

研究報告書

「低酸素シグナルによる炎症制御の解明と循環器疾患治療への応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年4月～平成26年3月

研究者: 武田 憲彦

1. 研究のねらい

最近の研究から心不全、心線維化症例では血中の炎症性サイトカイン濃度が上昇していることが明らかにされている。このような組織リモデリングの病態にはTNF α 、IL-1 β 、IL-6などの炎症性サイトカインや inducible Nitric oxide synthase (iNOS)由来の一酸化窒素(NO)を介した慢性的な炎症プロセスの活性化が重要な役割を果たしていると考えられているが、その分子機序は未だに明らかにされていない。

本研究は組織リモデリング過程の組織が低酸素環境に陥っていることに着目し、低酸素シグナルの役割と言う切り口から慢性炎症による組織リモデリング機構を明らかにすることを目的としている。炎症局所は炎症細胞浸潤による酸素消費増大、未熟な血管網形成による酸素供給により特に低酸素環境に陥っていると考えられる。更に心不全組織では病態悪化に伴う頻脈が組織灌流を低下させるだけでなく、心拡大に伴う力学的負荷が心筋細胞の酸素需要を増大させている。

低酸素に対し、細胞や組織はそれぞれ固有の応答を示すが、その主要な反応は Hypoxia inducible factor(HIF)と呼ばれる一群の低酸素応答転写因子群により調節される。低酸素応答は細胞応答を制御するのみならず、炎症性サイトカイン、NO 放出を調節することで炎症自体を増悪、持続させる。主要な役割を果たす HIFとして HIF-1 α と HIF-2 α が知られている。我々はこれまで、システムバイオロジーと実験的アプローチを用いて、HIF-1 α と HIF-2 α のバランス(HIFスイッチング)が一酸化窒素(Nitric oxide, NO)産生を調節することを明らかにしてきた。特にマクロファージにおいては炎症惹起型(M1)および炎症抑制型(M2)マクロファージにおいてそれぞれ HIF-1 α 、HIF-2 α が特異的に発現することで、炎症メディエーターである NO 産生の時空間的制御が行われていることを報告している(*Genes Dev.* 2010)。

本研究は(1)このような組織リモデリングにおいて炎症細胞、特にマクロファージが果たす役割について、心血管疾患モデルおよび、皮膚創傷治癒モデル、腫瘍増殖モデルなどを用いて明らかにし、(2)引き続き高血圧などにより引き起こされる心血管リモデリングにおける低酸素シグナルの役割を明らかにすることで、治療応用に向けた分子基盤を構築することを目的とする。

2. 研究成果

(1)概要

慢性的な炎症シグナルの活性化は過剰な組織リモデリングを誘導すると考えられるが、その詳細な分子機序は明らかにされていない。本研究では組織に浸潤するマクロファージに注

目し、その誘導機構および組織リモデリングにおいて果たしている役割につき解析を行った。

まず始めに、組織再構築過程につき種々の知見が得られている皮膚創傷治癒モデルおよび腫瘍増殖モデルを用いて、マクロファージ浸潤の分子機構およびその役割について解析を行った(研究テーマ A)。その結果、炎症組織に浸潤するマクロファージ由来の血管内皮細胞増殖因子(VEGF)により、創傷治癒過程、血管新生が促進されると共に過剰な線維化が抑制されること、更に組織再構築過程におけるマクロファージ遊走において線維芽細胞のHIF-1 α シグナルが重要な役割を果たしていることを確認した。

次に心血管モデルにおける低酸素シグナルの役割につき、特に HIF- α スイッチングに着目して解析を行った(研究テーマ B)。我々はこれまで、HIF- α スイッチングが炎症シグナルのメディエーターの一つである Nitric oxide(NO)産生の制御に関わることを明らかにしている。本研究では引き続き皮膚ケラチノサイトにおける HIF- α スイッチングが NO 産生の制御を介して血圧調節および引き続く心線維化において重要な役割を果たしていることを明らかにした。引き続き心臓リモデリング過程で心筋組織に集積するマクロファージ、低酸素シグナルの役割について解析を行っている。特に低酸素シグナルの役割に注目し、圧負荷後の心臓における心筋細胞傷害、マクロファージ浸潤、線維芽細胞活性化プロセスにつき経時的な解析を行っている。

