

# 低酸素シグナルによる生体機能調節機構の解明と疾患治療への応用

牧野雄一

## 1 研究のねらい

低酸素環境における生体応答あるいは低酸素シグナルによる生体機能の調節は実に多彩であり、その組織特異性、状況特異性などの多様性の分子機構については不明な点を多く残している。低酸素に対する生体適応の異常や破綻が多くの疾患・病態の成立に密接に関わることが明らかにされ、生体低酸素応答制御機構の本質的理解が生理学的のみならず臨床医学的にも要求されている。IPAS は低酸素などの細胞外環境因子によって誘導され、低酸素誘導性転写因子 HIF-1 とともに、低酸素シグナル伝達系におけるフィードバック制御、他の細胞内シグナルとのクロストークなどを媒介する重要な分子であり、低酸素下の生体機能の多様かつ精緻な制御に貢献していると考えられる。

そこで、本研究は、① IPAS 発現制御機構の解析による生体低酸素応答のフィードバック制御機構の分子基盤の解明、② IPAS ネットワークの解析とその生理学的意義の解明、③ IPAS システムの異常と疾患・病態との関連の解明を目的とし、低酸素環境下における生体機能調節機構を分子から個体レベルまで明らかにして低酸素が関わる病態の克服法開発の分子基盤を築くことをめざして開始された。

## 2 研究成果

本研究は、IPAS 発現制御の分子機構の解明、IPAS が生体内で形成する分子ネットワークの解明の 2 本の柱を中心に展開され、それぞれ以下の成果を得た。

### 1) IPAS mRNA 発現における低酸素依存性 IPAS 遺伝子プロモーター活性化機構および低酸素依存性選択的スプライシング機構とその役割の究明

IPAS 遺伝子転写開始点の上流約 5kb にわたるプロモーターを単離、断片化後、ルシフェラーゼレポーター遺伝子を作成し、低酸素下培養細胞におけるプロモーター活性の解析を行い、IPAS プロモーターが低酸素により活性化されることを明らかにした。かかるプロモーターの低酸素依存性活性化は HIF-1 $\alpha$  の発現およびプロモーター内の HIF-1 結合配列、さらに同配列への HIF-1 の結合に依存していた。一方、IPAS 型 mRNA 生成に関わる IPAS 特異的スプライシングは低酸素条件下でのみ認められる。低酸素下飼育マウスの臓器由来核抽出液中に IPAS に特異的なエクソン 4a の 3' スプライシング部位に結合する蛋白質が存在し、質量分析の結果、既知の RNA 結合蛋白質『A』であることが判明した(未発表)。『A』の発現プラスミド、SiRNA を用いて『A』の細胞内発現量を変化させるシステムを樹立した。IPAS 遺伝子エクソン 4a 含有を高感度で検出するミニジーンシステムも確立し、『A』による IPAS mRNA スプライシング制御機構を解明しつつある。

### 2) FLAG-IPAS 発現マウスの作出とその表現形質解析ならびに同マウス由来組織抽出液での IPAS 結合蛋白質検出システムの確立

FLAG 標識 IPAS(FLAG-IPAS)を高発現するトランスジェニックマウスを作出した。FLAG-IPAS の高発現組織では HIF-1 標的遺伝子の低酸素誘導性発現が抑制されており、IPAS は生体内におい

でも HIF-1 拮抗分子として働く事が示唆された。さらにかかる IPAS 発現マウスにおいては皮膚創傷の治癒が野生型マウスと比し有意に遅延していた。生体内 IPAS 過剰発現により創傷治癒に不可欠な血管新生が阻害された可能性が示唆される。また、FLAG-IPAS 発現マウス由来の各組織抽出液を対象として、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降法を確立しつつある。本法により、生体内で IPAS と相互作用する蛋白質の同定を目指している。

### 3 今後の展開

作出された FLAG-IPAS トランスジェニックマウスを用いて、関節炎モデル、担癌モデルなどを作成し低酸素応答／血管新生が密接に関連する病態の制御における IPAS の役割の解明を目指す。さらに、本研究の成果として明らかになりつつある IPAS 発現の制御機構に人為的に介入する方法を確立し、HIF-1-IPAS を中心とする生体低酸素応答システムの制御を標的とした新規分子療法開発の基盤としたい。

