

論 文 内 容 要 旨

題目 Systemic Preconditioning by a Prolyl Hydroxylase Inhibitor Promotes Prevention of Skin Flap Necrosis via HIF-1-Induced Bone Marrow-Derived Cells

(プロリン水酸化酵素阻害剤を術前に全身投与すると低酸素誘導因子 HIF-1 と骨髄由来細胞の応答を介して皮弁壊死の予防を促進する)

著者 Mitsuru Takaku, Shuhei Tomita, Hirotsugu Kurobe, Yoshitaka Kihira, Atsushi Morimoto, Mayuko Higashida, Yasumasa Ikeda, Akira Ushiyama, Ichiro Hashimoto, Hideki Nakanishi, Toshiaki Tamaki

平成 24 年 8 月 7 日発行 PLOS ONE 第 7 巻第 8 号
e42964 に発表済

内容要旨

局所皮弁は形成外科領域において最も一般的な皮膚再建方法の一つであるが、時に重度の血流障害による皮弁壊死を来し治療期間の延長や2次的な手術が必要となることがある。それゆえ薬剤を用いた皮弁壊死予防の研究は臨床的に意義を持つが、いまだ臨床応用されている薬剤はない。

今回我々は、局所皮弁が低酸素・虚血状態であることに注目し、細胞の低酸素応答における中心的役割を持つ低酸素誘導因子 (Hypoxia inducible factor: 以下 HIF と略す) を治療ターゲットとした。HIF は低酸素環境下における血管新生・細胞生存・代謝などに関わる多くの因子の発現を直接調節していることが報告されている。

HIF-1 α は通常酸素分圧下において prolyl hydroxylase domain enzymes (PHDs) による水酸化を受けて常に不活化されている。PHDs の活性化には酸素・2 価鉄・2-オキソグルタル酸を必要とするため、組織が低酸素環境となった場合、PHDs の活性は低下する。これにより HIF-1 α は安定化し、HIF-1 β と二量体を形成してターゲット遺伝子の発現を促進することができる。

本研究では、この PHDs の阻害剤である dimethyloxalyl glycine (DMOG) を投与し HIF-1 α を安定化させることで虚血皮弁における低酸素応答が増強し生存領域が拡大すると仮定し、マウス背部虚血皮弁を用いて検証した。

マウス背部に虚血皮弁を作製する 48 時間前に DMOG を腹腔内投与したところ、DMOG 処置群ではコントロール群と比較して有意に皮弁生存域が拡大した。また DMOG 投与群では、術前術後の皮膚における HIF-1 タンパクの発現上昇を認め、血管新生因子である vascular endothelial growth factor とその受容体の Flk-1 の発現が上昇し、皮弁近位における血管の有意な増加を認めた。また、血管新生に関与する循環血管内皮前駆細胞 (EPC) は DMOG 処置群で有意に増加していた。さらに、骨髄の BrdU/DNA 解析では DMOG 処置後 48 時間で増殖期の骨髄前駆細胞が著明に誘導されていた。これらの結果から、DMOG 投与により HIF シグナルは増強され虚血領域への血管新生が促進されることが示唆された。次に、虚血状態の皮弁におけるアポトーシスに対する影響を検証した。皮弁遠位の組織における TUNEL 染色では、虚血の強い皮弁遠位組織において DMOG 処置群でアポトーシス細胞の有意な減少を認めた。さらに、解糖系酵素である hexokinase II の発現上昇・アポトーシス促進因子である Bax タンパクの発現減少を認めた。これらの結果から、DMOG の皮弁生存効果には虚血の強い領域におけるアポトーシスの抑制が関与していることが考えられた。

次に、DMOG による皮弁壊死予防効果が HIF-1 α を介した反応であることを検証するために HIF-1 α 欠損マウスを用いて同様の実験を行った。HIF-1 α 欠損マウスでは皮弁生存の減少・循環 EPC の減少・アポトーシス細胞の増加を示したことから、皮弁生存には HIF-1 α が重要な役割を有することが示唆された。最後に、骨髄細胞における HIF-1 α の発現が皮弁生存に果たす役割を検証するために HIF-1 α 欠損マウスの骨髄を野生型マウスに移植し虚血皮弁を作製した。HIF-1 α 欠損マウスの骨髄を移植した野生型のマウスではコントロールと比較して有意な皮弁生存領域の減少を示した。

