

論文の内容の要旨

論文題目 マウス下肢虚血モデルにおける Int6 抑制による

下肢血流の改善

指導教員 名川 弘一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

外科学専攻

橋本 拓弥

序論

血管新生治療は、血管新生や側副血行路の発達を刺激して、虚血部の血流回復を促す治療法で、その萌芽は Isner らが下肢動脈閉塞を対象として血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor: VEGF) 発現プラスミドを使用した 1996 年の非盲検試験に遡る。しかしながら、単独の血管新生因子の投与では、未成熟な血管形成による副作用や、治療効果の限界があることも明らかになってきた。

これに対し、成熟した血管を誘導するために、転写調節因子として複数の血管新生因子をバランスよく発現させる低酸素応答因子 (hypoxia inducible transcription factor: HIF) を利用する試みがある。なかでも HIF-2 α は、血管のリモデリングにおいて重要な役割を担っており、HIF-1 α に比較すると安定性に優れているため、臨床応用により適していると考えた。

HIF-1 α および HIF-2 α は共通して、酸素濃度 20% の常酸素条件下では特定のプロリン残基がプロリン水酸化酵素による水酸化を受ける。その部位がユビキチンリガーゼ複合体の一部である Von Hippel-Lindau 蛋白によりユビキチン化されるため、プロテアゾームによる分解を受ける。しかし、酸素濃度 5% 以下の低酸素条件下ではプロリン水酸化酵素の活性が低下するため、分解を免れた HIF- α 蛋白が、ターゲット遺伝子の

プロモーター領域に存在する HRE (hypoxia responsive element) に結合することにより、転写調節を行う (図 1 上の部分)。

HIF-2 α 蛋白に特有の結合因子として、Int6 が酵母 Two hybrid 法によるスクリーニングにより同定された。Int6 が HIF-2 α 蛋白の特定の部位に結合すると、HIF-2 α 蛋白は常酸素、低酸素のいずれの条件下でも蛋白分解を受ける (図 1 下の部分)。マウスの創傷治癒モデルでは、Int6 遺伝子を抑制することにより、HIF-2 α 蛋白と各種血管新生因子が増加し、創傷治癒と局所の血管新生を増強した。しかし、虚血に陥っている筋組織において Int6 遺伝子の抑制が血管新生に与える影響は明らかになっていない。そこで、本研究では、マウス下肢虚血モデルで筋組織中の Int6 を抑制することにより、下肢の血流回復に与える影響を検討した。

