



## Effect of hypoxia on pulmonary endothelial cells from bleomycin-induced pulmonary fibrosis model mice

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2023-04-19 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 赤堀, 大介 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/00004345">http://hdl.handle.net/10271/00004345</a>

博士 (医学) 赤堀 大介

論文題目

Effect of hypoxia on pulmonary endothelial cells from bleomycin-induced pulmonary fibrosis model mice

(ブレオマイシン誘導性肺線維症モデルマウスの肺血管内皮細胞に対する低酸素の影響)

論文の内容の要旨

[はじめに]

肺線維症は間質の線維化によりガス交換が障害され、低酸素血症が生じる難治性疾患である。その病態には、主として肺胞上皮細胞や線維芽細胞が関与することが明らかになっている。申請者らは先行研究において肺血管内皮細胞に着目し、線維化メディエーターの産生や内皮間葉転換 (EndoMT)などを介して、内皮細胞も肺の線維化に重要な役割を果たしていることを示した。

近年、低酸素環境そのものが肺胞上皮のアポトーシス、血管新生、炎症反応の誘導を介して線維化を促進している可能性が報告されているが、肺線維症において低酸素が血管内皮細胞に与える影響は明らかでない。申請者はブレオマイシン誘導性肺線維症モデルマウスから単離した肺血管内皮細胞を用いて、低酸素刺激による内皮障害、線維化メディエーター発現、コラーゲン産生能及び EndoMT について検討した。

[材料ならびに方法]

マイクロスプレイヤーを用いて、ブレオマイシンを C57BL6 雄マウスに気管内投与し肺線維症マウスを作成した (各群 n=6)。マウスからの摘出肺をコラゲナーゼ処理し、磁気細胞分離装置を用いて肺血管内皮細胞を単離した。単離した内皮細胞を低酸素環境で培養し、線維化メディエーター、内皮障害マーカー、上皮間葉転換誘導転写因子、*α-smooth muscle actin (α-SMA)* 遺伝子の発現量を測定した。内皮細胞の hypoxia-inducible factor (HIF) -1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$  タンパク質発現はウェスタンブロッティングで確認し、ELISA 法で培養液上清中の線維化メディエーター発現、可溶性コラーゲン定量キットでコラーゲン量を測定した。血管内皮細胞を抗  $\alpha$ -SMA 抗体、抗 CD31 抗体、抗 HIF- $\alpha$  抗体で蛍光免疫染色し、 $\alpha$ -SMA 陽性細胞を算出した。動物実験は浜松医科大学の動物実験に関するガイドラインに従い、動物実験委員会の審査を経て実施した (承認番号 2019020)。

[結果]

ブレオマイシン投与 7 日後のマウス肺では炎症細胞浸潤を伴う線維化病変を認め、このマウス肺から血管内皮細胞を単離した。肺血管内皮細胞を低酸素培養すると HIF-2 $\alpha$  タンパク質の発現が確認された一方で、HIF-1 $\alpha$  の発現は確認されなかった。ブレオマイシン投与マウスでは内皮障害マーカーである *plasminogen*

*activator inhibitor-1*、*von Willebrand factor*、*matrix metalloproteinase-12* の mRNA 発現が有意に増加し ( $p<0.05$ )、低酸素下でこれらマーカーの発現量は更に増加した ( $p<0.05$ )。線維化メディエーターである *transforming growth factor- $\beta$* 、*connective tissue growth factor*、*platelet-derived growth factor* の mRNA 発現はブレオマイシン投与マウスで有意に増加し、低酸素下で発現が増強した ( $p<0.05$ )。コラーゲン産生量、線維化メディエーターのタンパク質発現は低酸素下で増加した ( $p<0.05$ )。 $\alpha$ -SMA 陽性細胞はブレオマイシン投与マウスでのみ増加していたが ( $p<0.05$ )、低酸素下では生食投与マウス、ブレオマイシン投与マウスいずれにおいても  $\alpha$ -SMA 陽性細胞の増加が確認され ( $p<0.05$ )、ブレオマイシン投与マウスの血管内皮細胞を低酸素培養した場合に最も増加した ( $p<0.05$ )。蛍光免疫染色では CD31 陽性細胞、 $\alpha$ -SMA 陽性細胞のいずれにも HIF-2 $\alpha$  が発現していた。転写因子 *Twist-1*、*Snail*、*Slug* の mRNA 発現は低酸素下で増加した ( $p<0.05$ )。

#### [考察]

HIF は低酸素への適応を司る制御因子であり、HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$  の 2 つのアイソフォームが重要とされている。HIF の発現には器官依存性があり、HIF-1 $\alpha$  はほぼ全身の臓器に発現する一方で、HIF-2 $\alpha$  は内皮細胞や肝細胞、腎間質細胞など限られた細胞に発現することが知られている。また、肺線維芽細胞においては HIF-1 $\alpha$  は低酸素曝露後早期にピークに達し、HIF-2 $\alpha$  は低酸素曝露後徐々に増加することが報告されている。本研究では 72 時間の低酸素刺激を与えた CD31 陽性の肺血管内皮細胞において HIF-2 $\alpha$  の発現のみが確認され、肺血管内皮細胞での低酸素応答の主体は HIF-2 $\alpha$  であると考えられた。

これまでに肺線維芽細胞の増殖においては低酸素が関与することが示されている。加えて HIF-2 $\alpha$  のノックダウンや HIF 阻害剤投与により低酸素誘導性の線維芽細胞増殖が抑制されることから、低酸素下での肺線維芽細胞の増殖に HIF-2 $\alpha$  が関与すると指摘されている。肺血管内皮細胞を用いた本研究では低酸素刺激により HIF-2 $\alpha$  の発現と共に線維化メディエーターやコラーゲン産生の増加が確認され、血管内皮細胞においても低酸素刺激が HIF-2 $\alpha$  を介して線維化の進行に関与している可能性が示唆された。

本研究では低酸素刺激によりブレオマイシン投与マウスの  $\alpha$ -SMA 陽性細胞が増加すると共に、CD31 陽性の内皮細胞に加えて  $\alpha$ -SMA 陽性細胞にも HIF-2 $\alpha$  の発現がみられたことから、低酸素刺激が HIF-2 $\alpha$  を介して EndoMT を誘導している機序が想定された。

#### [結論]

ブレオマイシン誘導性肺線維症モデルマウスから単離した血管内皮細胞において、低酸素は内皮障害、線維化メディエーターの産生発現及び EndoMT を促進した。低酸素自体が肺血管内皮細胞による線維化の進展に寄与している可能性が示唆された。