

HIF-2 $\alpha$ の欠損は  
脾臓血管内皮細胞の増殖を介して  
赤血球造血を制御する

2015

筑波大学大学院博士課程人間総合科学研究科

坪 井 一 輝

筑波大学

博士（医学）学位論文

# 目次

## HIF-2 $\alpha$ の欠損は脾臓血管内皮細胞の増殖を介して 赤血球造血を制御する

### I . 序論

...P.6-12

1. 低酸素応答転写因子 (HIF: Hypoxia inducible factor) の誘導と制御機構
2. HIF-1 と HIF-2 の特異性と相補性
3. マウス血球系細胞の分化/成熟と造血支持臓器
4. HIF-2 $\alpha$  欠損マウスを用いた先行研究
  - 1) HIF と赤血球造血
  - 2) HIF と血管内皮細胞 (EC: Endothelial cell)
5. 本研究の目的

### II . 実験方法

...P.13-27

1. マウス樹立及び維持
  - 1) *Hif-2 $\alpha$*  knockdown/knockout hetero mouse (*kd/null*) 作製
  - 2) 遺伝子型検定
2. *in vivo* 解析

- 1) 末梢血を用いた解析
  - 1-1) 末梢血の回収
  - 1-2) 末梢血を用いた血球分画の解析
  - 1-3) 末梢血中エリスロポエチン (EPO: Erythropoietin) 濃度の解析
- 2) 骨髄・脾臓浮遊細胞分画を用いた赤血球前駆細胞分画の解析
  - 2-1) フローサイトメトリー
  - 2-2) コロニーアッセイ
- 3) 脾臓の組織学的解析
  - 3-1) 抗 CD31 抗体染色
  - 3-2) ヘマトキシリン&エオジン (HE) 染色
  - 3-3) 抗 Selectin 抗体染色
3. *in vitro* 解析
  - 1)脾臓血管内皮細胞 (spEC) 株の樹立
    - 1-1) 不死化因子 (SV40T) 導入マウスを用いた EC 株の単離・純化
    - 1-2) Lenti-virus を用いた siHIF-2 $\alpha$  の導入を伴う EC 株の単離・純化
  - 2) Cell proliferation assay による細胞増殖能の検定
4. 分子生物学的解析
  - 1) quantitative real-time PCR (qRT-PCR) 解析
  - 2) Western blot 解析
  - 3) CHIP assay による遺伝子発現制御機構の検定
5. 統計学的解析

### Ⅲ. 結果

...P.28-41

#### 1. *kd/null* 作製

- 1) 遺伝子型検定
- 2) 非造血臓器における HIFs 発現解析

#### 2. マウス成体個体 (84 日齢) を用いた *in vivo* 解析

##### 1) 血球分画の解析

###### 1-1) 末梢血の解析

###### 1-2) 骨髄・脾臓浮遊細胞分画を用いた赤血球前駆細胞分画の解析

###### 1-2-1) フローサイトメトリー (FACS)

###### 1-2-2) コロニーアッセイ

##### 2) HIFs と HIFs 下流因子

###### 2-1) 腎臓・肝臓における発現解析

###### 2-2) 末梢血における発現解析

###### 2-3) 脾臓における発現解析

##### 3) 脾臓の組織学的解析

###### 3-1) 抗 CD31 抗体染色

###### 3-2) ヘマトキシリン&エオジン (HE) 染色

###### 3-3) 抗 Selectin 抗体染色

#### 3. 脾臓の発達過程 (14-84 日齢) における *in vivo* 解析

##### 1) 末梢血を用いた血球分画の解析

##### 2) 脾臓の組織学的解析 (抗 Selectin 抗体染色)

##### 3) 脾臓の発現解析

#### 4. *in vitro* 解析

- 1) SV40T を導入した EC の単離と純化
- 2) EC を用いた発現解析
- 3) Cell proliferation assay による増殖能の検定
- 4) CHIP assay による発現制御機構の検定
5. HIF-2 $\alpha$  発現減弱モデルを用いた *in vitro* 解析
  - 1) *kd/kd* 由来 EC に対する Lenti-virus による si HIF-2 $\alpha$  の導入
  - 2) *kd/kd-si HIF-2 $\alpha$*  由来 EC を用いた発現解析
  - 3) Cell proliferation assay による細胞増殖能の検定
  - 4) CHIP assay による発現制御機構の検定

#### IV. 考察

...P.42-49

1. *kd/null* における *Hif-2 $\alpha$*  遺伝子欠損と HIFs の発現
2. HIF-2 $\alpha$  の発現減少に対して *kd/kd*、*kd/null* 血球分画の示した赤血球減少症と *kd/null* における改善
3. HIF-2 $\alpha$  と赤血球支持因子
  - 1) 腎臓・肝臓における EPO 発現と末梢血中の EPO 濃度
  - 2) 脾臓における HIFs 発現と HIFs 下流因子
4. 脾臓の構造的発達による赤血球造血能の亢進
5. 脾臓の発達に伴う脾臓赤脾髄領域の亢進と HIFs
  - 1) 血球分画の解析
  - 2) 脾臓赤血球造血微小環境 (赤脾髄) の解析
  - 3) 脾臓に関する血管新生因子、赤血球造血支持因子に関する発現解析

6. 低酸素に伴う EC の増殖能の向上と HIF 下流因子
7. HIF-2 発現強度に応じて生じる HIF-2 に対する HIF-1 の機能的代償機構
8. *kd/kd-si HIF-2 $\alpha$*  EC 細胞株を用いた HIFs 制御機構の再現性
9. 総括: *kd/null* における赤血球減少症の改善メカニズム

## V. 結論

...P.50

## VI. 謝辞

...P.51

## VII. 引用文献

...P.52-61

## I. 序 論

### 1. 低酸素応答転写因子 (HIF: Hypoxia inducible factor) の誘導と制御機構

HIF は細胞が低酸素ストレスにさらされた際に、生体防御として働く因子の産生を促進する転写因子として知られている。そして、HIF には HIF-1 $\alpha$  (Goldberg et al., 1988)、HIF-2 $\alpha$  (Ema et al., 1997)、HIF-3 $\alpha$  (Hara et al., 2001) の三種類の HIF- $\alpha$  サブユニットが報告されており、共通の HIF- $\beta$  サブユニットである ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) とヘテロ二量体を形成し、標的遺伝子の制御領域に存在するシスエレメントである HRE (Hypoxia Responsive Element) 配列に結合することにより HIFs 下流因子の転写活性化を行っている (Wang et al., 1995)。

HIFs は  $\alpha$  サブユニットが mRNA レベル、タンパクレベルの二段階で発現や活性化が制御される。HIF- $\alpha$  サブユニットの mRNA は、細胞膜上において受容体型チロシンキナーゼに増殖因子が結合することによるシグナルが PI3K (Phosphoinositide 3 kinase) や MAPK (mitogen-activated protein kinase) といったリン酸化経路を経てその転写が活性化されることが報告されている (Zhong et al., 2000, Dalmás et al., 2008)。一方、HIF- $\alpha$  サブユニットのタンパクは通常酸素条件下 (21% O<sub>2</sub>) において PHD (proline hydroxylase) によりプロリン残基が水酸化されることで pVHL (Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor protein) を介したユビキチン化を経て、26S プロテオソームによる分解を受けることによって細胞内における蓄積が抑制される (Maxwell et al., 2002)。また、VEGF/VEGFR (FLK-1, FLT-1) の下流シグナルである細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK1/2: Extracellular Signal-regulated Kinase) のリン酸化 (p-ERK1/2) の亢進は HIF-1 $\alpha$  タンパクを活性化させる (Das et al., 2005)。HIF- $\alpha$  は低酸素条



件下 (1~8% O<sub>2</sub>) において、プロリン残基の水酸化による分解を免れる事で、核内移行、ARNT とのヘテロ二量体の形成を経た後に標的遺伝子に対する転写活性化能を示すことが可能となる (Wang et al., 1993, Maxwell et al., 2002)。

そして、マウスの生体内の臓器における平均的な酸素分圧は成体 (8-12 週齢) において 5%程度であり、胎児期においては 2%程度である事が報告されている (Dunwoodie et al., 2009)。また、42 日齢から 70 日齢マウス脾臓における酸素分圧は 0.5-4.5%と全体的に低く、脾臓動脈から離れるにつれて低酸素となる事が報告されている (Charles et al., 2001)。

## 2. HIF-1 と HIF-2 の特異性と相補性

最初に発見された低酸素応答転写因子である HIF-1 $\alpha$  はほぼ全ての細胞種に発現しており、その下流遺伝子は細胞増殖や細胞分化、エネルギー産生などに関与することが知られている (Wang et al., 1993)。一方、HIF-2 $\alpha$  は HIF-1 $\alpha$  の類似の転写因子として発見され、血管内皮細胞 (EC: Endothelial cell)、上皮細胞、神経細胞、尿細管間質細胞などの一部の細胞種において発現していることが知られている (Tian et al., 1997, Flamme et al., 1998)。そして、HIF-2 下流遺伝子の機能は血管新生や血管収縮、造血等多岐に渡るが、HIF-1 下流遺伝子と共通している機能として細胞増殖や細胞分化などに関与することが報告されている (Richerd et al., 2006)。また、近年発見された HIF-3 $\alpha$  は、ARNT とのヘテロ二量体形成は可能であるが、HRE 配列に結合後に下流因子へと強い転写活性をもたらすドメイン構造を持たないために転写活性が弱い (Gu et al., 1998)。そのため、HIF-3 $\alpha$  は本来の転写因子としての作用ではなく、単体の ARNT の存在量を調整することによって HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$  に対する競合的阻害作用を持つことが報告されている (Makino et al., 2001)。

そして、*Hif-1* 完全欠損マウスや *Hif-2* 完全欠損マウスは特殊な例を除き、ほぼ全てが汎血球減少や脈管形成不全による胎生致死を示す事が報告されている (Maxwell et al., 1993, Camenisch et al., 2001)。

HIF-1 と HIF-2 は HIFs 下流因子の転写調節領域に含まれる HRE の認識・結合によって転写制御を行うが、HIF-1 と HIF-2 の認識する HRE の配列は共通であるとされている。しかし、*Glut-1* (Glucose transporter type-1) や *Vegf* (Vascular endothelial growth factor) 等は HIF-1 と HIF-2 の共通した下流因子 (HIFs 共通下流因子) であるとされる一方、HIFs 下流因子の中でも *Ang-1* (Angiopoietin-1) や *Angptl4* (Angiopoietin-Like Protein 4) 等は HIF-1 に特異的な下流因子であり、*Vcam-1* (Vascular cell adhesion molecule-1) や *Flk-1* (Fetal liver kinase-1) 等は HIF-2 に特異的な下流因子であるとされている (Sukuli et al., 2012)。しかし、条件によってはこれらの特異性が当てはまらない事例も報告されており、これら特異性を生み出す要因は未だ解明されていない (Hu et al., 2003)。

### 3. マウス血球系細胞の分化/成熟と造血支持臓器

マウス血球系細胞 (赤血球/白血球/血小板) は共通の造血幹細胞から発生し、CFU-GEMM までは共通の細胞系譜をたどる。そして、赤血球は赤芽球前駆細胞 (BFU-E/CFU-E) を経て赤芽球として成熟し、脱核の後に赤血球となる (Peschle et al., 1978, Dalmas et al., 2008)。また、白血球系の細胞は白血球前駆細胞 (CFU-GM) を経て顆粒球前駆細胞や単球前駆細胞として成熟し、白血球系の細胞となる (Bol et al., 1980)。血小板は巨核球コロニー形成細胞 (CFU-MEG)、巨核球を経て血小板として成熟する (Bol et al., 1980)。

これら血球系細胞分化は個体発生の段階に応じて異なる組織・臓器において

生じる事が知られているが、中でもマウス赤血球造血は胎児期から成体期において大きく変化する事が知られている。マウス胎児造血は胎生 7 日より胎児卵黄嚢で始まり、胎生 12 日から胎児肝臓が胎児期において中心的な役割を担う (Ohneda et al., 1998)。また、胎生 15 日から骨髄、胎生 16 日から脾臓が造血支持臓器としての機能を持ち、骨髄・脾臓は生後に大きく発達すると共にマウス成体造血 (赤血球/白血球/血小板の分化) の中心的な臓器として機能する (Yanai et al., 1989, Walker et al., 2001)。

#### 4. HIF-2 $\alpha$ 欠損マウスを用いた先行研究

##### 1) HIF と赤血球造血

白血球系細胞分画には HIF-1 $\alpha$  と HIF-2 $\alpha$  が共に発現し、白血球の機能や分化に対する作用が報告されている (Imtiyaz et al., 2010)。一方、赤血球細胞分画に発現する HIF-1 $\alpha$  は細胞周期を制御する事が報告されているが (Scortegagna et al., 2003)、HIF-2 $\alpha$  は造血幹細胞および赤血球系細胞において必須の因子ではない、あるいは発現していない事が報告されている (Scortegagna et al., 2003, Amelie et al., 2013)。しかし、HIF-2 $\alpha$  は赤血球分化を支持する種々の細胞に発現しており、赤血球造血に重要な役割を 2 つ担っている事が報告された。

HIF-2 $\alpha$ によって制御される赤血球造血支持因子の1つは、出生後において腎臓・肝臓で産生されるホルモンのエリスロポエチン (Epo: Erythropoietin) である。先行研究において *Hif-2 $\alpha$*  完全欠損マウスは胎生致死であったが、限定条件下では出生後の汎血球減少、脈管形成不全を発症し、若年期 (28日齢まで) に多臓器不全により死亡した (Scortegagna et al., 2003)。そして、*Hif-2 $\alpha$*  完全欠損マウスにおける汎血球減少はEPOの発現に起因しており、EPOの大量投与により回復する事が解明された (Scortegagna et al., 2005)。よって、出生後に腎臓

で産生されるEPOはHIF-1の制御を受けずHIF-2の制御のみを受けるHIF-2特異的下流因子であり、血流を介して骨髄・脾臓に輸送され、赤血球系細胞分画の生存・維持に作用する事が明らかとなった (Keighley et al., 1964, Ohneda et al., 1990, Jelkmann et al., 2007, Luo et al., 2013)。

もう一つは、骨髄・脾臓において発現する細胞接着因子のVCAM-1である。VCAM-1はHIF-2特異的下流因子であり、赤芽球におけるVLA-4との接着によるシグナルを介した赤血球分化を支持している (Hamamura et al., 1996)。所属研究室は50% HIF-2 $\alpha$ 発現減弱モデルである*Hif-2 $\alpha$  knockdown*マウス (*kd/kd*) の成体 (84日齢) における赤血球減少症を観察した。そして、所属研究室はHIF-2 $\alpha$ の発現減少に伴う造血微小環境の構造的な縮小・VCAM-1の発現減弱が赤血球造血支持能の低下をもたらし、*kd/kd*における赤血球減少症に至った事を明らかにした (Trentin et al., 1971, Yamashita et al., 2008)。

以上の様に、赤血球造血においてHIF-2は複数の臓器・機序によって赤血球造血を支持する事が明らかとされている。

## 2) HIF と血管内皮細胞 (EC: Endothelial cell)

生体内の低酸素ストレスに際して生じる血管新生は既存血管からの血管壁細胞の脱落、ECの増殖、新生血管への血管壁細胞の再凝集の3つのステップから成るが、毛細血管はEC単層の血管から成る事が報告されている (Iwasaka et al., 1996, Tanaka et al., 1998, Kanno et al., 2000)。そして、骨髄や脾臓の造血微小環境は線維芽細胞や脂肪細胞、骨芽細胞、マクロファージを含む毛細血管網から構築される (Trentin et al., 1971)。よって、胎児期から出生後にかけて生じる造血微小環境の発生・発達にはECの増殖と伸張が極めて重要であるが、その際のマスターレギュレーターの一つがHIFsである。個体・臓器の発生・発達、創

傷部位、虚血には低酸素状況が発生する。そして、組織・臓器における低酸素状況は細胞内における酸素分圧の低下、HIFs の転写活性化・安定化を亢進する。細胞中の HIFs は様々な HIFs 下流因子を亢進する事が知られており、HIFs 下流因子は血管新生や細胞増殖、細胞内代謝などに寄与する事で EC の増殖に作用する (Skuli et al., 2012)。また、HIF による血管新生作用は臨床的な研究も進められおり、特にがん (悪性腫瘍) における HIF の関与が報告されている (Shinojima et al., 2007, Biswas et al., 2010)。

## 5. 本研究の目的

HIFs は低酸素状況において転写因子として働き、赤血球造血や血管新生に大きな役割を担う事が様々な *Hifs* 減弱・欠損モデルを用いて報告されている。しかし、*Hif-2 $\alpha$*  完全欠損マウスはそのほぼ全てが胎生致死であり、129S6/SvEvTac と C57BL/6J の異なる二つの系統由来の完全欠損マウスを掛け合わせた F1 交雑マウスのみ 28 日齢までの生存が可能であった (Scortegagna et al., 2003)。*Hif-2 $\alpha$*  完全欠損マウスは汎血球減少による多臓器不全を併発するために 28 日齢という若年のマウスを用いて解析がされており、マウス成体赤血球造血における HIF-2 $\alpha$  の機能を解析する上で適切なモデルであるとは言い難い。また、当研究室の用いた HIF-2 $\alpha$  の発現を 50%まで減弱させたモデルである *kd/kd* は赤血球減少を示した一方、汎血球減少は確認されなかった。よって、「腎臓・肝臓由来 EPO と骨髄・脾臓の VCAM-1 による赤血球造血への作用の関連性」や「骨髄・脾臓の赤血球造血環境の発生・発達・機能に対する HIF-2 の作用機序」、「HIF-2 の白血球系細胞、血小板への関与」は未だ十分に解明されたとは言い難い。

本研究では HIF-2 $\alpha$  の発現を 25%まで減弱させたモデルである新規 *Hif-2 $\alpha$*  遺伝子組み換えマウスである *Hif-2 $\alpha$*  knockdown/knockout hetero mice (*kd/null*)を

作製し、野生型 (*WT*: wild type)、*kd/kd* との比較解析を行った。そして、出生後から成体に至るまでの「HIFs と造血微小環境」や「HIFs と血球系細胞」、「造血微小環境と血球系細胞」の関連や作用機序の更なる解析を行う事を目的とした。

## II. 実験方法

### 1. マウス樹立及び維持

マウスは筑波大学動物資源センターB棟においてSPFの環境下 (RT: 22±1°C、湿度: 55±10%、明暗サイクル: 明 14/暗 10 hours、繁殖用固形配合飼料、自動給水) にて飼育を行った。動物実験は筑波大学の動物実験に関するガイドラインに従い、委員会の審査を経て実施した。

本研究で使用した *WT* と二種類の *Hif-2α* 遺伝子組み換えマウス (*kd/kd*、*kd/null*) は全て C57BL/6L の遺伝的背景を持つ。50%*Hif-2α* 発現減弱モデルである *kd/kd* は先行研究と同一の系統を使用した (Morita et al., 2003, Yamashita et al., 2008)。また、本研究で新規に用いた 75%*Hif-2α* 発現減弱モデルである *kd/null* は新たに作製した。

#### 1) *Hif-2α* knockdown/knockout heterozygote mouse (*kd/null*) 作製

新規 75%*Hif-2α* 発現減弱モデルである *kd/null* は *Hif-2α* knockdown allele (*kd* allele) と *Hif-2α* exon2 knockout allele (*null* allele) をヘテロに持つマウスである。先行研究において作製された *kd* allele は *Hif-2α* exon1 に対して Neomycin 耐性因子が挿入されている (Morita et al., 2003)。よって、*kd* allele から産生される HIF-2α タンパクは構造異常を伴い発現減弱されている。また、*null* allele において欠損している *Hif-2α* exon2 は HIF-2α と ARNT のヘテロ二量体形成や HIFs 下流因子のエンハンサー領域にある HRE 配列への結合に重要な配列である事が報告されている (Higgins et al., 2004)。そして、*null* allele は *Hif-2α* exon2 に対して loxP 配列と共に挿入された Neomycin (*Neo*) 耐性因子によるセレクション、embryonic stem (ES) 細胞 (clone 144) への導入後の Cre-loxP 部位特異的組み

替えによって exon2 を除去する事で *Hif-2 $\alpha$*  knockout/wild type heterozygote として樹立した。*Hif-2 $\alpha$*  knockout/wild type heterozygotic mouse (*null/+*) は組み替え ES 細胞の胚盤胞への導入によりキメラマウスとして出生し、生殖系細胞に *null/+*を持つ個体と WT との交配を経て得られた個体を遺伝子型検定する事によって、N8 世代以降において *null/+*は *Hif-2 $\alpha$*  knockout allele を維持している事が確認された。また、*kd/null* は *null/+*と *kd/kd* の交配により作成した。*kd/null* は後述の血管内皮細胞 (EC) の樹立に向け、温度感受性 SV40 large T-antigen (SV40T) Tg マウスとの交配の上で維持した (Kameoka et al., 1995)。

## 2) 遺伝子型検定

ゲノム DNA は ES (Embryonic stem) 細胞、あるいはマウス組織片から lysis buffer [50mM Tris-HCl pH 8.1, 10mM EDTA, 1% sodiumdodecyl sulfate (SDS), 1mM Protease inhibitor cocktail] を用いて抽出した。DNA サンプルは Hind III を用いた制限酵素処理の後、アガロースゲル (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を用いた電気泳動、ナイロン膜 (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ) への転写により分離した。ナイロン膜に吸着された変異 exon2 DNA の検出は alkaline phosphatase using a cross-linking kit (AlkPhos Direct; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) による標識を行った Southern probe との複合体形成、蛍光発光試薬 (CDP star; Amersham Pharmacia Biotech) による X 線フィルム (KODAK, Tokyo, Japan) による可視化により行った。

また、抽出した DNA は primer (Table 1) と共に Ex Taq (TaKaRa, Siga, Japan) による増幅により遺伝子型を検定した。PCR 反応は 3step 法 [熱変性 (94°C, 30sec)、アニーリング (65°C, 30sec)、伸張反応 (74°C, 60sec)、35cycle] で行い、増幅産物は 10 × PCR loading dye (0.3% Orange G, 0.03% Blomophenol blue,



0.03% Xylene Cyanol FF, 10mM Tris-HCl pH 7.5)、50mM EDTA、50% glycerol) と混合後、アガロースゲルによる電気泳動、ゲル撮影装置 (FAS-Ⅲ+DS-100; TOYOBO, Osaka, Japan) を用いて紫外線 (302nm) を照射することでゲル中の EtBr (final; 0.5 $\mu$ g/mL) の励起光を画像データとして回収した。

Kd	5' primer	AAGGGACCTGGAGTTCCGTT
	3' primer	TCGGCAGTGTCCTGAGACTG
Neo	5' primer	AAGTATCCATCATGGCTGATGATG
	3' primer	TAGCCAACGCTATGTCCTGATA
Cko	5' primer	TCTAACCTGTCGTCTCTCAGATCAG
	3' primer	TCACCTGAGCCTTGCGAGCCCAGGCTTAGCCTCC

## 2. *in vivo* 解析

### 1) 末梢血を用いた解析

#### 1-1) 末梢血の回収

末梢血の回収はマウスにアバチン (63mM トリブロモエタノール/イソアミルアルコール/DDW, 体重 1g に対して 16mL~20mL 使用) の腹腔内投与による麻酔を施し、眼下静脈叢よりヘパリンコート済み採血管 (Drummond Scientific Company, Broomall, PA) を用いて行い、EDTA-2Na (final; 1.5mg/mL) を混合することで抗凝固措置とした。

#### 1-2) 末梢血を用いた血球分画の解析

採血後は氷上で保管し、血球計数器 (セルタック; NIHON KOHDEN, Tokyo, Japan) により全血測定 (赤血球; RBC、白血球; WBC、血小板; PLT、ヘモグロビン; HGB、ヘマトクリット; HCT の測定) を行った。

