

**特集：生体の低酸素応答と疾患治療への応用****生体の低酸素応答と病態 —血管リモデリングにおける転写因子 HIF の関与—**富田 修平, 今西 正樹, 櫻田 巧, 山野 範子, 木平 孝高,  
池田 康将, 玉置 俊晃

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部病態情報医学講座薬理学分野

(平成23年3月15日受付)

(平成23年3月22日受理)

**はじめに**

多細胞生物として構成される生体内では、その局所環境の酸素分圧は常に変動しており、細胞はさまざまな機構により適応する。近年、低酸素に対する生体適応の異常や破綻が多くの疾患や病態の成立とその進展に密接に関わることが明らかになってきており、生理学的のみならず臨床医学的にも生体低酸素応答制御機構の本質的理解が要求されている。疾患に伴う低酸素環境は、虚血性疾患や腫瘍をはじめ代謝性疾患や炎症性疾患を含め多くの疾患に観られており、疾患の発動因子のみならず修飾因子として病態に関与している。低酸素応答性転写因子 (Hypoxia Inducible Factor: HIF) は、そのような生体内の酸素分圧の低下に伴い活性化される生体の低酸素ストレスに対する適応性を規定する分子として発見された。

近年、動脈硬化や病的血管新生の進展機序には局所の炎症が深く関与していることが明らかとなってきた。そのような病態局所で惹起される各種細胞内ストレスや、細胞の増殖および代謝亢進に伴う細胞内のエネルギー消費が低酸素環境を引き起こすと考えられ、その結果としてさまざまな細胞内シグナルを介して HIF の活性化が報告されている。われわれは、動脈硬化や血管新生に伴う血管リモデリングに関与する細胞群の HIF がどのように機能し病態に関与するのかを分子レベルで理解するために、個体の細胞系譜別に HIF 遺伝子を欠損した疾患モデル動物を構築して、生理学的あるいは病態生理学的環境下に観られる HIF の機能解析を行ってきた。本総説では、血管リモデリングの病態における HIF を介する低酸素応答について考察するとともに、われわれが行ってきた研究について紹介する。

**血管リモデリングの病態局所に存在する低酸素微小環境の意味**

低酸素環境は、細胞の酸素供給の低下あるいは酸素需要の増加した場合に形成される。これまでに、アテローム性あるいは血管障害性の動脈硬化において、動脈壁の酸素分圧は通常の血管壁のものより相対的低酸素環境にあることが酸素分圧の測定あるいは酸素分圧感受性試薬標識により明らかにされている<sup>1-3)</sup>。また、そのような血管壁や周囲の細胞における低酸素環境は、血管リモデリングに伴う新生内膜増生や血管石灰化によるものの他に、血管周囲に浸潤する炎症性細胞に観られる細胞内代謝亢進に伴う酸素要求性の増加に起因するものも含まれることが分かっている。事実、血管壁の酸素環境は、組織内血管からの最大酸素拡散距離である100-250 $\mu$ mを超えると低酸素状況になると考えられているが、アテローム性動脈硬化のプラークや血管腔傍のマクロファージは、最大酸素拡散距離より血管に近い位置にあるが、低酸素マーカーが陽性であることが報告されている。従って、低酸素閾値は、酸素拡散距離のみならず患部の局所炎症性環境により決定されると考えられる。

動脈硬化に伴う低酸素環境は、炎症に伴う患部の病態増悪の一因になると考えられる。例えば、低酸素条件下のマクロファージは炎症性サイトカインの産生や細胞外マトリックス関連酵素の分泌の促進が報告されている。また、低酸素環境は、マクロファージの遊走を抑制することにより患部に集積して局所的な活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) の産生増加を引き起こして結果的に炎症応答を亢進させる。従って、局所の ROS の産生増加を介する血管リモデリングの発症と増悪に低酸素環境が関与することを示唆されるが、血管リモデリン

グの病態にどのように低酸素環境が関与するのかその詳細はまだ十分理解されていない。

#### 動脈障害性血管リモデリングに観られる免疫応答

免疫不全モデル動物の新生内膜の増生には、その障害に対する免疫応答が関与することを示している。関与する特異抗原は明らかになっていないが、細胞障害の結果、免疫応答を惹起するアジュバント効果のある尿酸や熱ショックタンパク質などを含む細胞内物質が放出される。また、damage associate molecular pattern (DAMP) が、障害あるいはストレス状態にある細胞から放出され pathogen-associated molecular pattern (PAMP) 受容体を介して炎症性応答を惹起することが分かっている<sup>4)</sup>。

