

科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金) 研究成果報告書

平成25年5月7日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：23659421

研究課題名(和文) 低酸素応答系の制御に基づく生活習慣病治療の試み

研究課題名(英文) The role of hypoxia response system in the development of cardiovascular and metabolic diseases.

研究代表者

砂川 賢二 (SUNAGAWA KENJI)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号：50163043

研究成果の概要(和文)：

低酸素応答系において、酸素濃度センサーとして働く酵素である prolyl hydroxylase (PHD)の阻害は平滑筋細胞のアンジオテンシン II 受容体の発現, アンジオテンシン II による心臓の線維化を抑制した。また PHD アイソフォーム2を脂肪細胞特異的に欠損するマウスは高脂肪食負荷による体重増加に抵抗性であり、耐糖能が保たれていた。PHD の阻害は心血管病やメタボリック症候群の新たな治療法となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：

Inhibition of prolyl hydroxylase (PHD), an oxygen sensor, suppressed angiotensin II receptor expression in vascular smooth muscle cells and angiotensin II-induced cardiac fibrosis. Mice with targeted deletion of PHD isoform 2 in adipocytes were resistant to high-fat diet-induced obesity and glucose intolerance. PHD inhibition may be a novel strategy for the treatment of cardiovascular diseases and metabolic syndrome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子血管病態学、低酸素応答系、生活習慣病

1. 研究開始当初の背景

(1) 動脈硬化病変や肥満マウスにおけるインスリン抵抗性などの形成機序において、血管や脂肪組織へのマクロファージの浸潤を伴う慢性炎症が重要な役割を果たすと考えられている。そして、炎症と組織低酸素は悪循環を形成する。

(2) 細胞が低酸素に対応する機序において hypoxia inducible factor (HIF) とよばれる転写因子が重要な役割を果たす。正常酸素濃度下では HIF は prolyl hydroxylase domain protein (PHD) により水酸化を受け、プロテアソームにおいて分解されるため極めて低

い発現レベルに抑えられている。低酸素状態では PHD による水酸化が抑制され HIF の発現が安定化する。その結果、HIF はエリスロポイエチンなどの発現を誘導し、低酸素に適応しようとするフィードバック機構が働く。HIF が活性化する遺伝子は主に低酸素に拮抗する分子であり、HIF の発現誘導自体は生体にとっては有利な反応と考えられる。PHD には三種類のアイソフォーム(1～3)が有るが、PHD 2 が主に低酸素応答に関わると考えられている。

(3) PHD を積極的に阻害して HIF を安定化(疑似低酸素状態)させれば、炎症を惹起する

ことなく組織循環の低下に適応し、慢性炎症と組織低酸素の悪循環を断ち切れる可能性があると考えた。我々は、マクロファージ系の細胞株において、PHD2の阻害がリポポリサッカライドによって誘導されるTNF α の発現を抑制することを報告している (Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009;29:2132-7)。従ってPHD2の阻害は、生体内でも抗炎症作用により、動脈硬化形成の抑制やインスリン抵抗性の改善をもたらす可能性も示唆される。

(4) HIFは解糖系酵素の発現を誘導すると同時にミトコンドリアでの酸化的リン酸化を抑制する。正常酸素下でこのような状態(好氣的解糖)を作ると、ATP合成効率が低下する。そのため同じ量のATPを産生するためにより多くのグルコースが必要となる。また、アセチルCoAの減少により、中性脂肪の合成が低下する。したがってPHDの阻害によるグルコース消費の増加から体重が減少し、脂肪合成が低下するためにインスリン抵抗性が改善される可能性もあると考えられる。

2. 研究の目的

低酸素応答系に重要な役割を果たすprolyl hydroxylase domain protein (PHD)の抑制が動脈硬化やインスリン抵抗性の新規治療法となりうるかを検討し、その機序を解明することを目的とする。

①PHD欠損マウスやPHD阻害薬を用いて、PHD阻害がアポリポ蛋白E欠損マウスの動脈硬化や食事性肥満モデルにおけるインスリン抵抗性を改善するかを明らかにする。

②PHD阻害の有効性の機序として、抗炎症作用という観点から自然免疫、レニン・アンジオテンシン系、小胞体ストレス、活性酸素などに注目してPHDとの関連・相互作用を明らかにする。