### 1-3) 末梢血中エリスロポエチン (EPO: Erythropoietin) 濃度の解析

末梢血由来血漿を用いた ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) を行い、末梢血中 EPO 濃度の測定を行った。末梢血由来血漿は遠心 (15,000rpm, 5min, 4°C) により回収し、-80°Cで保存した。測定は EPO ELISA kit (Roche, Basel, Switzerland) を用いて行い、Micro plate Reader (Bio-Rad, Hercules, CA) によって測定した。

### 2) 骨髄・脾臓浮遊細胞分画を用いた赤血球前駆細胞分画の解析

使用したすべてのマウスの組織・臓器は頸椎脱臼等の方法を用いた安楽死の後回収し、脾臓・骨髄を 2% FBS (fetal bobine serum) (NICHIREI Biosciences, Tokyo, Japan) /PBS (phosphate buffered saline) 中に採取した。脾臓はクリーンベンチ内において裁断することで浮遊細胞分画を採取し、骨髄は両端を切断後、22G 針付きシリンジ (TERUMO, Tokyo, Japan) で 2% FBS/PBS に押し出し、100µm セルストレーナー (Becton, Dickinson and Company, Franklin, NJ) を通す事で浮遊細胞分画を採取した。

#### 2-1) フローサイトメトリー

細胞に対して Fcγ ブロック (CD16/CD32) (1/200 希釈) (BioLegend, San Diego, CA) を行うことで抗体の非特異的な結合を防いだ上で、IgG 抗体あるいは蛍光標識抗体 (FITC-conjugated rat anti-CD71、PE-conjugated rat anti-Ter119) (1/200 希釈) (BioLegend) を用いて細胞の染色を行った。(CD71<sup>+</sup>/Ter119<sup>+</sup>; 未成熟赤芽球細胞) (CD71<sup>-</sup>/Ter119<sup>+</sup>; 成熟赤芽球細胞)

細胞の解析は Gallios Flow Cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA) によって行った。操作は同社の推奨手順書に従った。

## 2-2) コロニーアッセイ

骨髓から回収した細胞を Hypotonic solution (155mM NH<sub>4</sub>Cl, 10mM KOH, 1mM EDTA) にて処理し、浸透圧法により赤血球を除去したものをサンプルとして用いた。

CFU-E (colony-forming-unit erythroid) は  $2 \times 10^4$  個/35mm non coat dish (Sumitomo Bakelite, Tokyo, Japan) を CFU-E 用の MethoCult 培地 [MESOCULT #3234 (Stem Cell Technology, Vancouver, Canada), 20%FBS, 1U/mL EPO] に播種して 2 日間、BFU-E (burst-forming-unit erythroid) は  $1 \times 10^5$  個/35mm non coat dish を BFU-E 用の MethoCult 培地 [MESOCULT #3234, 20% FBS, 2 U/mL EPO, 100ng/mL stem cell factor (SCF; PeproTech, Rocky Hill, NJ)] に播種して 7 日間培養した。

培養後、Benzidine 染色液 [DW: Benzidine stock solution (11.5mL 酢酸, 1.27mL DDW, 0.395g Benzidine) : 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を 5 : 1 : 1 で混合] を 100 mL/dish 添加することでヘモグロビン産生細胞を染色した。染色後、CFU-E の場合は 8 個以上の陽性細胞群をコロニーと見なし、BFU-E の場合は 30 個以上の陽性細胞群をコロニーと見なした上で顕微鏡下、目視によるコロニー数の計測を行った。

CFU-GM (colony-forming-unit granulocyte-monocyte) は  $5 \times 10^5$  個/35mm non coat dish を CFU-GM 用の MethoCult 培地 [MESOCULT #3231 (Stem Cell Technology), 20% IMDM, 10 $\mu$ g/mL IL-3] に播種して 5 日間培養し、50 個以上の陽性細胞群をコロニーと見なした上で顕微鏡下、目視によるコロニー数の計測を行った。

### 3) 脾臓の組織学的解析

使用したすべてのマウスの組織・臓器は頸椎脱臼等の方法を用いた安楽死の後に回収し、摘出組織は切れ込みを入れる処置を行った上で PBS による血液の洗浄後、4%パラホルムアルデヒドによる固定 (4°C, 8hours) を行った。

#### 3-1) 抗 CD31 抗体染色

固定後のサンプルを MeOH で置換後、Wax (polyester wax; VWR international, Gul Dr, Singapore) による包埋を行った。回転式マイクロトーム (RM 2265; Leica, Solms, Germany) により 5µm 厚に作成した切片から包埋剤を除去した後、組織切片を親水処理後 3%過酸化水素水 (Wako, Osaka, Japan) / PBS で氷上にて 1 時間ほど処理し、内在性ペルオキシダーゼ活性を失活させた。切片を PBS で洗浄後、アビジン溶液 (biotin blocking kit; DAKO, Glostrup, Denmark) に切片を浸透させ、室温下で 10 分間ブロッキングした。PBS で洗浄後、切片をビオチン溶液 (DAKO) に浸透させ、室温下で 10 分間ブロッキングした。再度 PBS 洗浄をした後、PBS に室温下で 5 分間浸透させた。その後 5%正常ヤギ血清 (Invitrogen, Carlsbad, CA)/1%ウシ血清アルブミン (BSA) (SIGMA, Kanagawa, Japan)/PBS 溶液を PBS-MT [スキムミルク (Becton, Dickinson and Company) : Triton X-100 (Wako) : PBS を 2 : 0.1 : 100 で混合] にて 5 倍希釈したブロッキングバッファー溶液を作製し、室温下で 1 時間ブロッキングした。一次抗体 [rat 抗 mouse CD31 抗体 (1 : 500) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)] を使用し、コントロールとして rat IgG (BioLegend) をおいて 4°Cで一晩反応させた。組織切片を PBS-MT にて 3 回洗浄し、PBS-T (PBS : Triton X-100 を 100 : 0.1 で混合) で 2 回洗浄した後、Biotin 標識 goat 抗 rat IgG (1 : 1000) (Vector laboratories, Burlingame, CA) にて、室温下で 1 時間反応させた。組織切片を

PBS-T にて洗浄した後、VECTASTAIN Elite ABC standard Kit (Vector laboratories)を用いて HRP (horse radish peroxidase) 標識をし、DAB 基質 [chromophore 3, 3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Wako) / PBS / 30%過酸化水素溶液を 1 : 10 : 0.01 で混合] を用いて DAB 発色を行った。画像は正立顕微鏡 (OLYMPUS, Tokyo, Japan) 下で撮影を行い、陽性細胞群 (血管内皮細胞)・陰性細胞群 (W: 他細胞) を判定した。

### 3-2) ヘマトキシリン&エオジン (HE) 染色

固定後のサンプルを MeOH で置換後、Wax による包埋を行った。回転式マイクローム (RM 2265; Leica) により 5 $\mu$ m 厚に作成した切片から包埋剤を除去した後、Hematoxylin (Vector laboratories) と Eosin Alcohol solution acid extract (Wako) による染色を行った。Xylen (Wako) 透徹した後、Marinol (武藤化学, Tokyo, Japan) にて封入し、正立顕微鏡 (OLYMPUS) 下で撮影を行った。画像は画像解析ソフト (Image J) により赤脾髄 (R)・白脾髄 (W) の面積を計測し、面積比を算出した。

### 3-3) 抗 Selectin 抗体染色

マウス尾静脈から 0.1mg/mL TRITC conjugated BS-I Lectin (SIGMA) 200 $\mu$ L を注入後、脾臓を摘出した。固定後のサンプルはシュークロース溶液に置換後、OCT.compound (Tissue-Tek 4583; Sakura FineTek Japan, Tokyo, Japan) に包埋した。5 $\mu$ m 厚の組織切片を回転式マイクローム (CM1850UV; Leica) により作成、glycerol にて封入後、蛍光顕微鏡 (OLYMPUS) 下で検鏡を行った。画像の単位面積に対する陽性領域 (毛細血管領域) の割合は画像解析ソフト (Image J) による明度の計測により算出した。

### 3. *in vitro* 解析

#### 1) 脾臓血管内皮細胞 (spEC) 株の樹立

##### 1-1) 不死化因子 (SV40T) 導入マウスを用いた EC 株の単離・純化

頸椎脱臼後の成体マウスから回収した脾臓を 0.1% P/S (100U/mL penicillin, 0.1mg/mL streptomycin) (Invitrogen) を添加した 2% FBS/PBS で洗浄し、滅菌シャーレの上で滅菌したはさみを用いて 1mm 角以下に細断した。細断組織片を 0.1% collagenase 溶液 (Nitta Gelatin, Osaka, Japan) /20%FBS/PBS 溶液に入れ、37°Cの恒温槽で約 1 時間酵素処理を行った。得られた細胞懸濁液は 18G および 22G の注射針 (TERUMO) と 5mL シリンジ (TERUMO) を用いた'ずり応力'により個々の細胞に分離し、100 $\mu$ m セルストレーナーで濾過後に遠心 (1000rpm, 5min, RT) した。上清を除去後、得られたペレットを 100ng/mL ECGS (Endothelial Cell Growth Supplement; Becton, Dickinson and Company)を添加した HAVA 培地 [DMEM-high glucose/10%FBS/0.1mM non-essential amino acid (Invitrogen) /2mM L-グルタミン (Invitrogen) /0.1mM 2-メルカプトエタノール (Invitrogen)] で懸濁し、35mm collagen type I-coated dishes (Becton, Dickinson and Company) に播種、初代培養を行った (33°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub>)。

初代培養細胞は Fc $\gamma$  ブロック (CD16/CD32) (1/200 希釈) (BioLegend) を行うことで非特異的な結合を防いだ上で、蛍光標識抗体 (1/200 希釈) (PE-conjugated anti-CD31, FITC-conjugated anti-CD45 antibodies; BioLegend) を用いて細胞の染色を行った。EC 分画 (CD31<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>) を flow cytometry (Moflo XDP; Beckman Coulter) により回収、HAVA 培地で懸濁後、細胞培養用 25cm<sup>2</sup> フラスコ (Sumitomo Bakelite) で培養した (33°C, 5% CO<sub>2</sub>, 20% O<sub>2</sub>)。培養された細胞は限界希釈法 [継代時に限界希釈するとともに 9cm 細胞培養皿

(Sumitomo Bakelite) に播種] により細胞株化した。クローニングされた細胞株は PCR による EC マーカー (uPAR, CD31, CD34 等) の陽性発現と他細胞マーカー (CD45 等) の陰性発現 (Table 2)、管腔形成能の評価により EC 株であることを確認した。細胞株は独立した実験系により樹立された。

EC 株の性質である管腔形成能は Tube formation assay により確認された。Tube formation assay には matrigel (Matrigel™ Matrix Basement Membrane; Becton, Dickinson and Company) でコートした well (4well の 1 穴に対して matrigel 300 $\mu$ L を加え、37°C で 30min 静置後に除去) を用いた。樹立した細胞株は  $5 \times 10^4$  cells in HAVA 培地 200 $\mu$ L/well になるように懸濁・播種した。細胞は 33°C で 9h 静置後に検鏡・撮影し、管腔の形成を確認した。

uPAR	5' primer	GGCTTAGATGTGCTGGGAAA
	3' primer	CAATGAGGCTGAGTTGAGCA
CD31	5' primer	TCTCGCTGTTGGAGTTCAGAAGTGGAG
	3' primer	CACAGATAAGCCCACCAGAGACATGGA
CD34	5' primer	CTGGAACCTTGATGGCTGTT
	3' primer	CCTGGACAGTATAGAAATAAAGTAGCA
CD45	5' primer	CCTGCTCCTCAAACCTTCGAC
	3' primer	GACACCTCTGTGCGCCTTAGC

### 1-2) Lenti-virus を用いた siHIF-2 $\alpha$ の導入を伴う EC 株の単離・純化

*kd/kd*由来EC株 (#3) に対して Lenti-virusによるGFP induced control-si RNA vector (MISSION TurboGFP™ Control Transduction Particles; Sigma-Aldrich, St. Louis, MI) あるいはHIF-2 $\alpha$ -si RNA (MISSION Lentiviral Transduction Particles; Sigma-Aldrich) の導入を行った。導入は同社の推奨手順書に従って行った。樹立

されたHIF-2 $\alpha$ 発現減弱コントロール細胞 (*kd/kd-control*)、HIF-2 $\alpha$ 発現減弱細胞 (*kd/kd-si HIF-2 $\alpha$* ) は先述の限界希釈法に従い細胞株化された。

## 2) Cell proliferation assay による細胞増殖能の検定

EC 株を  $2 \times 10^4$  cells in HAVA 培地 1.5mL/35mm dish で播種し、通常条件下 (20% O<sub>2</sub>) あるいは低酸素条件下 (5% O<sub>2</sub>) で 33°C、9 日間培養した。培地は day5 で全量交換した。細胞は 3 日ごとに回収し、0.1vol トリパンプルー (invitrogen) による染色後、血球計算盤 (Fujiston, Osaka, Japan) によりカウントした。

## 4. 分子生物学的解析

使用したすべてのマウスの組織・臓器は頸椎脱臼等の方法を用いた安楽死の後に回収し、液体窒素を用いた凍結後に-80°Cで保存した。使用時は氷上で解凍を行った。骨髄に関しては凍結前に 22G の針付きシリンジにて大腿骨中の骨髄を 1 mL の PBS に懸濁後に遠心し、細胞のみを回収した上で保存した。

また、通常酸素 (20% O<sub>2</sub>) あるいは低酸素条件 (1% O<sub>2</sub>, 6h)、33°C で培養した細胞を回収する際にはセルスクレーパー (Sumitomo Bakelite) を用いて物理的に剥離させ、PBS による洗浄、遠心 (3000rpm, 1min, 4°C) の上、ペレットとして回収した。

### 1) quantitative real-time PCR (qRT-PCR) 解析

TotalRNA は組織重量 100mg あるいは  $1 \times 10^7$  個の培養細胞に対して 1.0mL の Sepasol-RNA I Super G (Nacalai Tesque)を用いて同社のプロトコールに従い回収した。回収した RNA は分光光度計 (ND-1000; LMS Co.,Ltd., Tokyo, Japan) による吸光度測定により濃度、純度を計測した。



回収した total RNA 1.0mg は逆転写により、cDNA サンプルへと合成した。合成は Reva Tra Ace kit (TOYOBO) のランダムプライマーを用いて行い、手順は同社のプロトコールに従った。THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)、0.3mM プライマーセット (Table 3)、ROX reference dye (TOYOBO) を混合し、Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いて PCR 反応を行った。Real-time PCR 解析については ddCt 法を用いた。得られたデータより、ハウスキーピング遺伝子 ( $\beta$ -actin) に対する標的遺伝子の相対 RNA 量を求め、各サンプルの相対発現量を標準遺伝子の相対発現量で補正した。

HIF-1 $\alpha$	5' primer	AATTACTCAGAGCTTTGGATCAAGTTA
	3' primer	CTATCTGAGTTTGTGCAGTATTGTAGC
HIF-2 $\alpha$	5' primer	TGAGTTGGCTCATGAGTTGC
	3' primer	CAGCAATGAAACCCTCCAAG
Epo	5' primer	CTTTTACTCTCCTTGCTACTGATTCCT
	3' primer	CAAGCATAGAAGTTGACTTTGGTATCT
Ang-1	5' primer	CAAACGCTTTCTTTAACGG
	3' primer	CCTATGAGTCAGAATGGC
Ang-2	5' primer	AGCAGCACAAACTCGGAAAC
	3' primer	TGTGCAAGTGGTGACCTGGA
Vegf	5' primer	CTTTACTGCTGTACCTTCACCATGC
	3' primer	AACAAGGCTCACAAGTGATTTTCTGG
Tgf- $\beta$	5' primer	AGTGTGGAGCAACATGTGGAACCTC
	3' primer	AAAAGACAGCCACTCAGGCGTATC
$\beta$ -actin	5' primer	GTCGTACCACAGGCATTGTGATGGACT
	3' primer	CACCAGACAGCACTGTGTTGGCATAGA

## 2) Western blot 解析

組織重量に対して 3.0vol、あるいは  $3 \times 10^7$  個の培養細胞に対して 100 $\mu$ L の Buffer A [10mM HEPES pH 7.9 (Wako), 10mM KCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM EDTA, 1mM DTT (dithiothreitol) (Wako), 100mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride) (Wako)] を加え、組織を破碎した。15 min 氷上で静置後に 10% IGEPAL (SIGMA) を Buffer A に対して 0.1vol 加え、遠心 (15,000rpm, 10min, 4°C) によって上清 (細胞質) と沈殿 (核) を分けた (上清を細胞質分画として使用)。

沈殿に Buffer A に対して 0.3vol (組織の場合) あるいは 0.5vol (培養細胞の場合) の Buffer C (20mM HEPES, 20% glycerol, 500mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM EDTA, 1mM DTT, 100mM PMSF) を加え、攪拌後に氷上に 15 min 静置。遠心により、上清を核抽出物として回収した。タンパク質の濃度測定は Protein assay (Bio-Rad) による Bradford 法にて行った。サンプルは 2×SDS buffer (50% Buffer C, 14mM SDS, 10% 2-mercaptoethanol (SIGMA), 20% glycerol, 0.02% bromophenyl blue) と混合し、95 °C で 10 min 変性させた。

SDS-PAGE は 7.5% Running gel、3% Stacking gel を作成し、各レーンにアプライ、EP buffer (100mM Tris, 7mM SDS, 760mM glycine) を用いた電気泳動によって行った。

ゲルからメンブレンへのタンパクの転写は、セミドライ式によって行い、親水処理をした PVDF (polyvinylidene difluoride) メンブレン (MILLIPORE, Billerica, MA) を用いてタンパクを転写した。転写は Blotting Buffer B<sub>1</sub>~B<sub>3</sub> (Blotting Buffer B<sub>1</sub>; 0.3M Tris pH 7.5, 10% MeOH、Blotting Buffer B<sub>2</sub>; 25 mM Tris pH 10.4, 10% MeOH、Blotting Buffer B<sub>3</sub>; 25mM Tris pH 9.4, 10% MeOH, 40mM  $\beta$ -アミノヘキサン酸) と共に 2 mA/cm<sup>2</sup>、30 min の条件で行った。

抗体反応、発色はメンブレンを 5% skim milk/TBS-T (0.1% Tween) でブロッ

キング (RT, 1hour) し、一次抗体溶液 [rabbit polyclonal anti-HIF-1 $\alpha$  (1 : 2,000) (Novus Biologicals, Littleton, CO), rabbit polyclonal anti-HIF-2 $\alpha$  (1 : 2,000) (Novus Biologicals), goat polyclonal anti-ACTIN (1 : 4,000) (Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal anti-FLK-1 (1 : 2,000) (Novus Biologicals), rabbit polyclonal anti-FLT-1 (1 : 2,000) (Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal anti-VCAM-1 (1 : 2,000) (Santa Cruz Biotechnology), rabbit polyclonal anti-p-ERK1/2 (1 : 2,000) (Cell signaling TECHNOLOGY, Danvers, MA), rabbit polyclonal anti-ERK1/2 (1 : 2,000) (Cell signaling TECHNOLOGY), goat polyclonal anti-LAMIN B (1 : 4,000) (Santa Cruz Biotechnology)] を室温下で、1 時間反応させることで一次抗体を結合させた。TBS-T で室温、1 時間の洗浄後、室温、1 時間 (あるいは 4 °C、over night) で二次抗体 [HRP-conjugated goat anti-rabbit antibodies (1 : 10,000) (Vector Laboratories), HRP-conjugated rabbit anti-goat antibodies (1 : 10,000) (Vector Laboratories)] を反応させた。TBS-T で室温、1 時間洗浄後、Immobilon [HRP (horse radish peroxidase) 基質 (MILIPORE)] による発色を行い、ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare, Foster City, CA)を用いて画像を撮影した。得られた画像は画像解析ソフト (Image J) による明度の計測によって定量した。

### 3) ChIP assay による遺伝子発現制御機構の検定

10cm 培養皿 (Sumitomo Bakelite) に対して 3%のホルムアルデヒド/Medium (FBS-) 10mL を注ぎ、10min、室温、シェーカーで攪拌する事で細胞を固定した。PBS で洗浄後、固定停止液 (1mM PMSF, 125mM Glycine/PBS) 5mL を注ぎ、10min、室温、シェーカーで攪拌する事で固定反応を停止した。再度 PBS で洗浄後、Buffer A (1.0mM PMSF/PBS) 1mL と共に細胞をセルスクレーパー

(Sumitomo Bakelite) によって回収し、遠心 (3000rpm, 1min, 4°C) の上、上清を廃棄する事でペレットとして回収した。

ペレットに対して resuspend Buffer (5 mM Pipes pH 8.0, 85mM KCl, 0.5% NP-40) を添加して 10min 静置後に、遠心 (4000rpm, 5min, 4°C) する事で核を抽出した。核は lysis buffer [50mM Tris-HCl pH 8.1, 10mM EDTA, 1% sodiumdodecyl sulfate (SDS), 1mM PIC] で懸濁し、27G 張り付きシリンジで複数回懸濁する事でゲノム DNA を剪断すると共に抽出した。抽出したゲノム DNA 溶液に 3.0vol の dilution buffer (0.01% SDS, 1.1% TritonX-100, 1.2mM EDTA, 16.7mM Tris-HCl pH8.1, 167mM NaCl) と 1mM PMSF、40 $\mu$ L Preblocked 50% protein A/G sepharose (Calbiochem, La Jolla, CA) を添加し、4°C、45min ローテーターで攪拌した。3000rpm, 5min, 4°C遠心し、上清を回収後に 1 $\mu$ g/mL 相当の negative control IgG (mouse IgG or rabbit IgG)、1 $\mu$ g/mL 相当の targeted antibody [1mg/mL anti-HIF-1 $\alpha$  antibody (Novus Biologicals), anti-HIF-2 $\alpha$  antibody (Novus Biologicals)] を加え、4°C、over night ローテーターで攪拌した。60 $\mu$ L Preblocked 50% protein A/G sepharose を添加し、4°C、1h ローテーターで攪拌した。遠心 (3000rpm, 5min, 4°C) して、上清を廃棄し、Wash buffer A (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH8.1, 150mM NaCl)、Wash buffer B (0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH8.1, 500mM NaCl)、Wash Buffer C (0.25M LiCl, 1% NP40, 1% sodium deoxycholate, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH8.1) 各 1mL で室温下、15min ローテーターで攪拌した [遠心 (3000rpm, 5min, 4°C)、上清の廃棄、wash の繰り返し]。TE buffer (pH.8.0) で転倒混和した [遠心 (3000rpm, 5min, 4°C)、上清の廃棄、wash の3回を繰り返し]。遠心 (3000rpm, 5min. 4°C) 後に、上清を廃棄した。ペレットを 250 $\mu$ L Elution Buffer (1% SDS、0.1M NaHCO<sub>3</sub>) (加温) に溶解し、ボルテックス

後、15min、室温下でローテーター攪拌した。遠心 (3000rpm, 5min, 4°C) し、上清を回収した (1<sup>st</sup>は 200 $\mu$ L 回収し、再度 250 $\mu$ L Elution Buffer を加え、2<sup>nd</sup>は 250 $\mu$ L 回収)。各サンプルに 20 $\mu$ L の 5M NaCl を加え、65°C、over night で静置した (クロスリンクの破壊)。各サンプルに 10 $\mu$ L 0.5M EDTA、20 $\mu$ L 1M Tris-HCl (pH 6.5)、2 $\mu$ L 10mg/mL Pro K を加え、45°C、1h 静置した。フェノクロ抽出後、30 $\mu$ L TE (pH 8.0) に溶解することで、ゲノム DNA 溶液を回収した。ゲノム DNA を鋳型として PCR を実施した (標的下流因子の HRE 部位を挟むように作製した primer: Table 4 を使用)。

Table 4. Primers used for PCR		
<i>Flik-1</i> HRE	5' primer	TTGCTCTCAGATGCGACTTG
	3' primer	CCGGCTACACACTAGCGAAT
<i>Flt-1</i> HRE	5' primer	GCCAAGATGACTGACTCGAA
	3' primer	TTACAGGGACAAGACTGGGC
<i>Vcam-1</i> HRE	5' primer	GCCCTTTCGGAGCTGAAGGTCAGG
	3' primer	CTCTGCTTCAAAGCCTTCTTTGTGCC