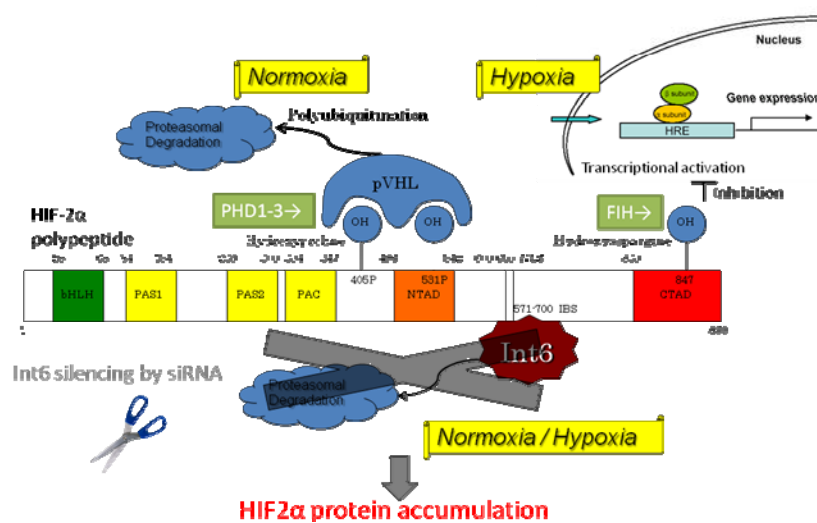


図 1. HIF-2 α 蛋白分解のメカニズム

HIF- α 蛋白は、酸素濃度 20% の常酸素条件下では特定の 2 カ所のプロリン残基が水酸化酵素 (PHD; prolyl hydroxylase) により水酸化される。その部位が E3 ユビキチンリガーゼ複合体の一部である VHL 蛋白により認識されるため、プロテアゾーム経路で分解される。酸素濃度 5% 以下の低酸素条件下では PHD の活性が低下するため、分解を免れた HIF- α 蛋白が核内に移行し、これらが β サブユニットと二量体を形成して標的遺伝子のプロモーター領域に存在する HRE に結合することにより、転写調節が行われる。このメカニズムが HIF-1 α および HIF-2 α 両方のサブタイプに共通であるのに対し、Int6 の結合による分解は HIF-2 α に特異的である。Int6 が HIF-2 α 蛋白の IBS (Int6 binding site) に結合すると、HIF-2 α 蛋白は常酸素、低酸素のいずれの条件下でもプロテアゾームによる蛋白分解を受ける。したがって、RNA 干渉を利用して Int6 遺伝子を抑制することにより、内因性 HIF-2 α 蛋白の増加が期待できる。

I. Int6 抑制が筋細胞に与える影響の検討

<方法>

Int6 抑制プラスミドベクターの作製

siRNA (small interfering RNA) を発現するプラスミドベクターである pSilencer (Ambion) を用い、マウス Int6 遺伝子の抑制は 5-AAgAACCCACAgTTgTTgCg-3, ヒト Int6 遺伝子の抑制は 5-AAgAACCCACAgTggTTgCA-3 の配列により行った. コントロールとしては, ランダム配列を有する siRNA プラスミドベクターを用いた.

初代筋芽細胞の培養と遺伝子導入

マウス初代筋芽細胞は, 専用培地とともにプライマリーセル社から購入して使用した. ヒト初代筋芽細胞は, 10% FBS を含む DMEM 中で培養した. ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells: HUVECs) は, 2%FBS, bFGF を含む 200S 培養液中で培養した. いずれも 37°C, 5%二酸化炭素の存在下で培養され, 遺伝子導入は, プラスミド DNA を用い AMAXA Nucleofector で行った.

Int6 抑制下における初代筋芽細胞の蛋白解析

遺伝子導入後の細胞から溶解抽出し, Laemmli サンプルバッファーを用いて同量, 同濃度に調製した蛋白溶液を, 電気泳動分離後にセミドライ法で転写した. HIF-2 α と Int6 に対する一次抗体はポリクローナルで作製した. 二次抗体は抗ラビットまたは抗マウス HRP を使用し, 化学蛍光法で検出した.

Int6 抑制下における初代筋芽細胞の mRNA 発現解析

遺伝子導入後に RNA を抽出し, cDNA を合成した. 各種血管新生因子の測定は Taqman を用いたリアルタイム RT-PCR 法にて行なった.

HUVEC を用いた管腔形成実験

96 穴プレート上で固相化したマトリゲル上で 1.5×10^4 個の HUVEC 細胞を 12 時間培養した. その後, 4×10^5 個のヒト初代筋芽細胞に Int6 抑制プラスミドもしくはコントロールプラスミド 4 μ g を遺伝子導入して 24 時間後に回収した培養液上清を加えた. 経時的に HUVEC 細胞の管腔形成を観察し, 管腔長を解析した.

免疫 PCR 法による筋芽細胞培養液上清中の血管新生因子蛋白濃度の測定

上記のHUVECの管腔形成実験で用いた, ヒト初代筋芽細胞にInt6抑制プラスミドもしくはコントロールプラスミドを遺伝子導入して24時間後に回収した培養液上清中

に含まれる血管新生因子蛋白の濃度を，免疫PCR法であるMUSTag法（Synthera Technologies Co., Ltd., 東京）により測定した。

統計解析

結果は平均±標準誤差で表した。2群の比較には Mann-Whitney の順位検定を適用し，p 値は 0.05 を有意水準とした。

<結果>

Int6 抑制下における初代筋芽細胞の蛋白解析

Int6 抑制プラスミドを導入した 24 時間後のマウス初代筋芽細胞で，コントロールと比較して，内因性 Int6 蛋白の減少とともに内因性 HIF-2 α 蛋白が増加していた（図 2）。

