

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590381

研究課題名(和文)血管構築細胞の低酸素誘導性形質転換の分子機序の解明

研究課題名(英文)Mechanism of hypoxia-induced transformation in endothelial cells

研究代表者

富田 修平(Tomita, Shuhei)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：00263898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：血管再構築過程における血管内皮細胞(EC)のHIFの役割を明らかにするために、EC特異的なHIF-2 遺伝子過剰発現マウスを作製し個体レベルでの機能解析法を確立した。まず、血管再構築モデルとして本変異マウスを用いた虚血皮弁モデルを作製しその表現型を解析した。興味深いことに変異マウスにおける虚血壊死組織領域の有意な減少とその皮弁組織でのCD31陽性血管細胞の密度は有意に高いことを見出した。このことは、ECにおけるHIFシグナルの過剰発現を介して血管形成が促進されたことを意味する。

研究成果の概要(英文)：Hypoxia-inducible factors (HIFs) in endothelial cells (ECs) help to maintain ECs and promote vascularization, and HIF-2 is abundantly expressed in ECs. However, the mechanisms of action of HIF-2 in ECs are not yet fully understood. The aim of this study was to evaluate the in vivo effects of overexpression of HIF-2 in ECs on skin flap survival. A random pattern skin flap was elevated on the dorsum of transgenic mice (Tg mice) with EC-specific HIF-2 conditional overexpression and wild-type littermate control mice. The HIF-2 mRNA and protein levels were significantly increased in the Tg mice when compared with control mice. Tg mice had significantly increased skin flap survival areas when compared with wild-type mice. Moreover, histological examination revealed an increase in the subcutaneous blood vessel counts in the Tg mice. Specific overexpression of HIF-2 in ECs promoted vascularization and enhanced skin flap survival in vivo in a mouse model.

研究分野：病態医化学

キーワード：血管内皮細胞 低酸素応答 HIF

1. 研究開始当初の背景

虚血性疾患や炎症性疾患に伴う血管再構築の分子機序については、これまでに増殖因子、サイトカイン、接着因子、酵素などの生体内生理活性分子とその下流のシグナル分子が報告されている。しかし、経時的な病態変化あるいは病態局所の微小環境が血管再構築に与える影響について、その規定する分子機序の理解は未だ不十分である。病態局所に形成される低酸素環境が血管再構築に与える影響についても個体レベルでの解析は十分でない。

また、血管構築細胞の形質転換は、病態形成および進展に直接関与する要因であるが、患部の低酸素微小環境が及ぼす影響について、未だ国内外での明確な分子機構は提唱されていない。近年、EC および血管平滑筋細胞(SMC)などの HIF シグナルが各種血管新生の活性因子に応答したり、逆にそれら因子の発現を増強したりする報告はあるが、経時的・空間的要因を検討した個体レベルでの包括的解析はなされていない。

2. 研究の目的

本研究課題では、血管内皮細胞(EC)の HIF シグナルがもたらす血管構築細胞の機能的・形態的变化についてその分子機構の解明を目指す。具体的には、独自開発の EC 特異的 HIF-1 / 遺伝子欠失および HIF-1 /HIF-2 過剰発現マウスにおける肺高血圧症 (PH) モデルを用いた血管再構築の形態学的・分子機能学的解析を進める。そのために、EC および血管平滑筋細胞(SMC)を可視化標識したレポーターマウスを確立して生体レベルでの細胞系譜別形態・機能の評価系を構築する。また、EC 特異的 HIF 過剰発現マウスの PH モデルを用いて、病態モデルにおける EC の HIF シグナルネットワークの解析を通して EC の HIF シグナルを介する血管再構築に必須な標的分子群を抽出してその詳細な分子機構を明らかにする。

本研究では、EC の低酸素シグナルを介する血管再構築の分子機序を解明し、低酸素応答破綻に伴う病態の新規治療法開発基盤の研究を行なう。具体的には、独自に開発した EC 特異的 HIF 遺伝子欠失および過剰発現マウスを利用して血管再構築モデルを作製・解析することにより、PH モデルにおける EC に限局した低酸素応答の血管リモデリングにおける寄与について検証する。また、独自開発の Tag を搭載した HIF 過剰発現マウスを用いることで、EC における HIF の標的遺伝子群の抽出を通して、生体内の EC の低酸素応答ネットワークがどのように EC や SMC に対して寄与し、それら細胞の形質変化(血管再構築)を進展させるのかについて明らかにする。