## 5. 統計学的解析

各データは独立した実験を 3 回以上行い、means  $\pm$  standard deviation (SD) を算出する事で表示した。有意差検定は各群に対して Ryan 法による分散分析 (ANOVA) を行った。有意差が認められたデータについて、図中に  $p < 0.05$  あるいは  $p < 0.01$  で表記した。

### Ⅲ. 結果

#### 1. *kd/null* 作製

先行研究の結果より、50%HIF-2 $\alpha$  発現減弱モデル (*kd/kd*) では *WT* と比較してマウス成体において有意な赤血球減少症が確認された。一方、*Hif-2 $\alpha$*  完全欠損モデルでは *WT* と比較して若年マウス (28 日齢) において有意な汎血球減少症が確認された。よって、我々は新規に 75%HIF-2 $\alpha$  発現減弱モデル (*kd/null*) を作成し、造血に対する HIFs の関与を更に詳細に解析した。

##### 1) 遺伝子型検定

*null* allele における *Hif-2 $\alpha$*  exon 2 は Cre-loxP 部位特異的組み替えにより除去されたことがゲノム PCR、Southern blot の結果より明らかとなった (図 1. A-C)。また、*null/+* は N8 以降の世代において *null/+* の *Hif-2 $\alpha$*  allele を維持しており、*kd/kd* との交配によって *kd/null* のマウスが樹立された。また、*kd/null* は *kd/kd* との交配によって維持され (図 1. D)、*kd/null* の出生はメンデル則に従う事が確認された。

##### 2) 非造血臓器における HIFs 発現解析

*kd/null* は 75%HIF-2 $\alpha$  発現減弱モデルとして作成された。よって、各遺伝子型の 13.5 日胚頭部組織由来核抽出タンパクを用いて Western blot を行う事で、*kd/null* における HIF-2 $\alpha$  の発現低下と HIF-1 $\alpha$  及び HIFs 下流因子への影響を確認した。脳は多くの神経細胞を含むため、HIF-1 $\alpha$  および HIF-2 $\alpha$ 、HIFs 下流因子を恒常的に高く発現する事が知られている。結果、頭部において HIF-1 $\alpha$  は各遺伝子型間において有意な差は見られなかった (図 2)。一方、HIF-2 $\alpha$  は *kd/null*

の頭部において *WT* と比較して有意に低下する事が明らかとなった。また、HIF-2 下流因子である VCAM-1 も HIF-2 発現量に従い、*kd/null* において *WT* と比較して有意に低下する事が明らかとなった (図 2)。よって、*kd/null* は恒常的かつ全身性な HIF-2 $\alpha$  発現減弱モデルであると考えられる。

## 2. マウス成体個体 (84 日齢) を用いた *in vivo* 解析

先行研究の結果より、HIF-2 $\alpha$  の発現量は血球系の分化へと影響を与える事が報告されている。よって、*kd/null* における HIF-2 $\alpha$  発現減弱に従って *WT*、*kd/kd* と比較して *kd/null* において赤血球数の一層の減少、白血球数・血小板数の減少が予想された。そこで、各遺伝子型間における末梢血中の血球分画、及びマウス成体における造血の場として働く骨髄・脾臓中の浮遊細胞分画における血球系前駆細胞分画の解析を行う事で、HIF-2 $\alpha$  の発現減弱が血球系に与える影響を解析した。

### 1) 血球分画の解析

#### 1-1) 末梢血の解析

各遺伝子型における末梢血中の血球分画を血球計数器により解析した結果、単位量当たりの赤血球数 (RBC) は *WT* と比較して *kd/null* において有意に低下している事が明らかとなった (図 3)。しかし、RBC は *kd/kd* と比較して *kd/null* において有意に増加している事が明らかとなった (図 3)。

一方、単位量当たりの白血球数 (WBC) は *WT*、*kd/kd* と比較して *kd/null* において有意に低下している事が明らかとなった (図 3)。また、単位量当たりの血小板数 (PLT) は各遺伝子型間において有意差は見られなかった (図 3)。

## 1-2) 骨髄・脾臓浮遊細胞分画を用いた赤血球前駆細胞分画の解析

赤血球系の細胞系譜は造血幹細胞から始まり、CFU-GEMM、BFU-E、CFU-E、赤芽球を経て赤血球 (RBC) に至る。そして、*kd/kd* を用いた先行研究では、*kd/kd* における赤血球減少症の要因は骨髄・脾臓における赤芽球前駆細胞の分化障害であった。

一方、白血球系の細胞系譜は造血幹細胞から始まり、CFU-GEMM、CFU-GM を介してマクロファージなどの白血球 (WBC) に至る。そして、*kd/kd* を用いた先行研究では、白血球における分化障害が見られなかったが、*Hif-2α* 完全欠損マウスでは汎血球減少が確認されている。

そして、本研究では *kd/null* において *kd/kd* と比較して末梢血における RBC の増加、WBC の減少が確認されている (図 3)。

よって、*kd/null* における分化障害の有無を解析するために骨髄・脾臓中の浮遊細胞を FACS、コロニーアッセイにより解析した。

### 1-2-1) フローサイトメトリー (FACS)

FACS に使用した骨髄の単位本数当たりの浮遊細胞数、脾臓の重量は各遺伝子型間において有意な差は確認できなかった [骨髄中浮遊細胞数 ( $\times 10^6$  cells/bone): *WT* ( $23.5 \pm 6.7$ ,  $n=6$ )、*kd/kd* ( $20.4 \pm 4.9$ ,  $n=4$ )、*kd/null* ( $23.2 \pm 6.6$ ,  $n=5$ )] [脾臓重量 (mg): *WT* ( $96.5 \pm 17.9$ ,  $n=6$ )、*kd/kd* ( $99.7 \pm 23.5$ ,  $n=4$ )、*kd/null* ( $89.2 \pm 20.5$ ,  $n=4$ )]。

FACS 解析の結果、*kd/null* は *WT*、*kd/kd* と比較して骨髄における未成熟赤芽球 ( $CD71^+/Ter119^+$ ) が有意に増加していた一方 (図 4)、脾臓における成熟赤芽球細胞 ( $CD71^-/Ter119^+$ ) が有意に減少していた (図 4)。 [ $CD71^+/Ter119^+$  (%); *WT* ( $27.6 \pm 1.05$ ), *kd/kd* ( $37.9 \pm 0.96$ ), *kd/null* ( $40.3 \pm 0.84$ )、 $CD71^-/Ter119^+$  (%); *WT*



(29.1±2.60), *kd/kd* (23.9±1.18), *kd/null* (21.8±0.60)]

### 1-2-2) コロニーアッセイ

*kd/null* の骨髄中における赤芽球前駆細胞分画 (BFU-E、CFU-E) は *WT*、*kd/kd* と比較して有意に増加していた (図 5)。 [BFU-E (colonies/dish): *WT* (7.7±1.7), *kd/kd* (10.1±1.5), *kd/null* (17.2±2.0)、CFU-E (colonies/dish): *WT* (17.1±7.1), *kd/kd* (27.5±7.4), *kd/null* (38.9±6.6)]

また、*kd/null* の骨髄中の白血球前駆細胞 (CFU-GM) をコロニーアッセイにより解析した結果、*WT* と比較して CFU-GM は有意に増加していた (図 5)。 [CFU-GM (colonies/dish); *WT* (138.9±20.8), *kd/kd* (173.3±54.1), *kd/null* (195.4±47.5)]

## 2) HIFs と HIFs 下流因子

*kd/null* における赤血球数は HIF-2 $\alpha$  発現減弱に反して *kd/kd* と比較して有意に増加している事が明らかとなった (図. 3)。また、*kd/null* の骨髄における未成熟赤芽球以前の未分化細胞は増加していた事から、骨髄における赤血球系細胞の分化障害が生じている事が示唆された (図. 4, 5)。一方、*kd/null* の脾臓における成熟赤芽球以降の赤血球系細胞は減少していた (図. 4)。よって、脾臓においては分化障害が生じておらず、HIF-2 $\alpha$  発現減弱に反して赤血球系細胞は正常に分化した事が示唆された。

赤血球系細胞の幹細胞や前駆細胞は骨髄や脾臓の造血微小環境において EPO/EPOR シグナルや VLA-4/VCAM-1 シグナルを介して維持されるとともに、分化を支持される事が報告されている (Yamashita et al., 2008)。腎臓・肝臓において産生される EPO は血流を介して輸送されるホルモンである。そして、は赤

血球系幹細胞/前駆細胞に発現する EPOR への作用により、細胞増殖や生存、維持に関与する事が知られている (Keighley et al., 1964)。特に、赤血球系幹細胞/前駆細胞の中でも CFU-E/前赤芽球細胞における EPOR は強く発現する事が知られている (Lin et al., 1996, Suzuki et al., 2002)。また、骨髄・脾臓において発現する細胞接着因子の VCAM-1 は赤芽球における VLA-4 との接着を介して赤血球分化を支持している (Yanai et al., 1994)。これらの造血支持因子の中でも、EPO と VCAM-1 は HIF-2 特異的下流因子である一方、EPOR や VLA-4 は HIF の影響を受けない事が知られている (Sukuli et al., 2012)。

よって、脾臓におけるこれらのシグナルが HIF-2 $\alpha$  発現減弱に対する代償機構として強く作用した結果、*kd/null* 脾臓における分化障害の改善や赤血球数の増加に寄与した可能性が示唆された。そこで、各遺伝子型由来骨髄や脾臓、腎臓や肝臓における HIFs の発現と HIFs に制御される造血支持因子の発現を解析した。

### 2-1) 腎臓・肝臓における発現解析

腎臓・肝臓における Hif-1 $\alpha$ 、Hif-2 $\alpha$  の発現を qRT-PCR によって解析した結果、Hif-1 $\alpha$  の発現はいずれの遺伝子型においても有意差は見られなかった (図 6)。一方、Hif-2 $\alpha$  の発現は非造血臓器と同様に (図 2)、それぞれの遺伝子型に応じて *WT* と比較して *kd/kd*、*kd/null* の腎臓・肝臓において有意に減少している事が確認された (図 6)。しかし、*kd/kd* と *kd/null* の間に有意差は見られなかった。また、HIF-2 下流因子である EPO の発現は Hif-2 $\alpha$  の発現に従って、*WT* と比較して *kd/kd*、*kd/null* の腎臓・肝臓において有意に減少している事が確認された (図 6)。

## 2-2) 末梢血における発現解析

EPO は腎臓・肝臓で産生された後に血流に放出され、血球系幹細胞・前駆細胞に作用する。よって、末梢血中における EPO タンパク量を ELISA により計測した。結果、末梢血中における EPO タンパク量は *WT* と比較して *kd/kd*、*kd/null* の腎臓・肝臓において有意に減少している事が確認された (図 7)。しかし、*kd/kd* と *kd/null* の間に有意差は見られなかった。

## 2-3) 脾臓における発現解析

脾臓における HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$  の発現を Western blot によって解析した結果、HIF-1 $\alpha$  に関していずれの遺伝子型においても有意差は見られなかった (図 8)。しかし、HIF-2 $\alpha$  の発現は *WT* と比較して *kd/kd*、*kd/null* の腎臓・肝臓において有意に減少していた一方、*kd/null* の脾臓において *kd/kd* と比較して有意差に増加している事が明らかとなった (図 8)。また、*kd/null* における HIFs 共通下流因子 (Vegf, Tgf- $\beta$ ) や HIF-1 下流因子 (Ang-1)、HIF-2 下流因子 (VACM-1, FLK-1, FLT-1, Ang-2) は *kd/kd* と比較して有意に増加している事が qRT-PCR・Western blot より明らかとなった (図 8, 9)。

## 3) 脾臓の組織学的解析

脾臓における HIF-2 $\alpha$  の発現量は *WT* と比較して *kd/kd*、*kd/null* の腎臓・肝臓において有意に減少していた一方、*kd/null* は *kd/kd* と比較して有意差に増加している事が本研究より明らかとなった (図 8)。脾臓は造血微小環境としての役割を担っているが、その構造は二つに分かれている事が報告されている。一つは、主に EC で構成される毛細血管網から成り、赤血球造血微小環境として機能する赤脾髄である。もう一つは、毛細繊維組織から成り、白血球造血微小環境

として機能する白脾髄である。赤脾髄を構成する EC は HIF-1 $\alpha$  及び HIF-2 $\alpha$  を強く発現するが、白脾髄を構成する線維芽細胞やリンパ球は HIF-2 $\alpha$  を発現しないことが知られている。そして、*kd/null* の脾臓において発現の亢進していた HIFs 下流因子は血管新生因子としての作用を持つ。よって、赤脾髄は *kd/null* において発現の亢進していた血管新生因子として作用する HIFs 下流因子の影響を受けることが予想された。また、血管新生因子の影響を受けて *kd/null* 脾臓における赤脾髄の割合が増加した事で、*kd/null* の脾臓における総量的な HIF-2 発現量が *WT* や *kd/kd* に対して発現亢進した結果となった事が予想された。そこで、脾臓の赤脾髄を構築する EC を種々の染色法によって染色・定量する事で脾臓の組織学的解析を行った。

### 3-1) 抗 CD31 抗体染色

CD31 は EC に強く発現している事が知られている (Albelda et al., 1991)。よって、脾臓切片を抗 CD31 抗体で染色した結果、*kd/null* における赤脾髄領域 (図中: 陽性領域) は *WT* と比較して減少している一方で、*kd/kd* と比較して増加している傾向が見られた (図 10)。

### 3-2) ヘマトキシリン&エオジン (HE) 染色

本実験で用いた青紫色の色素であるヘマトキシリンは塩基性の部位 (白脾髄: 図中 W 領域) を染色し、赤色の色素であるエオジンは酸性の部位 (赤脾髄: 図中 R 領域) を染色する。よって、HE で染色された脾臓切片を撮影・定量する事で、単位面積当たりの赤脾髄の占める割合を計測した。計測・定量した結果、*kd/null* における赤脾髄領域は *WT* と比較して有意差は見られなかった一方で、*kd/kd* と比較して増加している事が明らかとなった (図 11)。

### 3-3) 抗 Selectin 抗体染色

本実験で血中に注入された Lectin は血管内にのみ浸潤し、EC に強く発現している Selectin と結合する事が知られている。よって、Lectin を注入された個体から得られた脾臓切片を撮影・定量する事で、赤脾髄領域特異的な染色を行った。定量した結果、*kd/null* における赤脾髄領域 (図中: 陽性領域) は *WT* と比較して有意に減少していた一方で、*kd/kd* と比較して増加している事が明らかとなった (図 12)。

### 3. 脾臓の発達過程 (14-84 日齢) における *in vivo* 解析

成体マウスを用いた解析により、*kd/null* の腎臓・肝臓における EPO 発現量や血漿中 EPO 濃度は *kd/kd* と同程度、あるいは有意に減少していた事から、*kd/null* における赤血球数増加の要因ではないと考えられた。一方、*kd/null* は HIF-2 $\alpha$  発現減弱モデルであるにも関わらずマウス成体脾臓では HIF-2 $\alpha$  や HIF-2 $\alpha$  下流因子が発現増加した。そして、これらの因子の発現増加は脾臓における血管内皮細胞の割合の増加に起因する事が示唆された。よって、*kd/null* において HIF-2 $\alpha$  及び HIFs 下流因子の発現亢進や血管内皮細胞領域の増加が確認された事から、*kd/null* における赤血球数増加の要因は脾臓にあると考えられた。そこで、各日齢脾臓 (14, 28, 42, 84 日齢) における末梢血中の血球細胞の推移や発現解析、組織学的解析を行う事で、脾臓の発達と赤血球造血能の発達に対する HIFs の影響を解析した。

#### 1) 末梢血を用いた血球分画の解析

各日齢の脾臓 (14, 28, 42, 84 日齢) における末梢血中の赤血球細胞の推移を

血球計数器によって計測した結果、いずれの遺伝型においても 14 日齢から 42 日齢にかけて大きく変動しており、*kd/null* は 42 日齢において成体 (84 日齢) と近い数値となった (図 13)。よって、14 日齢において脾臓による赤血球支持能の変化は生じており、42 日齢までに脾臓による赤血球支持能は完成された事が示唆された。

## 2) 脾臓の組織学的解析 (抗 Selectin 抗体染色)

*kd/null* における RBC は 42 日齢において成体 (84 日齢) と近い数値を示したため (図 13)、赤血球造血微小環境としての機能を持つ脾臓の発達期 (14, 28, 42, 84 日齢) における赤脾髄 (図中: 陽性領域) を免疫染色により解析した。結果、*kd/null* における赤脾髄領域は 14 日齢において有意に少ないが、脾臓の発達に伴い 42 日齢まで有意に増加している事が明らかとなった (図 14)。

## 3) 脾臓の発現解析

*kd/null* における赤脾髄領域は 14 日齢において有意に少ないが、脾臓の発達に伴い 42 日齢までは有意な増加、あるいは発達を遂げる事が明らかとなった。そこで、脾臓の発達期 (14, 28, 42, 84 日齢) における HIF および HIF 下流因子の発現を qRT-PCR・Western blot により解析した。結果、*WT*、*kd/kd* における HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$  はいずれの日齢においてもほぼ安定していた一方、*kd/null* は 14 日齢において有意に高い HIF-1 $\alpha$  の発現を示した (図 15)。また、*kd/null* における HIF-2 $\alpha$  の発現量は 14 日齢から 42 日齢にかけて脾臓の赤脾髄領域の拡大とともに有意に増加した (図 14, 15)。

HIFs 下流因子を qRT-PCR・Western blot により解析した結果、*kd/null* における HIF-2 下流因子 (VCAM-1) は HIF-2 $\alpha$  の発現減少に従って 14 日齢の *kd/null*

において *WT*、*kd/kd* と比較して有意に減少していると共に、14 日齢から 42 日齢にかけて脾臓の赤脾髄領域の拡大とともに有意に増加した事が明らかとなった (図 14, 15)。一方、14 日齢の *kd/null* の脾臓における HIF 共通下流因子 (*Vegf*, *Tgf-β*) や HIF-1 下流因子 (*Ang-1*)、一部の HIF-2 下流因子 (*FLK-1*, *FLT-1*, *Ang-2*) は *kd/kd* と比較して有意に増加している事が qRT-PCR・Western blot より明らかとなった (図 15, 16)。

#### 4. *in vitro* 解析

##### 1) SV40T を導入した EC の単離と純化

脾臓における血管内皮細胞の割合の増加が赤血球数増加の要因である可能性が脾臓の発達過程 (14-84 日齢) を用いた *in vivo* 解析より明らかとなった。よって、脾臓における血管内皮細胞を増加させたメカニズムを探索するため、脾臓由来脾臓血管内皮細胞 (*spEC*) を用いた *in vitro* 解析を行った。

温度感受性不死化因子 (SV40T) を導入されたマウス由来 *spEC* の内、*WT spEC* と *kd/kd spEC* は先行研究によって樹立された細胞株を使用した。また、*kd/null spEC* は本研究において FACS sorter (Moflo XDP) により *acetyl-LDL<sup>+</sup>/CD45<sup>-</sup>*である EC 分画 (図中: 赤色分画) を回収し (図 17)、限界希釈法による株化を行った結果、*WT spEC*、*kd/kd spEC* と同様の細胞形態の細胞株 (*kd/null spEC* #3, #8, #14) を得た (図 18)。*kd/null spEC* は EC マーカーの陽性発現、他細胞マーカーの陰性発現、管腔形成能を確認した (data not shown)。

##### 2) EC を用いた発現解析

先行研究で用いた *WT spEC* #25, *kd/kd spEC* #3 に加え、本研究で樹立した 3 つの *kd/nul spEC* (#3, #8, #14) を用いて各種発現解析を行った。

HIFs 下流因子を qRT-PCR・Western blot により解析した結果、HIF-2 $\alpha$  及び HIF-2 下流因子 (VCAM-1) は低酸素下 (表中: H) の *kd/null* において WT、*kd/kd* と比較して有意に減少している事が明らかとなった (図 19)。一方、*kd/null* における HIF-1 $\alpha$  及び HIF 共通下流因子 (Vegf, Tgf- $\beta$ ) や HIF-1 下流因子 (Fgf2, Ang-1)、一部の HIF-2 下流因子 (FLK-1, FLT-1, Ang-2) は *kd/kd* と比較して有意に増加している事が qRT-PCR・Western blot より明らかとなった (図 19, 20)。

また、*kd/null* の低酸素下における Vegf、VEGFR (FLT-1, FLK-1) の発現増加に従い、VEGF/VEGFR の下流シグナル経路の活性化 [ERK1/2 のリン酸化 (p-ERK1/2)の割合の亢進] が確認された (図 21)。

### 3) Cell proliferation assay による増殖能の検定

*kd/null* の低酸素下における VEGF/VEGFR の下流シグナル経路の活性化 [ERK1/2 におけるリン酸化 (p-ERK1/2)の割合の亢進] が確認された事から、*kd/null*spEC は低酸素下で特異的に高い細胞増殖能を示す事が予想された。

そして、低酸素下 (5% O<sub>2</sub>) における増殖能の検定において WT spEC は有意に最も高い増殖能を示した一方、HIF-2 $\alpha$  の発現 (図 19) に反して *kd/null* spEC は *kd/kd* spEC と比較して有意に高い増殖能を示した (図 22)。

### 4) ChIP assay による発現制御機構の検定

*kd/null* spEC は低酸素下で特異的に高い細胞増殖能を示した。そして、*kd/null* spEC は HIF-2 $\alpha$  が発現減弱した一方で HIF-1 $\alpha$  が発現亢進し、HIF-2 特異的な下流因子として報告された FLK-1 と FLT-1 が HIF-1 に制御された事が予想された。よって、ChIP assay により HIF-2 特異的な下流因子 (*Vcam-1*, *Flk-1*, *Flt-1*) の HIF-1 による代償的な発現制御の可能性を検討した。



結果、HIF-2 $\alpha$  の発現に従って有意に発現量が減少していた *Vcam-1* の HRE に対する anti-HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$  抗体を用いた ChIP assay の結果、HIF-1 $\alpha$  は各遺伝子型の *Vcam-1* HRE に対してほぼ結合していない一方、HIF-2 $\alpha$  は低酸素下 (1% O<sub>2</sub>) の WT spEC において最も高い結合を示した (図 23)。

一方、HIF-2 $\alpha$  の発現に反して有意に発現量が増加していた *Flk-1*、*Flt-1* の HRE に対する anti-HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$  抗体を用いた ChIP assay の結果、*Vcam-1* HRE に見られた結果と同様に HIF-2 $\alpha$  は低酸素下 (1% O<sub>2</sub>) の WT spEC において最も高い結合を示した (図 23)。しかし、HIF-1 $\alpha$  は WT spEC、*kd/kd* spEC の *Flk-1* HRE、*Flt-1* HRE に対してほぼ結合していない一方、*kd/null* spEC の *Flk-1* HRE、*Flt-1* HRE に対して低酸素下 (1% O<sub>2</sub>) において有意に高い割合で結合していた (図 23, 24)。

## 5. HIF-2 $\alpha$ 発現減弱モデルを用いた *in vitro* 解析

*kd/kd* では一部の HIF-2 特異的下流因子 (*Flk-1*, *Flt-1*) の HIF-1 による HIF-2 に対する発現量的・機能的な代償的な発現制御が生じずに *kd/null* において生じたことから、HIF-2 $\alpha$  発現量依存的に代償機構が生じた可能性が示唆された。よって、*kd/kd* spEC における HIF-2 $\alpha$  発現量を *kd/null* spEC と同程度まで減弱させる事で、*kd/kd* spEC において代償機構が再現される事を検定した。

### 1) *kd/kd* 由来 EC に対する Lenti-virus による si HIF-2 $\alpha$ の導入

*kd/kd* spEC における HIF-2 $\alpha$  発現減弱は、*kd/kd* spEC に Lenti-virus を用いて si control、HIF-2 $\alpha$ -si RNA を導入する事で行った。結果、*kd/kd-control*、*kd/kd-si HIF-2 $\alpha$*  細胞株を樹立した。