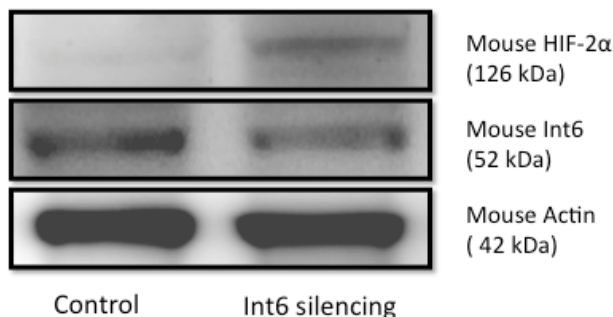


図 2. マウス初代筋芽細胞における Int6 抑制に伴う HIF-2 α 蛋白の増加

Int6 抑制プラスミドを導入後 24 時間において，コントロールと比較して内因性 Int6 蛋白（52 kDa）が減少し，内因性 HIF-2 α 蛋白（126 kDa）が増加した。

Int6 抑制下における初代筋芽細胞の遺伝子解析

マウス初代筋芽細胞に Int6 抑制プラスミドを導入した場合には，コントロールと比較して，18 時間後において，細胞中の bFGF および PDGF-B（platelet-derived growth factor-B）の mRNA がそれぞれ 1.8 倍，1.9 倍と有意に発現が増加していた（n=3）。bFGF に関しては 42 時間後においても有意な発現の亢進が持続していた（図 3）。

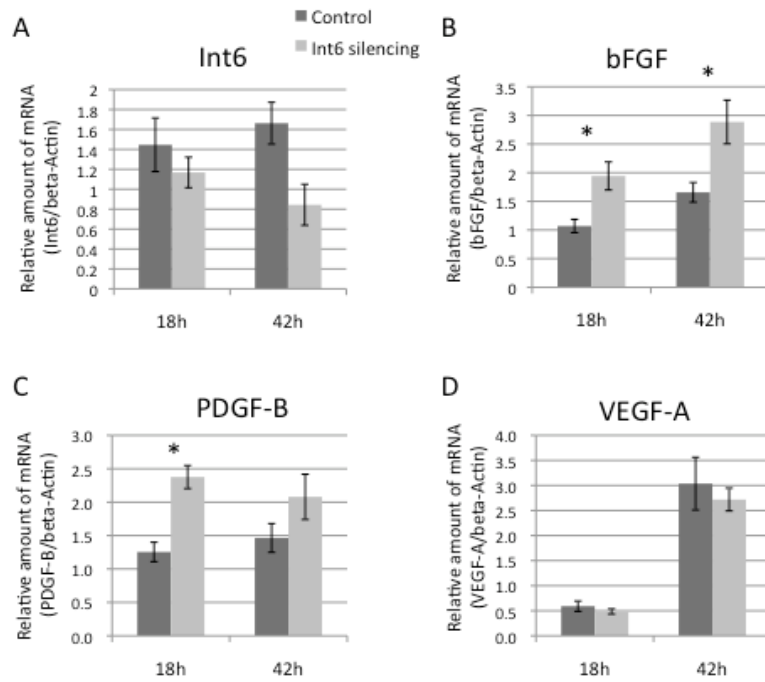


図3. Int6 抑制に伴う各血管新生因子の遺伝子発現相対量の推移

A. マウス初代筋芽細胞への Int6 抑制遺伝子導入後, Int6 mRNA は, コントロールと比較して 18 時間において 19%, 42 時間後において 49%抑制されていた. B. bFGF (basic fibroblast growth factor) mRNA 相対量は, コントロールと比較して 18 時間後において 1.8 倍, 42 時間後において 1.7 倍と有意な発現増加が認められた. C. PDGF-B (platelet-derived growth factor) mRNA 相対量は, 18 時間後において 1.9 倍と有意な発現増加が認められた. D. VEGF-A (vascular endothelial growth factor-A) の mRNA 相対量には Int6 抑制による有意な変化は認められなかった. *: $p < 0.05$.

HUVEC を用いた管腔形成実験

Int6 抑制プラスミドの遺伝子導入後 24 時間のヒト筋芽細胞培養液上清中で培養した HUVEC ではコントロールと比べると管腔形成が目立ち, 管腔長の計測でも培養開始 7 時間後においてコントロールの 2.2 倍, 12 時間後において 2.3 倍といずれも管腔長に有意差を認めた.

