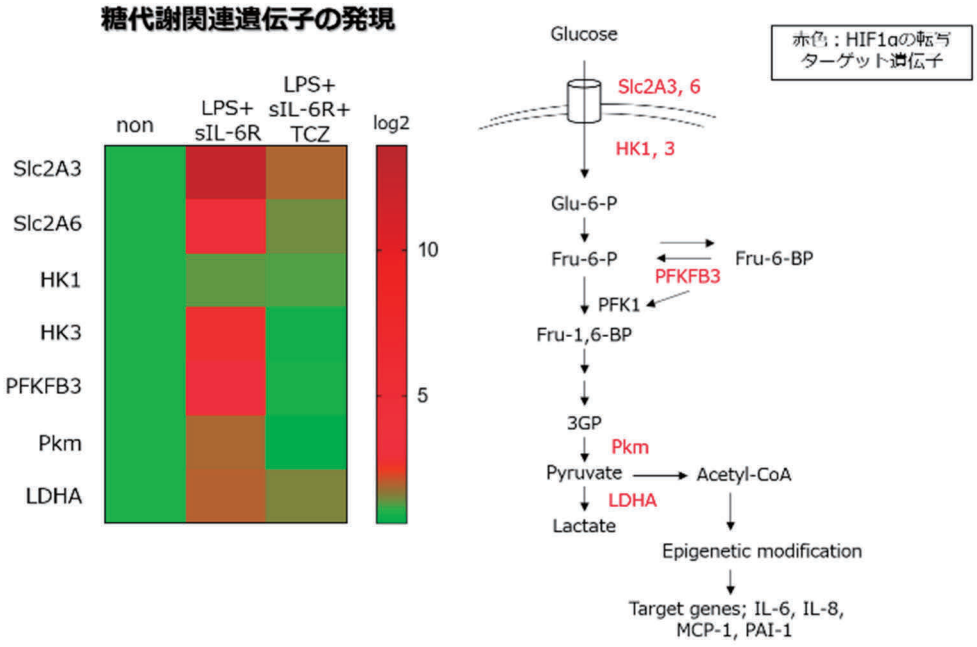
26　血管内皮細胞におけるエピゲノムと代謝のクロストーク	姜　秀辰

【目的】組織損傷や感染によって血管内皮細胞に炎症が生じると、凝固因子の発現が増加し、血栓形成を強力に誘導する。この様な血管内恒常性の破綻は全身性炎症反応の重症化に大きく関与する。しかし、何故血管内皮細胞の傷害で凝固と炎症のカスケードが誘導されるのかについては未だに不明である。本研究では、IL-6 受容体シグナルにより誘導される代謝分子である HIF1α因子に着目して「血管内皮細胞における代謝と炎症のクロストークの分子基盤の解明」を目指す。

【方法】血管内皮細胞における IL-6 受容体シグナルの詳細を解明するため、RNA-seq を行った。siRNA による gp130 をノックダウンした HUVEC を用い、糖代謝およびエピゲノム解析を行った。更に血管内皮細胞特異的 *gp130* 欠損マウスを作製し、敗血症、ARDS、熱傷などの様々なサイトカインストームマウスモデルを用い、生体における gp130 シグナルを評価した。

【結果】HUVEC を用い、*gp130* 遺伝子をノックダウンすると IL-6 受容体シグナルに対し炎症性サイトカイン産生や PAI-1 の産生が減少した。さらに、IL-6 受容体の下流シグナルにおける遺伝子制御機構を明らかにするため、RNA-seq 解析により、IL-6 受容体シグナル依存的に HIF1α及びその下流遺伝子が制御されることが明らかとなった。この結果から、IL-6 受容体の下流に存在する HIF1α は糖代謝を介して血管内皮細胞活性化を制御することが明らかとなった。HIF1α は gp130 シグナルによりその発現が制御されることから、IL-6 受容体シグナル活性により糖代謝に必要な酵素発現を検討した。その結果、HIF1α により転写制御される複数の糖代謝関連酵素遺伝子の発現が IL-6 受容体シグナル依存的に誘導された。さらに、HIF1α の阻害剤である PX-478 をマウスに投与し、エンドトキシンモデルにおけるグリコカリックスの脱落を検討した結果、PX-487 処理群は血中 syndecan-1、PAI-1 が対処群と比べ、顕著に減少した。これらの結果から、血管内皮細胞における IL-6 受容体―HIF1α パスウェイが血管内皮細胞のグリコカリックスの安定化を制御することが明らかとなった。