## 2) *kd/kd-si HIF-2 $\alpha$* 由来 EC を用いた発現解析

*kd/kd* spEC #3 に加え、本研究で樹立した *kd/kd-control*、*kd/kd-si HIF-2 $\alpha$*  の各細胞株を用いて各種発現解析を行った。

HIFs 下流因子を qRT-PCR・Western blot により解析した結果、HIF-2 $\alpha$  及び HIF-2 下流因子 (VCAM-1, Tie-2) は低酸素下 (表中: H) の *kd/kd-si HIF-2 $\alpha$*  において *kd/kd* spEC、*kd/kd-control* と比較して有意に減少している事が明らかとなった (図 25)。一方、*kd/kd-si HIF-2 $\alpha$*  における HIF-1 $\alpha$  及び HIFs 共通下流因子 (Vegf, Tgf- $\beta$ ) や HIF-1 下流因子 (Fgf2, Ang-1)、一部の HIF-2 下流因子 (FLK-1, FLT-1, Ang-2) は *kd/kd* と比較して有意に増加している事が qRT-PCR・Western blot より明らかとなった (図 25, 26)。

また、*kd/kd-si HIF-2 $\alpha$*  の低酸素下における Vegf、VEGFR (FLT-1, FLK-1) の発現増加に従い、VEGF/VEGFR の下流シグナル経路の活性化を示す ERK1/2 のリン酸化の割合の亢進が確認された (図 27)。

よって、spEC における HIF-1 による HIF-2 に対する発現量的な代償機構は HIF-2 $\alpha$  発現量依存的に生じた可能性が支持された。

## 3) Cell proliferation assay による細胞増殖能の検定

HIF-2 $\alpha$  の発現量に反して (図 25)、低酸素下 (5% O<sub>2</sub>) における *kd/kd-si HIF-2 $\alpha$*  は *kd/kd* spEC、*kd/kd-control* と比較して有意に高い増殖能を示した (図 28)。

## 4) ChIP assay による発現制御機構の検定

HIF-2 $\alpha$  の発現に従って有意に発現量が減少していた *Vcam-1* の HRE に対する anti-HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$  抗体を用いた ChIP assay の結果、HIF-1 $\alpha$  は各遺伝子型

の *Vcam-1* HRE に対してほぼ結合しておらず、低酸素下 (1% O<sub>2</sub>) の HIF-2 $\alpha$  は *kd/kd-si HIF-2 $\alpha$*  において最も低い結合を示した (図 29)。

一方、HIF-2 $\alpha$  の発現に反して有意に発現量が増加していた *Flk-1*、*Flt-1* の HRE に対する anti-HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$  抗体を用いた CHIP assay の結果、*Vcam-1* HRE に見られた結果と同様に HIF-2 $\alpha$  は低酸素下 (1% O<sub>2</sub>) の *kd/kd* spEC、*kd/kd-control* において最も高い結合を示した (図 30)。しかし、HIF-1 $\alpha$  は *kd/kd* spEC、*kd/kd-control* の *Flk-1* HRE、*Flt-1* HRE に対してほぼ結合していない一方、*kd/kd-si HIF-2 $\alpha$*  の *Flk-1* HRE、*Flt-1* HRE に対して低酸素下 (1% O<sub>2</sub>) において有意に高い割合で結合していた (図 30)。よって、spEC における HIF-1 による HIF-2 に対する機能的な代償機構は HIF-2 $\alpha$  発現量依存的に生じた可能性が支持された。

## IV. 考察

### 1. *kd/null* における *Hif-2 $\alpha$* 遺伝子欠損と HIFs の発現

*kd/null* は *Hif-2 $\alpha$*  allele に挿入された変異によって HIF-2 $\alpha$  の発現量が成体の非造血支持組織・臓器において *WT* と比較して 60%程度、*kd/kd* の 80%程度であり (図 2)、低酸素下 (1% O<sub>2</sub>, 6h) の *kd/null* 由来 EC 細胞株において *WT* と比較して 10%程度、*kd/kd* と比較して 25%程度であった (図 19)。一方、HIF-2 $\alpha$  と同じ HIF ファミリーに属する HIF-1 $\alpha$  の発現量は成体のいずれの組織・臓器においても *WT*、*kd/kd*、*kd/null* 間で有意差は見られず (図 2)、低酸素下 (1% O<sub>2</sub>, 6h) の *kd/null* 由来 EC 細胞株において *WT*、*kd/kd* と比較して 1.5 倍程度であった (図 19)。

以上の発現解析より、HIF-2 $\alpha$  の発現減少に伴って血管新生や血管収縮、造血能に障害が *kd/null* マウスに生じる可能性が示唆された。しかし、一方で HIF-1 および HIF-2 は HIF ファミリーに属しており、HIF-1 あるいは HIF-2 の発現減弱、欠損に際して相補的に発現量の増加が生じる事が報告されている (Yuan et al., 2013)。よって、*kd/null* 由来 EC 細胞株において生じた HIF-2 $\alpha$  の発現量の減弱が HIF-1 $\alpha$  の発現量増加に繋がった可能性が示唆された。また、HIF-1 の発現量増加は細胞内代謝や細胞増殖能、血管新生能といった種々の機能を向上させる事が報告されている事から、*kd/null* においてこれらの機能が向上する可能性も示唆された (図 3)。

### 2. HIF-2 $\alpha$ の発現減少に対して *kd/kd*、*kd/null* 血球分画の示した赤血球減少症と *kd/null* における改善

*kd/kd*、*kd/null* では HIF-2 $\alpha$  の発現減弱に伴い、赤血球減少症が生じていた (図

3)。赤血球造血を強く支持する腎臓・肝臓由来 EPO と骨髄・脾臓における VCAM-1 はいずれも HIF-2 によって正に制御されている事が報告されている。しかし、*kd/kd* よりもさらに HIF-2 $\alpha$  が発現減弱していた *kd/null* における赤血球減少症は有意に改善されていた (図 3)。よって、HIF-2 の減弱に対する代償機構の存在が示唆され、*kd/null* における HIF-1 $\alpha$  の発現量増加は *kd/kd* において生じていない事から HIF-1 がその代償機構の主たる制御を司ると考えられる。よって、*kd/null* の赤血球造血に対する HIF-1 による代償機構は未知の経路や因子の影響、あるいは既知の経路や因子の新たな機能の可能性が示唆された。

また、*kd/null* 由来骨髄における BFU-E、CFU-E、未成熟赤芽球分画は *WT*、*kd/kd* と比較して有意に増加した一方、*kd/null* 由来脾臓における成熟赤芽球分画は *WT*、*kd/kd* と比較して有意に減少した (図 4, 5)。よって、*kd/null* の赤血球造血に対する HIF-1 による代償機構は脾臓において生じた可能性が示唆された。

### 3. HIF-2 $\alpha$ と赤血球支持因子

#### 1) 腎臓・肝臓における EPO 発現と末梢血中の EPO 濃度

*kd/null* の腎臓・肝臓における Epo mRNA の発現量は HIF-2 $\alpha$  の発現量に従って *WT*、*kd/kd* と比較して有意に減少している事が明らかとなった (図 6)。また、腎臓・肝臓で産生された EPO は血流を介して骨髄・脾臓中の赤血球系細胞分画の生存・維持に作用するため、ELISA により末梢血中の EPO 存在量を定量したが、*WT*、*kd/kd* と比較して *kd/null* において有意に減少している事が明らかとなった (図 7)。よって、*kd/null* における赤血球減少症の改善要因ではないと考えられた。

#### 2) 脾臓における HIFs 発現と HIFs 下流因子

*kd/null* の脾臓における HIF-2 $\alpha$  や HIF-2 下流因子である赤血球造血支持因子 (VCAM-1) や細胞増殖因子受容体 (VEGFR: FLK-1・FLT-1) の発現量は細胞における HIF-2 $\alpha$  の発現減弱に反して *kd/kd* と比較して有意に増加している事が明らかとなった (図 8, 19)。一方、脾臓における HIF-1 $\alpha$  発現量は *WT*、*kd/kd*、*kd/null* において有意な差は見られなかった (図 8)。また、HIFs 下流細胞増殖因子 (Vegf、Tgf- $\beta$ 、Ang-1、Ang-2) の発現も同様に増加していた (図 9)。これらの結果から、*kd/null* の脾臓における VCAM-1 の発現量の増加が *kd/null* における赤血球減少症の改善に寄与した事が示唆された。しかし、*kd/null* 脾臓中の主たる HIF-2 $\alpha$  発現細胞である EC における HIF-2 $\alpha$  は有意に減少していた事から、脾臓の組織的に生じた何らかの変化が脾臓における HIF-2 $\alpha$  の総量を増加させたためにこれらの現象が生じたと考えられた。

#### 4. 脾臓の構造的発達による赤血球造血能の亢進

*kd/null* 脾臓の組織的に生じた何らかの変化が脾臓における HIF-2 $\alpha$  や VCAM-1 の総量を増加させ、脾臓の赤血球造血能を亢進させた事が *WT*、*kd/kd*、*kd/null* の成体を用いた比較解析によって示唆された。よって、脾臓の組織学的解析を行った結果、*kd/null* の脾臓における血管内皮細胞の細胞数が *kd/kd* と比較して増加している事が抗 CD31 抗体染色の結果より示唆された (図 10)。また、HE 染色を行った結果、抗 CD31 抗体染色で陽性を示した血管内皮細胞は赤脾髄領域 (図中: R 領域) であり、単位面積当たりの赤脾髄の割合は *kd/null* において *kd/kd* と比較して有意に高い事が明らかとなった (図 11)。そして、*kd/null* において EC によって構築された赤脾髄は Lectin を用いた染色によって染色された事から、*kd/null* において赤脾髄を構築する EC は毛細血管として機能的であると考えられた (図 12)。また、Lectin による赤脾髄領域 (陽性部位) の定量の結

果は HE の結果を支持していた事から、*kd/null* の脾臓において血管内皮細胞の細胞数が *kd/kd* と比較して有意に増加している事が明らかとなった。

以上の結果から、*kd/null* 脾臓の特異的な EC の細胞数 (赤脾髄領域) の増加が生じ、EC の細胞数が増加したために脾臓における HIF-2 $\alpha$  の総量が増加した事が支持された。そして、脾臓における HIF-2 $\alpha$  に従い HIFs 下流因子 (VCAM-1) の発現が亢進した事で、*kd/null* における赤血球数は *kd/kd* と比較して有意に増加したと考えられる。

## 5. 脾臓の発達に伴う脾臓赤脾髄領域の亢進と HIFs

マウス成体を用いた解析の結果、上記のステップを介して *kd/null* における赤血球減少症は改善したと考えられるが、*kd/null* 脾臓の特異的な EC の細胞数 (赤脾髄領域) の増加が生じた原因は成体となる以前に生じた可能性が考えられた。脾臓は出生後に主たる造血として機能するとともに、発達する。よって、各日齢のマウス (14, 28, 42, 84 日齢) を用いた種々の比較を行い、*kd/null* 脾臓の特異的な EC の細胞数 (赤脾髄領域) の増加が生じた原因・時期を特定した。

### 1) 血球分画の解析

赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン値 (HGB)、ヘマトクリット値 (HCT) は *kd/null* の 14-28 日齢までに急増していたが、42 日齢以降に安定した (図 13)。よって、14-28 日齢までにかけて赤血球造血微小環境を構築する脾臓の EC 数の増加 (赤脾髄の割合の増加) が生じたと考えられた (図 14)。

### 2) 脾臓赤血球造血微小環境 (赤脾髄) の解析

*kd/null* における赤血球数は 14-28 日齢までに急増していたが、赤脾髄領域 (毛

細血管) の占める割合は 14 日齢において *kd/kd* と比較して有意に低い一方で、28-42 日齢において *kd/kd* と有意差がないほど急増していた (図 14)。また、*kd/null* における赤血球数は 84 日齢において *kd/kd* よりも有意に増加しており、*kd/null* における赤脾髄の占める割合も 84 日齢において *kd/kd* よりも有意に高くなっていった (図 14)。よって、成体を用いた解析より示唆された「*kd/null* における赤血球減少症の改善が *kd/null* における赤脾髄領域の拡大に起因する」という仮説は発達過程の脾臓を用いた解析によって強く支持された。

### 3) 脾臓に関する血管新生因子、赤血球造血支持因子に関する発現解析

*kd/null* における赤脾髄領域 (毛細血管) の占める割合は 14-42 日齢までに急増していた。HIFs や HIFs 下流因子に関する発現解析を行った結果、*kd/null* の脾臓における HIF-2 $\alpha$  は 14 日齢において *WT* と比較して有意に低かった一方で 28-42 日齢において *WT* と有意差がないほど急増していた。よって、*kd/null* における赤脾髄領域の割合が拡大するにつれて *kd/null* 脾臓の総量的な HIF-2 $\alpha$ 、VCAM-1 発現量は増加したと考えられた (図 15)。また、*kd/null* における赤脾髄領域の拡大は 14 日齢における有意な HIF-2 $\alpha$  発現量の増加に起因すると考えられた (図 15)。FLK-1、FLT-1 は HIF-2 $\alpha$  下流因子であるにもかかわらず 14 日齢において *WT*、*kd/kd* と比較して有意に増加していたことから、HIF-1 によって制御された可能性が支持された (図 15)。同様に、*kd/null* の 14 日齢において有意に発現が亢進していた HIF-1 $\alpha$  に従い、血管新生因子である HIFs 下流因子 (Vegf、Tgf- $\beta$ ) が亢進した (図 16)。

14 日齢において有意に発現が亢進していた血管新生因子 (Vegf、Tgf- $\beta$ 、FLK-1、FLT-1) が *kd/null* における赤脾髄領域 (毛細血管) の割合を 14-42 日齢までに急増させた要因である可能性が示唆された。



## 6. 低酸素に伴う EC の増殖能の向上と HIF 下流因子

*kd/null* 成体の脾臓における赤血球数の改善・赤血球造血微小環境（赤脾髄領域）の拡大は *kd/null* の 14 日齢において HIF-1 $\alpha$  が発現亢進し、HIFs 下流血管新生因子が誘導された事で EC の細胞数が増加したためであると考えられた。よって、*WT*、*kd/kd*、*kd/null* の脾臓から樹立した EC 細胞株を用いた発現解析を行った結果、*kd/null* の EC 細胞株は低酸素下において *WT*、*kd/kd* と比較して有意に低い HIF-2 $\alpha$  の発現を示した一方で、有意に高い HIF-1 $\alpha$  の発現を示した（図 20）。そして、*kd/null* において発現が亢進していた HIF-1 $\alpha$  に従い、血管新生因子である HIFs 下流因子 (Vegf、Tgf- $\beta$ )、HIF-1 $\alpha$  下流因子 (Ang-1)、HIF-2 $\alpha$  下流因子 (FLK-1、FLT-1、Ang-2) が亢進した（図 19, 20）。また、VEGF/VEGFR (FLK-1, FLT-1) の発現亢進に伴って下流シグナルである ERK1/2 のリン酸化 (p-ERK1/2) の割合が *kd/null* の低酸素下において *WT*、*kd/kd* と比較して有意に高く（図 21）、ERK1/2 によって制御される細胞増殖能は *kd/null* の低酸素下において *WT*、*kd/kd* と比較して有意に高かった（図 22）。VEGF/VEGFR に依存して亢進する ERK1/2 のリン酸化は HIF-1 $\alpha$  の翻訳を誘導し、HIF-1 は VEGF を誘導する正のフィードバック機構が報告されている (Semenza et al., 2003, Das et al., 2005)。

よって、14 日齢の *kd/null* 脾臓における EC の HIF-2 $\alpha$  発現減弱/赤血球減少症は、HIF-1 $\alpha$  発現亢進をもたらす事で HIFs 下流血管新生因子 (VEGF, Ang-1, Ang-2 など) を介して血管新生を誘導した。そして、脾臓における総量的な赤血球造血微小環境（赤脾髄）の機能 (VCAM-1 の発現量) が増加した事で、*kd/null* 成体において赤血球減少症が改善したと考えられた。

## 7. HIF-2 発現強度に応じて生じる HIF-2 に対する HIF-1 の機能的代償機構

*kd/null* において減弱した HIF-2 $\alpha$  に対して、14 日齢の *kd/null* 脾臓において HIF-1 $\alpha$  は有意に増加しており、低酸素下の *kd/null* 脾臓 EC においても HIF-1 $\alpha$  は有意に増加していた (図 15, 19)。また、14 日齢の *kd/null* 脾臓、低酸素下の *kd/null* 脾臓 EC において有意に増加していた HIF-1 $\alpha$  が本来 HIF-2 下流因子である FLK-1 や FLT-1 を制御したような結果が得られた (図 15, 19)。そして、ChIP assay によって HIF-1 $\alpha$  による VCAM-1 や FLK-1、FLT-1 の制御の可能性を検討した結果、低酸素下の *kd/null* 脾臓 EC 特異的に HIF-1 $\alpha$  による FLK-1、FLT-1 の制御が生じた (図 23, 24)。よって、HIF-1 と HIF-2 の発現強度のバランスに応じて、HIF 下流因子の HRE に対する HIFs の結合能が規定される可能性が示唆された。また、HIF 下流因子の HRE に対する HIFs の結合能には HIF- $\alpha$  サブユニット、Arnt だけではなく、HAS や ETS、HSP90 などが co factor として正に関与する事が報告されている (Manfred et al., 2003)。また、HIF-3 $\alpha$  や KLF2 のように HIF の機能や発現に対して負に関与する因子も報告されている事から (Makino et al., 2001, Atkins et al., 2007)、これらの因子が HIF-2 $\alpha$  の発現減弱に伴って作用した可能性が考えられた。

## 8. *kd/kd-si HIF-2 $\alpha$* EC 細胞株を用いた HIFs 制御機構の再現性

*kd/kd* 脾臓由来 EC 細胞株に対して HIF-2 $\alpha$  si RNA を導入する事で、*kd/kd* における HIF-2 $\alpha$  発現強度を *kd/null* と同程度まで減弱させる事で、*kd/null* に見られた「HIF-2 発現強度に応じて生じる HIF-2 に対する HIF-1 の発現量的・機能的代償機構」の再現性の有無を検討した。結果、*kd/null* 細胞株に見られた現象は *kd/kd-si HIF-2 $\alpha$*  EC 細胞株においても再現されたことから、「HIF-2 発現強度に応じて生じる HIF-2 に対する HIF-1 の発現量的・機能的代償機構」は *kd/kd-si*

HIF-2 $\alpha$ EC 細胞株を用いた実験系においても支持された (図 25-30)。

## 9. 総括: *kd/null* における赤血球減少症の改善メカニズム

14 日齢の *kd/null* における HIF-2  $\alpha$  発現減弱を起因とする赤血球減少症は脾臓 EC における HIF-1 $\alpha$  発現亢進をもたらす (図 13, 15)、HIF-1 下流血管新生因子 (VEGF, Ang-1 など) や一部の HIF-2 下流血管新生因子 (FLK-1, FLT-1 など) が特異的に発現亢進した (図 15, 16)。また、発現の亢進した VEGF/VEGFR を介して ERK1/2 のリン酸化が進み (図 21)、HIF-1 $\alpha$  が正のフィードバックとして継続的に誘導されたと考えられる (図 31)。これらの経路により脾臓中の赤血球造血微小環境が誘導され (図 14)、脾臓における総量的な赤脾髄の機能 (VCAM-1 の発現量) が増加した事で、*kd/null* 成体において赤血球減少症が改善したと考えられた (図 32)。

## V. 結論

本研究で作製した新規 HIF-2 $\alpha$  遺伝子組み換えマウスである *Hif-2 $\alpha$  knockdown/knockout hetero mice (kd/null)* は EC において HIF-2 $\alpha$  の発現が 75%まで減弱されたモデルであり、ほぼ全ての組織・臓器においても HIF-2 $\alpha$  の発現は既存の *kd/kd* よりも有意に低かった。また、*kd/null* は *Hif-2 $\alpha$  knockout mice* と異なり成体まで成長したことから、*kd/null* は胎児から成体までにおいて HIF-2 $\alpha$  を介して制御される様々な低酸素応答性を解析するために有用である事が明らかとなった。特に、本研究では *WT*、*kd/kd*、*kd/null* を用いた比較解析により「腎臓非依存的な脾臓による赤血球減少症の改善」、「脾臓赤血球造血微小環境の発達期及び関連因子の解明」、「HIF-1 と HIF-2 の下流因子に対する特異性と代償性」が明らかとなった。

## VI. 謝辞

本研究を進めるにあたり、全般にわたり御指導いただきました大根田 修教授 (筑波大学大学院 人間総合科学研究科 再生幹細胞生物学) に心より御礼申し上げます。

また、日頃より多くの御指導、御助言をいただきました山下 年晴助教 (同 人間総合科学研究科 再生幹細胞生物学) に深く御礼申し上げます。

また、これまで温かく見守っていただきました再生幹細胞生物学研究室スタッフならびに大学院生、学生の方々に深甚なる感謝の意を表します。

## VII. 引用文献

Albelda SM, Muller WA, Buck CA, Newman PJ. 1991. Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol.* 114:1059-68.

Amelie VG, Chithra S, Alejandro AD, Gillian S, Catarina S, Deniz G, Milica V, Karen D, Patrick P, Tessa LH, Tariq E, Peter JR, Kamil RK. 2013. Hif-2 $\alpha$  is not essential for cell-autonomous hematopoietic stem cell maintenance. *Blood.* 122:1741-1745.

Atkins BG, Jain KM. 2007. Role of Kruppel-Like Transcription Factors in Endothelial Biology. *Circ Res.* 100:1686-1695.

Biswas S, Troy H, Leek R, Chung YL, Li JL, Raval RR, Turley H, Gatter K, Pezzella F, Griffiths JR, Stubbs M, Harris AL. 2010. Effects of HIF-1 $\alpha$  and HIF2 $\alpha$  on Growth and Metabolism of Clear-Cell Renal Cell Carcinoma 786-0 Xenografts. *J Oncol.* 2010:757908.

Bol S, Williams N. 1980. The maturation state of three types of granulocyte/macrophage progenitor cells from mouse bone marrow. *J Cell Physiol.* 102:233-43.

Camenisch G, Stroka DM, Gassmann M, Wenger RH. 2001. Attenuation of HIF-1 DNA-binding activity limits hypoxia-inducible endothelin-1 expression. *Eur J Physiol.* 443:240-249.

Charles CC, Kojima H, Lukashev D, Armstrong J, Farber M, Apasov SG, Sitkovsky MV. 2001. Differential effects of physiologically relevant hypoxic conditions on T lymphocyte development and effector functions. *J Immunol.* 167:6140-6149.

Dalmas DA, Tierney LA, Zhang C, Narayanan PK, Boyce RW, Schwartz LW, Frazier KS, Scicchitano MS. 2008. Effects of p38 MAP Kinase Inhibitors on the Differentiation and Maturation of Erythroid Progenitors. *Toxicol Pathol.* 36:958.

Das B, Yeger H, Tsuchida R, Torkin R, Gee MF, Thorner PS, Shibuya M, Malkin D, Baruchel S. 2005. A Hypoxia-Driven Vascular Endothelial Growth Factor/Flt1 Autocrine Loop Interacts with Hypoxia-Inducible Factor-1a through Mitogen-Activated Protein Kinase/Extracellular Signal-Regulated Kinase 1/2 Pathway in Neuroblastoma. *Cancer Res.* 65:7267-7275.

Dunwoodie SL. 2009. The role of hypoxia in development of the Mammalian embryo. *Dev Cell.* 17:755-773.

Ema M, Taya S, Yokotani N, Sogawa K, Matsuda Y, Fujii-Kuriyama Y. 1997. A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible

factor 1alpha regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. Proc Natl Acad Sci U S A. 94:4273-4278.

Flamme I, Krieg M, Plate KH. 1998. Up-regulation of vascular endothelial growth factor in stromal cells of hemangioblastomas is correlated with up-regulation of the transcription factor HRF/HIF-2alpha. Am J Pathol. 153:25-29.

Goldberg MA, Dunning SP, Bunn HF. 1988. Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme protein. Science. 242:1412-1415.

