

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29日現在

機関番号：16101
研究種目：若手研究（B）
研究期間：2011～2012
課題番号：23790298
研究課題名（和文） 血管リモデリングにおける HIF-1 α の機能解析及び病態生理学的意義の解明
研究課題名（英文） Functional analysis and pathological roles of HIF-1 α in vascular remodeling
研究代表者 石澤 啓介（ISHIZAWA KEISUKE） 徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教 研究者番号：60398013

研究成果の概要（和文）：平滑筋特異的 HIF-1 α 遺伝子欠損マウスを用いた検討から、アンジオテンシン II（Ang II）誘発血管リモデリングは HIF-1 α を介して制御されていることを明らかにした。①平滑筋特異的 HIF-1 α 遺伝子欠損マウスにおいて、Ang II による大動脈の中膜肥厚及び繊維化が軽減した。②平滑筋特異的 HIF-1 α 遺伝子欠損マウスの大動脈において、Ang II による繊維化及び炎症性に関わる遺伝子の発現上昇が抑制された。

研究成果の概要（英文）：It was revealed that Hif-1 α is a crucial mediator of angiotensin II (Ang II)-induced vascular remodeling, using mice lacking the Hif-1 α gene in smooth muscle cells (SMKO mice). 1, Chronic Ang II infusion induced medial thickness and vascular fibrosis in aortae of control mice, but not in SMKO mice. 2, The expression of genes related to fibrosis and inflammation was induced by Ang II in control mice, but not in SMKO mice.

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	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・薬理学一般

キーワード：血管リモデリング、動脈硬化、血管平滑筋細胞、Hypoxia inducible factor、アンジオテンシン II

1. 研究開始当初の背景

(1) 低酸素応答性転写因子-1 (hypoxia-inducible factor-1 α : HIF-1 α) は低酸素刺激に応答して、血管新生、細胞分化、生体防御（免疫）等の生理機能を制御し、癌・慢性炎症等の病態成立に関与する転写因子である。近年、低酸素非依存的にも HIF-1 α の発現が制御されている可能性が見出され、アンジオテンシン II (Ang II) 等の血管作動性物質や酸化ストレスが、HIF-1 α 発現を上昇させることが報告されている。

(2) 研究代表者らは、T 細胞特異的低酸素応答 HIF-1 α 遺伝子欠損マウスを用いて、炎症反応により惹起された血管リモデリングにお

ける HIF-1 α の役割を既に報告している (Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2010)。

(3) 動脈硬化をはじめとする血管リモデリングを伴う疾患において、血管の HIF-1 α 発現亢進は、血管平滑筋細胞増殖・遊走および炎症性細胞集積等を惹起し、病態増悪の一因となり得る可能性が示唆される。

2. 研究の目的

血管リモデリングにおける HIF-1 α の直接的な機能解析及び病態生理学的意義を検討し、HIF-1 α を標的とした新しい動脈硬化治療法の開発に向けた基盤研究を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 平滑筋細胞特異的に発現している SM22 を標的として Cre-loxP システムにより、平滑筋特異的 HIF-1 α 遺伝子欠損マウスを作製する。

(2) 平滑筋特異的 HIF-1 α 遺伝子欠損マウスを用いて、Ang II の 4 週間持続皮下投与により血管リモデリングモデルを作製する。

(3) 血管リモデリングモデルマウスにおける動脈の病理学的変化及び血管平滑筋細胞の動態を明らかにする。

(4) HIF-1 α が制御する血管リモデリングに関連する遺伝子を探索する。

4. 研究成果

(1) 平滑筋細胞特異的に発現している SM22 を標的として Cre-loxP システムにより HIF-1 α (flox/flox) SM22-Cre TG (+/-) マウス (SMKO) 及び HIF-1 α (wild/wild) SM22-Cre TG (+/-) マウス (Control) を作成した。

(2) Control では Ang II 投与により大動脈の HIF-1 α mRNA 発現およびタンパク発現上昇を認めたが、SMKO では認めなかった。

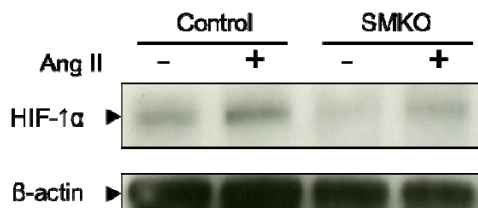


図 1、大動脈における HIF-1 α タンパク発現 (ウエスタンブロッティング)