(2) 詳細

研究テーマ A 「組織リモデリングにおけるマクロファージの役割」

これまで我々はヒト心不全病理標本を用いた解析から、心不全組織にマクロファージが恒常的に浸潤していることを確認し、組織リモデリングにおいてマクロファージが重要な役割を果たしていると考えている。低酸素ストレスに晒されたマクロファージは血管内皮細胞増殖因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)を強く分泌する。そこで組織リモデリングにおいてマクロファージ由来の VEGF が果たす役割について、まず皮膚創傷治癒モデルを用いて検討を行った。マウス皮膚に欠損を作成したところ、炎症期から線維芽細胞増殖期にかけて低酸素環境に陥っている創傷部位にマクロファージが浸潤し、HIF- α 標的因子である VEGF 分泌を促進していた。治癒過程においてマクロファージが分泌する VEGF の役割を解析するため、マクロファージ特異的に VEGF を欠損したマウスを作成し検討した。健常マウスでは欠損作成後 Day14 までに皮膚欠損部は修復されるが、VEGF 欠損マウスでは Day14 においても依然として創傷治癒過程が完了しないだけでなく、肉芽組織および SM- α -アクチン陽性筋線維芽細胞の増殖が亢進していることを確認し報告した (*J Invest Dermatology* 2011)。この知見より、マクロファージ由来の VEGF は創傷治癒過程を促進するだけでなく、筋線維芽細胞の活性化・増殖を制御する可能性があると考えられた。

ではこのようなりモデリング過程の組織へとマクロファージを遊走させるシグナルは何であろうか？ 我々は間質組織、特に線維芽細胞の低酸素シグナルが重要な役割を果たしているとの仮説を立て、線維芽細胞特異的 HIF-1 α 欠損マウスを作成し、腫瘍増殖モデルを用いた解析を行った。乳癌自然発症モデルマウスを用いて健常マウスおよび線維芽細胞特異的 HIF-1 α 欠損マウスと交配し、乳癌増殖過程を解析したところ、HIF-1 α 欠損マウスにおいては腫瘍

組織内へのマクロファージ遊走が有意に減弱していた。間質、特に線維芽細胞の低酸素シグナルが炎症細胞遊走に作用する事を確認し報告した(*Cancer Res.* 2012)。HIF-1 α 欠損マウスではマクロファージ遊走が減弱するだけでなく、健常マウスと比較して腫瘍内の血管が成熟化すると共に腫瘍の増大が認められた。

研究テーマB「心血管疾患病態において低酸素シグナルが果たす役割の解析」

本研究では引き続き、HIF- α を介する低酸素シグナルが心血管リモデリングにおいて果たしている役割につき解析を行った。我々はこれまでHIF- α スイッチング、即ちHIF-1 α とHIF-2 α によりマクロファージ由来のNitric oxide(NO)産生が制御されることを明らかにしてきた(*Genes Dev.* 2010)。NOは炎症誘導因子である一方、循環動態においては強い血管拡張作用を有することが知られている。血管収縮、血圧上昇による圧負荷は左心室への力学的ストレスを惹起し、心臓リモデリングの大きな原因となるため、その制御機構の解明は重要である。末梢組織、なかでも皮膚は体内で最大の臓器であり、抵抗血管の収縮性を制御することで血圧制御においても重要な役割を果たしていると考えられる。そこで我々は皮膚ケラチノサイト特異的にHIF-1 α およびHIF-2 α を欠損したマウスを樹立し、血圧制御における役割を解析した。ケラチノサイト特異的HIF-1 α 欠損マウスでは健常マウスと比較して血圧が上昇していた。運動負荷を与えると通常マウスは末梢血管の拡張を示したが、HIF-1 α 欠損マウスにおいては血管拡張能が低下していた。興味深い事にケラチノサイト特異的HIF-2 α 欠損マウスではHIF-1 α 欠損マウスと反対に血圧の低下が認められた。強い血管収縮能を有し、血圧を上昇させる作用を持つAngiotensin IIを投与すると、健常マウスでは著しい血圧上昇および心線維化が誘導された一方、HIF-2 α 欠損マウスでは血圧上昇および心線維化の程度がいずれも軽減していた。以上の知見から、皮膚ケラチノサイトにおけるHIF- α スイッチングが血圧調節を介して心臓リモデリングにおいて重要な役割を果たしていることを確認し報告した(*PNAS* 2013)。

現在、我々は引き続き心臓リモデリングにおけるマクロファージ浸潤および低酸素シグナルの役割について解析を行っている。マウスにおける心臓リモデリングモデルである横行大動脈縮尺術による圧負荷心不全モデルを施行し、浸潤するマクロファージの性状を経時的に観察すると共に、このプロセスにおいて低酸素シグナルが果たしている役割について解析を継続している。心臓リモデリング過程におけるマクロファージ遊走機構の解明と、マクロファージの役割につき解析を行うことで、慢性炎症としての心臓リモデリングの結果引き起こされる心線維化の分子機構の解明に迫りたいと考えている。

3. 今後の展開

組織リモデリングの一部は組織修復として合目的に作用する一方、過剰な線維化は臓器機能を低下させる原因となる。現在我々は、慢性的な炎症シグナルの活性化が過剰な線維化、組織の低酸素化を惹起し、更に炎症細胞の活性化を引き起こす可能性があると考えている。このような組織リモデリングを介する低酸素シグナル、炎症プロセス活性化と言うフィードバックループを慢性炎症の一つの機構と捉えると、今後実質細胞傷害、炎症細胞浸潤および線維芽細胞活性化制御の細胞間相互作用を明らかにする必要があると思われる。このような視点から、炎

