

論 文 内 容 要 旨

題目 Smooth muscle cell specific Hif-1 α deficiency suppresses angiotensin II-induced vascular remodeling in mice

(平滑筋特異的 Hif-1 α 欠損は angiotensin II 誘発性血管リモデリングを抑制する)

著者 Masaki Imanishi, Shuhei Tomita, Keisuke Ishizawa, Yoshitaka Kihira, Masaki Ueno, Yuki Izawa-Ishizawa, Yasumasa Ikeda, Noriko Yamano, Koichiro Tsuchiya, Toshiaki Tamaki

平成 26 年発行 Cardiovascular Research に発表予定

内容要旨

Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)は低酸素環境下で誘導され、細胞遊走・増殖や細胞分化、エネルギー代謝等に関わる様々な遺伝子群を制御する転写因子である。通常酸素下においても angiotensin II (Ang II)などが HIF-1 α 発現調節に関与することが知られている。血管平滑筋細胞において HIF-1 α は細胞増殖や遊走に関与することが *in vitro* の検討により報告されている。また、血管傷害モデルにおける新生内膜や Ang II 慢性持続皮下投与による血管リモデリングにおいて HIF-1 α が誘導されることが報告されているが、血管リモデリングにおける血管平滑筋細胞由来 HIF-1 α の生体内での役割は不明である。本研究では、平滑筋特異的 HIF-1 α 遺伝子欠損マウスを作製し、血管平滑筋細胞由来 HIF-1 α が血管リモデリングに関与するメカニズムの解明を目指した。

HIF-1 α floxed マウスと SM22 プロモーターを利用して平滑筋特異的に Cre recombinase が過剰発現する SM22CreTG マウスを用いて、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 (SMKO)を作製した。血管リモデリングは Ang II を充填した浸透圧ポンプをマウス皮下に埋め込み、4 週間持続投与することにより惹起した。

大動脈における HIF-1 α mRNA 発現およびタンパク発現を、それぞれ real-time RT-PCR 法およびウェスタンブロット法にて検討したところ、平滑筋特異的 HIF-1 α 遺伝子を欠損したマウスの大動脈ではいずれの発現も低下していた。Ang II をコントロールマウス (Control)に持続投与すると大動脈の HIF-1 α mRNA 発現およびタンパク発現はいずれも上昇したが、SMKO ではその効果は認められなかった。Ang II 持続投与による血圧上昇の程度は Control に比べ

SMKO は緩やかであり、4週目の時点で有意に抑制された。血管壁中膜肥厚及び繊維化を Masson's trichrome 染色により評価したところ、Ang II 持続投与によるそれらの誘導は SMKO では抑制された。Ang II 持続投与による PAI-1 および collagen I の mRNA 発現上昇は SMKO では抑制された。各遺伝子型のマウス大動脈より血管平滑筋細胞を単離し、*in vitro* で細胞の大きさを cell analyzer により評価したところ、Ang II 刺激による細胞の肥大は平滑筋特異的 HIF-1 α 遺伝子欠損により抑制された。Control における Ang II 持続投与による血圧上昇を、ヒドララジンの投与により SMKO に Ang II を持続投与したときの程度まで抑制したところ、Ang II 持続投与による血管リモデリングには影響を及ぼさなかった。これより、平滑筋特異的 HIF-1 α 遺伝子欠損は、血圧変化とは独立して Ang II 誘発性血管リモデリングを抑制することが示唆された。大動脈切片の F4/80 蛍光免疫染色を行ったところ、Ang II 持続投与によるマクロファージ浸潤は SMKO では抑制された。Ang II 持続投与による大動脈 F4/80、MCP-1 および IL-1 β mRNA 発現の上昇は SMKO では抑制された。以上より、血管平滑筋細胞由来 HIF-1 α は、血管平滑筋細胞肥大、線維化、炎症を介して Ang II 誘発性血管リモデリングに関与することが示唆された。