IL-6 受容体シグナルによる血管内皮細胞における解糖系経路関連遺伝子の発現



26. 血管内皮細胞におけるエピゲノムと代謝のクロストーク

姜　秀辰

大阪大学 免疫学フロンティア研究センター 免疫機能統御学

Key words：血管内皮細胞，サイトカインストーム，IL-6，解糖系，敗血症

緒　言

サイトカインストームは感染症に起因する全身性炎症反応であり、悪性新生物、心疾患をはじめとした多様な疾患に合併しうる病態である。進行すると多臓器不全から致死的な転機を辿る病態であり、近年の医療水準の向上にも関わらず、世界的にみると依然として深刻な健康障害の原因である。サイトカインストームは血小板減少や過剰な IL-6 や TNFα などの炎症性サイトカイン産生が誘導され、単球やマクロファージの活性化が病態に寄与することが報告されている。近年、腫瘍特異的 T 細胞輸注療法の重篤な副作用として全身性炎症応答であるサイトカイン放出症候群が引き起こされるが、抗 IL-6 受容体抗体療法は高サイトカイン炎症に対し有効性を示すことが報告されている［1］。最近、我々は IL-6 受容体シグナルが血管内皮細胞に直接作用し、炎症の重症化に関与することを明らかにした［2〜4］。しかし、このような全身性炎症反応の病態形成が何故 IL-6 依存的に起こるのかについて未だ不明である。

組織損傷や感染によって血管内皮細胞に炎症が生じると、凝固因子の発現が増加し、血栓形成を強力に誘導する。この様な血管内恒常性の破綻は敗血症などの全身性炎症反応症候群の重症化に大きく関与する。しかし、何故血管内皮細胞の傷害で凝固と炎症のカスケードが誘導されるのかについては未だに不明である。本研究では、IL-6 受容体シグナルにより誘導される HIF1α に着目して「血管内皮細胞における代謝と炎症のクロストークの分子基盤の解明」を目指す。

方　法

1. HUVEC を用いた gp130-HIF1α axis の炎症応答制御機構の解明

LPS＋sIL-6R 存在下、siRNA により gp130 を発現ノックダウンした HUVEC を用い、炎症性サイトカイン、PAI-1 および HIF1α の発現を検討した。HIF1α 転写活性を抑制する阻害剤である PX-478 を前処理し、LPS＋sIL-6R で刺激した後、同様に炎症応答を ELISA および qPCR で検討した。

2. HUVEC を用いた gp130-HIF1a axis の糖代謝制御機構の解明

LPS＋sIL-6R 存在下、siRNA により gp130 を発現ノックダウンした HUVEC を用い糖代謝関連酵素である HK2 及び PFKFB2 の発現をウェスタンブロットで検討した。

3. *In vivo* における血管内皮細胞 gp130-HIF1A axis の炎症応答制御機構の解明

Gp130 遺伝子を欠損させたコンディショナルノックアウトマウス（$gp130^{flox/flox}$、Cdh5-Cre；$gp130^{ECKO}$）および野生型マウスを用いて、敗血症モデル（エンドトキシンショックモデル）により評価した。静脈注射により LPS を投与した後、7 日間、生存率を観察した。血管内皮細胞の炎症応答を観察するため、LPS 投与した 6 時間後、野生型と $gp130^{ECKO}$ マウスより血清を採取し、炎症性サイトカインおよび血管内皮細胞障害マーカー（syndecan-1、PAI-1）を測定した。

エンドトキシンショックを誘導した野生型や $gp130^{ECKO}$ マウスの肺血管内皮細胞を単離し、HIF1α およびその下流シグナル関連遺伝子の発現を qPCR で検討した。また、同マウスモデルを用い野生型マウスに PX-478 を腹腔内投与し、6 時間後に血清を採取して敗血症の炎症応答に関与する因子を ELISA で評価した。