3. 研究の方法

①ラット大動脈由来の培養平滑筋細胞にPHD阻害薬、PHD2に対するsiRNAを投与し、アンジオテンシン(Ang)IIタイプ1受容体(AT1R)のmRNAおよび蛋白発現をそれぞれノーザンブロット法およびウエスタンブロット法により検討した。

AT1R遺伝子のプロモーター活性はルシフェラーゼ法により測定した。

マウスに浸透圧ミニポンプを用いてAngIIを4週間皮下投与した。PHD阻害剤である塩化コバルトを経口投与し、大動脈のAT1Rの発現、心臓の線維化(Masson Trichrome染色)を評価した。

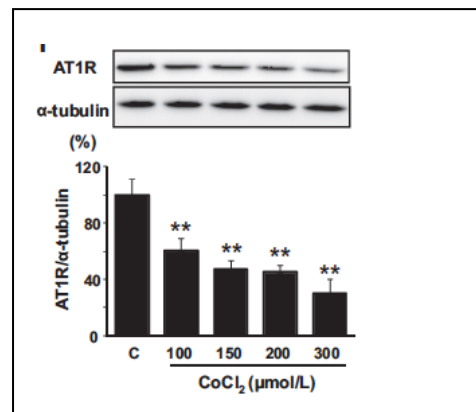
②PHD2-floxedマウスとaP-2(脂肪細胞特異的遺伝子)/Creマウスの交配により脂肪細胞特異的なPHD2欠損マウスを作成した。12週令より6週間高脂肪食を負荷し、糖負荷試験、インスリン負荷試験などを施行した後、脂肪組織の組織学的解析(脂肪細胞の大きさ、血管新生:レクチンによる染色、マクロファージ浸潤:Mac3抗体による免疫染色)、mRNA発現(定量的PCR)および蛋白発現(ウエスタンブロット法)の解析などを行った。siRNAを用いて3T3L1細胞のPHD2をノックダウンした後、脂肪細胞へ分化させmRNA発現(定量的PCR法)や中性脂肪の蓄積(Oil Red O染色)を検討した。

4. 研究成果

(1) PHD阻害によるAT1Rの発現抑制

【結果】

①PHDの阻害薬である塩化コバルト(CoCl_2)の投与あるいは低酸素(1% O_2)への暴露は、培養平滑筋細胞のHIFの発現を増加させると同時に、AT1RのmRNAおよび蛋白発現を抑制した。下図は CoCl_2 の濃度依存性に平滑筋細胞の



AT1R蛋白の発現が減少している事を示す。

逆にvascular endothelial growth factor mRNAの発現は CoCl_2 の濃度依存性に増加した。 CoCl_2 以外のPHD阻害薬(DMOG)でも同様の結果を得た。

②PHDの主要なアイソフォームであるPHD2をsiRNAによりノックダウンした平滑筋細胞でも同様にAT1Rの発現が抑制された。しかしHIFの過剰発現はAT1Rの発現には影響を与えなかった。

③PHD阻害はAT1R遺伝子のプロモーター活性を抑制すると同時に、mRNA安定性を減少させた。

④コバルトによる前処置は平滑筋細胞においてAngIIによるextracellular signal-regulated kinase(ERK)の活性化を抑制した。

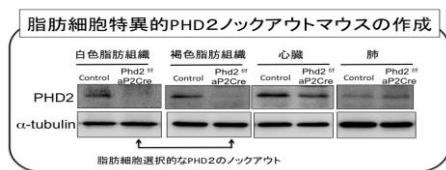
⑤マウスにコバルトを飲水投与すると、大動脈におけるAT1Rの発現が抑制された。コバルトの投与は4週間のAngII投与により生じる冠動脈周囲の線維化を抑制したが、AngIIによる血圧上昇には影響を与えなかった。

【考察】PHDの阻害がAT1Rの発現を抑制する事を明らかにした。AT1Rの発現抑制により、AngIIにより誘導される細胞内シグナルの活性化、平滑筋細胞の肥大、血管周囲の線維化などが抑制されたと考えられた。AngIIは心不全や動脈硬化などの進展に重要な役割を果たしていることから、PHDの阻害はレニン・アンジオテンシン系の抑制を介して、心血管病の新たな治療戦略となる可能性が示唆された。PHD阻害によるAT1Rの発現抑制はHIF非依存性であり、PHDのHIF以外の基質についての更なる検討、発現抑制の分子機序の解明が必要と考えられた。

