

令和2年度研究助成実績報告書

一般財団法人日本産業科学研究所
理事長 宮地 尚 殿

下記の通り、一般財団法人日本産業科学研究所研究助成金による研究実績をご報告致します。

申請者

氏名：牧野雄一

所属・職名：旭川医科大学地域共生医育統合センター 教授

研究課題

低酸素誘導性転写因子の遺伝子多型が関わる膠原病性肺高血圧症の分子病態の解明

研究内容

(背景・目的)

膠原病性肺高血圧症は、従来、膠原病患者の予後改善を阻む難治性病態の一つであった。近年、早期診断、エンドセリン (ET) 受容体拮抗薬、ホスホジエステラーゼ5阻害剤などの肺血管拡張薬の開発や治療戦略の進歩により、肺動脈性肺高血圧症の予後は改善しつつある。しかしながら一方で、強皮症で見られる間質性肺病変、心筋病変、肺静脈閉塞性病変を基盤に発生する肺高血圧症に対してはこれらの薬剤の効果は限局的であることも示されている。すなわち、強皮症に伴う肺高血圧症の多様性を理解し、個々の病因や病態の分子機構を把握し、それに基づいた治療法を開発することが極めて重要な課題である。申請者らは、低酸素応答抑制分子 HIF-3 α 遺伝子破壊マウスがヒト肺高血圧症類似の形質を示す事ことに着目して研究を展開している。これ

まで、ヒト HIF-3 α 遺伝子一塩基多型 (SNP) が強皮症性肺高血圧症患者に高頻度で認められる事を発見し、同 SNP が肺動脈内皮細胞において ET1 発現を亢進させるなど、標的遺伝子誘導プロファイルに変調をもたらす事を明らかにしつつある。

本研究は、HIF-3 α 遺伝子異常が膠原病性肺高血圧症の発症進展にいかなるメカニズムで寄与するか、特に標的遺伝子制御の破綻との関連から解明し、強皮症性肺高血圧症の病態における HIF-3 α の意義を究明することを目指す。従来未知の分子病態のモデルを提唱し、新たな治療法開発の分子基盤を確立することを最終的な目標とする。

(研究成果)

1 ゲノム編集法で作成した HIF-3 α 遺伝子破壊マウスにおけるヒト肺高血圧症類似形質の解析

これまで、申請者らは、エクソン 2 領域の相同組換えにより作成した HIF-3 α 遺伝子破壊マウスの形質を解析し、①肺動脈内皮細胞におけるエンドセリン 1 の発現亢進、②肺細動脈の筋性動脈化、③右心室の拡大、などヒト肺高血圧症類似の形質を示すことを発表してきた。本研究では、同じく HIF-3 α 遺伝子エクソン 2 領域にゲノム編集法による塩基欠失を導入し、HIF-3 α 翻訳フレームシフトを生じさせたマウス (ゲノム編集マウス) を作成し、形質解析を行った。ゲノム編集マウスでは、①肺細動脈の筋性動脈化、②肺胞の虚脱を認めた。また、ゲノム編集マウスは、4 週令ではホモ接合体の生存率が明らかに低下していた。これらの観察結果は、ゲノム編集マウスにお

いて、肺胞虚脱による生存率低下ならびに肺胞換気血流不均衡による肺動脈性肺高血圧症が生じている可能性を示唆する。興味深いことに、ゲノム編集マウスの肺組織において、脂肪酸触媒酵素の発現が亢進しており、肺サーファクタントの構成成分である脂肪酸の発現に影響する可能性が示されている。現在、肺組織を中心に、低酸素応答性遺伝子発現様相、肺胞構造と構成成分などについて、ゲノム編集マウス、野生型マウスにおける差異を解析している。

2 強皮症性肺高血圧症関連ヒト HIF-3 α 遺伝子一塩基多型 (SNP) が肺動脈における遺伝子発現に与える影響の解析

SNP 導入 HIF-3 α 特異的標的遺伝子の網羅的解析と意義付けを旨とし研究を行っている。遺伝子発現解析では、RNA Ampliseq 法を用いて SNP 導入 IPAS/HIF-3 α 特異的標的遺伝子を明確にすること、ChIP シーケンス法を用いて SNP 導入 IPAS/HIF-3 α の標的結合配列を明らかにすることが必須であるため、レンチウイルスシステムを用いたタグ付き SNP 導入 HIF-3 α の高発現細胞を樹立した。低酸素など各種培養条件下で RNA 発現解析を展開中である。

研究業績

U2AF - Hypoxia-induced fas alternative splicing regulator.

Vilya L, Peciuliene I, Jakubauskiene E, Zinkeviciute R, Makino Y, Kanopka A.

Exp Cell Res. 2021 Feb 1;399(1):112444. doi: 10.1016/j.yexcr.2020.112444. Epub 2020 Dec 26.