症細胞の低酸素シグナルに着目し、線維芽細胞活性制御因子の同定を試みたいと考えている。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究において、特に組織リモデリング過程において間質細胞、特にマクロファージが果たしている役割について解析を行ってきた。皮膚創傷治癒モデル、腫瘍増殖モデルにおいてマクロファージ、線維芽細胞の低酸素シグナルおよびそれにより誘導される VEGF は組織リモデリングにおいて重要な役割を果たしていることを確認し報告することができた。加えて循環器疾患モデルにおいても皮膚ケラチノサイトにおける HIF- α スwitchングが血圧制御を介して心線維化のプロセスに重要な役割を果たしていることを報告した。これらいくつかの知見を報告できた一方で、心臓リモデリングにおける低酸素シグナルの役割については本研究期間内に論文発表できなかったことは残念であった。現在その分子機構の解明を継続中であるが、その中で興味深い知見を得ており、できるだけ早く論文発表を行いたいと考えている。

(2) 研究総括評価(公開項目)

本研究では、炎症において組織に浸潤してくるマクロファージや間質の線維芽細胞などが、HIF が活性化しやすい炎症組織の低酸素状態にあって、どのように組織リモデリングに関与しているのか解析してきた。皮膚創傷治癒モデルでは、マクロファージ由来の HIF- α 標的因子である VEGF の分泌促進が創傷治癒に促進的に働き、また自然発症腫瘍増殖モデルでは線維芽細胞における HIF-1 α 依存的な低酸素シグナルがマクロファージの腫瘍組織内への遊走を促進して腫瘍の増殖を抑制することを明らかにした。さらに、体内最大臓器である皮膚のケラチノサイト特異的に HIF-1 α あるいは HIF-2 α を欠損したマウスにおいて、HIF-1 α 欠損では血圧が上昇して運動負荷時の血管拡張能が低下し、反対に HIF-2 α 欠損では血圧の低下が認められ Angiotensin II 投与による血圧上昇や心線維化の程度の軽減が認められ、皮膚ケラチノサイトにおける HIF- α スwitchングが血圧調節を介して心臓リモデリングにおいて重要な役割を果たしていることを確認し論文発表した。以上のように、低酸素シグナルによる炎症制御の解明に関し、研究は概ね順調に進捗していると評価できる。今後、心臓リモデリングの系での解析がさらに進めば、臨床応用に向けた基盤的知見が得られると期待できる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Cowburn AS, Takeda N, Boutin AT, Kim JW, Sterling JC, Nakasaki M, Southwood M, Goldrath AW, Jamora C, Nizet V, Chilvers ER, Johnson RS. HIF isoforms in the skin differentially regulate systemic arterial pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013; 110(43):17570-5.
2. Saito T, Takeda N, Amiya E, Nakao T, Abe H, Semba H, Soma K, Koyama K, Hosoya Y, Imai Y, Isagawa T, Watanabe M, Manabe I, Komuro I, Nagai R, Maemura K. VEGF-A induces its negative regulator, soluble form of VEGFR-1, by modulating its alternative splicing. *FEBS Lett*. 2013; 587(14):2179-85.

3. Kim JW, Evans C, Weidemann A, Takeda N, Lee YS, Stockmann C, Branco-Price C, Brandberg F, Leone G, Ostrowski MC, Johnson RS. Loss of fibroblast HIF-1 α accelerates tumorigenesis. *Cancer Res.* 2012; 72(13):3187-95.
4. Stockmann C, Kirmse S, Helfrich I, Weidemann A, Takeda N, Doedens A, Johnson RS. A wound size-dependent effect of myeloid cell-derived vascular endothelial growth factor on wound healing. *J Invest Dermatol.* 2011; 131(3):797-801.
5. Takeda N, O'Dea EL, Doedens A, Kim JW, Weidemann A, Stockmann C, Asagiri M, Simon MC, Hoffmann A, Johnson RS. Differential activation and antagonistic function of HIF-[alpha] isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes Dev.* 2010; 24(5):491-501.

(2)特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

武田憲彦

酸素医学特別セミナー (東北大学医学部 2013年2月20日)

HIF- α を介する炎症と低酸素シグナルの制御機構

武田憲彦

第35回 日本分子生物学会(福岡国際会議場、福岡、2012年12月12日)

マクロファージ低酸素応答におけるエピジェネティック調節機構の役割

武田憲彦

第36回 日本分子生物学会(神戸国際会議場、神戸、2013年12月3日)

細胞の低酸素センサーと代謝調節

武田憲彦

第10回 がんとハイポキシア研究会(横浜開港記念館、横浜、2012年12月6日)

HIFを介する炎症と低酸素シグナルの制御

Abe H, Takeda N, Semba H, Soma K, Isagawa T, Manabe I, Nagai R and Komuro I.

Roles of Macrophage Hypoxia Signaling in Cardiac Remodeling.

AHA Scientific Session 2012

(Los Angeles convention center, Los Angeles, USA. 2012年11月6日)