これらの結果から、DMOG の術前投与による皮弁壊死の予防効果は、HIF-1 機能を介した抗アポトーシス効果と血管新生促進効果によるものであり、DMOG 術前投与は皮弁壊死予防の治療的戦略となる可能性があることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

| | | | |
|------|----------------------------------|----|------|
| 報告番号 | 甲医第 1180 号 | 氏名 | 高久 暢 |
| 審査委員 | 主査 佐々木 卓也 副査 丹黒 章 副査 久保 宜明 | | |

題目 Systemic Preconditioning by a Prolyl Hydroxylase Inhibitor Promotes Prevention of Skin Flap Necrosis via HIF-1-Induced Bone Marrow-Derived Cells

(プロリン水酸化酵素阻害剤を術前に全身投与すると低酸素誘導因子 HIF-1 と骨髄由来細胞の応答を介して皮弁壊死の予防を促進する)

著者 Mitsuru Takaku, Shuhei Tomita, Hirotsugu Kurobe, Yoshitaka Kihira, Atsushi Morimoto, Mayuko Higashida, Yasumasa Ikeda, Akira Ushiyama, Ichiro Hashimoto, Hideki Nakanishi, Toshiaki Tamaki

平成 24 年 8 月発行 PLoS ONE 第 7 巻第 8 号 e42964 に発表済
(主任教授 中西秀樹)

要旨 局所皮弁は形成外科領域において最も一般的な皮膚再建方法の一つであるが、時に重度の血流障害による皮弁壊死を来し治療期間の延長や2次的な手術が必要となることがある。それゆえ薬剤を用いた皮弁壊死予防の研究は臨床的に意義を持つが、いまだ臨床応用されている薬剤はない。

今回申請者らは、局所皮弁が低酸素・虚血状態であることに注目し、細胞の低酸素応答における中心的役割を持つ低酸素誘導因子 (Hypoxia inducible factor:以下 HIF と略す) を治療ターゲットとした。HIF は低酸素環境下における血管新生・細胞生存・代

謝などに関わる多くの因子の発現を直接調節していることが報告されている。

HIF-1 α は通常酸素分圧下では prolyl hydroxylase domain enzyme (PHDs) による水酸化をうけて分解されるが、組織が低酸素環境になると PHDs の水酸化活性が抑制され HIF-1 α は安定化し、HIF-1 β と二量体を形成してターゲット遺伝子の発現を促進する。

本研究では、この PHDs の阻害剤である Dimethyloxalylglycine (DMOG) を投与し HIF-1 α を安定化させることで虚血皮弁における低酸素応答が増強し生存領域が拡大すると仮定し、マウス背部虚血皮弁を用いて検証した。

マウス背部に虚血皮弁を作製する48時間前に DMOG を腹腔内投与したところ、DMOG 処置群ではコントロール群と比較して有意に皮弁生存域が拡大した。DMOG 処置群ではコントロール群と比較して皮弁における HIF-1 α タンパク発現の上昇・血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の増加・循環血管内皮前駆細胞 (EPC) の増加を認め、皮弁へ流入する血管数の有意な増加を認めた。また、DMOG 処置群では虚血の強い皮弁遠位組織において、解糖系酵素である Hexokinase-2 の発現増加やアポトーシス促進因子である Bax の発現抑制を認め、アポトーシス細胞数の有意な減少を認めた。次に、DMOG による皮弁壊死予防効果が HIF-1 α を介した反応であることを検証するために HIF-1 α 欠損マウスを用いて同様の実験を行った。HIF-1 α 欠損マウスでは皮弁生存域の減少、循環 EPC の減少、及びアポトーシス細胞の増加を示した。最後に、骨髓細胞における HIF-1 α の発現が皮弁生存に果たす役割を検証するために HIF-1 α 欠損マウスの骨髓を野生型マウスに骨髓移植し虚血皮弁を作製した。HIF-1 α 欠損マウスの骨髓を移植した野生型のマウスではコントロールと比較して有意な皮弁生存領域の減少を示した。

これらの結果から、DMOG の術前投与による皮弁壊死の予防効果は、HIF-1 機能を介した抗アポトーシス効果と血管新生促進効果によるものであり、DMOG 術前投与は皮弁壊死予防の治療的戦略となる可能性があることが示唆された。

本研究は、HIF-1 の機能解析を基にして皮弁壊死予防のメカニズムを詳細に解析しており、学位授与に値するものと判定した。