Gu YZ, Moran SM, Hogenesch JB, Wartman L, Bradfield CA. 1998. Molecular characterization and chromosomal localization of third class hypoxia inducible factor subunit, HIF-3 $\alpha$ . Gene Expr. 7:205-213.

Hamamura K, Matsuda H, Takeuchi Y, Habu S, Yagita H, Okumura K. 1996. A critical role of VLA-4 in erythropoiesis in vivo. Blood. 87:2513-2517.

Hara S, Hamada J, Kobayashi C, Kondo Y, Imura N. 2001. Expression and Characterization of Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-3 $\alpha$  in Human Kidney: Suppression of HIF-Mediated Gene Expression by HIF-3 $\alpha$ . Biochemical and Biophysical Research Communications. 5659.



Higgins DF, Biju MP, Akai Y, Wutz A, Johnson RS, Haase VH. 2004. Hypoxic induction of Ctgf is directly mediated by Hif-1. *Am J Physiol Renal Physiol.* 287:1223-1232.

Hu CJ, Wang LY, Chodosh LA, Keith B, Simon MC. 2003. Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol.* 23:9361-9374.

Imtiyaz HZ, Simon MC. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2010. Hypoxia-inducible factors as essential regulators of inflammation. 345:105-120.

Imtiyaz HZ, Williams EP, Hickey MM, Patel SA, Durham AC, Yuan LJ, Hammond R, Gimotty PA, Keith B, Simon MC. 2010. Hypoxia-inducible factor 2alpha regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation. *J Clin Invest.* 120:2699-2714.

Iwasaka C, Tanaka K, Abe M, Sato Y. 1996. Ets-1 regulates angiogenesis by inducing the expression of urokinasetype plasminogen activator and matrix metalloproteinase-1 and the migration of vascular endothelial cells. *J Cell Physiol.* 169:522-531.

Jelkmann W. 2007. Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur J Haematol.* 78:183-205.

Kameoka J, Yanai N, Obinata M. 1995. Bone marrow stromal cells selectively stimulate the rapid expansion of lineage-restricted myeloid progenitors. *J Cell Physiol.* 164:55-64.

Kanno S, Oda N, Abe M, Terai Y, Ito M, Shitara K, Tabayashi K, Shibuya M, Sato Y. 2000. Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells. *Oncogene.* 19:2138-2146.

Keighley G, Hammond D, Lowy PH. 1964. The sustained action of erythropoietin injected repeatedly into rats and mice. *Blood.* 23:99-107.

Luo B, Jiang M, Yang X, Zhang Z, Xiong J, Schluesener HJ, Zhang Z, Wu Y. 2013. Erythropoietin is a hypoxia inducible factor-induced protective molecule in experimental autoimmune neuritis. *Biochim Biophys Acta.* 1832:1260-70.

Makino Y, Cao R, Svensson K, Bertilsson G, Asman M, Tanaka H, Cao Y, Berkenstam A, Poellinger L. 2001. Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature.* 414:550-554.

Manfred K, Saleh MI. 2003. Molecular responses to hypoxia in tumor cells. *Molecular Cancer.* 2:23

Maxwell PH, Osmond MK, Pugh CW, Heryet A, Nicholls LG, Tan CC, Doe BG, Ferguson DJ, Johnson MH, Ratcliffe PJ. 1993. Identification of the renal erythropoietin-producing cells using transgenic mice. *Kidney Int.* 44:1149-1162.

Maxwell PH, Ratcliffe PJ. 2002. Oxygen sensors and angiogenesis. *Stem Cell Dev Biol.* 13:29-37.

Morita M, Ohneda O, Yamashita T, Takahashi S, Suzuki N, Nakajima O, Kawauchi S, Ema M, Shibahara S, Uono T, Tomita K, Tamai M, Sogawa K, Yamamoto M, Fujii-Kuriyama Y. 2003. HLF/HIF-2 $\alpha$  is key factor in retinopathy of prematurity in association with erythropoietin. *EMBO J.* 22:1134-1146.

Ohneda O, Yanai N, Obinata M. 1990. Microenvironment created by stromal cells is essential for a rapid expansion of erythroid cells in mouse fetal liver. *Development.* 110:379-84.

Ohneda O, Fennie C, Zheng Z, Donahue C, La H, Villacorta R, Cairns B, Lasky LA. 1998. Hematopoietic stem cell maintenance and differentiation are supported by embryonic aorta-gonadmesonephros region-derived endothelium. *Blood.* 92:908-919.

Peschle C, Cillo C, Lettieri F, Soricelli A, Pizzella F, Migliaccio G, Mastroberardino G. 1978. Mechanisms regulating the kinetics of erythroid burst-forming unit (BFU-E) and colony-forming unit (CFU-E). *Haematologica.* 63:389-394.

Richard M, Koei C, Jane F. 2006. A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell*. 6:515-527.

Scortegagna M, Ding K, Oktay Y, Gaur A, Thurmond F, Yan LJ, Marck BT, Matsumoto AM, Shelton JM, Richardson JA, Bennett MJ, Garcia JA. 2003. Multiple organ pathology, metabolic abnormalities and impaired homeostasis of reactive oxygen species in *Epas1*<sup>-/-</sup> mice. *Nat Genet*. 35:331-340.

Scortegagna M, Ding K, Zhang Q, Oktay Y, Bennett MJ, Bennett M, Shelton JM, Richardson JA, Moe O, Garcia JA. 2005. HIF-2 $\alpha$  regulates murine hematopoietic development in an erythropoietin-dependent manner. *Blood*. 105:3133-3140.

Semenza GL. 2003. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 3:721-732

Shinojima T, Oya M, Takayanagi A, Mizuno R, Shimizu N, Murai M. 2007. Renal cancer cells lacking hypoxia inducible factor (HIF)-1 $\alpha$  expression maintain vascular endothelial growth factor expression through HIF-2 $\alpha$ . *Carcinogenesis*. 28:529–536.

Skuli N, Majmundar AJ, Krock BL, Mesquita RC, Mathew LK, Quinn ZL, Runge A, Liu L, Kim MN, Liang J, Schenkel S, Yodh AG, Keith B, Simon MC. 2012.

HIF-2 $\alpha$  regulates murine pathological angiogenesis and revascularization processes. *J Clin Invest.* 122:1427-1443.

Tanaka K, Chen D, Negishi S, Aizawa S, Hoshi H. 1998. Splenic adherent cells, stimulated in vitro, induce the reactive formation of lymphoid follicles and germinal centres in draining lymph nodes after subcutaneous transfusion into syngeneic mice. *J Anat.* 193:49-59.

Tian H, McKnight SL, Russell DW. 1997. Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes Dev.* 11:72-82.

Trentin J. 1971. Determination of bone marrow stem cell differentiation by stromal hemopoietic inductive microenvironments (HIM). *Am J Pathol.* 65:621-628.

Walker L, Carlson A, Tan-Pertel HT, Weinmaster G, Gasson J. 2001. The notch receptor and its ligands are selectively expressed during hematopoietic development in the mouse. *Stem Cells.* 19:543-552.

Wang GL, Semenza GL. 1993. Desferrioxamine induces erythropoietin gene expression and hypoxia-inducible factor 1 DNA-binding activity: implications for models of hypoxia signal transduction. *Blood.* 15:3610-3615.

Wang GL, Semenza GL. 1995. Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 270:1230-1237.

Yamashita T, Ohneda O, Nagano M, Iemitsu M, Makino Y, Tanaka H, Miyauchi T, Goto K, Ohneda K, Fujii-Kuriyama Y, Poellinger L, Yamamoto M. 2008. Abnormal heart development and lung remodeling in mice lacking the hypoxia-inducible factor-related basic helix-loop-helix PAS protein NEPAS. *Mol Cell Biol.* 28:1285-1297.

Yamashita T, Ohneda O, Sakiyama A, Iwata F, Ohneda K, Fujii-Kuriyama Y. 2008. The microenvironment for erythropoiesis is regulated by HIF-2 $\alpha$  through VCAM-1 in endothelial cells. *Blood.* 112:1482-1492.

Yanai N, Matsuya Y, Obinata M. 1989. Spleen stromal cell lines selectively support erythroid colony formation. *Blood.* 74:2391-2397.

Yanai N, Sekine C, Yagita H, Obinata M. 1994. Roles for integrin very late activation antigen-4 in stromadependent erythropoiesis. *Blood.* 83:2844-2850.

Yuan G, Peng YJ, Reddy VD, Makarenko VV, Nanduri J, Khan SA, Garcia JA, Kumar GK, Semenza GL, Prabhakar NR. 2013. Mutual antagonism between hypoxia-inducible factors 1 $\alpha$  and 2 $\alpha$  regulates oxygen sensing and cardio-respiratory homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 110:1788-1896.

Zhong J, Terry D. 2000. Redox-mediated Effects of Selenium on Apoptosis and Cell Cycle in the LNCaP Human Prostate Cancer Cell Line. *Cancer Res.* 61:7071-7078.

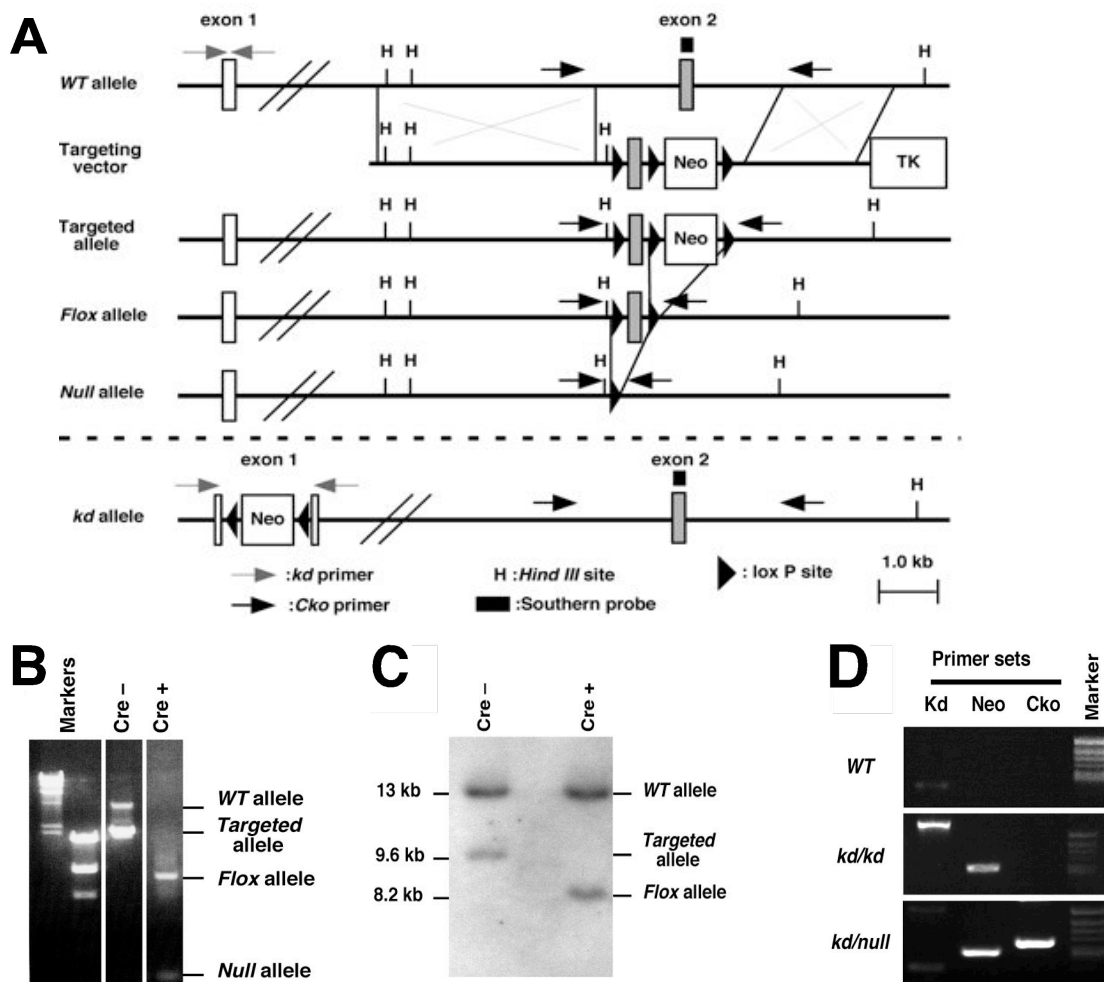


図 1. mouse *Hif-2α* exon 2 における変異の挿入と確認

A) Cre-loxP 部位特異的組み換えにより作製された *Hif-2α* knockout (*null*) allele の *Hif-2α* exon 1, exon 2 restriction gene map 及び、*Hif-2α* exon 1, exon 2 を標的とした genotype 標的部位.

B, C) 樹立された *null/+* を用いて *null* allele における *Hif-2α* exon2 の欠損を確認した. [制限酵素処理 (Hind III 使用) 後のゲノム DNA 使用. B: ES 細胞由来ゲノム DNA、C: マウス組織片由来ゲノム DNA]

D) 各遺伝子型 (*WT*, *kd/kd*, *kd/null*) を Kd, Neo, Cko の 3 種の primer sets を用いた PCR によって同定した. (マウス組織片由来ゲノム DNA を使用)



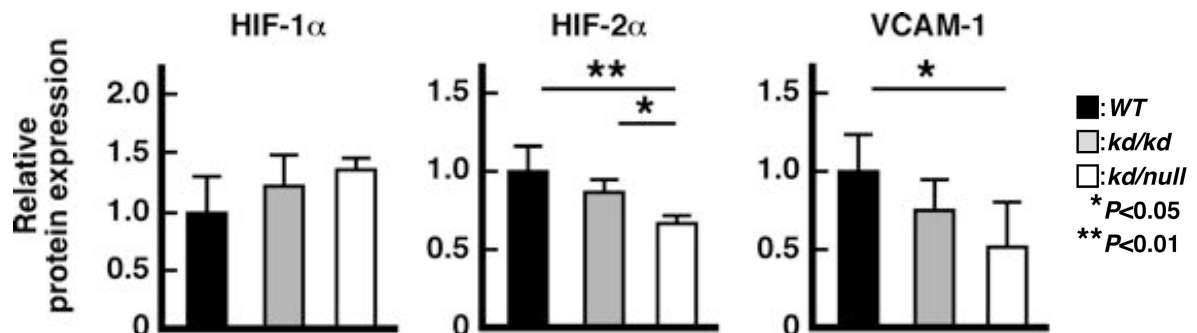


図 2. 13.5 日胚頭部組織由来核抽出タンパクを用いた Western blot

- ・ HIF-1 $\alpha$  は WT、kd/kd、kd/null の間において有意な差はなかった.
- ・ HIF-2 $\alpha$  は WT、kd/kd と比較して kd/null において有意に減少していた.
- ・ HIF-2 下流因子である VCAM-1 は HIF-2 $\alpha$  の発現量と同様に WT、kd/kd と

比較して kd/null において有意に減少していた.

発現強度は WT の数値を 1 とした相対値で示した (ANOVA, n=3, mean $\pm$ SD).

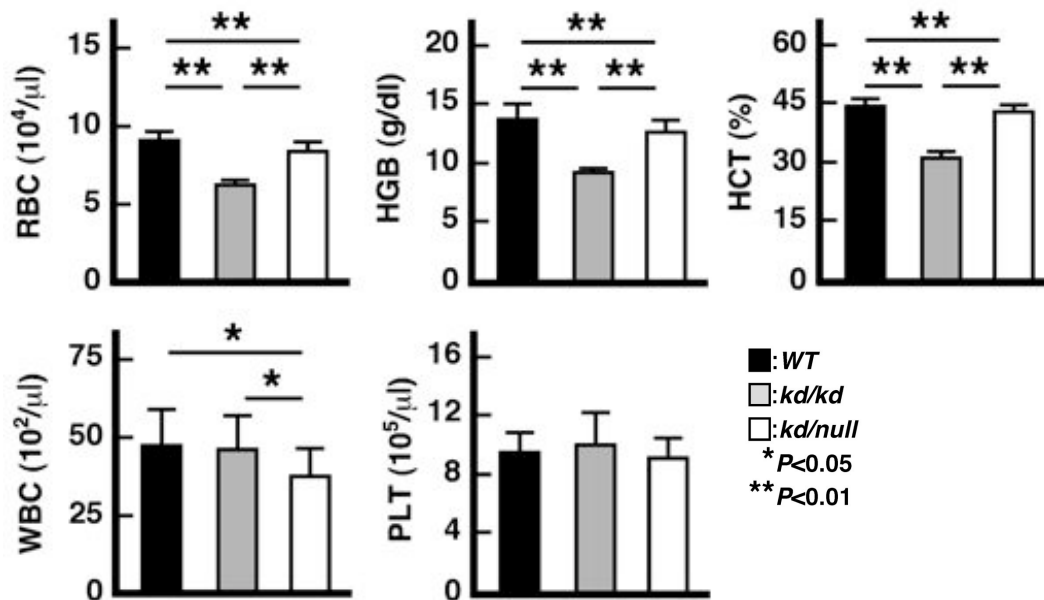


図 3. マウス成体 (84 日齢) 由来末梢血を用いた血球分画の解析

・赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン値 (HGB)、ヘマトクリット値 (HCT) は WT と比較して *kd/kd*、*kd/null* において有意に減少していたが、*kd/kd* と比較して *kd/null* において有意に増加していた。

・白血球数 (WBC) は WT と *kd/kd* に有意差はなかったが、WT や *kd/kd* と比較して *kd/null* において有意に減少していた。

・血小板数 (PLT) において有意差は見られなかった。

細胞数は血球計数器により計測された (ANOVA, n=5, mean±SD)。

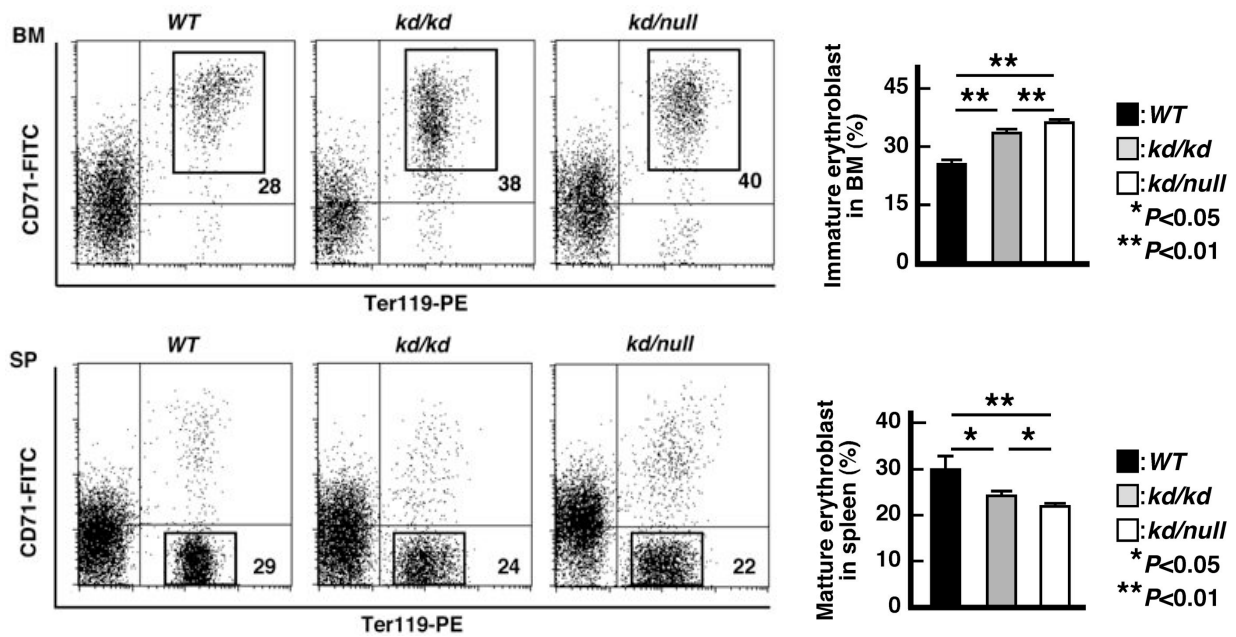


図 4. マウス成体骨髄・脾臓由来浮遊細胞を用いた FACS 解析

・骨髄における未成熟赤芽球分画 (CD71<sup>+</sup>/Ter119<sup>+</sup>) は WT、kd/kd と比較して kd/null において有意に増加していた。

・脾臓においては成熟赤芽球分画 (CD71<sup>+</sup>/Ter119<sup>+</sup>) が WT、kd/kd と比較して kd/null において有意に減少していた。

FACS 解析は Moflo XDP により計測された (ANOVA, n=4, mean±SD).

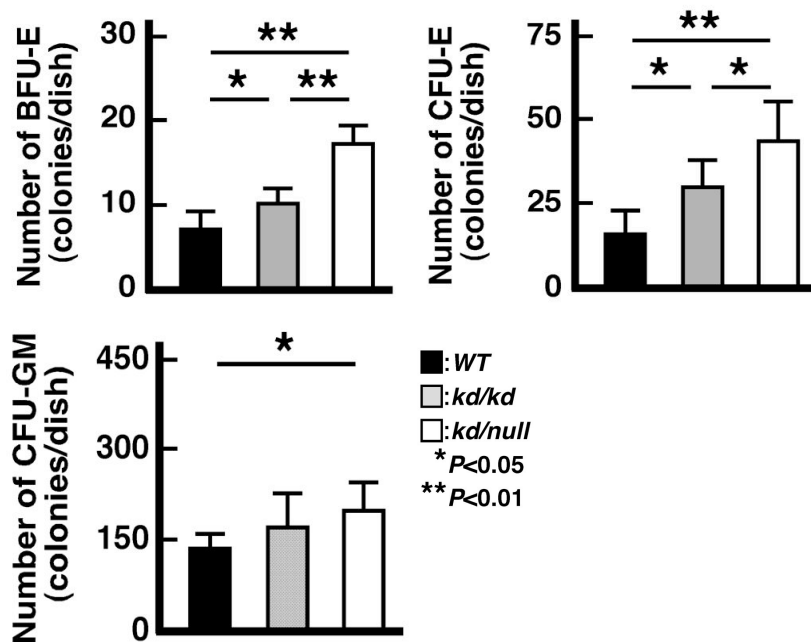


図 5. マウス成体骨髄由来浮遊細胞を用いたコロニーアッセイ

骨髄由来 BFU-E、CFU-E は WT、kd/kd と比較して kd/null において有意に増加していた。また、CFU-GM は WT と比較して kd/null において有意に増加していた (ANOVA,  $n=4$ ,  $\text{mean} \pm \text{SD}$ ).