結果および考察

1. HUVEC を用いた gp130-HIF1α axis の炎症応答制御機構の解明

血管内皮細胞の炎症応答における gp130 の機能解析を行うため、*gp130* 遺伝子に対する siRNA で HUVEC 細胞を処理し、サイトカイン産生及び PAI-1 発現を検討した。*Gp130* 遺伝子をノックダウンすると IL-6 受容体シグナルに対し、炎症性サイトカイン産生や PAI-1 の産生が減少した。さらに、IL-6 受容体の下流シグナルにおける *gp130* 遺伝子制御機構を明らかにするため、RNA-seq 解析を行った。その結果、IL-6 受容体シグナル依存的に HIF1α及びその下流遺伝子が制御されることが明らかとなった。HIF1α の転写活性が血管内皮細胞の炎症応答における関与性を検討するため、HUVEC を HIF1α転写活性阻害剤である PX-478 で 6 時間ほど前処理後、LPS＋sIL-6R で刺激した。48 時間後、HUVEC の培養液を用い、炎症性サイトカインである IL-6、MCP-1、IL-8 および PAI-1 を ELISA で測定した。その結果、PX-478 を処理した群は対照群と比べ、炎症性サイトカインや PAI-1 産生が顕著に低下した（図 1）。この結果から、IL-6 受容体シグナルは HIF1α を介して血管内皮細胞活性化を制御することが明らかとなった。

HIF1α は転写因子として解糖系に関与する酵素の発現を制御することにより、糖代謝を制御することが知られている。Gp130 シグナルが HIF1α の発現を制御することから、IL-6 受容体シグナル活性により糖代謝に必要な酵素発現を検討した。その結果、HIF1α により転写制御される複数の糖代謝関連酵素遺伝子の発現が IL-6 受容体シグナル依存的に誘導された（図 1）。更に、gp130 をノックダウンした HUVEC 細胞は HIF1a、HK2、PFKFB3 の発現がコントロール群と比べ低下していた（図 1）。上記の結果により、IL-6 受容体シグナルによる血管内皮細胞の炎症応答においては HIF1α を介して糖代謝が制御されることが明らかとなった。

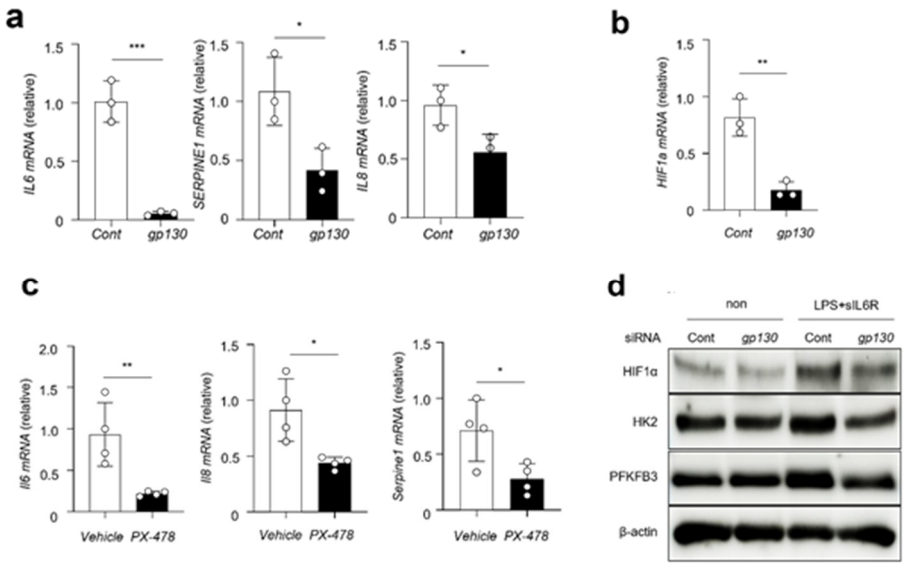


図 1. 血管内皮細胞における gp130-HIF1α シグナルは解糖系を介して炎症応答を制御する
LPS＋sIL-6R 処理の 24 時間後の遺伝子発現を qPCR（a～c）で、タンパク質を WB（d）で測定した。
a） gp130 siRNA 処理した HUVEC の IL6、SERPINE1 IL8 mRNA の発現。
b） gp130 siRNA 処理した HUVEC の HIF1a mRNA の発現。
c） PX-478 前処理した HUVEC の IL6、SERPINE1 IL8 mRNA の発現。
d） gp130 siRNA 処理した HUVEC の HIF1α、HK2、PFKFB3 の発現。
*p＜0.05、**p＜0.01、***p＜0.005（unpaired t-test）。

