九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

Deletion of Phd2 in Myeloid Lineage Attenuates Hypertensive Cardiovascular Remodeling

池田, 次郎

https://hdl.handle.net/2324/1398332

出版情報：九州大学, 2013, 博士（医学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（2）

KYUSHU UNIVERSITY

氏名・(本籍・国籍)	池田次郎（いけだじろう）（福岡県）
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	医博甲第２６４４号
学位授与の日付	平成25年9月24日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当　医学系学府　医学専攻
学位論文題目	Deletion of *Phd2* in Myeloid Lineage Attenuates Hypertensive Cardiovascular Remodeling（骨髄系細胞における*Phd2*の欠損は高血圧性心血管リモデリングを抑制する）
論文調査委員	（主　査）教　授　住本英樹 （副　査）教　授　富永隆司　　教　授　北園孝成

論文内容の要旨

【諸言】

高血圧は細胞肥大と線維化などの心血管リモデリングを誘導する。一般的にレニン－アンジオテンシン系（RAS）の活性化と一酸化窒素（NO）レベルの低下がこの過程において重要な役割を果たしている。高血圧はまた心血管系の炎症を誘導し、浸潤したマクロファージなどの炎症細胞は心血管リモデリングにおいて重要な役割を果たす。マクロファージは線維化の病理学的機序にも関与し、マクロファージ由来の Transforming growth factor-β (TGF-β)は線維芽細胞から細胞外マトリックスの蓄積を制御する筋線維芽細胞への分化を促進する。また筋線維芽細胞において膠原線維の合成を誘導する。

hypoxia inducible factor（HIF）は低酸素に対する細胞応答を制御する重要な転写因子である。HIF は酸素感受性のαサブユニットと恒常的に発現しているβサブユニットから構成される。通常酸素濃度下では prolyl hydroxylase domain protein（PHD）が HIF-αのプロリン残基を水酸化し、ユビキチン化とプロテアソーム分解を誘導する。低酸素状況下では PHD 活性は阻害され、HIF-αは安定化し核へ蓄積する。HIF-αと HIF-βはヘテロ二量体を形成して、血管形成、造血、代謝を調整する標的遺伝子の発現を活性化する。我々はマクロファージにおいてPHDの薬理学的阻害またはPHD2のノックダウンがリポ多糖類（LPS）による TNF-αの発現誘導を抑制することを示した。これらの研究に基づ

いて私は骨髄系細胞特異的な Phd2 の欠損が高血圧性心血管リモデリングに及ぼす影響を調べた。

【方法】

骨髄特異的 Phd2 欠損マウス（MyPHD2KO）は、Cre リコンビナーゼの発現がリゾチーム M（LysM）遺伝子プロモーターにより誘導される LysM-Cre マウスとヘテロ接合体の Phd2-floxed マウス（Phd2f/+）を交配させることによって得られた。8～10 週齢のマウスに 0.9%NaCl 中に溶解した L-NAME を 14 日間経口投与した。後半の 7 日間浸透圧ミニポンプにてアンジオテンシン(Ang)II を皮下投与した。ジゴキシンは L-NAME の投与開始の 7 日前より 1 日おきに腹腔内注射した。心拍数（HR）と収縮期血圧（SBP）は、非麻酔下マウスにおけるテールカフ法にて測定した。経胸壁心エコー検査は 1.5%イソフルランによる麻酔下に行った。3%チオグリコレートを腹腔内注射して得られた腹腔内マクロファージ(PM)と大腿骨と脛骨から単離した骨髄由来マクロファージ(BMDM)を使用した。大動脈および心臓の凍結切片はそれぞれシリウスレッド溶液、マッソントリクローム溶液で染色した。心筋細胞の断面領域を測定する際にはコムギ胚芽アグルチニン-Alexa Fluor488 色素で染色した。Mac-2 免疫組織化学染色にはパラフィン包埋組織切片を用いた。マクロファージ、大動脈と心臓組織における遺伝子発現は、リアルタイム RT-qPCR にて評価した。走化性分析には PM を用いた。NF-κB の転写活性は PM を用いルシフェラーゼアッセイにて評価した。LPS（100ng/ml）による刺激後、細胞を溶解しルシフェラーゼ活性を測定し、タンパク質濃度によって標準化した。