最近の報告では、angiotensinII 負荷や食塩感受性高血圧に引き続く血管リモデリングモデルの病態において、免疫担当細胞がその病態形成過程に深く関与することが明確になってきている<sup>5)</sup>。炎症性サイトカイン interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) は、各種細胞を活性化して主要組織適合性抗原や共刺激分子の発現や各種サイトカイン、ケモカイン、接着分子や細胞外マトリックス関連分子の産生を促進する。一方、IFN- $\gamma$  は、活性化されたマクロファージや IL-12や IL-18によって活性化された平滑筋細胞により産生されることが報告されている。これらの事実は、動脈障害性血管リモデリングは、マクロファージや平滑筋細胞の活性化による免疫応答の亢進によりモジュレートされる可能性がある。

#### 血管リモデリングにおける T 細胞に発現する HIF-1 の役割

また、動脈硬化やステント留置に伴う局所血管リモデリング形成過程において、血管およびその周囲組織の低酸素環境が、筋線維芽細胞の増殖や血管外膜における細胞外マトリックス成分の増加の一因と考えられている。また、低酸素条件はアテローム性動脈硬化症の病態を促進することが報告されている。多くの研究報告より、ヒトのアテローム性動脈硬化症やその動物モデルの動脈壁では酸素分圧の低下が観察されている<sup>1,6,7)</sup>。また、これら局所病態における酸素分圧変化に適応することは、病態に関わる免疫担当細胞の活性化には大変重要であると考えられている。なぜなら、免疫細胞はしばしば異なる酸素分圧に曝されるからである。これらの事実を考えれば、血管リモデリングにおいて、免疫細胞の酸素分圧への適応は、その病態生理を制御する上で大変重要な位置づけとなると考えられる。しかしながら、血管リモデリングの病態に低酸素環境が免疫応答に与える詳細なメカニ

ムは十分理解されておらず、治療標的としての意義についても考慮されていない。特に獲得免疫応答の司令塔的役割である T 細胞の病態に対する体酸素応答の解析は不十分である。

T 細胞の血管リモデリングへの関与については、傷害された血管組織に T 細胞が観察されるまで否定的であった。その後、T 細胞欠失マウスや無胸腺ラットの血管障害モデルにおいて、新生内膜の増生が対照群に比較して促進されていることが報告された<sup>8)</sup>。これらの初期の報告は、動脈の障害に対する免疫応答システムの機能を示すこととなった。最近の研究でもまた動脈障害性血管リモデリングの形成に伴う低酸素環境が、炎症が増悪することによりその病態の悪化が報告されている。われわれは、血管リモデリングモデルの一つであるマウス大腿動脈に対するポリエチレンカフ障害性血管リモデリングモデルを利用して作製された低酸素環境を伴うモデル病態において、その患部局所に集積する T 細胞に HIF-1 $\alpha$  が発現していることを確認した<sup>9)</sup>。このことより、これら集積する T 細胞の機能は、HIF-1 $\alpha$  の機能発現により変化する可能性があるのではないかと考えた。すなわち、これまでに HIF-1 $\alpha$  は、低酸素シグナル経路によるものの他に、各種サイトカインや成長因子あるいは酸化ストレスシグナルにより活性化されることが報告されているが、局所の酸素分圧の低下による酸素供給の低下と炎症活性化による局所細胞内の酸素の需要の増加による HIF-1 $\alpha$  の活性化が T 細胞の機能に影響する可能性も無視できないと考えられる。また、興味深いことには、末梢の T 細胞の HIF-1 $\alpha$  の発現タンパク量の増加は、低酸素環境だけでは不十分であり、T 細胞受容体からのシグナルが必要であることが報告されている。このことは、T 細胞の活性化に HIF-1 $\alpha$  の機能が関与する可能性を期待させる。事実、慢性関節性リウマチの患者の炎症局所に集積している T 細胞では、HIF-1 $\alpha$  が発現していることが報告されている<sup>10)</sup>。

更に、われわれは、上述の T 細胞特異的 HIF-1 $\alpha$  欠失マウスを用いた血管障害性血管リモデリングモデルにおいて、T 細胞を介する免疫応答の活性化が認められるとともに新生内膜の増生が亢進することを見出した<sup>9)</sup>。T 細胞の HIF-1 $\alpha$  は、炎症性サイトカインや特異抗原に対する抗体の産生を抑制的に制御する可能性が示唆された。また別のグループの研究では、LPS 投与による急性炎症モデルにおいても T 細胞の HIF-1 $\alpha$  が機能不全になると敗血症病態は悪化することが観察されている<sup>11)</sup>。以上の事実より、T 細胞の HIF-1 $\alpha$  は、細胞性免疫および液性免疫を含む獲得免疫応答の制御に関与していることが考えられた。