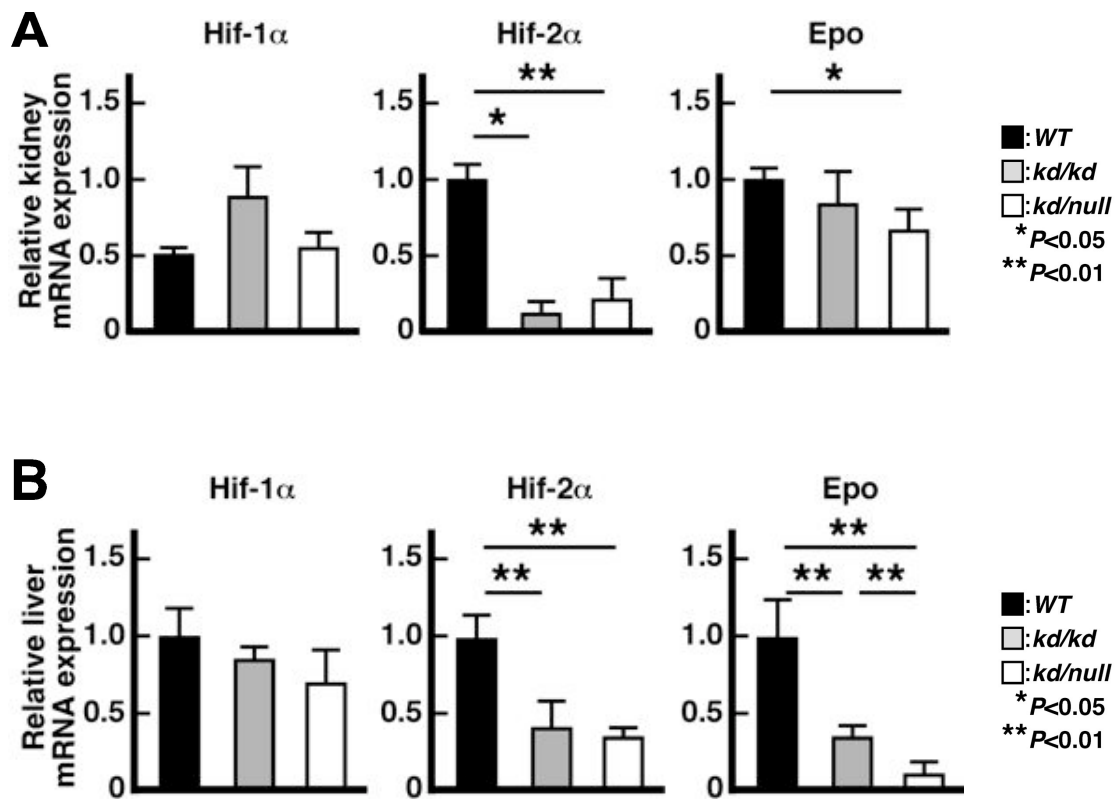


図 6. マウス成体由来腎臓・肝臓を用いた qRT-PCR

(A) 腎臓における Hif-1 $\alpha$  発現量は WT、kd/kd、kd/null の間において有意な差はなかった。 Hif-2 $\alpha$  及び Epo 発現量は WT と比較して kd/null において有意に減少し、kd/kd と kd/null の間において有意な差はなかった。

(B) 肝臓における Hif-1 $\alpha$  発現量は WT、kd/kd、kd/null の間において有意な差はなかった。 Hif-2 $\alpha$  発現量は WT と比較して kd/null において有意に減少し、Epo 発現量は kd/kd と kd/null の間において有意な差はなかった。

発現強度は WT の数値を 1 とした相対値で示した (ANOVA, n=5, mean $\pm$ SD).

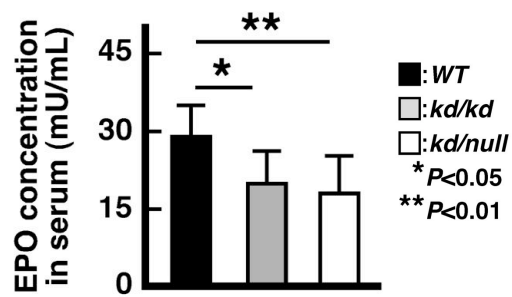


図 7. マウス成体由来血漿を用いた EPO ELISA

末梢血から得られた血漿における EPO 濃度は *WT*、*kd/kd* と比較して *kd/null* において有意に減少していた ( $n=5$ ,  $\text{mean} \pm \text{SD}$ ).

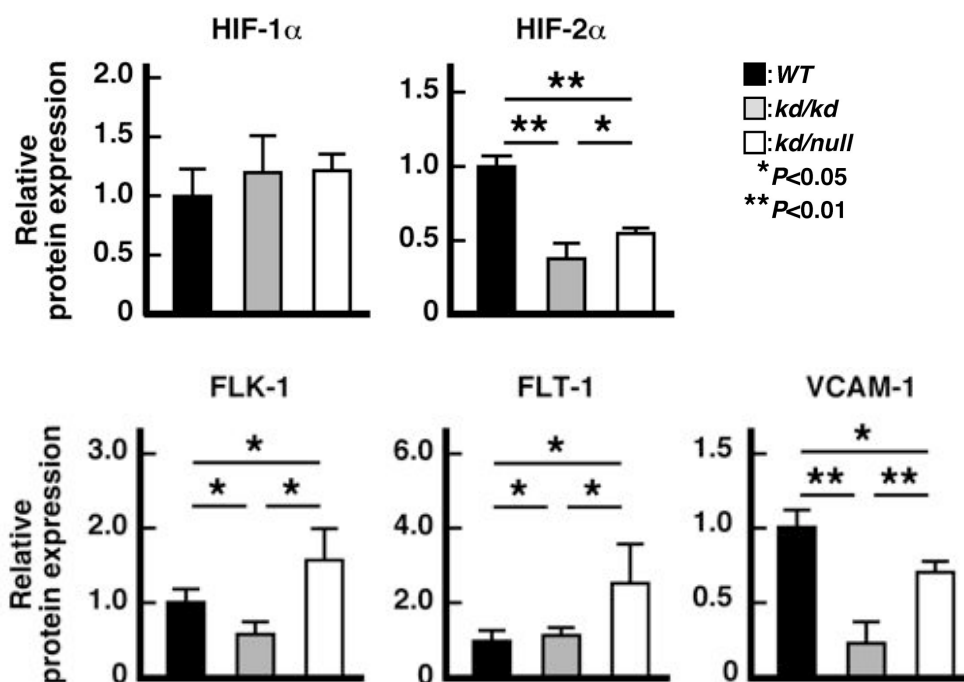
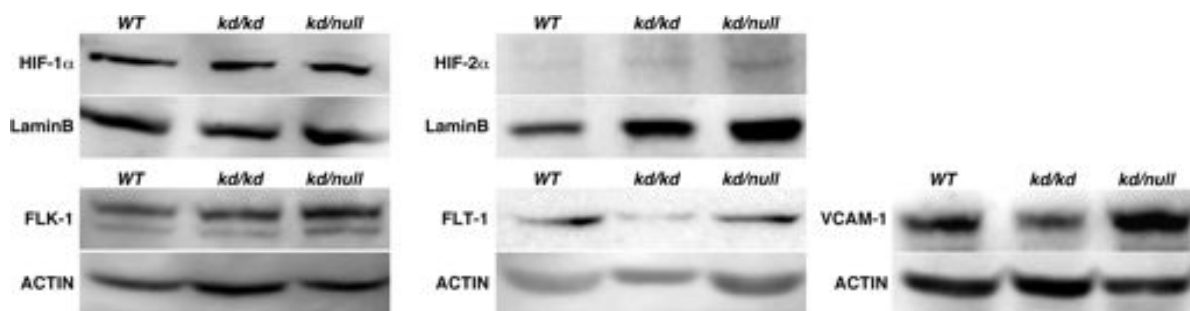


図 8. マウス成体由来脾臓を用いた Western blot

- ・ HIF-1α は WT、*kd/kd*、*kd/null* の間において有意な差はなかった。
  - ・ HIF-2α は WT と比較して *kd/kd*、*kd/null* において有意に減少していたが、*kd/kd* と比較して *kd/null* において有意に増加していた。
  - ・ HIF-2 下流因子である FLK-1、FLT-1、VCAM-1 は HIF-2α の発現量と同様に *kd/kd* と比較して *kd/null* において有意に増加していた。
- 発現強度は WT の数値を 1 とした相対値で示した (n=3, mean±SD).

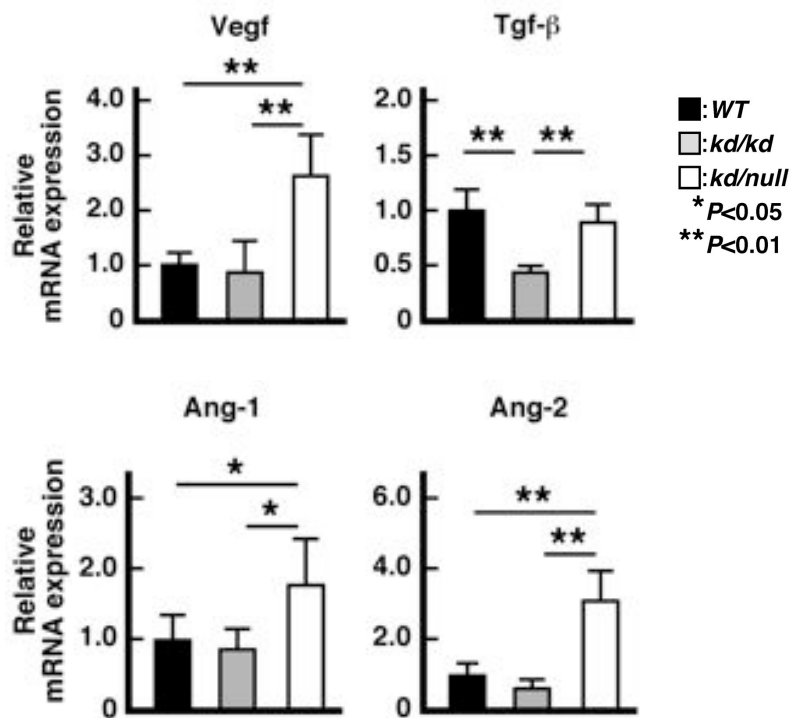


図 9. マウス成体由来脾臓を用いた qRT-PCR

HIFs 共通下流因子 (Vegf, Tgf-β) や HIF-1 下流因子 (Ang-1)、HIF-2 下流因子 (Ang-2) は *kd/kd* と比較して *kd/null* において有意に増加していた。

発現強度は *WT* の数値を 1 とした相対値で示した (ANOVA, n=5, mean±SD).





図 10. マウス成体由来脾臓を用いた組織免疫染色 (抗 CD31 抗体染色)

*kd/null* における血管内皮細胞は *WT* と比較して減少している一方で、*kd/kd* と比較して増加している傾向が見られた。 [図中: 血管内皮細胞 (陽性細胞), その他細胞群 (W, 陰性細胞), bar: 200 $\mu$ m]

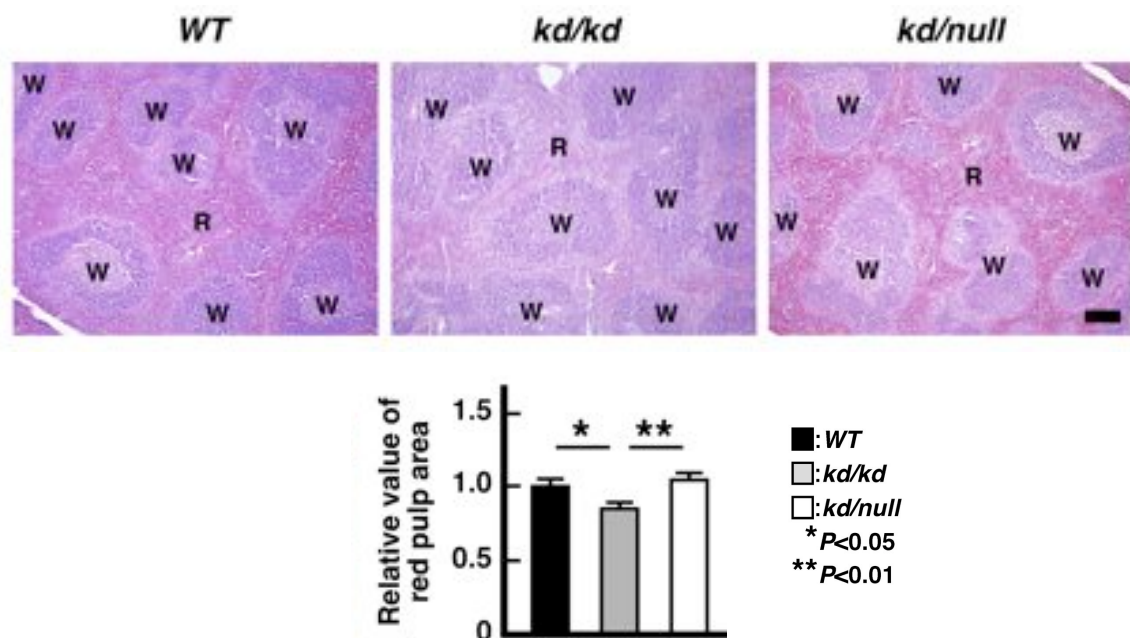


図 11. マウス成体由来脾臓を用いた組織免疫染色 (HE 染色)

*kd/null* における赤脾髄領域は *kd/kd* と比較して有意に増加していた。

赤脾髄領域は *WT* の数値を 1 とした相対値で示した (ANOVA,  $n=4$ ,  $\text{mean} \pm \text{SD}$ ). [図中: 赤脾髄領域 (R), 白脾髄領域 (W), bar: 200 $\mu\text{m}$ ]

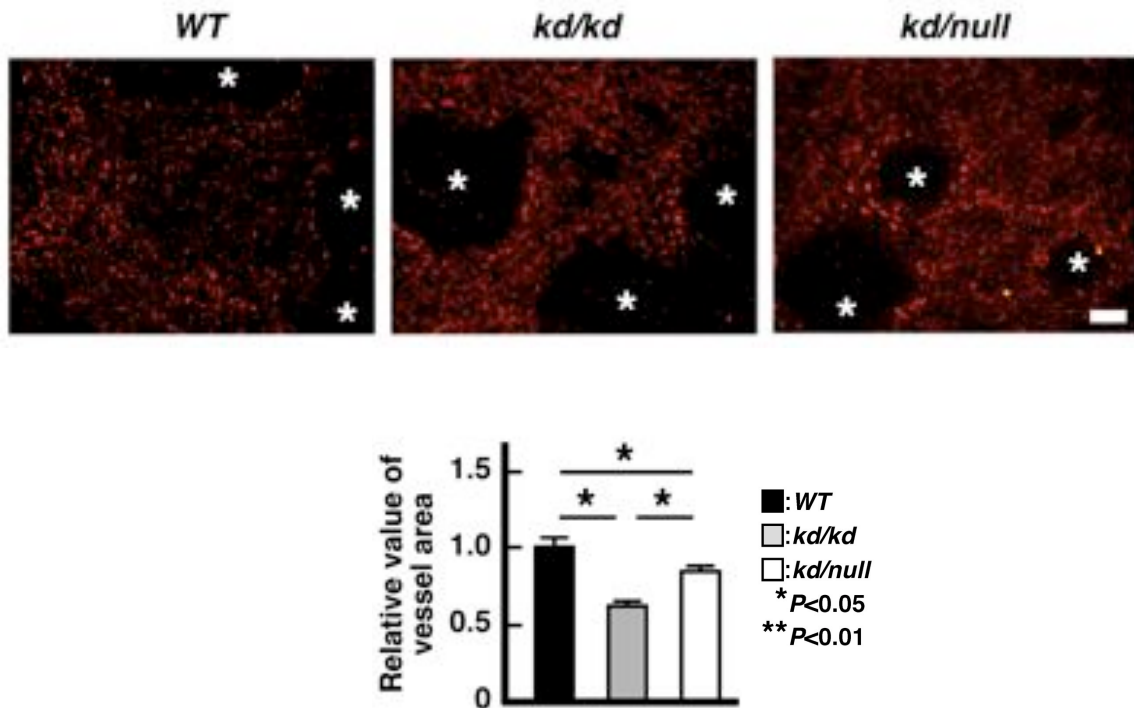


図 12. マウス成体由来脾臓を用いた蛍光免疫染色 (抗 Selectin 抗体染色)

*kd/null* における毛細血管領域 (血管内皮細胞) は *WT* と比較して有意に減少している一方で、*kd/kd* と比較して有意に増加していた。

毛細血管領域の占める割合は *WT* の数値を 1 とした相対値で示した (n=4, mean±SD). [図中: 毛細血管領域 (陽性領域), その他領域 (\*領域), bar: 200μm]

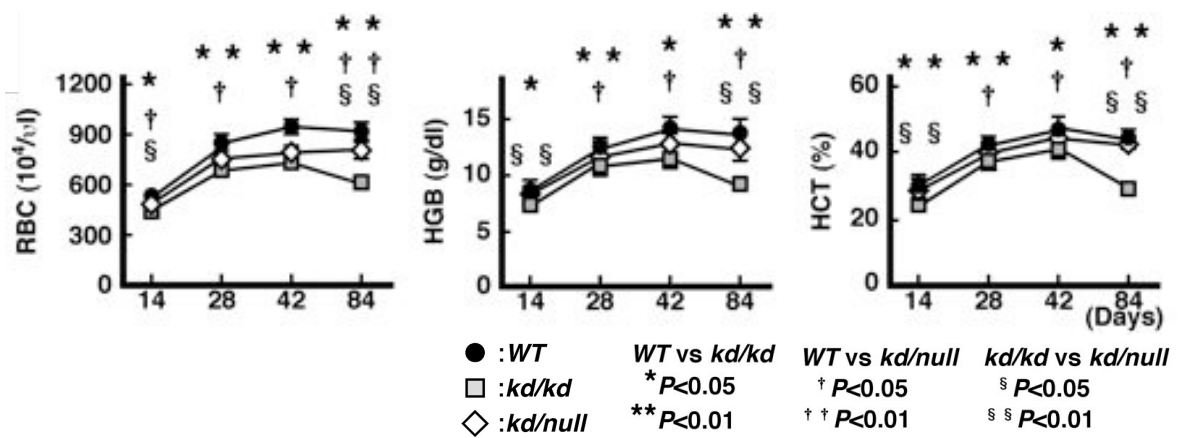


図 13. 各日齢マウス由来由来末梢血を用いた血球分画の解析

赤血球数 (RBC)、ヘモグロビン値 (HGB)、ヘマトクリット値 (HCT) は *kd/null* の 14-28 日齢までに急増していたが、42 日齢以降に安定した。

細胞数は血球計数器により計測された (ANOVA, n=5, mean±SD).

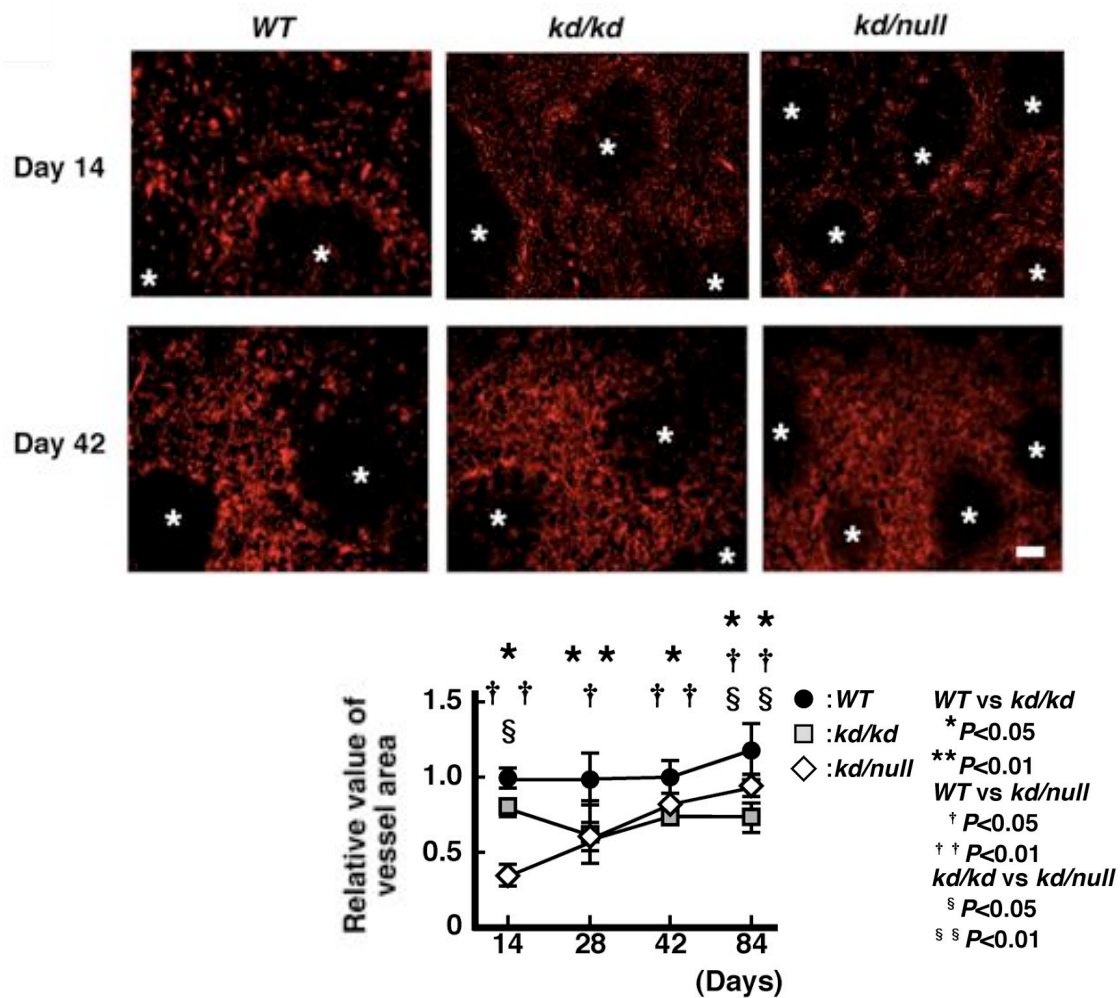


図 14. 各日齢マウス由来脾臓を用いた蛍光免疫染色 (抗 Selectin 抗体染色)

*kd/null* における毛細血管領域 (血管内皮細胞) の占める割合は 14 日齢において *kd/kd* と比較して有意に低い。28-42 日齢は *kd/kd* と有意差がなく、84 日齢において *kd/kd* よりも有意に高い事が明らかとなった。

毛細血管領域の占める割合は 14 日齢の *WT* の数値を 1 とした相対値で示した (ANOVA,  $n=4$ ,  $\text{mean} \pm \text{SD}$ ). [図中: 赤脾髄領域 (陽性領域), 白脾髄領域 (\*領域), bar: 200 $\mu\text{m}$ ]

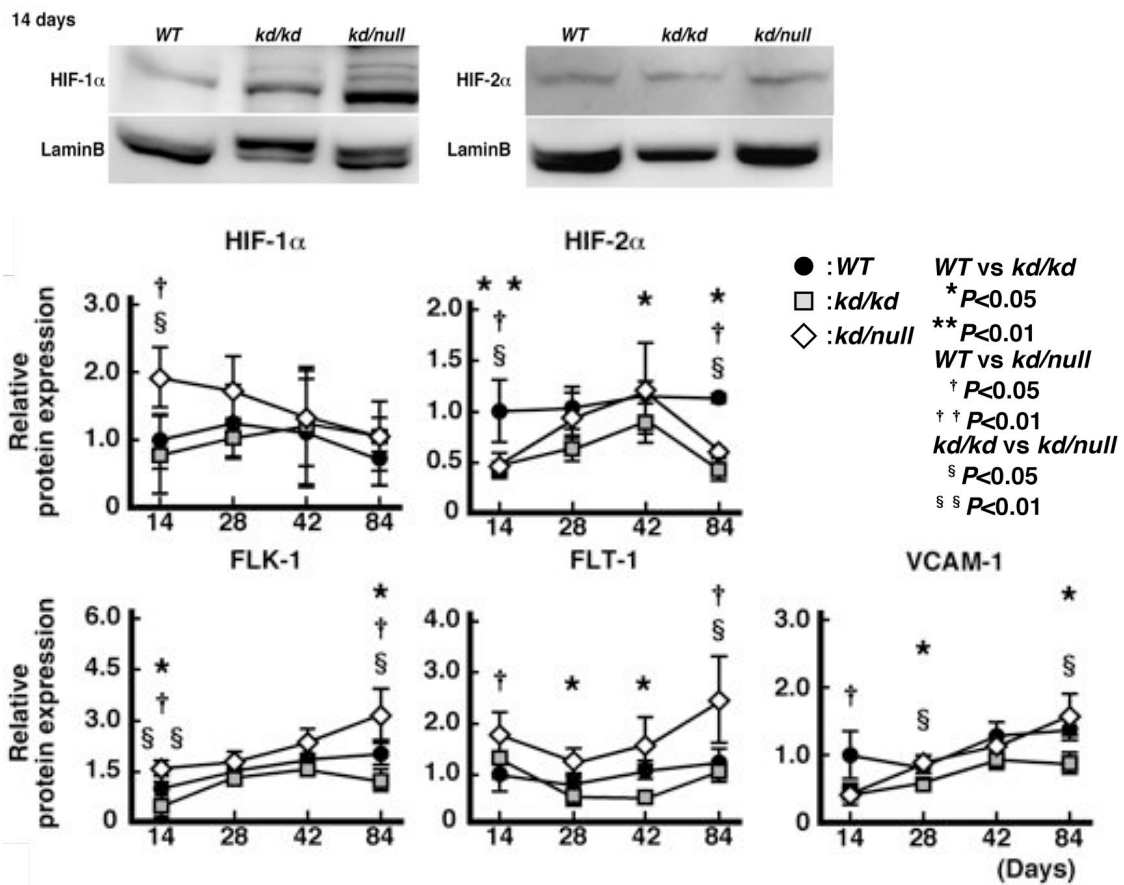


図 15. 各日齢マウス由来脾臓を用いた Western blot

・ *kd/null* における HIF-1 $\alpha$  発現量は 14-28 日齢まで *WT*、*kd/kd* と比較して有意に高く、28-84 日齢は *WT*、*kd/kd* と有意差がなかった。

・ *kd/null* における HIF-2 $\alpha$ 、VCAM-1 発現量は 14 日齢において *WT* と比較して有意に低く、28-84 日齢において *WT* と有意差がなかった。

・ *kd/null* における FLK-1、FLT-1 の発現量は 14-84 日齢において *WT*、*kd/kd* と比較して有意に高い、あるいは最も高い傾向にあった。

発現強度は 14 日齢の *WT* の発現量を 1 とした相対値で示した (ANOVA, n=3, mean $\pm$ SD).