免疫 PCR 法によるヒト筋芽細胞培養液上清中の蛋白濃度測定

Int6 抑制プラスミドを遺伝子導入したヒト初代筋芽細胞の培養液上清中においては, コントロールプラスミドを遺伝子導入したヒト初代筋芽細胞の培養液上清中と比較して, ヒト bFGF 蛋白およびヒト Ang-1 蛋白が有意に増加していた.

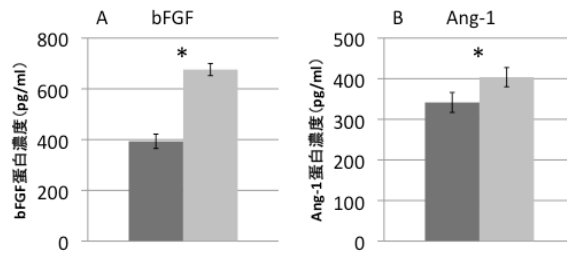


図4. ヒト初代筋芽細胞の培養液上清中の血管新生因子蛋白濃度

Int6 を抑制された筋芽細胞の培養液上清中には、コントロールの筋芽細胞の培養液上清中と比較して、bFGF 蛋白 (A) および Ang-1 蛋白 (B) が増加していた. *: $p < 0.05$.

II. Int6 抑制が下肢血流回復に与える影響の検討

<方法>

マウス下肢虚血モデルの作製とプラスミドの投与

8 週齢の BALB/c マウスの左大腿動脈を結紮切離した後、Int6 抑制プラスミドもしくはコントロールプラスミド 400 μg を大腿内転筋群に 3 カ所に分けて筋肉内投与した (図 5, 各群 $n=9$).

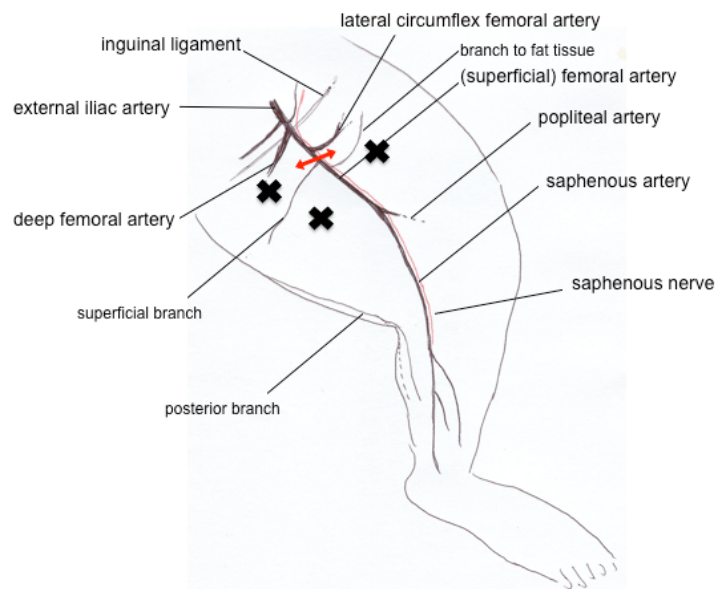


図5. マウス下肢虚血モデル

大腿動脈を結紮切離 (両矢印) することにより、足部の血流量は約 5% に減少する (レーザードプラー法により測定). ×印はプラスミドベクターの筋注部位を示す.

歩行機能障害と組織障害の評価

虚血肢の歩行機能障害と組織障害の2項目を経時的にスコアリングした。歩行機能障害に関しては、正常=0点、尻尾を引っ張ると足趾は効かないが、足首で踏んばる=1点、下肢をひきずってはいないが、足首が効かない=2点、下肢全体をひきずる=3点で評価し、組織障害に関しては、変化なし=0点、皮膚色変化=1点、1-2趾脱落=2点、3-5趾脱落=3点、足部以上の肢脱落=4点、で評価した。