2. *In vivo* における gp130-HIF1α axis の炎症応答制御機構の解明

生体内での血管内皮細胞における gp130-HIF1α の機能を解析するため、*gp130* 遺伝子のエキソン 1 領域の両末端に LoxP 配列を組み込んだマウスを作製した。Cdh5-Cre マウスを用いて血管内皮細胞特異的 *gp130* 欠損マウスを作製した。タモキシフェンを連続 5 日間腹腔内投与し、7 日後、血管内皮細胞における *gp130* 遺伝子欠損を確認した。*In vivo* における血管内皮細胞の gp130-HIF1α シグナルの炎症応答を検討するため、コントロールマウス（gp130$^{flox/flox}$）と血管特異的 *gp130* 欠損マウス（gp130^{ECKO}）に LPS を投与し、生存率を検討した。その結果、gp130^{ECKO} マウスはコントロール群と比べ、顕著に生存していた（図 2a）。HIF1α が血管内皮細胞の炎症応答に関与するかを検討するため、LPS 投与の 6 時間後、肺組織から CD31 陽性細胞を単離し、HIF1α の発現を qPCR にて検討した。その結果、コントロール群より gp130^{ECKO} マウス由来の血管内皮細胞の HIF1α 発現が有意に低下していた（図 2b）。次に、*in vivo* における gp130-HIF1α シグナルが血管内皮細胞の損傷や炎症応答に関与するかを検討するため、LPS 投与したマウスから血清を採取してサイトカイン、ケモカインや血管内皮細胞の障害マーカーを ELISA にて測定した。その結果、gp130^{ECKO} マウスはコントロール群より血管内皮細胞障害マーカーである Syndecan-1 や PAI-1、そして IL-6、KC、MCP-1 の産生が低下していた（図 2c、d）。これらの結果から、血管内皮細胞の gp130-HIF1α シグナルは炎症時に血管内皮細胞の炎症応答を制御することが明らかになった。