3. 研究の方法

【実験 1】各遺伝子改変マウスを利用した PH

モデルの EC に関する機能的解析

PH モデルでは、組織の酸素分圧の変化を伴い、活性酸素の増加も報告されている。病態モデルの病態組織内について低酸素マーカー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、血管透過性変化や細胞間の情報の変化、内皮-間葉転換関連分子群の発現あるいは活性変化について調べる。更に、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 の機能的な面として、血液の凝固系、線溶系、血小板機能の関連分子の発現や酵素活性を測定する。更に EC の分化・増殖・移動機能についても解析する。マウス肺組織より EC を単離する技術は既に確立している。なお、使用する変異マウス系統のうち胎生致死の表現型を示す場合は、ヘテロ接合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進める。

【実験 2】変異マウスをベースとした EC・SMC 特異的標識マウスの確立と各細胞の形態学的解析

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 マウスあるいは ROSA26 LacZ 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。確立したマウスをもとに PH モデルを作製して、生体レベルの肺動脈および肺組織の形態学的な変化および EC・SMC 各細胞の形質変化について、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、PH モデルによる肺動脈の血管リモデリングの病態が、骨髄由来細胞の影響を受けている可能性を考え、同モデルを用いて骨髄移植実験による評価も加える。

【実験 3】EC 株の培養実験系における HIF シグナルを介する EC の細胞応答解析

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、最近確立された不死化 EC 株を用いて、培養条件下の EC の HIF-1 分子の機能を解析する。EC 株を低酸素の培養条件で、機能獲得型解析 (HIF-1/2 および ARNT 遺伝子過剰発現系による) および機能欠失型解析 (HIF-1/2 遺伝子ノックダウンによる) 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。同様の実験を SMC についても考

案・実施する。

【実験 4】PH モデルマウスからの単離 EC を用いた HIF の標的遺伝子群の抽出

生体内では EC の HIF がどのような細胞応答を介して血管再構築を引き起こすのかを分子レベルで解析するために、EC 特異的 HIF 過剰発現マウスの PH モデルを用いて、EC の HIF の標的遺伝子群を網羅的に抽出する。抗 CD31 抗体を用いた免疫学的分離法により PH モデルの肺組織から EC を単離して、全ゲノムに対して、マイクロアレイ解析、クロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-Seq) および DNA メチル化解析を施行する。これらの解析情報を合わせて、PH に関わる EC 由来の HIF 標的遺伝子群を抽出する。

【実験 5】機能的検索による HIF の血管再構築関連分子の抽出

【実験 4】で得られた HIF の血管再構築に関連した候補分子を遺伝子導入した EC と SMC の培養をおこない、SMC の細胞遊走能を指標としたスクリーニングを行うことにより目的の機能性分子群を再抽出する。最終年度には再抽出された分子が、実際に生体内で血管再構築モデルマウスにおいて機能性を発揮するかどうかを検証する。以上の実験結果とこれまでに報告されている情報を基に血管再構築を人為的に制御できる可能性を考察するとともに血管再構築の伴う疾患の新たな治療方針を提案する。

4. 研究成果

(1) 本研究遂行を目的として、血管内皮細胞 (EC) の機能に必須である HIF-2 の機能解析を行うために EC 特異的に HIF-2 の過剰発現モデル (HIF-2VE-Tg) の作製を行った。定量的 PCR によって測定された、HIF-2VE-Tg のゲノムに挿入された遺伝子のコピー数は 4 コピーであった。本変異マウスを低酸素環境に 10% 酸素分圧下に 1 時間暴露させたところ、変異マウスの肺組織における HIF-2 の蛋白発現は有意に増加していた。また、変異マウスの表現型は肉眼的には正常マウスと変わらず、血管の組織学的解析においても血管の走行や密度なども変化を認めなかった。EC の HIF-2 の機能解析を目的として、本変異マウスを利用して血管再構築の解析モデルとして虚血皮弁モデルを作製した。その結果、変異マウス群では、対照群 (野生型) に比較して患部虚血壊死領域の減少が認められた。また組織学的解析よりレクチンで検出される血管領域の増大も認められた (Morimoto et al., PRS-GO 2014)。

(2) また、病態モデルの血管再構築に関連する HIF シグナル標的分子群の同定を試みるために、マウス肺組織から EC の単離手技を確立した。同時に、低酸素および薬剤 (monocrotaline あるいは SU5416) を用いたマウス肺高血圧症モデルを確立した。まず酸素濃度 10% 低酸素環境下で 4 週間飼育した本変異マウスの解析を行ったところ対照

群に比較して右室左室心筋重量比の解析において有意な変化は認められなかった。EC 機能障害を伴う薬物投与モデルも追加作製して現在施行中である。また、長期間低酸素条件に暴露された野生型マウスより肺組織の EC をソーティングにより単離して、長期低酸素環境に暴露されることによる EC の形質変化について網羅的遺伝子解析を施行し現在解析中である。

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 22 件)

1 Yamano N, Tomita S (他 8 名, 8 番目): A long-term high-fat diet changes iron distribution in the body, increasing iron accumulation specifically in the mouse spleen. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 61:20-27 (2015). (査読有) doi: 10.3177/jnsv.61.20.