レーザードプラー測定装置を用いた下肢血流量の評価

各マウスにおける足関節以下の血流量を経時的に全麻下で測定し、虚血肢/非虚血肢の相対比を算出した。

統計的解析

結果は平均±標準誤差で表した。Int6抑制群とコントロール群の経時的なデータの比較には2-way ANOVAを適用し、p値は0.05を有意水準とした。

<結果>

肢機能と組織障害の評価

肢機能はInt6抑制群で良好に推移し、7、14、21日後においては、それぞれコントロール群 2.17 ± 0.19 , 1.94 ± 0.23 , 1.14 ± 0.31 に対して、Int6 siRNA群 1.67 ± 0.20 , 0.97 ± 0.23 , 0.50 ± 0.16 と有意に低値であった(図6左)。組織障害についても、観察期間中に一貫して症状が悪化したコントロール群に対して、Int6抑制群では7日後以降に症状が回復に転じ、28日後ではコントロール群 0.81 ± 0.45 に対して、Int6抑制群では 0 ± 0 と組織障害が完全に消失した(図6右)。

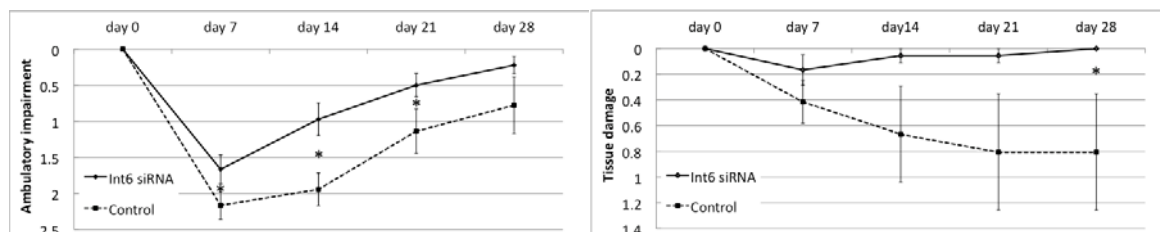


図6. 虚血による症状のスコアリングによる評価

それぞれ左が歩行機能、右が虚血による組織障害を評価したもの。左：正常(尻尾を引っ張ると足趾で踏んばる)=0点、尻尾を引っ張ると足趾は効かないが、足首で踏んばる=1点、下肢をひきずってはいないが、足首が効かない=2点、下肢全体をひきずる=3点。右：変化なし(健常肢と同様)=0点、皮膚色変化(チアノーゼ、変色)=1点、1-2趾脱落=2点、3-5趾脱落=3点、足部以上の肢脱落=4点。いずれも実線(●)がInt6抑制群、点線

(■) がコントロール群の平均スコアの推移を示す (各群 n=9). * : p<0.05.

レーザードプラー測定装置を用いた下肢血流量の評価

両群とも手術直後が最も血流が乏しく、7日以降は回復傾向にあるのは同様であったが、特に Int6 抑制群で回復が良好であり、7日後と14日後において、コントロール群と有意差を認めた (Int6 抑制群 vs. コントロール群の血流比 : 7日後, 0.22 ± 0.33 vs. 0.13 ± 0.04 ; 14日後, 0.32 ± 0.04 vs. 0.22 ± 0.07) (図7).