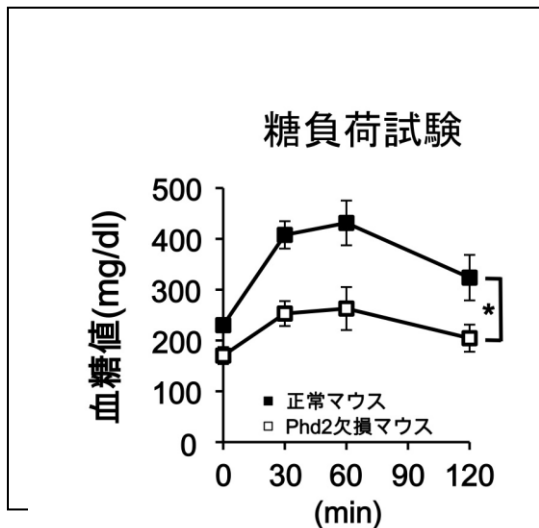
(2) 脂肪細胞特異的PHD 2欠損マウスの作成と解析。

【結果】

①PHD2-floxed マウスとaP2-Creマウスを交配し、脂肪細胞特異的PHD2欠損マウスを作成した。このマウスの脂肪組織ではHIF1 α およびHIF2 α の発現が増加していた。



② 高脂肪食負荷後、PHD2欠損マウスと比較してPHD2欠損マウスは体重および脂肪重量が少なく、耐糖能が良好であった。餌の摂取量には差はなかった。下図は糖負荷試験の結果を示す。



インスリン負荷試験では有意な差は認められなかったが、インスリン抵抗性を示すHOMA-IRでは、PHD 2欠損マウスのインスリン抵抗性が改善している事が示唆された。血中の中性脂肪やコレステロール値には差はなかった。

③高脂肪食負荷後のPHD2欠損マウスの白色脂肪細胞は野生型マウスと比べ小さく、脂肪組織へのマクロファージの浸潤が少なく、血管新生が若干多かった。血管新生に関する遺伝子では、PHD 2欠損マウスの脂肪組織においてplacenta growth factorが増加していた。

④PHD 2欠損マウスの脂肪組織で脂肪組織において解糖系酵素遺伝子の発現増加が認められた。またPPAR γ 、CEBP/ α 、アディポネクチンなどの発現も増加していた。

⑤PHD 2欠損マウスの褐色脂肪組織の脂肪の蓄積は野生型マウスと比べ少なく、またuncoupling protein 1 (UCP-1)の発現が増加していた。PHD 2欠損マウスでは酸素消費量が多かった。

⑥PHD2をノックダウンした3T3L1細胞では、解糖系酵素の遺伝子発現が亢進していた。スクランブルsiRNAを導入した対照の3T3L1細胞とくらべ、培養上清中のグルコース濃度が低下し、乳酸濃度が増加していた。脂肪細胞へ分化させたところ、PHD2をノックダウン3T3L1細胞では細胞内への脂肪の蓄積が対照の細胞と比べ少なかった。

【考察】脂肪細胞特異的にPHD 2を欠損するマウスは高脂肪食負荷による肥満に抵抗性で耐糖能の悪化が軽度であった。これは、HIFの活性化により解糖系が亢進し、酸化的リン酸化が抑制されたため、より多くの糖を消費してATP産生を行うためと考えられた。また脂肪組織へのマクロファージの浸潤が減少しており、脂肪組織における炎症の軽減の関与も示唆された。酸素消費量が増加している事から、エネルギー消費の亢進が考えられる。その機序としてはUCP-1の発現増加によるものが考えられるが、UCP-1はHIFの標的遺伝子ではなく、その機序に関しては、今後の検討が必要と考えられる。脂肪細胞のPHD 2は肥満軽減のための創薬のよい標的分子となる可能性が考えられた。