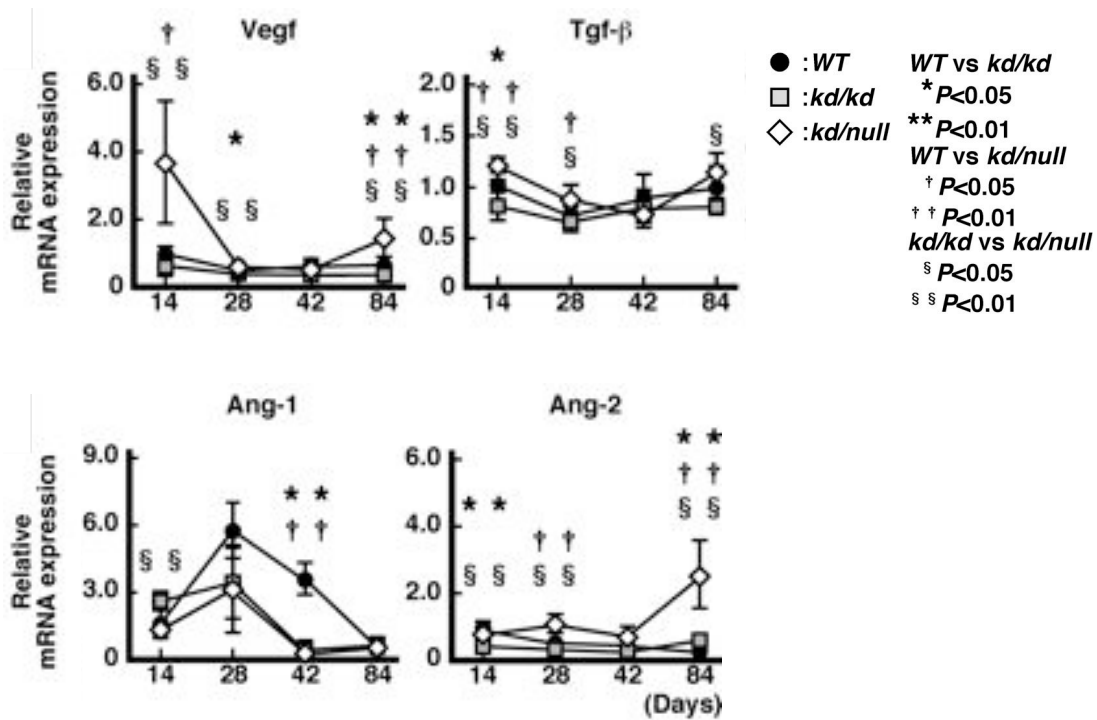


図 16. 各日齢マウス由来脾臓を用いた qRT-PCR

kd/null における HIFs 共通下流因子 (Vegf, Tgf-β) を始めとした血管新生関連因子が kd/kd と比較して 14-28 日齢において有意に増加していた。

発現強度は 14 日齢の WT の発現量を 1 とした相対値で示した。(ANOVA, n=4, mean±SD)



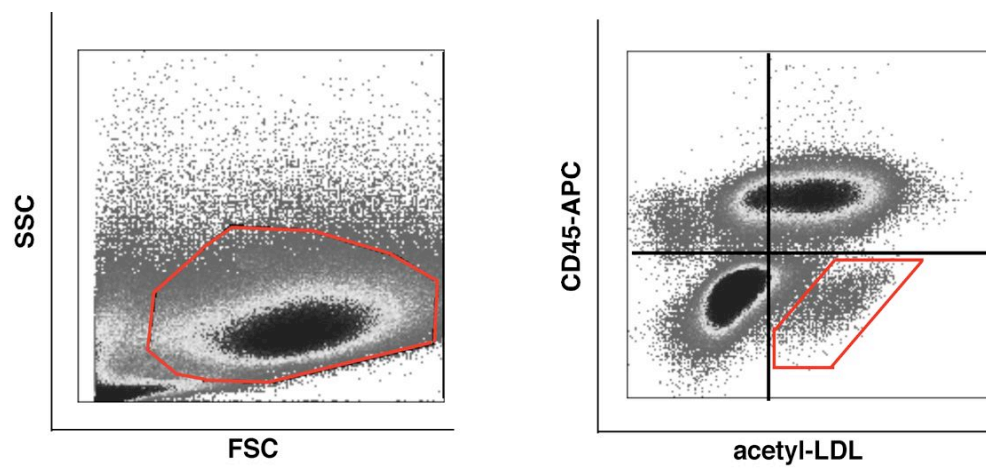


図 17. マウス成体由来脾臓を用いた血管内皮細胞 (EC) 分画の回収

WT、*kd/kd*、*kd/null* 由来脾臓における EC 細胞分画 [ $acetyl-LDL^+$ / $CD45^-$  (図中: 赤色領域)] を cell sorter (Moflo XDP) により回収した。



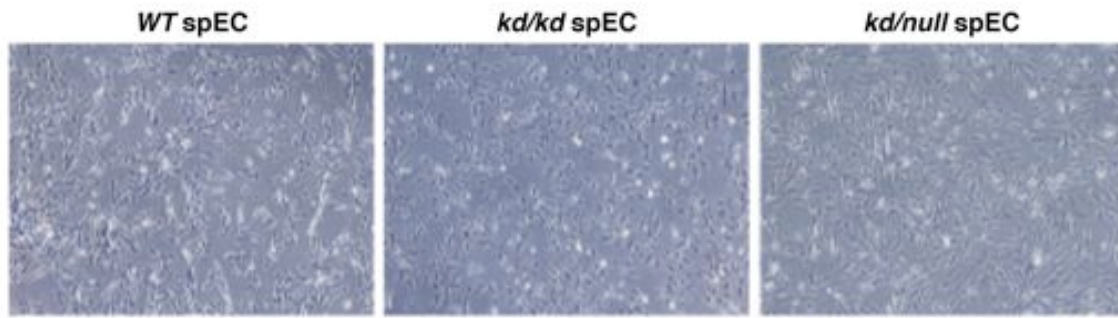


図 18. マウス成体由来脾臓を用いた EC 細胞株樹立

WT、*kd/kd*、*kd/null* 由来脾臓から回収された EC 群を用い、限界希釈法によって EC 細胞株を樹立した。検鏡による細胞形態の観察では WT、*kd/kd*、*kd/null* 間において差は見られなかった。

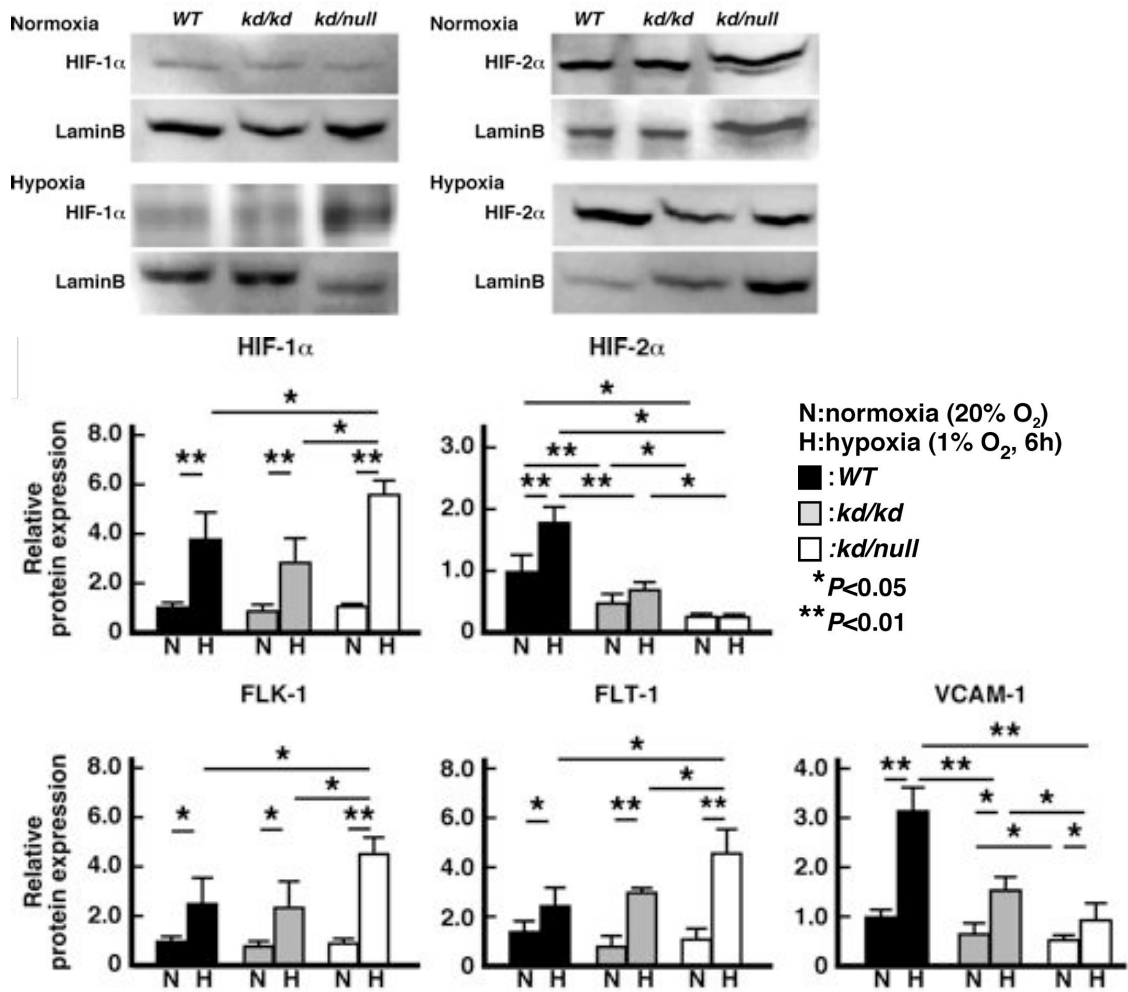


図 19. EC 細胞株を用いた Western blot

・ *kd/null* における HIF-1α 発現量は低酸素下において WT、*kd/kd* と比較して有意に高く、HIF-2α 発現量は低酸素下において WT、*kd/kd* と比較して有意に低かった。

・ *kd/null* における VCAM-1 発現量は HIF-2α の発現パターンと類似した結果であった一方で、FLK-1、FLT-1 発現量は低酸素下において増加しており、HIF-1α の発現パターンと類似した結果であった

発現強度は通常酸素下の WT の発現量を 1 とした相対値で示した (ANOVA, n=3, mean±SD).

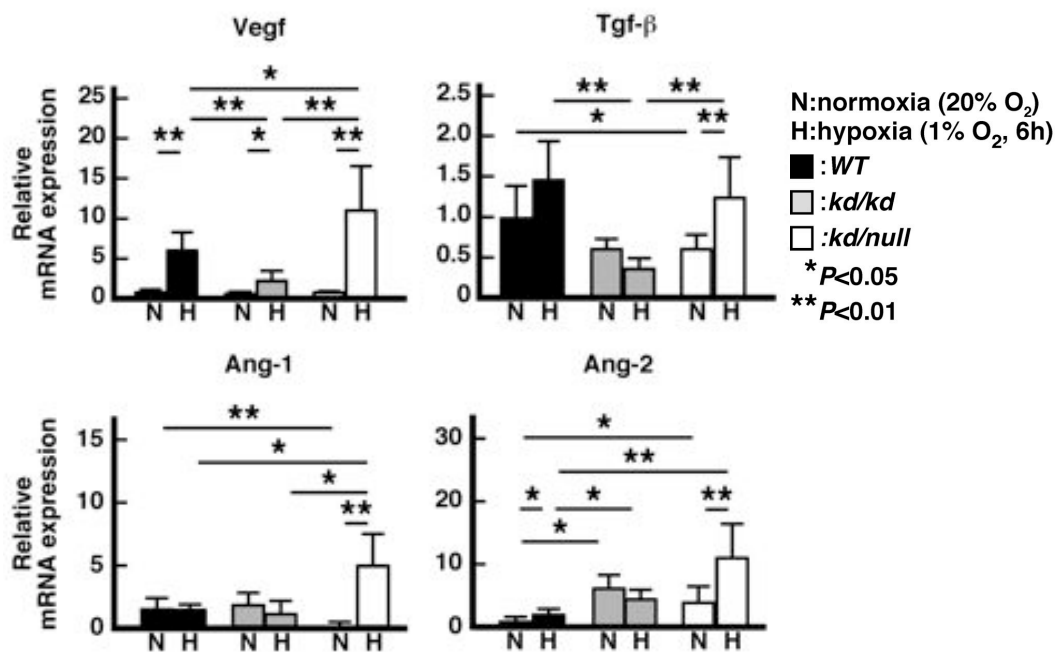


図. 20 EC 細胞株を用いた qRT-PCR

*kd/null* における HIFs 共通下流因子 (Vegf, Tgf-β)、HIF-1 下流因子 (Ang-1)、HIF-2 下流因子 (Ang-2) を始めとした血管新生関連因子が *WT*、*kd/kd* と比較して低酸素下において有意に増加していた。

発現強度は通常酸素下における *WT* の発現量を 1 とした相対値で示した (ANOVA, n=5, mean±SD).

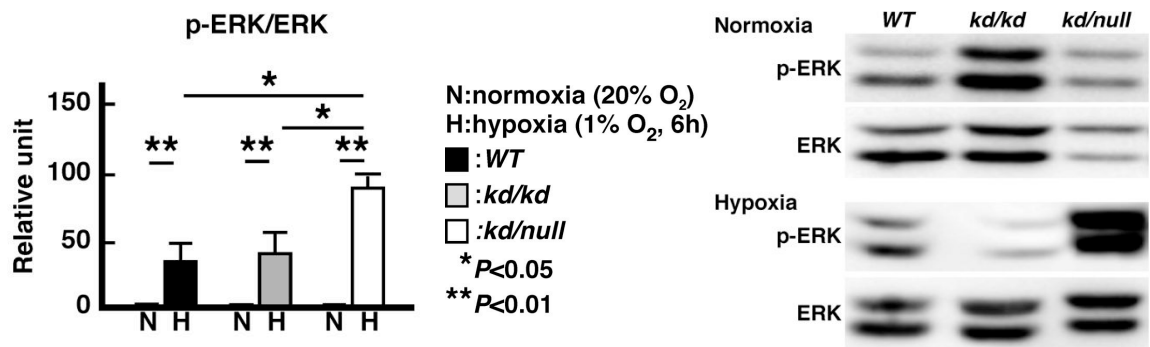


図 21. EC 細胞株を用いた Western blot

VEGF と VEGFR (FLK-1, FLT-1) の下流シグナルである ERK1/2 のリン酸化 (p-ERK1/2) の割合が *kd/null* の低酸素下において *WT*、*kd/kd* と比較して有意に増加していた。

発現強度は通常酸素下における *WT* の p-ERK/ERK の値を 1 とした相対値で示した (ANOVA, n=4, mean±SD).

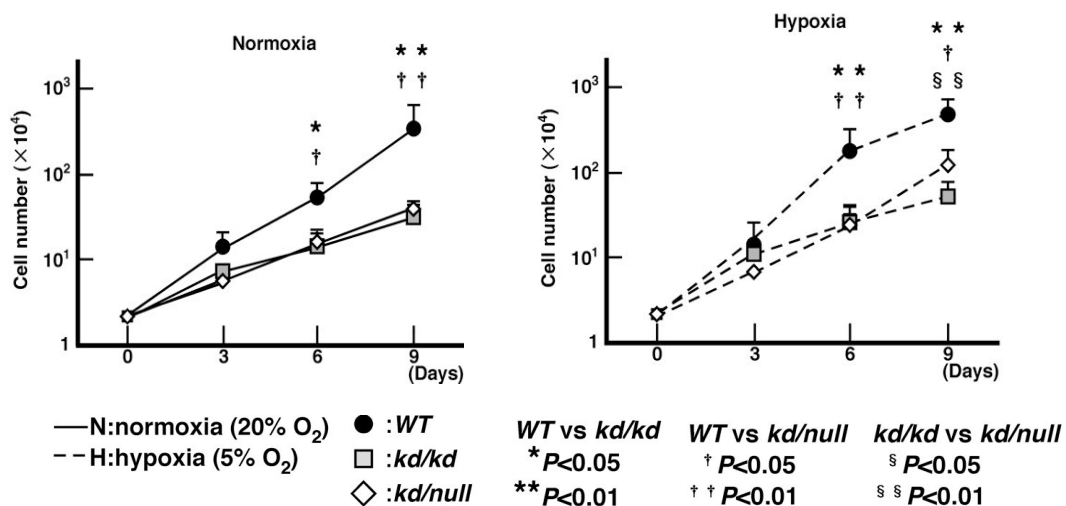


図 22. EC 細胞株を用いた細胞増殖能の検定

細胞増殖能は WT において最も高かった一方、kd/null における細胞増殖能は kd/kd と比較して低酸素下において有意に高かった [細胞倍加時間, (normoxia WT: 41.4±7.4 hours, hypoxia WT: 25.4±7.4 hours, normoxia kd/kd: 85.0±18.7 hours, hypoxia kd/kd: 73.8±16.4 hours, normoxia kd/null: 65.1±13.1 hours, hypoxia kd/null: 37.7±6.0 hours)].

細胞倍加時間は day3 から day6 における細胞数から求めた (ANOVA, n=4, mean±SD).

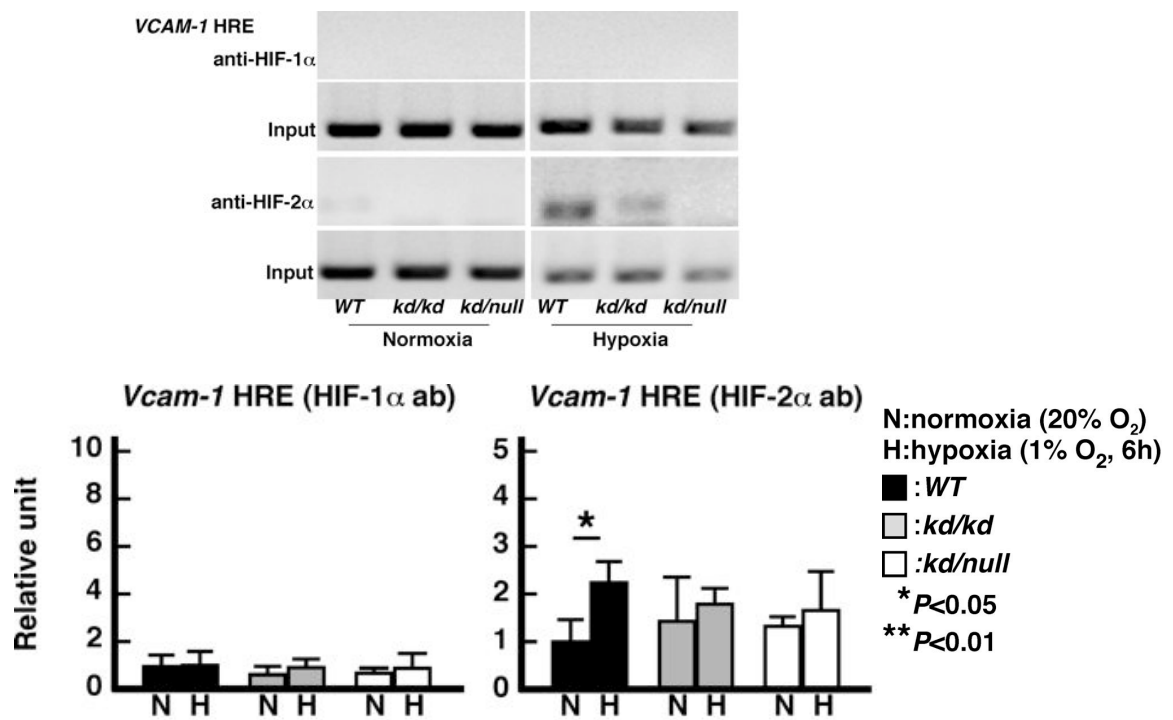


図 23. EC 細胞の *Vcam-1* HRE 配列に対する HIF 結合能の解析

WT、*kd/kd*、*kd/null* 由来ゲノム DNA の *Vcam-1*HRE 配列に対して通常酸素下/低酸素下において HIF-1 $\alpha$  はほぼ結合していない一方、HIF-2 $\alpha$  は高い割合で結合していた。

各 HIF タンパクの結合率は通常酸素下の WT に対する結合率を 1 とした相対値で示した (ANOVA, n=4, mean $\pm$ SD).

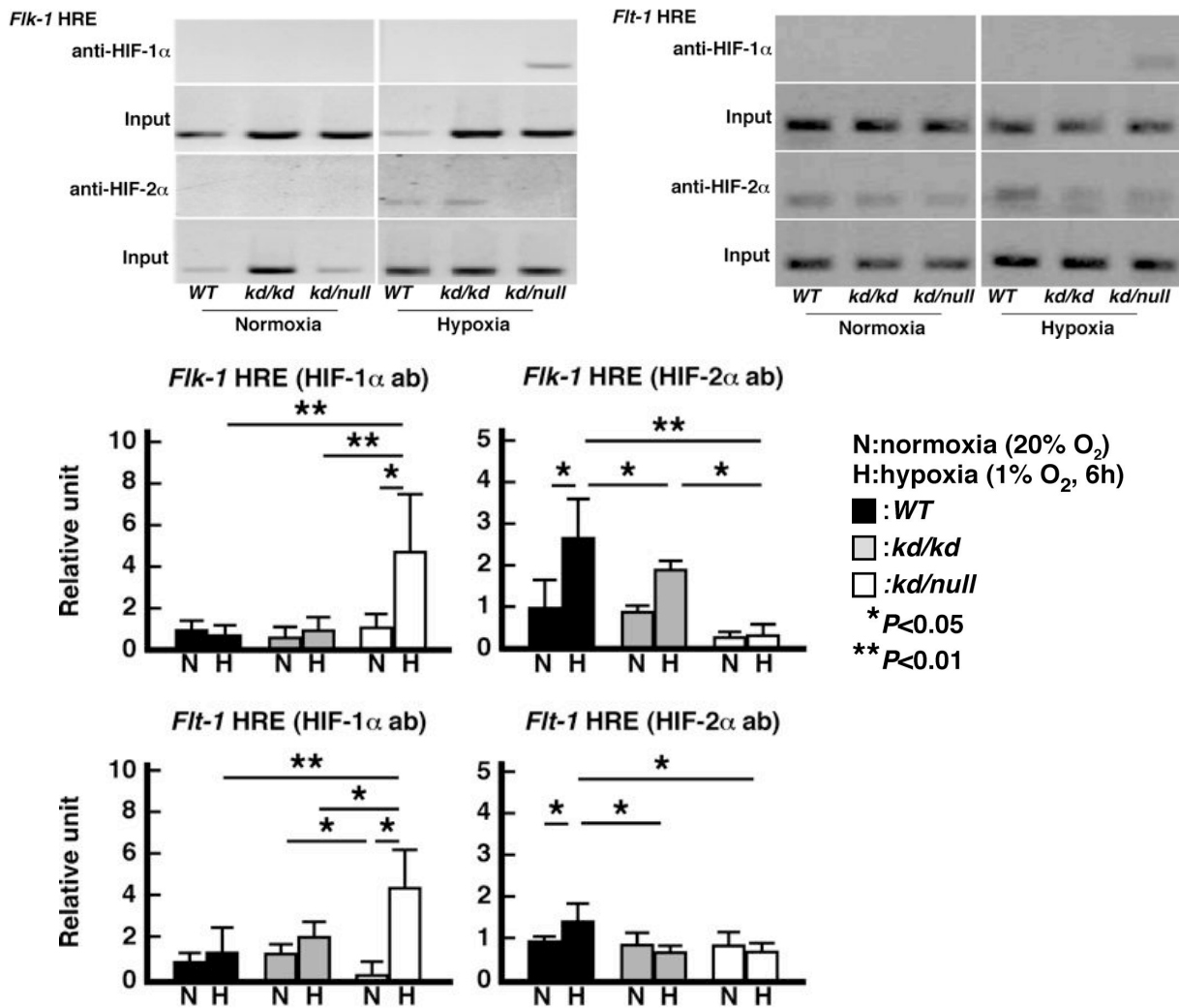


図 24. EC 細胞の *Flk-1*, *Flt-1* HRE 配列に対する HIF 結合能の解析

・ WT、*kd/kd* の *Flk-1*, *Flt-1*HRE 配列に対して HIF-1α はほぼ結合していない一方、低酸素下において HIF-2α は高い割合で結合していた。

・ *kd/null* の *Flk-1*, *Flt-1*HRE 配列に対して通常酸素下において HIF-1α はほぼ結合していない一方、低酸素下において HIF-1α の結合は増加していた。また、*kd/null* の *Flk-1*, *Flt-1*HRE 配列に対する HIF-2α の結合率は有意に低下していた。

各 HIF タンパクの結合率は通常酸素下の WT に対する結合率を 1 とした相対値で示した (ANOVA, n=4, mean±SD).