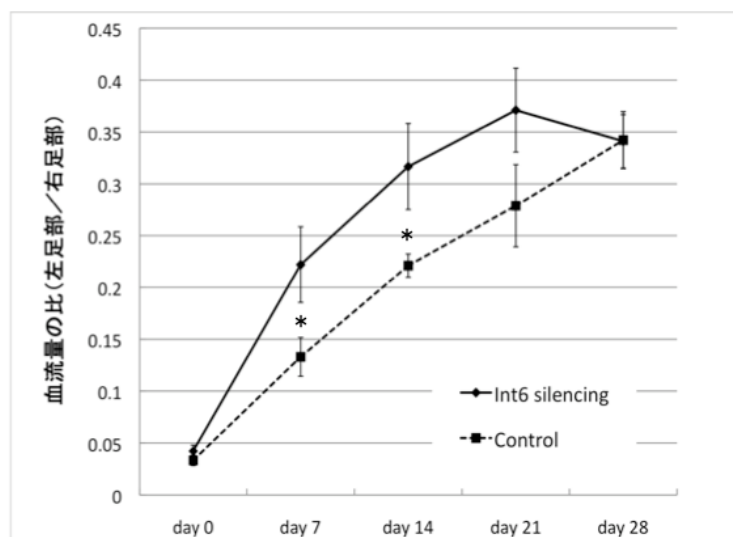
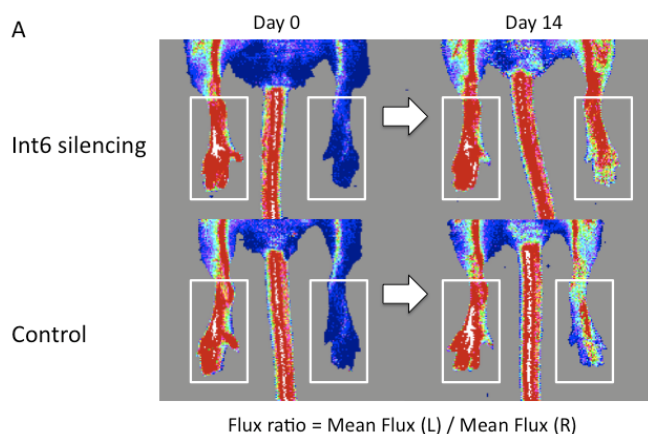


図7. レーザードプラー法を用いた足部血流の評価

虚血肢/非虚血肢足部の血流量の比の経時的変化を示した. 実線 (●) が Int6 抑制群, 点線 (■) はコントロール群 (各群 n=9). 7日後と14日後において有意に Int6 抑制群の血流回復が良好であった. * : p<0.05



考察

本研究では、まず培養筋細胞を用いた蛋白の解析から、Int6 依存性の HIF-2 α 蛋白分解が阻害されると、筋細胞内の内因性 HIF-2 α 蛋白が増加することが示唆された。さらに、筋細胞の遺伝子発現の解析では、Int6 の抑制により血管新生因子である bFGF と PDGF-B 遺伝子の発現の増強が認められた。この2つの遺伝子はいずれも血管のリモデリングに関わる血管新生因子であり、筋細胞における HIF-2 α の増加が血流の回復を促す際に、これらが重要な役割を果たしているものと考えられた。また、ヒトの筋細胞の Int6 を抑制することにより、血管内皮細胞の

出芽や管腔維持に関わる血管新生因子蛋白の分泌が増強し、筋細胞が血管内皮細胞の管腔形成能に及ぼす傍分泌効果が強まることを明らかにした。この結果から、筋細胞で *Int6* を抑制すると *HIF-2 α* 蛋白が増加し、続いてそのターゲットである血管新生因子群の発現が増強し、それらの一部が分泌されることによって血管内皮細胞の管腔形成が増強している可能性が考えられた。

生体での検討では、*Int6* 抑制プラスミドの筋注は、効果を及ぼす期間が限定的である可能性はあるものの、マウス下肢の血流の回復を促し、臨床症状を改善していた。この血流回復に関して、培養細胞を用いた実験の結果と考え合わせると、次のような機序が想定される。まず、プラスミド筋注による *Int6* 遺伝子の抑制によって、筋組織中の *Int6* 蛋白が減少し、それまで *Int6* による分解を受けていた *HIF-2 α* 蛋白が増加した。そのようにして増加した *HIF-2 α* 蛋白の転写調節作用により、筋細胞内で *bFGF* と *PDGF-B* の発現が誘導された。続いてこれらの血管のリモデリングに関わる血管新生因子が筋細胞から分泌され、近傍の血管構成細胞に働きかけることにより、側副血行路の発達を促され、足部の血流の回復を促した。閉塞性末梢動脈疾患では、側副血行路の発達不良が重症化につながるが多いため、本研究のように側副血行路のリモデリングを狙った戦略は、臨床的に非常に有効であると思われる。

結論

マウス下肢虚血モデルにおけるプラスミド筋注による *Int6* の抑制は、下肢血流と症状の改善を促した。その機序の一部として、筋細胞内での *HIF-2 α* の安定化を介して血管新生因子群が増強し、血管構成細胞への傍分泌効果を及ぼすことが考えられた。*Int6* 抑制による新たな血管新生治療の可能性が示唆された。