(3) まとめ

PHD 特に PHD 2の阻害はレニン・アンジオテンシン系の抑制、抗肥満作用などを示し、メタボリック症候群を伴う心血管病患者の新たな治療戦略となる可能性が示唆された。現在、PHD 阻害薬が貧血の治療薬として開発されており、新たな応用が期待される。

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 3 件)

1. Matsuura H, Ichiki T, Inoue E, Nomura M, Miyazaki R, Hashimoto T, Ikeda J, Takayanagi R, Fong GH, Sunagawa K. Prolyl Hydroxylase Domain Protein 2 Plays a Critical Role in Diet-induced Obesity and Glucose Intolerance. *Circulation* 2013 In Press
2. Inoue E, Ichiki T, Takeda K, Matsuura H, Hashimoto T, Ikeda J, Kamiharaguchi A, Sunagawa K. Beraprost sodium, a stable prostacyclin analogue, improves insulin resistance in high-fat diet-induced obese mice. *J Endocrinol.* 2012;213:285-291
3. Matsuura H, Ichiki T, Ikeda J, Takeda K, Miyazaki R, Hashimoto T, Narabayashi E, Kitamoto S, Tokunou T, Sunagawa K. Inhibition of Prolyl Hydroxylase Domain-containing Protein Downregulates Vascular Angiotensin II Type 1 Receptor. *Hypertension* 2011;58:386-393

[学会発表] (計 8 件)

第 34 回日本高血圧学会総会 (2011 年 10 月 20-22 日、宇都宮市)

松浦広英, 市来俊弘, 武田宏太郎, 砂川賢二
Prolyl hydroxylase domain 蛋白の阻害はアンジオテンシン II タイプ 1 受容体の発現を抑制する。

Scientific Sessions 2011, American Heart Association (2011 年 11 月 12-16 日、アメリカ合衆国、フロリダ)

- ①Hirohide Matsuura, Toshihiro Ichiki; Kotaro Takeda, Kenji Sunagawa
Inhibition of Prolyl Hydroxylase Domain-containing Protein Downregulates Vascular Angiotensin II Type 1 Receptor
- ②Hirohide Matsuura, Toshihiro Ichiki; Kotaro Takeda, Kenji Sunagawa
Adipocyte-Specific Deletion of Prolyl Hydroxylase Domain Protein 2 Ameliorates Diet-Induced Obesity and Glucose Intolerance in Mice

第 76 回日本循環器学会総会 (2012 年 3 月 16-18 日、福岡)

- ①Hirohide Matsuura, Toshihiro Ichiki; Kotaro Takeda, Kenji Sunagawa

Adipocyte-Specific Deletion of Prolyl Hydroxylase Domain Protein 2 Ameliorates Diet-induced Obesity and Glucose Intolerance in Mice

- ②Hirohide Matsuura, Toshihiro Ichiki; Kotaro Takeda, Kenji Sunagawa
Inhibition of Prolyl Hydroxylase Domain Protein Downregulates Vascular Angiotensin II Type 1 Receptor

High Blood Pressure Research 2012 Scientific Sessions (2012 年 9 月 19-22 日、ワシントン DC)

Toshihiro Ichiki, Kenji Sunagawa
Inhibition of prolyl hydroxylase domain containing protein downregulates vascular angiotensin II type 1 receptor.

第 29 回国際心臓研究会日本部会 (2012 年 10 月 26、27 日、福岡)

①Toshihiro Ichiki, Kenji Sunagawa
A novel role of prolyl hydroxylase domain protein, an oxygen sensor, in cardiovascular remodeling.

②Jiro Ikeda, Toshihiro Ichiki, Kotaro Takeda, Kenji Sunagawa
Macrophage-Specific Deletion of PHD2 Attenuates Hypertensive Cardiovascular Remodeling.

American Heart Association, Scientific Sessions 2012 (2012 年 11 月 3-7、Los Angeles, USA)

Jiro Ikeda, Toshihiro Ichiki, Kotaro Takeda, Kenji Sunagawa
Myeloid-Specific Deletion of PHD2 Attenuates Hypertensive Cardiovascular Remodeling

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

砂川 賢二 (SUNAGAWA KENJI)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：50163043

(2) 研究分担者

市来 俊弘 (ICHIKI TOSHIHIRO)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：80311843