さらに superoxide の産生について、dihydroethidium 染色により検討したところ、Ang II 持続投与による superoxide 産生亢進は SMKO では抑制された。Nox-1 および p22phox mRNA の Ang II 持続投与による発現上昇は SMKO では抑制された。次に、*in vitro* において Src 阻害剤を用いることにより、Ang II による血管平滑筋細胞内 HIF-1 α 発現上昇は Src のリン酸化を介していることが示された。マウス大動脈において Src のリン酸化を評価したところ、Ang II 持続投与により Control では Src のリン酸化が認められたが SMKO では認められなかった。したがって、平滑筋特異的 HIF-1 α 遺伝子欠損は Ang II による HIF-1 α 発現上昇経路にも影響している可能性が示唆された。すなわち、Ang II 慢性持続投与下においては、Ang II 誘発性血管リモデリングの経路において血管平滑筋細胞由来 HIF-1 α によるフィードバック機構が存在することが考えられ、これは大動脈における superoxide 産生の結果と一致した。

以上の結果から、Ang II 誘発性血管リモデリングは、血管平滑筋細胞の HIF-1 α を介して制御されている可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 1213 号	氏名	今西 正樹
審査委員	主査 赤池 雅史 副査 北川 哲也 副査 佐田 政隆		

題目 Smooth muscle cell specific Hif-1 α deficiency suppresses angiotensin II-induced vascular remodeling in mice

(平滑筋特異的 Hif-1 α 欠損は angiotensin II 誘発性血管リモデリングを抑制する)

著者 Masaki Imanishi, Shuhei Tomita, Keisuke Ishizawa, Yoshitaka Kihira, Masaki Ueno, Yuki Izawa-Ishizawa, Yasumasa Ikeda, Noriko Yamano, Koichiro Tsuchiya, Toshiaki Tamaki
 平成 26 年発行 Cardiovascular Research に発表予定
 (主任教授 玉置俊晃)

要旨 Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)は低酸素環境下で誘導され、細胞遊走・増殖や細胞分化、エネルギー代謝等に関わる様々な遺伝子群を制御する転写因子である。近年では、通常酸素下においても angiotensin II (Ang II)やサイトカインなどが HIF-1 α 発現調節に関与することが知られている。血管傷害モデルにおける新生内膜や Ang II 慢性持続投与による血管リモデリングにおいて HIF-1 α が誘導されることが報告されているが、血管リモデリングにおける血管平滑筋細胞由来 HIF-1 α の生体内での役割は不明なままである。申請者は、平滑筋特異的 HIF-1 α 遺伝子欠損マウス (SMKO) を作製し、Ang II を浸透圧ポンプで 4 週間持続投与することにより血管リモデリングを惹起させて血管平滑筋細胞由来 HIF-1 α が血管リモデリングに関与するメカニズムの検討を行った。得られた結果は以下のとおりである。

- 1) Ang II 投与によりコントロールマウス (Control)では、大動脈における HIF-1 α mRNA 発現およびタンパク発現はいずれも上昇したが、SMKO ではその効果は認められなかった。
- 2) Ang II 投与による血圧上昇の程度は Control に比べ SMKO は緩やかであり、4 週の時点で有意に抑制された。
- 3) 血管壁中膜肥厚及び線維化を Masson's trichrome 染色により評価したところ、Ang II 投与によるそれらの誘導は SMKO では抑制された。Ang II 投与による PAI-1 および Collagen I の mRNA 発現上昇は SMKO では抑制された。
- 4) Ang II 刺激による大動脈血管平滑筋細胞の肥大は平滑筋特異的 HIF-1 α 遺伝子欠損により抑制された。
- 5) Ang II 投与による大動脈へのマクロファージ浸潤は SMKO では抑制された。大動脈 F4/80、MCP-1 および IL-1 β mRNA 発現の Ang II 投与による上昇は SMKO では抑制された。
- 6) Ang II 投与による superoxide 産生亢進は SMKO では抑制された。NADPH oxidase の構成タンパクである、Nox-1 および p22phox mRNA の Ang II 投与による発現上昇は SMKO では抑制された。
- 7) マウス大動脈において Src のリン酸化を評価したところ、Ang II 投与により Control では Src のリン酸化が認められたが SMKO では認められなかった。

以上の結果から、Ang II 誘発性血管リモデリングは、血管平滑筋細胞の HIF-1 α を介して制御されている可能性が示唆された。本研究は、血管リモデリングに対する疾患分子病態の解明と、新たな治療法の開発研究に寄与するところ大であり、学位授与に値すると判定した。