### 4 研究成果リスト

#### 論文

1. Makiko Matsumoto, Yuichi Makino, Tetsuhiro Tanaka, Hirotoshi Tanaka, Nobuhiro Ishizaka, Eisei Noiri, Toshiro Fujita, and Masaomi Nangaku  
Induction of Renoprotective gene expression by cobalt ameliorates ischemic injury of the kidney in rats. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 14: 1825-1832 (2003)
2. Tsunenori Kodama, Noriaki Shimizu, Noritada Yoshikawa, Yuichi Makino, Rika Ouchida, Kensaku Okamoto, Testuya Hisada, Hiroshi Nakamura, Chikao Morimoto, and Hirotoshi Tanaka.  
Role of the glucocorticoid receptor for regulation of hypoxia-dependent gene expression  
*J. Biol. Chem.*, 278: 33384-33391 (2003)
3. Yuichi Makino, Hiroshi Nakamura, Eiji Ikeda, Kei Ohnuma, Kenji Yamauchi, Yuataka Yabe, Lorenz Poellinger, Yasunori Okada, Chikao Morimoto, and Hirotoshi Tanaka  
Hypoxia-inducible factor regulates survival of antigen receptor-driven T cells  
*J. Immunol.*, 171: 6534-6540 (2003)
4. Helene Ameln, Thomas Gustafsson, Carl Johan Sundberg, Lorenz Poellinger, Eva Jansson, and Yuichi Makino  
Physiological activation of hypoxia-inducible factor-1 in human skeletal muscle  
*FASEB J.*, 19: 1009-1011 (2005)
5. Hiroshi Nakamura, Yuichi Makino, Kensaku Okamoto, Lorenz Poellinger, Kei Ohnuma, Chikao Morimoto, and Hirotoshi Tanaka  
TCR-engagement increases HIF-1 $\alpha$  protein synthesis via rapamycin-sensitive pathway under hypoxic conditions in human peripheral T cells  
*J. Immunol.*, 174: 7592-7599 (2005)

## 総説

1. IPAS による低酸素応答性遺伝子発現の制御

牧野雄一

臨床免疫 41:472-476(2004)

2. 低酸素シグナルによる末梢での T 細胞の制御

牧野雄一、森本幾夫、田中廣壽

臨床免疫 43:92-96(2005)

## 学会発表・講演

1. 広島大学若手研究者によるクロマチン研究会 (2003 年、広島市)

IPAS による生体低酸素応答の制御

牧野雄一

2. 第8回酸素ダイナミクス研究会 (2003 年、神戸市)

HIF-1 機能抑制分子 IPAS による生体低酸素応答制御の分子機構

牧野雄一、中村博志、岡本健作、田中廣壽

3. 横浜市立大学大学院総合理学特別講義 (2003 年、横浜市)

生体の低酸素環境への適応機構

牧野雄一

4. 聖マリアンナ医科大学難病治療研究センター セミナー (2003 ねん、川崎市)

低酸素誘導性転写因子による生体機能調節機構

牧野雄一

5. 第 47 回日本リウマチ学会学術集会 (2003 年、東京都)

HIF-1 機能抑制分子 IPAS による低酸素応答のフィードバック制御機構

牧野雄一、中村博志、Lorenz Poellinger、田中廣壽

6. 第1回がんとハイポキシア研究会 (2003 年、京都市)

IPAS による生体低酸素応答制御の分子機構

牧野雄一

7. 第 48 回日本リウマチ学会学術集会 (2004 年、岡山市)

T 細胞における低酸素応答性転写因子 HIF-1 の役割の解析

牧野雄一、中村博志、大沼圭、森本幾夫、田中廣壽

8. 6<sup>th</sup> International Symposium on vonHippel-Lindau Disease (2004、Kouchi, Japan)

Plenary workshop

Negative feedback regulation of hypoxia-inducible gene expression by a bHLH/PAS factor

IPAS

Yuichi Makino, Arvydas Kanopka, Hiroshi Nakamura, Lorenz Poellinger, Hirotoishi Tanaka

9. Vilnius Institute Biotechnology Seminar (2004, Vilnius, Lithuania)  
Negative feedback regulation of hypoxia-inducible gene expression by IPAS  
Yuichi Makino, Arvydas Kanopka, and Lorenz Poellinger
  
10. 第2回がんとハイポキシア研究会 (2005年、つくば市)  
低酸素応答性遺伝子発現のネガティブフィードバック制御機構  
牧野雄一

#### 謝辞

さきがけ研究の遂行にあたり多大なご支援を賜りました、東京大学医科学研究所先端医療研究センター免疫病態分野、森本幾夫教授、田中廣壽助教授、ならびに研究室の皆様にご心より感謝申し上げます。また、スウェーデンカロリンスカ研究所 Lorenz Poellinger 教授をはじめ研究協力者の方々にもここに御礼申し上げます。