

## 学位請求論文の内容の要旨

論文提出者氏名	循環病態科学領域循環病態内科学教育研究分野 氏名 鈴木 晃子
(論文題目) Coupling factor 6 attenuates CXCR4 expression through HIF-1 $\alpha$ and cSrc pathways and promotes endothelial apoptosis and inflammation (Coupling factor 6 は HIF-1 $\alpha$ と cSrc の系を介して CXCR4 の発現を抑制し内皮のアポトーシスと炎症を促進する)	
(内容の要旨) <b>【目的】</b> 血管内皮細胞は常に虚血関連の酸性状態に暴露されているが、chemokine の 1 種である CXCL12 (stromal cell-derived factor-1)-CXC chemokine receptor type 4 (CXCR4) 系が、保護的に作用する可能性が示されている(1)。Coupling factor 6 (CF6) は細胞表面に存在する ATP 合成酵素と結合し、ATP を消費することにより proton を細胞内に流入させる。CF6 はこの細胞内酸性化を介して prostacyclin 並びに nitric oxide の産生を阻害し、内皮機能障害を惹起する。本研究では、CF6 の血管内皮 CXCR4 に及ぼす影響とその調節機構並びに病態形成における意義について検討した。 <b>【方法】</b> 1) Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) に CF6 を添加し、CXCR4 の発現を RT-PCR、Western blot 法で測定した。同様に低酸素による酸性化の影響も検討した。CF6 の CXCR4 発現抑制機序を chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay と immunoprecipitation assay で検討した。アポトーシスの評価は Flow Cytometry で annexin V-propidium iodide を用いて行った。 2) CF6 過剰発現マウスの CXCR4 蛋白の発現を Western blot 法で測定した。また、冠動脈におけるアポトーシス細胞の評価、冠動脈の壁厚の評価、CD16 並びに CD206 陽性炎症細胞浸潤について免疫組織学的に検討した。 <b>【結果】</b> 1) HUVEC における CXCR4 遺伝子並びに蛋白発現は CF6 投与により濃度依存性に抑制され、 $10^{-7}$ M で有意な抑制を認めた ( $p<0.05$ )。また、CF6 ( $10^{-7}$ M) 投与により、CXCR4 発現は時間依存性に抑制された (24 時間後、48 時間後ともに $p<0.05$ )。CF6 による CXCR4 の抑制は hypoxia inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ siRNA 並びに cSrc 阻害薬 PP1 の前投与により完全に消失した。また、低酸素による酸性化の条件でも CF6 添加時と同様に CXCR4 の発現が抑制され ( $p<0.05$ )、さらに CF6 を添加しても CXCR4 抑制作用に相乗効果はみられなかった。CF6 による CXCR4 発現抑制の機序を検討するために行った ChIP assay では、CXCR4 promoter の hypoxia response element (HRE, repressive site) 領域 と HIF-1 $\alpha$ の interaction が増強することが示された。また、免疫沈降では、CF6 投与によりリン酸化 cSrc と histone deacetylase (HDAC)-3 の interaction が増強することが示された。アポトーシス細胞の割合は、CF6 投与により正常酸素において $4.3\pm 0.7\%$ から $5.6\pm 1.7\%$ へ増加した ( $p<0.05$ )。また、低酸素状態でも $5.3\pm 1.8\%$ から	

7.0±1.3%へ増加し ( $p<0.05$ )、それらの増加は HIF-1 $\alpha$  siRNA または CXCR4 ligand の添加により抑制された。

2) CF6 過剰発現マウスの心臓では野生型マウスに比較して CXCR4 の蛋白発現が有意に減少していた ( $p<0.05$ )。冠動脈におけるアポトーシス細胞数は、過剰発現マウスが野生型マウスより有意に大であった。また、冠動脈の壁厚に関しては、野生型マウスに比較して過剰発現マウスで有意に大であった。CD16 陽性細胞 (inflammatory macrophage) と CD206 陽性細胞 (fibrosis-promoting macrophage) の冠動脈周辺組織への浸潤は過剰発現マウスが野生型マウスに比較して有意に大であった。

#### [考察]

これまで我々は CF6 が細胞内アシドーシスを介して内皮機能障害を惹起することを報告してきた(2)。また、CF6 が高血圧症や急性心筋梗塞など動脈硬化性疾患と深く関連していることも明らかにした(3)。本研究では、CF6 の血管内皮 CXCR4 に及ぼす影響について検討し、CF6 が血管内皮の CXCR4 発現を抑制することを明らかにした。この機序として、ChIP assay により、CF6 投与後 HIF-1 $\alpha$  が CXCR4 promoter の HRE 領域に結合することを明らかにし、エピジェネティック作用により CXCR4 発現を抑制している可能性が考えられた。また、CF6 投与によりリン酸化された cSrc が HDAC3 と結合することも明らかにした。cSrc と HDAC3 の結合は遺伝子発現を抑制することが報告されており(4)、同様の作用により CXCR4 発現が抑制された可能性も示唆された。

CF6 の CXCR4 を介した生理的作用として、HUVEC のアポトーシスが促進されることを明らかにした。この促進反応は、CXCR4 のリガンドである CXCL12 の添加により抑制された。以上の結果から、CXCR4 は抗アポトーシス作用を有していると考えられ、血管内皮において保護的に作用すると考えられた。また、CF6 はその作用を抑制することにより、アポトーシスを促進させる可能性が考えられた。

In vivo の検討では、CF6 過剰発現マウスで CXCR4 発現が抑制されており、組織染色の結果、冠動脈でのアポトーシスの増強、壁厚の増大、炎症細胞浸潤の増加が確認された。これらの所見は、CF6 が引き起こす動脈硬化の発症・進展に CXCR4 抑制を介した機序が関与している可能性を示唆するものと考えられた。

#### [文献]

- 1) Melchionna R, Romani M, Ambrosino V, D'Arcangelo D, Cencioni C, Porcelli D, Toietta G, Truffa S, Gaetano C, Mangoni A, Pozzoli O, Cappuzzello C, Capogrossi MC, Napolitano M. Role of HIF-1 $\alpha$  in proton-mediated CXCR4 down-regulation in endothelial cells. *Cardiovasc Res* 2010; 86:293-301.
- 2) Osanai T, Magota K, Tanaka M, Shimada M, Murakami R, Sasaki S, Tomita H, Maeda N, Okumura K. Intracellular signaling for vasoconstrictor coupling factor 6: Novel function of  $\beta$ -subunit of ATP synthase as receptor. *Hypertension* 2005; 46:1140-1146.
- 3) Osanai T, Sasaki S, Kamada T, Fujiwara N, Nakano T, Tomita H, Matsunaga T, Magota K, Okumura K. Circulating coupling factor 6 in human hypertension: role of reactive oxygen species. *J Hypertens* 2003; 21:2323-2328.
- 4) Matteucci E, Ridolfi E, Maroni P, Bendinelli P, Desiderio MA. c-Src/histone deacetylase 3 interaction is crucial for hepatocyte growth factor dependent decrease of CXCR4 expression in highly invasive breast tumor cells. *Mol Cancer Res* 2007; 5:833-845.