(3) SMKO において、Ang II による大動脈の中膜肥厚及び繊維化が軽減した。

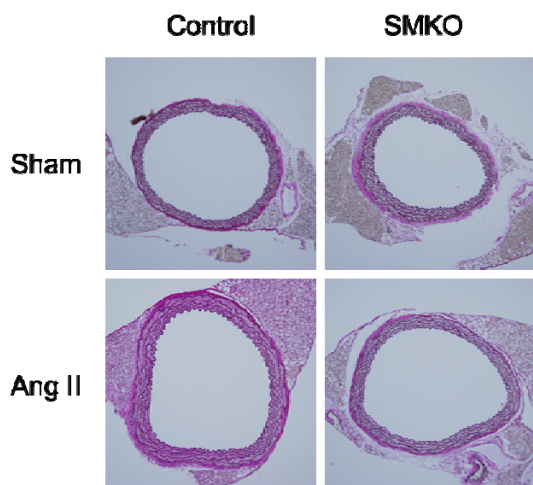


図 2、大動脈における血管リモデリング (EVG 染色)

SMKO では、Ang II による中膜肥厚及び繊維化が軽減している。

(4) Control では Ang II 投与により大動脈血管壁における Ki67 陽性細胞数の増加、活性酸素種産生の増加を認めたが、SMKO では認めなかった。

(5) Control において Ang II 持続皮下投与により収縮期血圧は有意に上昇したが、SMKO では有意な抑制が認められた。

(6) Control で認められた Ang II による血管周囲の繊維化が、平滑筋特異的 HIF-1 α 遺伝子欠損により抑制されたことから、細胞外マトリックス代謝および組織繊維化に関連する遺伝子の mRNA 発現変動について解析を行った。また動脈硬化は炎症を伴う疾患であり、マクロファージの血管壁内への取り込みが病態の進行に関与することから炎症性サイトカインについても併せて検討を行った。

①細胞外マトリックスの構成成分である fibronectin および collagen 1 の mRNA 発現は、Control において Ang II により有意に上昇し、SMKO では有意に抑制された。

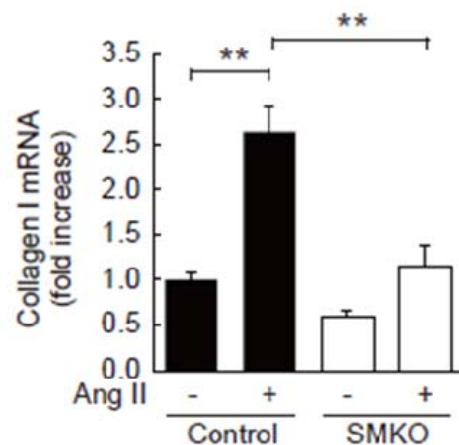


図 3、大動脈における collagen 1 の mRNA 発現 (**P<0.01)

②単球走化性因子である MCP-1、および炎症性サイトカインである IL-1 β の mRNA 発現は、Control において Ang II により有意に上昇し、SMKO では有意に抑制された。

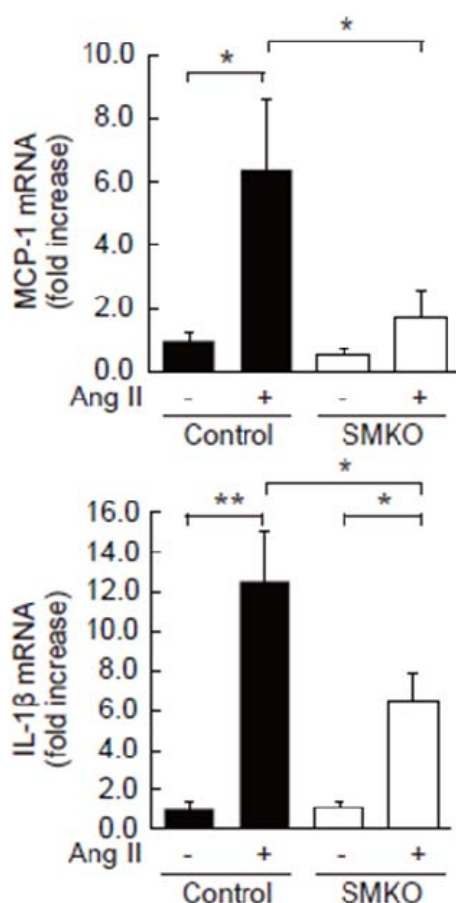


図 4、大動脈における MCP-1 および IL-1 β の mRNA 発現 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

以上の成果より、血管平滑筋細胞において、Ang II 誘発血管リモデリングは HIF-1 α を介して制御されていることが明らかとなった。

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 10 件)

- ① Keisuke Ishizawa (他 14 名、2 番目)、Nitrosonefipine ameliorates angiotensin II-induced vascular remodeling via antioxidative effects, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*、査読有、386、2013、29-39
DOI: 10.1007/s00210-012-0810-7
- ② Keisuke Ishizawa (他 8 名、6 番目)、Dietary iron restriction inhibits progression of diabetic 2 nephropathy in db/db mice, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*、査読有、304、2013、F1028-F1036
DOI: 10.1152/ajprenal.00473.2012
- ③ Keisuke Ishizawa (他 12 名、2 番目)、

Angiotensin II receptor blocker improves tumor necrosis factor- α -induced cytotoxicity via antioxidative effect in human glomerular endothelial cells, *Pharmacology*、査読有、90、2012、324-331
DOI: 10.1159/000343244