2 Miyamoto L, Tomita S (他 6 名, 7 番目): Spontaneously hyperactive MEK-Erk pathway mediates paradoxical facilitation of cell proliferation in mild hypoxia. *Biochim Biophys Acta*. 1850:640-646 (2015). (査読有) doi: 10.1016/j.bbagen.2014.12.006.

3 Imanishi M, Tomita S (他 8 名, 2 番目, 責任著者): Smooth muscle cell specific Hif-1 deficiency suppresses angiotensin II-induced vascular remodeling in mice. *Cardiovasc Res* 102:460-468 (2014). (査読有) doi: 10.1093/cvr/cvu061.

4 Imamura Y, Tomita S, Imanishi M (他 5 名, 2 番目, 責任著者): HIF-2 /ARNT complex regulates hair development via induction of p21Waf1/Cip1. *FASEB J* 28:2517-2524 (2014). (査読有) doi: 10.1096/fj.13-244079.

5 Kihira Y, Tomita S (他 12 名, 14 番目, 責任著者): Deletion of Hypoxia-Inducible Factor-1 in Adipocytes Enhances Glucagon-Like Peptide-1 Secretion and Reduces Adipose Tissue Inflammation. *PLoS ONE* 9(4) e93856 (2014). (査読有) doi: 10.1371/journal.pone.0093856.

6 Saito M, Tomita S (他 6 名, 8 番目): Prostatic ischemia induces ventral prostatic hyperplasia in the SHR; possible mechanism of development of BPH. *Sci Rep* 4:3822 (2014). (査読有) doi: 10.1038/srep03822.

7 Morimoto A, Tomita S, Imanishi M (他 9 名, 2 番目, 責任著者): Overexpressed HIF-2 in Endothelial Cells Promotes Vascularization and Improves Random Pattern Skin Flap Survival. *Plast Reconstr Surg Glob Open* 2:e132 (2014). (査読有) doi: 10.1097/GOX.0000000000000083.

8 Shimizu S, Tomita S (他 9 名, 8 番目): Blocking of the ATP sensitive potassium channel ameliorates the ischemia-reperfusion injury in the rat testis. *Andrology* 2:458-465 (2014). (査読有) doi: 10.1111/j.2047-2927.2014.00199.x.

9 松永慎司, 富田紀子, 富田修平 (責任著者)『心血管病態における低酸素センサーの役割とその治療応用』, 心血管薬物療法 2-1 号 (2014) (査読無) URL: <http://j-iscp.com/pdf/j-iscp02.pdf>.

10 Nakayama T, Tomita S (他 14 名, 16 番目, 責任著者): Role of macrophage-derived hypoxia-inducible factor (HIF)-1 as a mediator of vascular remodeling. *Cardiovasc Res* 99:705-15 (2013). (査読有) doi: 10.1093/cvr/cvt146.

11 Nakajima K, Tomita S (他 9 名, 7 番目): The ARNT-STAT3 axis regulates the differentiation of intestinal intraepithelial TCR +CD8 + cells. *Nat Commun* 4:2112 (2013). (査読有) doi: 10.1038/ncomms3112.

12 Sakurada T, Tomita S (他 13 名, 9 番目): Nitrosonifedipine ameliorates angiotensin II-induced vascular remodeling via antioxidative effects. *N-S Arch Pharmacol* 386:29-39 (2013). (査読有) doi: 10.1007/s00210-012-0810-7.

13 Ikeda Y, Tomita S (他 7 名, 6 番目): Dietary iron restriction inhibits progression of diabetic nephropathy in db/db mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 304:F1028-36 (2013). (査読有) doi: 10.1152/ajprenal.00473.2012.

14 Sato S, Tomita S (他 4 名, 3 番目): The aryl hydrocarbon receptor and glucocorticoid receptor interact to activate human metallothionein 2A. *Toxicol Appl Pharmacol* 273:90-99 (2013). (査読有) doi: 10.1016/j.taap.2013.08.017.