【結果】

Phd2 を欠損した PM では、Tnfa、Il6、Il1b、Rantes、Mcp1、iNOS などの M1 マクロファージマーカー、Pdgfb、Tgfb と Ctgf などの線維化促進因子の発現が有意に減少した。M2 マクロファージマーカーの発現には一貫した傾向はなかった。MyPHD2KO マウスの PM の NF-kB 活性は統計学的有意差は認められなかったが、ベースラインおよび LPS 刺激後ともにコントロールマウスのそれより低かった。Phd2 を欠損した PM では MCP-1 による細胞遊走が低下していた。L-NAME/Ang II 負荷により、コントロールマウスおよび MyPHD2KO マウスにおいて収縮期血圧は同等に上昇したが、MyPHD2KO マウスにおいて大動脈中膜および外膜肥厚、マクロファージの浸潤が抑制された。また、心筋間質の線維化および心筋細胞の肥大,マクロファージの浸潤も MyPHD2KO マウスで有意に抑制された。炎症性サイトカイン、線維化関連因子の発現は、MyPHD2KO マウスの大動脈と心臓で減少していた。コントロールマウスでは L-NAME/Ang II 負荷による左室肥大と駆出率の減少が心エコー法により観察されたが MyPHD2KO マウスでは観察されなかった。L-NAME/Ang II 負荷を行った MyPHD2KO マウスに HIF-α の合成を阻害するジゴキシンを投与すると抑制されていた線維化関連因子の発現誘導、左室肥大が生じた。また駆出率が低下した。

【考察】

本研究において、私は骨髄系細胞の Phd2 欠損が L-NAME/Ang II により誘導される細胞の肥大や線維化を含む心血管リモデリングを抑制することを示した。MyPHD2KO マウスでは L-NAME/Ang II 負荷による心臓や大動脈外膜へのマクロファージの浸潤が抑制された。MyPHD2KO マウスの抗肥大および抗線維化効果の詳細な機序は不明であるが、マクロファージにおける TGF-β の発現減少が一役を担っている可能性がある。ジゴキシンの併用投与を行った群では、MyPHD2KO マウスで抑制されていた心臓および大動脈の肥大と線維化は元に戻ったが、サイトカインの発現は増加しなかった。以上から線維化促進

遺伝子の発現抑制はHIFに依存し、サイトカインの発現はHIFに依存していない可能性がある。NF-kBの活性は対照群と比較しMyPHD2KOマウスのPMで減少傾向がみられ、HIF経路と独立してNF-kBの転写活性の抑制が炎症促進性サイトカインの発現の抑制に関して重要な役割を果たしているかもしれない。近年 HIF-αに加えて Sprouty-2 やβ-arrestinなど新しいPHD2基質が同定されているが、コントロールマウスとMyPHD2KOマウスの腹腔内マクロファージにおけるこれらの発現レベルを調べたが変化はみられず、PHD2 による遺伝子制御を明らかにするためにはさらなる研究が必要である。私は骨髄系細胞の PHD2 が高血圧によって誘導される肥大と線維化において重要な役割をという確証的な証拠を示した。PHDの阻害が心血管疾患の新しい薬物療法となる可能性がある。

論文審査の結果の要旨

高血圧は心血管系細胞・組織の肥大と線維化を誘導するが、この過程には組織に浸潤したマクロファージが重要な役割を果たすと考えられている。申請者は、hypoxia inducible factor-α (HIF-α) の分解を促す「プロリン残基の水酸化」を行う酵素 prolyl hydroxylase domain protein 2 (PHD2) のマクロファージにおける役割を検討した。そのために、*Phd2* 遺伝子を骨髄系細胞で特異的に欠損させたマウス（MyPHD2KOマウス）を作出し、L-NAME (NOS 阻害剤) とアンジオテンシン II (AngII) 負荷による高血圧性心血管リモデリングに対する影響を解析した。収縮期血圧はMyPHD2KOマウスでも対照群マウスと同様に上昇したが、MyPHD2KO マウスにおいては大動脈中膜および外膜の肥厚とマクロファージの浸潤が抑制されていた。また、心筋の線維化および心筋細胞の肥大もMyPHD2KOマウスでは抑制されており、大動脈・心臓におけるTGF-βなどの線維化促進遺伝子の発現も MyPHD2KO マウスで減少していた。さらに、MyPHD2KO マウスでは、左室肥大の程度と駆出率の低下もともに軽減していた。MyPHD2KO マウスに見られたこれらの変化は、HIF-αの合成を抑制する効果をもつ digoxin の投与により抑制された。以上の結果から、骨髄系細胞の PHD2 は、高血圧性心血管リモデリングにおいて重要な役割を果すことが示唆された。

以上の成績はこの方面の研究に知見を加えた意義あるものと考えられる。本論文についての試験は、まず研究目的、方法、実験結果などについて説明を求め、各調査委員により専門的な観点から論文内容及びこれに関連した事項について種々の質問を行なったが、いずれについてもおおむね満足すべき回答を得た。

よって、調査委員合議の結果、試験は合格と決定した。