HIF-1 $\alpha$ は、アテローム性動脈硬化症において新生内膜形成に寄与することが報告され、患部ではその標的遺伝子の一つであるケモカイン stroma cell-derived factor-1 (SDF-1)が増加することが報告されている<sup>12)</sup>。低酸素条件下におけるHIF-1 $\alpha$ 欠損T細胞のSDF-1に対する遊走活性実験では、野生型のT細胞と同様の活性を示した。即ち、T細胞のHIF-1 $\alpha$ は、低酸素環境におけるSDF-1を介するT細胞の遊走機能には影響しないことが考えられた。また、これらの実験結果は、変異マウスのカフ障害性血管患部におけるT細胞の集積結果に一致するものである。即ち、変異マウスにおける血管リモデリングの増悪は、T細胞の患部への遊走活性の機能変化に起因するものではないことが示唆された。

最近、T細胞やB細胞が動脈障害性血管リモデリングの病態形成過程に関与することが明らかになり、傷害された血管組織を介する獲得免疫応答の制御不全が、血管障害に引き続くその修復過程を遅延させることも示唆されている。それは、T細胞を介するIFN- $\gamma$ や障害組織からの内因性抗原に対する抗原抗体反応による血管平滑筋の増殖抑制によるものかもしれない。また、T細胞特異的HIF-1 $\alpha$ 欠失マウスにおいては、カフ障害性血管リモデリングモデルにおいてT細胞を介するIFN- $\gamma$ や特異抗原に対する抗体産生量の増加が観られ、新生内膜増生の増悪傾向が観察されている。以上のことより、血管リモデリングに関わる免疫応答は、T細胞のHIF-1 $\alpha$ を介して厳密に制御されていることが考えられる。

これまでの報告によれば、Th1サイトカインであるIFN- $\gamma$ は、血管内膜増生を含む血管モデリングを促進する。このことは、T細胞特異的HIF-1 $\alpha$ 欠失マウスを使用した実験でも、活性化されたHIF-1 $\alpha$ 欠失T細胞におけるIFN- $\gamma$ の産生が増加することにより確認された。一方、Th2サイトカインであるIL-4やIL-13の発現量について障害はされていなかった。また、HIF-1 $\alpha$ 欠損T細胞を活性化した場合のIL-2産生の増加は、本変異マウスのリンパ節のT細胞の増加の一因になっている可能性がある。以上の結果を合わせると、マウスに観られるT細胞のHIF-1 $\alpha$ の欠失が引き起こす血管リモデリングの増悪は、傷害された血管組織局所のサイトカイン産生増加が関与している可能性が示された。

また、HIF-1 $\alpha$ 欠失マウスでは特異抗原に対する抗体産生量が増加することを報告している。このことより、動脈障害性血管リモデリングにおける自己応答性炎症に関して、本変異マウスにおける血管リモデリング病態の増悪の一因に自己応答性の増強がある可能性を示した。しかし、仮にそうだとすると、T細胞のHIF-1 $\alpha$ がどのようにして傷害された血管組織に対する自己応答性に関

与しているのかについては更に不明である。

おわりに

われわれ生体にとって、酸素分子は、「両刃の剣」であり、エネルギー産生、殺菌作用や各種酵素の活性化作用を介して生体維持に必須であると同時に、反応性の高い物質である活性酸素に代表されるように細胞障害性を備えている(図)。従って、HIF関連分子の発現制御を介して生体内の酸素代謝の恒常性を維持することにより、血管関連疾患のみならずさまざまな疾患の病態改善が期待できると考えている。