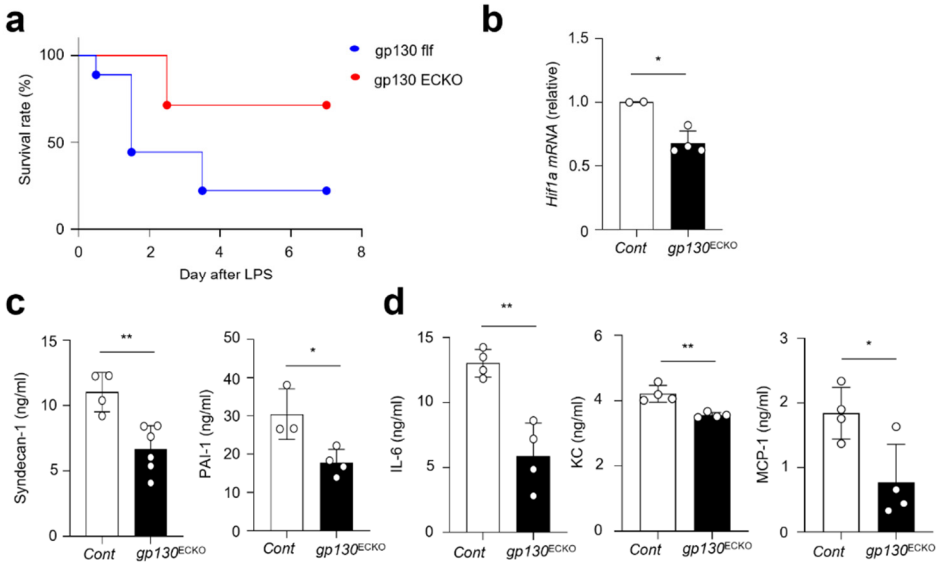


図 2. 血管内皮細胞特異的 *gp130* 欠損マウスは敗血症に対し抵抗性を示す

a) エンドトキシンモデルの生存率。

b) LPS 投与後肺血管内皮細胞の HIF1α 発現。

c) LPS 投与後の血管内皮細胞障害マーカーの血清濃度。

d) LPS 投与後のサイトカイン及びケモカインの血清濃度。

*p＜0.05、**p＜0.01、***p＜0.005（unpaired t-test）。

3. 炎症重症化における HIF1α シグナルの機能解析

生体内での血管内皮細胞における HIF1α の機能を解析するため、HIF1α の転写機能を抑制する阻害剤 PX-478 を用いて検討した。野生型マウスに PX-478 を前投与し、1 時間後、LPS を投与して敗血症を誘導した。LPS 投与の 6 時間後、PX-478 投与群とコントロール群から血清を採取してサイトカイン、ケモカインや血管内皮細胞の障害マーカーを ELISA にて測定した。その結果、LPS を投与した gp130^{ECKO} の血清解析と一致して、PX-478 投与群はコントロール群と比べ、Syndecan-1 や PAI-1、そして IL-6、KC、MCP-1 の産生が低下していた（図 3）。これらの結果から、HIF1α シグナルは炎症時に血管内皮細胞の炎症応答を制御することが明らかになった。

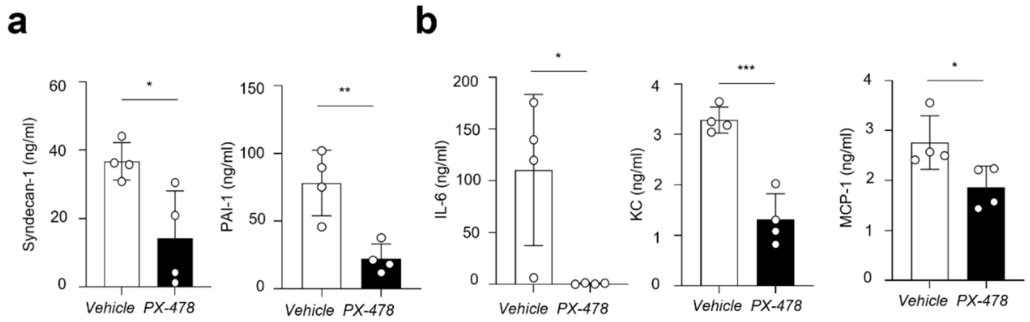


図 3. HIF1αシグナル阻害剤投与は敗血症の発症を抑制する

a) LPS 投与後の血管内皮細胞障害マーカーの血清濃度。

b) LPS 投与後のサイトカイン及びケモカインの血清濃度。

*p＜0.05、**p＜0.01、***p＜0.005（unpaired t-test）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学免疫学フロンティア研究センター免疫機能統御学の協力のもと実施された。

文　献

1) Kang S, Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic. Immunity. 2019 Apr 16;50(4):1007-1023. PMID: 30995492 DOI: 10.1016/j.immuni.2019.03.026.

2) Kang S, Tanaka T, Inoue H, Ono C, Hashimoto S, Kioi Y, Matsumoto H, Matsuura H, Matsubara T, Shimizu K, Ogura H, Matsuura Y, Kishimoto T. IL-6 trans-signaling induces plasminogen activator inhibitor-1 from vascular endothelial cells in cytokine release syndrome. Proc Natl Acad Sci U S A. 2020 Sep 8;117(36):22351-22356. PMID: 32826331 DOI: 10.1073/pnas.2010229117. Epub 2020 Aug 21.

3) Kang S, Kishimoto T. Interplay between interleukin-6 signaling and the vascular endothelium in cytokine storms. Exp Mol Med. 2021 Jul;53(7):1116-1123. PMID: 34253862 DOI: 10.1038/s12276-021-00649-0. Epub 2021 Jul 12.

4) Kishimoto T, Kang S. IL-6 Revisited: From Rheumatoid Arthritis to CAR T Cell Therapy and COVID-19. Annu Rev Immunol. 2022 Apr 26;40:323-348. PMID: 35113729 DOI: 10.1146/annurev-immunol-101220-023458. Epub 2022 Feb 3.