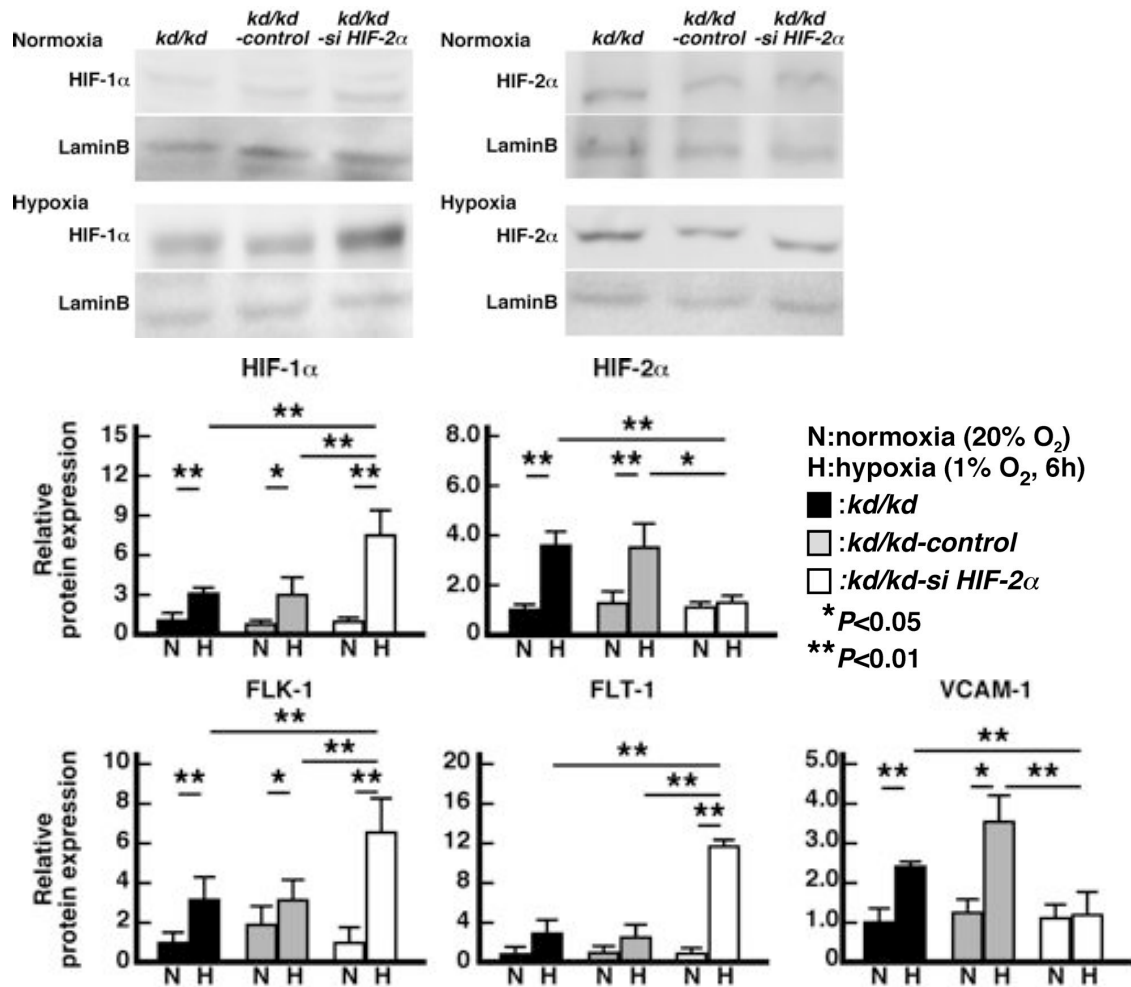


図 25. *kd/kd-si HIF-2 $\alpha$*  EC 細胞株を用いた Western blot

- ・ *kd/kd-si HIF-2 $\alpha$*  における HIF-1 $\alpha$  発現量は低酸素下において *kd/kd*、*kd/kd-control* と比較して有意に高く、HIF-2 $\alpha$  発現量は低酸素下において *kd/kd*、*kd/kd-control* と比較して有意に低かった。
- ・ *kd/kd-si HIF-2 $\alpha$*  における VCAM-1 発現量は HIF-2 $\alpha$  の発現パターンと類似した結果であった一方で、FLK-1、FLT-1 発現量は低酸素下において増加しており、HIF-1 $\alpha$  の発現パターンと類似した結果であった。

発現強度は通常酸素下の *kd/kd* の発現量を 1 とした相対値で示した (ANOVA,  $n=3$ , mean $\pm$ SD).



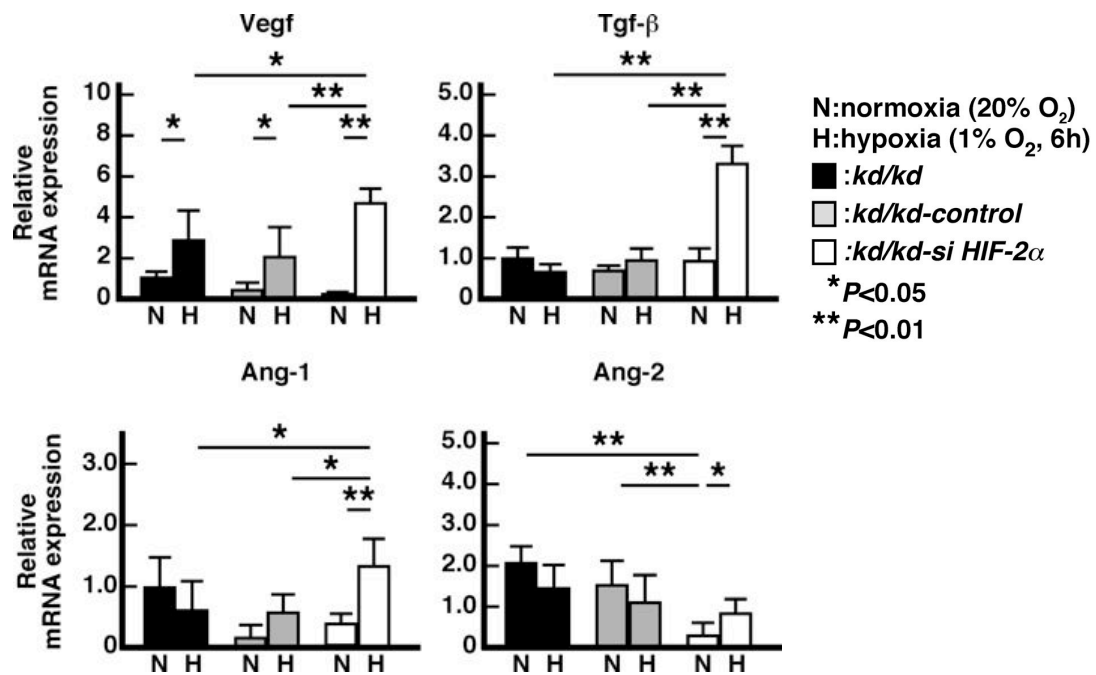


図 26. *kd/kd-si HIF-2α* EC 細胞株を用いた qRT-PCR

*kd/kd-si HIF-2α*における血管新生関連因子として作用するHIFs共通下流因子 (Vegf, Tgf-β) が *kd/kd*、*kd/kd-control* と比較して低酸素下において有意に増加している事が明らかとなった。

発現強度は通常酸素下における *kd/kd* の発現量を 1 とした相対値で示した (ANOVA, n=5, mean±SD).

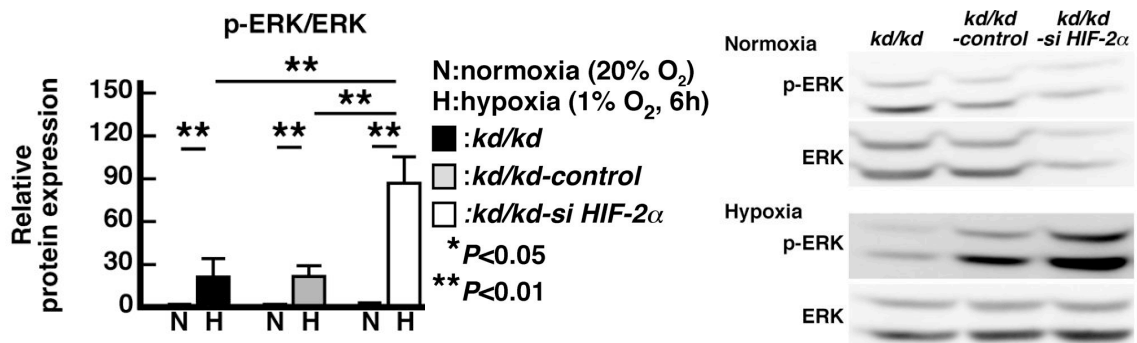


図. 27 *kd/kd-si HIF-2α* EC 細胞株を用いた Western blot

VEGF と VEGFR (FLK-1, FLT-1) の下流シグナルである ERK1/2 のリン酸化 (p-ERK1/2) の割合が *kd/kd-si HIF-2α* の低酸素下において *kd/kd*、*kd/kd-control* と比較して有意に増加していた。

発現強度は通常酸素下における *kd/kd* の p-ERK/ERK の値を 1 とした相対値で示した (ANOVA, n=4, mean±SD).

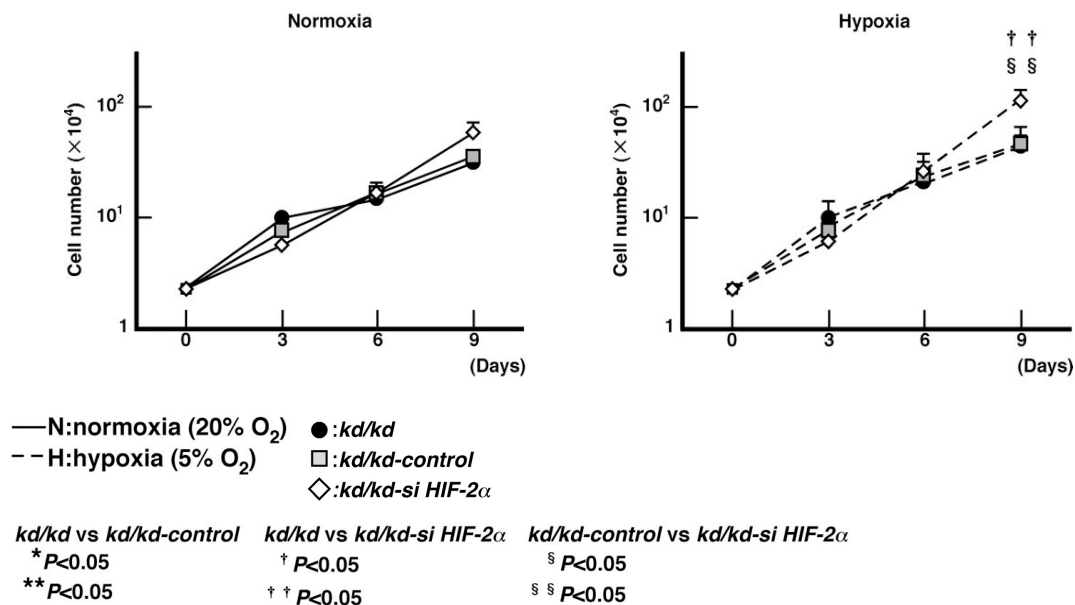


図 28. *kd/kd-si HIF-2α* EC 細胞株を用いた細胞増殖能の検定

*kd/kd-si HIF-2α* における細胞増殖能は *kd/kd*、*kd/kd-control* と比較して低酸素下において有意に高かった [細胞倍加時間, (normoxia *kd/kd*: 85.0±18.7 hours, hypoxia *kd/kd*: 73.8±16.4 hours, normoxia *kd/kd-control*: 80.6±8.9 hours, hypoxia *kd/kd-control*: 75.7±8.1 hours, normoxia *kd/kd-si HIF-2α*: 62.8±5.3 hours, hypoxia *kd/kd-si HIF-2α*: 39.9±12.5 hours)].

細胞倍加時間は day3 から day6 における細胞数から求めた (ANOVA, n=4, mean±SD).

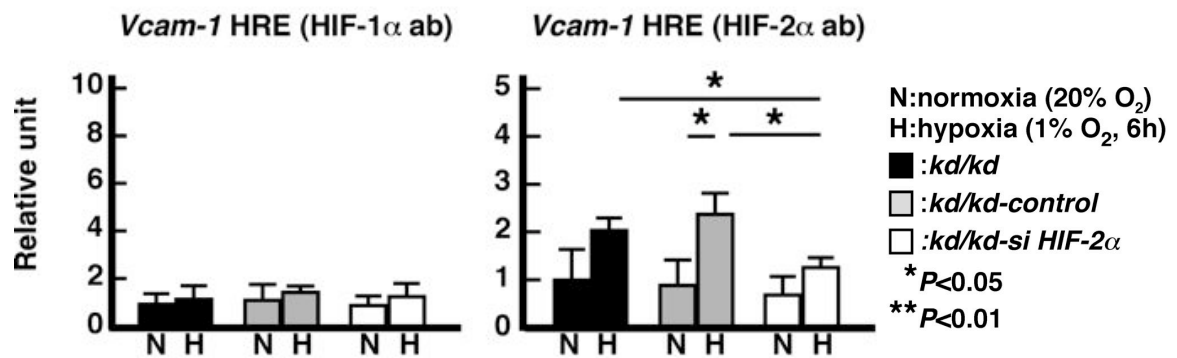


図 29. *kd/kd-si HIF-2α* EC 細胞の *Vcam-1* HRE 配列に対する HIF 結合能の解析

*kd/kd*、*kd/kd-control*、*kd/kd-si HIF-2α* 由来ゲノム DNA の *Vcam-1* HRE 配列に対して通常酸素下/低酸素下において HIF-1α はほぼ結合していない一方、HIF-2α は高い割合で結合していた。

各 HIF タンパクの結合率は通常酸素下の *kd/kd* に対する結合率を 1 とした相対値で示した (ANOVA, n=4, mean±SD).

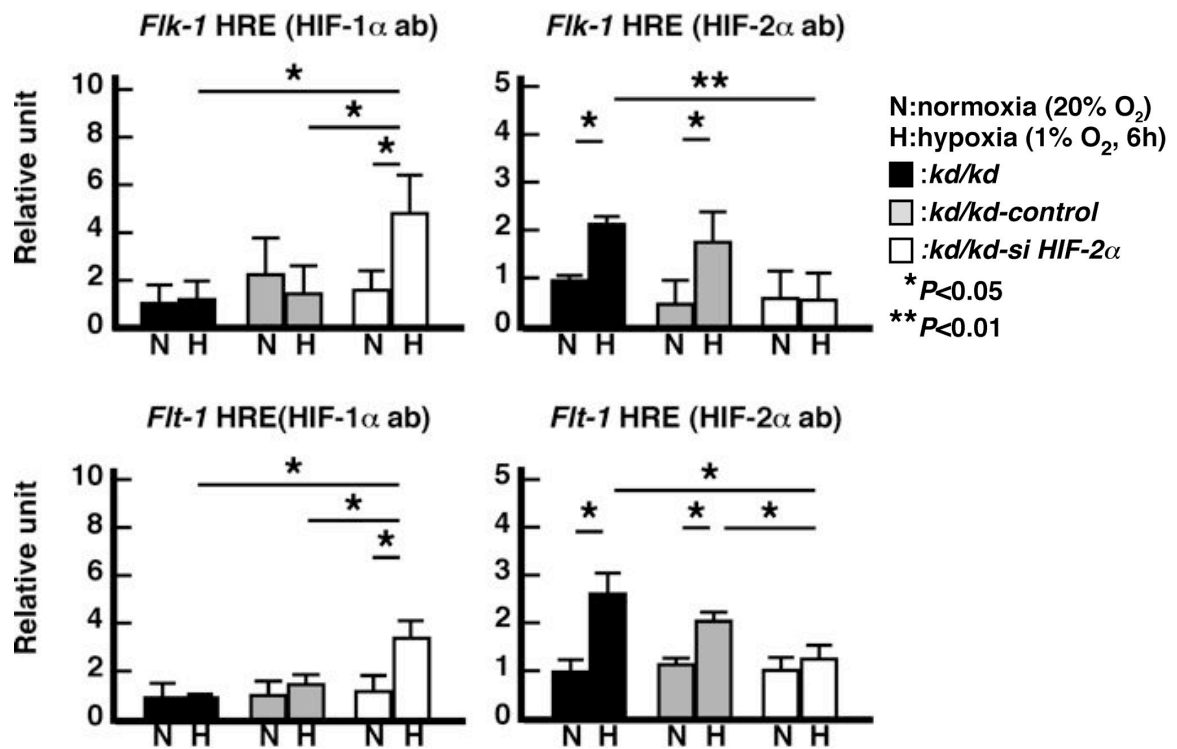


図 30. *kd/kd-si HIF-2 $\alpha$*  EC 細胞の *Flk-1*, *Flt-1* HRE 配列に対する HIF 結合能の解析

・*kd/kd*, *kd/kd-control*, *kd/kd-si HIF-2 $\alpha$*  の *Flk-1*, *Flt-1* HRE 配列に対して HIF-1 $\alpha$  はほぼ結合していない一方、低酸素下において HIF-2 $\alpha$  は高い割合で結合していた。

・*kd/kd-si HIF-2 $\alpha$*  の *Flk-1*, *Flt-1* HRE 配列に対して通常酸素下において HIF-1 $\alpha$  はほぼ結合していない一方、低酸素下において HIF-1 $\alpha$  の結合は増加していた。また、*kd/kd-si HIF-2 $\alpha$*  の *Flk-1*, *Flt-1* HRE 配列に対する HIF-2 $\alpha$  の結合率は有意に低下していた。

各 HIF タンパクの結合率は通常酸素下の *kd/kd* に対する結合率を 1 とした相対値で示した (ANOVA,  $n=4$ ,  $\text{mean} \pm \text{SD}$ )。

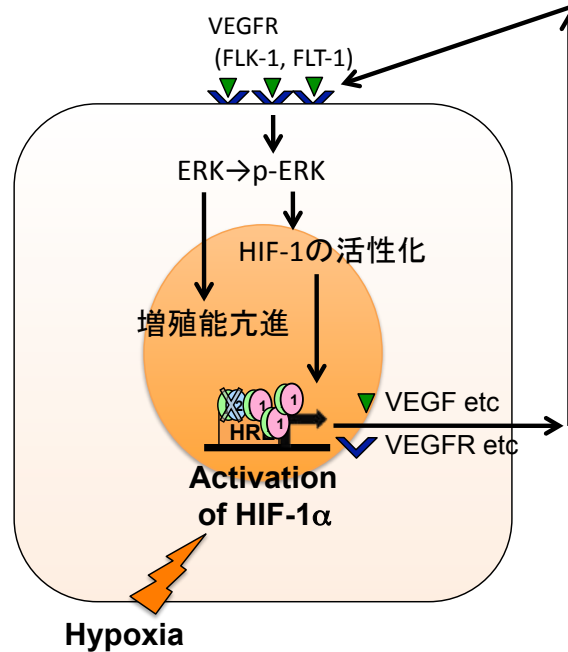


図 31. Scheme 1 (EC 細胞内における HIF-1 による HIF-2 発現減弱代償機構)

新生児期 (14 日齢) の *kd/null* 脾臓における低酸素状態及び HIF-2 の発現減弱は EC 内における HIF-1 $\alpha$  の安定化・蓄積に繋がり、HIF-1 下流の血管新生因子 (VEGF) や一部 HIF-2 下流の血管新生因子 (VEGFRs) の発現亢進をもたらす。VEGF/VEGFR シグナルは ERK1/2 を介して HIF-1 のリン酸化を亢進するため、正の制御による HIF-1 の発現・機能的亢進は強く支持される。また、ERK1/2 は他の細胞増殖因子や経路にも正に作用する。よって、新生児期の *kd/null* 脾臓 EC における増殖能の亢進は毛細血管網の拡充をもたらす。

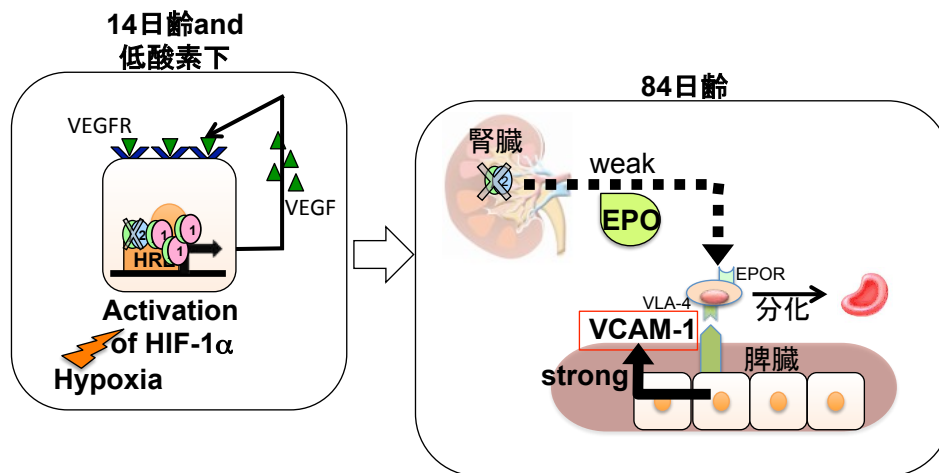


図 32. Scheme 2 (新生児時の *kd/null* 脾臓 EC の増殖亢進による成体時の赤血球造血能の支持

新生児期の *kd/null* 脾臓 EC における毛細血管網の拡充は赤脾髄における赤血球造血微小環境の赤血球造血支持能の向上に繋がる。よって、腎臓由来 EPO 発現量が *kd/kd* と *kd/null* 間において有意差がなかった一方で、成体 (84 日齢) における末梢血中赤血球数は *kd/kd* と比較して *kd/null* において有意に増加した。