/+)



(2) MCT 投与により野生型マウスでは肺高血圧モデルを確実に作製できたが、血管内皮特異的 HIF1- ノックアウトマウスでは、MCT 投与によっても肺高血圧が軽度には抑えられた。

(3) MCT 投与 PH モデルでは肺小細動脈とその周辺組織に低酸素症の存在が確認できた。



(4) MCT 投与による野生型 PH モデルマウスでは肺組織の ET-1 の上昇が認められたが、血管内皮特異的 HIF1- ノックアウトマウスでは、ET-1 の上昇が認められなかった。

(5) Bosentan 投与により野生型マウスと血管内皮特異的 HIF1- ノックアウトマウスいずれにおいても、MCT 投与の有無に関わらず、右室重量比、中膜肥厚は有意に減少し、肺小動脈数は有意に増加し、肺高血圧リモデリングを回避できた。

以上より、肺高血圧症モデルにおける血管内皮細胞の低酸素応答転写因子 HIF の役割について検討した。血管内皮特異的 HIF1- KO では肺高血圧症が軽度で、野生型モノクロタリン誘導肺高血圧モデルでは肺組織のエンドセリン-1 上昇が認められるが、HIF1- KO マウスでは認められなかった。以上から、モノクロタリン誘導肺高血圧の形成、増悪には血管内皮 HIF1- を介したエンドセリンシグナルが関与していることが示唆される。

低酸素環境下で Hif-1 転写システムを制御することにより、動脈硬化および肺高血圧症の進行を抑制できることを示唆している。今後、このエンドセリンシグナル ARNT-HIF1 系を介する低酸素応答機構の標的遺伝子を探索し、シグナル抑制薬の可能性を検討することにより、新たな治療法の確立をめざす。

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 6 件)

Taisuke Nakayama, Hajime Kinoshita, Mikio Sugano, Hirotsugu Kurobe, Tamotsu Kanbara, Eiki Fujimoto, Takashi Kitaichi, Hiroshi Fujita, Hitoshi Sogabe, Tetsuya Kitagawa, Delayed-onset severe heparin-induced thrombocytopenia after total arch replacement under cardiopulmonary bypass, THE JOURNAL OF MEDICAL INVESTIGATION, 査読有, Vol.60 (No.1,2), 2013, 154-158, <https://www.jstage.jst.go.jp/article>

[/jmi/60/1.2/60_154/_article](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jmi/60/1.2/60_154/_article)

菅野幹雄, 元木達夫, 黒部裕嗣, 吉田 誉, 中山泰介, 木下 肇, 神原 保, 藤本鋭貴, 北市 隆, 北川哲也, 再発性・多発性脳塞栓源となった僧帽弁輪石灰化に対する僧帽弁置換術の 1 例, 日本心臓血管外科学会雑誌, 査読有, 41 巻 6 号, 2012, 299-303,

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jmi/60/1.2/60_154/_article

Fujimoto E, Yoshizumi M, Kanbara T, Kurobe H, Motoki T, Sugano M, Nakayama T, Kitaichi T, Kitagawa T, Functional restoration of endothelial cells of the cryopreserved heart valve, Gen Thorac Cardiovasc Surg, 査読有, 59(3), 2011, 169-174, DOI: 10.1007/s11748-010-0711-y.

〔学会発表〕(計 15 件)

菅野幹雄, 中山泰介, 木下 肇, 神原 保, 藤本鋭貴, 北市 隆, 北川哲也, 当院における乳幼児房室弁膜症手術, 第 56 回 関西胸部外科学会, 2013 年 6 月 13 日-14 日, 広島国際会議場 (広島県)

中山泰介, 富田修平, 黒部裕嗣, 菅澤典子, 木下 肇, 菅野幹雄, 神原 保, 藤本鋭貴, 北市 隆, 玉置俊晃, 佐田政隆, 北川哲也, 小口径グラフト開存を目的とするマクロファージ HIF と極性の動脈リモデリング基礎研究, 第 43 回日本心臓血管外科学会学術総会, 2013 年 2 月 25 日-27 日, ホテル グランパシフィック LE DAIIBA (東京都)

Nakayama T, Kurobe H, Sugasawa N, Kinoshita H, Higashida M, Matsuoka Y, Yoshida Y, Hirata Y, Sakata M, Maxfield MW, Shimabukuro M, Takahama Y, Sata M, Tamaki T, Kitagawa T, Tomita S, Role of Macrophage-derived Hif-1 as a Mediator of Vascular Remodeling, American Heart Association AHA 2012, 2012 年 11 月 3 日-7 日, ロサンゼルスコンベンションセンター (アメリカ)

菅野幹雄, 中山泰介, 木下 肇, 黒部裕嗣, 神原 保, 藤本鋭貴, 北市 隆, 大西達也, 阪田美穂, 早瀬康信, 北川哲也, 成人期先天性心疾患患者の大動脈手術の経験, 第 40 回日本血管外科学会学術総会, 2012 年 5 月 23 日-25 日, 長野ビッグハット/若里市民文化ホール/社会福祉総合センター (長野県)

中山泰介, 木下 肇, 菅野幹雄, 神原 保, 藤本鋭貴, 北市 隆, 北川哲也, 肺循環系に問題のある Complex 症例 (乳児期 MAPCAs と absent P valve) に対する治療戦略, 第 42 回日本心臓血管外科学会学術総会, 2012 年 4 月 18 日-20 日, 秋田アトリオン/秋田キャスルホテル (秋田県)

中山泰介, 黒部裕嗣, 菅澤典子, 東田真

由子、吉田恭史、佐田政隆、玉置俊晃、
北川哲也、富田修平、小口径グラフト開
存性改善を目的とするマクロファージ
HIF 制御に関する基礎研究、第 42 回日
本心臓血管外科学会学術総会、2012 年 4
月 18 日-20 日、秋田アトリオン/秋田キ
ャスルホテル(秋田県)

(3)連携研究者
()

研究者番号:

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

菅野 幹雄 (SUGANO, Mikio)
徳島大学・大学病院・医員
研究者番号: 7 0 5 6 3 8 0 7

(2)研究分担者

北川 哲也 (KITAGAWA, Tetsuya)
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究
部・教授
研究者番号: 8 0 2 4 0 8 8 6

黒部 裕嗣 (KUROBE, Hirotsugu)
徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究
部・助教
研究者番号: 3 0 3 8 0 0 8 3

中山 泰介 (NAKAYAMA, Taisuke)
徳島大学・大学病院・医員
研究者番号: 8 0 5 8 2 7 9 1

藤本 鋭貴 (FUJIMOTO, Eiki)
徳島大学・大学病院・特任助教
研究者番号: 6 0 6 1 1 2 2 5