15 Shimizu S, Tomita S (他 9 名, 11 番目): Olmesartan ameliorates urinary

dysfunction in the spontaneously hypertensive rat via recovering bladder blood flow and decreasing oxidative stress. *NeuroUrol Urodyn* 33(3):350-357 (2013). (査読有) doi: 10.1002/nau.22405.

16 富田修平, 木平孝高, 玉置俊晃 (責任著者)『血管リモデリングにおける T 細胞の低酸素応答性転写因子の役割』, 生化学ミニレビュー-85-4 号 (2013). (査読無) URL: <http://www.jbsoc.or.jp/seika/wp-content/uploads/2013/06/85-04-06.pdf>.

17 Takeda T, Tomita S (他 3 名, 2 番目): Hypoxia inducible factor-1 is necessary for invasive phenotype in Vegf-deleted islet cell tumors. *Sci Rep* 2:494 (2012). (査読有) doi: 10.1038/srep00494.

18 Takaku M, Tomita S (他 7 名, 2 番目, 責任著者): Systemic Preconditioning by a Prolyl Hydroxylase Inhibitor Promotes Prevention of Skin Flap Necrosis via HIF-1-Induced Bone Marrow-Derived Cells. *PLoS ONE* 8:e42964 (2012). (査読有) doi: 10.1371/journal.pone.0042964.

19 Ikeda Y, Tomita S (他 6 名, 4 番目): Estrogen regulates hepcidin expression via GPR30-BMP6-dependent signaling in hepatocytes. *PLoS ONE* 7:e40465 (2012). (査読有) doi: 10.1371/journal.pone.0040465.

20 Ikeda Y, Tomita S (他 13 名, 7 番目): Heparin cofactor II, a serine protease inhibitor, promotes angiogenesis via activation of the AMPK-eNOS signaling pathway. *J Biol Chem* 287:34256-34263 (2012). (査読有) doi: 10.1074/jbc.M112.353532.

21 Izawa-Ishizawa Y, Tomita S (他 11 名, 9 番目): Angiotensin II receptor blocker improves tumor necrosis factor- α -induced cytotoxicity via antioxidative effect in human glomerular endothelial cells. *Pharmacology* 90:324-331 (2012). (査読有) doi: 10.1159/000343244.

22 Tajima S, Tomita S (他 11 名, 10 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* 302:E77-86 (2012). (査読有) doi: 10.1152/ajpendo.00033.2011.

〔学会発表〕(計5件)

1 Tomita S (国際シンポジウム招待講演)
Pathophysiological responses to hypoxia in vascular remodeling by hypoxia-inducible factor-1. The 11th World Congress of the International Society for Adaptive Medicine (Yonago, Tottori), May 26-30th 2015.

2 Saito M, Tomita S (国際シンポジウム口頭発表)
Does pelvic ischemia induce ventral prostatic hyperplasia in the SHR? The 8th Pan-Pacific Continence Society Meeting. Busan Exhibition & Convention Center (Busan, Korea) Sep 26-27th 2013.

3 Ikeda Y, Tomita S (国際学会ポスター発表)
The effect of dietary iron restriction against diabetic nephropathy in db/db mice. Experimental Biology, (Boston USA) April 20-24th 2013.

4 Nakayama T, Tomita S (国際学会口頭発表)
Role of Macrophage-derived Hif-1 as a Mediator of Vascular Remodeling American Heart Association Scientific Sessions 2012 Los Angeles Convention Center, (Los Angeles, USA) Nov 2012

5 Tomita S (国際シンポジウム招待講演).
Pathophysiological responses to hypoxia in vascular remodeling by hypoxia-inducible factors. 40th meeting of the International Society on Oxygen Transport to Tissue, Novotel, (Bruges, Belgium) August 19-24th, 2012. (査読無)

〔図書〕(計3件)

(1) 土屋浩一郎, 富田修平 (他5名, 3番目)
『亜硝酸塩による腎保護作用』, 腎とフリーラジカル 11:30-33 (2012). (査読無)

(2) 櫻田巧, 富田修平 (他5名, 3番目)
『Nitrosonifedipineはangiotensin IIによるマウス血管リモデリングを抑制する』, 腎とフリーラジカル 11:78-81 (2012). (査読無)

(3) 池田康将, 富田修平 (他5名, 3番目)
『脂肪組織肥大進展における鉄キレート剤の効果』, 腎とフリーラジカル 11:155-159 (2012). (査読無)

〔その他〕

ホームページ

URL:<http://www.med.tottori-u.ac.jp/molp/harm/6020.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 修平 (TOMITA SHUHEI)

鳥取大学・医学部・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