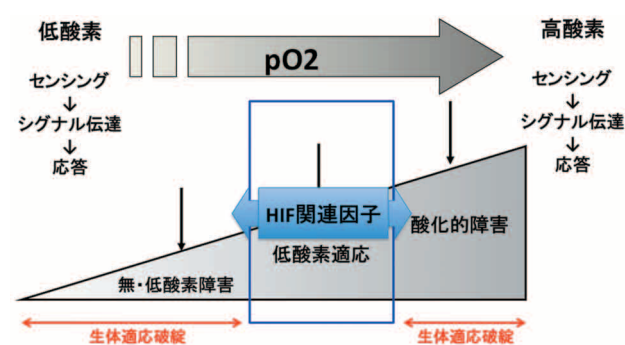


図. 酸素代謝の恒常性を維持する

文 献

- 1) Björnheden, T., Levin, M., Evaldsson, M., Wiklund, O.: Evidence of hypoxic areas within the arterial wall *in vivo*. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19: 870-876, 1999
- 2) Jurrus, E. R., Weiss, H. S.: *In vitro* tissue oxygen tensions in the rabbit aortic arch. *Atherosclerosis*, 28: 223-232, 1977
- 3) Zemplyni, T., Crawford, D. W., Cole, M. A.: Adaptation to arterial wall hypoxia demonstrated *in vivo* with oxygen microcathodes. *Atherosclerosis*, 76: 173-179, 1989
- 4) Bianchi, M. E.: DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J. Leukoc. Biol.*, 81: 1-5, 2007
- 5) Schiffrin, E. L.: T lymphocytes: a role in hypertension? *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 19: 181-186, 2010
- 6) Sluimer, J. C., Gasc, J. M., van, Wanroij, J. L., Kisters, N., *et al.*: Hypoxia, hypoxia-inducible transcription factor, and macrophages in human atherosclerotic plaques are correlated with intraplaque angiogenesis. *J. Am.*

- Coll. Cardiol., 51 : 1258-1265, 2008
- 7) Vink, A., Schoneveld, A. H., Lamers, D., Houben, A. J., *et al.* : HIF-1 $\alpha$  expression is associated with an atheromatous inflammatory plaque phenotype and upregulated in activated macrophages. *Atherosclerosis*, 195 : e69-e75, 2007
- 8) Hansson, G. K., Holm, J., Holm, S., Fotev, Z., *et al.* : lymphocytes inhibit the vascular response to injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88 : 10530-10534, 1991
- 9) Kurobe, H., Urata, M., Ueno, M., Ueki, M., *et al.* : Role of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in T cells as a negative regulator in development of vascular remodeling. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 30 : 210-217, 2010
- 10) Makino, Y., Nakamura, H., Ikeda, E., Ohnuma, K., *et al.* : Hypoxia-inducible factor regulates survival of antigen receptor-driven T cells. *J. Immunol.*, 171 : 6534-6540, 2003
- 11) Thiel, M., Caldwell, C. C., Kreth, S., Kuboki, S., *et al.* : Targeted deletion of HIF-1 $\alpha$  gene in T cells prevents their inhibition in hypoxic inflamed tissues and improves septic mice survival. *PLoS ONE*, 2 : e853, 2007
- 12) Karshovska, E., Zerneck, A., Sevilmis, G., Millet, A., *et al.* : Expression of HIF-1 $\alpha$  in injured arteries controls SDF-1 $\alpha$  mediated neointima formation in apolipoprotein E deficient mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 27 : 2540-2547, 2007

## *Role of Hypoxia-Inducible Factor 1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ ) in T cells in development of vascular remodeling*

*Shuhei Tomita, Masaki Imanishi, Takumi Sakurada, Noriko Yamano, Yoshitaka Kihira, Yasumasa Ikeda, and Toshiaki Tamaki*

*Department of Pharmacology, Institute of Health Biosciences, the University of Tokushima Graduate School, Tokushima, Japan.*

### SUMMARY

Recent studies have shown that the cellular immune response to the hypoxic microenvironment constructed by vascular remodeling development modulates the resulting pathologic alterations. A major mechanism mediating adaptive responses to reduced oxygen availability is the regulation of transcription by hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). Impairment of HIF-1-dependent inflammatory responses in T cells causes an augmented vascular remodeling induced by arterial injury, which is shown as prominent neointimal hyperplasia and increase in infiltration of inflammatory cells at the adventitia in mice lacking Hif-1 $\alpha$  specifically in T cells. Studies to clarify the mechanism of augmented vascular remodeling in the mutant mice have shown enhanced production of cytokines in activated T cells and augmented antibody production in response to a T-dependent antigen in the mutant mice. This minireview shows that HIF-1 $\alpha$  in T cells plays a crucial role in vascular inflammation and remodeling in response to cuff injury as a negative regulator of the T cell-mediated immune response and suggests potential new therapeutic strategies that target HIF-1 $\alpha$ .

Key words : vascular remodeling, hypoxia, hypoxia-inducible factor