④ Keisuke Ishizawa (他 14 名、8 番目)、Heparin cofactor II, a serine protease inhibitor, promotes angiogenesis via activation of the AMPK-eNOS signaling pathway, *J. Biol. Chem.*、査読有、287、2012、34256-34263

DOI: 10.1074/jbc.M112.353532

⑤ Keisuke Ishizawa (他 7 名、5 番目)、Estrogen regulates hepcidin expression via GPR30-BMP6-dependent signaling in hepatocytes, *PLoS ONE*、査読有、7、2012、e40465
DOI: 10.1371/journal.pone.0040465

⑥ Keisuke Ishizawa (他 12 名、7 番目)、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.*、査読有、302、2012、E77-E86
DOI: 10.1152/ajpendo.00033.2011

⑦ Keisuke Ishizawa (他 7 名、4 番目)、Basic fibroblast growth factor regulates glucose metabolism through glucose transporter 1 induced by hypoxia-inducible factor-1 α in adipocytes, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*、査読有、43、2011、1602-1611
DOI: 10.1016/j.biocel.2011.07.009

⑧ Keisuke Ishizawa (他 8 名、6 番目)、Pathophysiological response to hypoxia—from the molecular mechanisms of malady to drug discovery: Inflammatory responses of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α) in T cells observed in development of vascular remodeling, *J. Pharmacol. Sci.*、査読有、115、2011、433-439
DOI: 10.1254/jphs.10R22FM

⑨ Keisuke Ishizawa (他 9 名、1 番目)、Pharmacology in health food: Metabolism of quercetin in vivo and its protective effect against arteriosclerosis, *J. Pharmacol. Sci.*、査読有、115、2011、466-470
DOI: 10.1254/jphs.10R38FM

⑩ Keisuke Ishizawa、Drug discovery for improvement of chronic kidney disease and cardiovascular disease, *YAKUGAKU ZASSHI*、査読有、131、2011、1347-1352
https://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/131/9/131_9_1347/_pdf

〔学会発表〕(計 19 件)

- ① 今西正樹、血管平滑筋細胞の hypoxia-inducible factor-1 α は angiotensin II 誘発血管リモデリングにおいて AT1 受容体発現に関与する、第 86 回日本薬理学会年会、2013. 3. 23、福岡国際会議場 (福岡市)
- ② 石澤啓介、Angiotensin II 慢性投与は hypoxia-inducible factor-1 α を介して血管リモデリングを惹起する、第 33 回日本臨床薬理学会学術総会、2012. 12. 1、沖縄コンベンションセンター (那覇市)
- ③ Masaki Imanishi、Hypoxia-inducible factor-1 α in vascular smooth muscle cells regulates angiotensin II-induced vascular remodeling and AT1 receptor expression in mouse aortic media、American Heart Association Scientific Sessions 2012、2012. 11. 4、Los Angeles Convention Cent (アメリカロサンゼルス)
- ④ 石澤啓介、循環器疾患における酸化ストレス制御を基盤とする創薬研究、次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2012 (招待講演)、2012. 9. 1、神戸学院大学 (神戸市)
- ⑤ Masaki Imanishi、Hypoxia-inducible factor-1 α deficiency in smooth muscle cell attenuates angiotensin -induced vascular remodeling in mice、International Society on Oxygen Transport to Tissue (ISOTT) 2012 2012. 8. 21、Novotel hotel (ベルギーブルージュ)
- ⑥ 三宅真理子、脂肪細胞における低酸素誘導因子 1 α 欠損は高脂肪食負荷による耐糖能異常の発現を抑制する、日本薬学会第 132 年会、2012. 3. 30、北海道大学 (札幌市)
- ⑦ 谷口順平、血管平滑筋細胞の hypoxia-inducible factor-1 α は angiotensin II 誘発血管リモデリングの形成に関与する、第 50 回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中国四国支部学術大会、2011. 11. 12、サンポートホール高松 (高松市)
- ⑧ 今西正樹、Angiotensin II 誘発性血管リモデリングは平滑筋特異的 HIF-1 α 遺伝子欠損により抑制される、第 34 回日本高血圧学会総会、2011. 10. 22、栃木県総合文化センター (宇都宮市)
- ⑨ Masaki Imanishi、Hypoxia-inducible factor-1 α deficiency in smooth muscle cells suppresses angiotensin II-induced vascular remodeling in mice、High Blood Pressure Research 2011 Scientific Sessions、2011. 9. 22、Walt Disney Dolphin Resort (アメリカオーランド)
- ⑩ 今西正樹、Angiotensin II 誘発血管リモデリングは血管平滑筋細胞の hypoxia-inducible factor-1 α を介して形成

される、第 119 回日本薬理学会近畿部会、2011. 7. 8、ウインクあいち (名古屋市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石澤啓介 (ISHIZAWA KEISUKE)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・助教

研究者番号：60398013