

令和 2 年 9 月 17 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11414

研究課題名(和文)メタボロミクスによる傷害肺のエネルギー代謝の包括的解明と治療応用に向けた基盤研究

研究課題名(英文)Analysis of energy metabolism of injured lung and its application

研究代表者

太田 周平(Ota, Shuhei)

横浜市立大学・医学研究科・客員准教授

研究者番号：20381478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では最初に肺胞上皮細胞培養をLPS活性化好中球によって傷害を引き起こすin vitro実験系を構築し、傷害を受けた肺胞上皮細胞のエネルギー代謝が大きく変化することを見出した。マイクロアレイを用いて傷害を受けた細胞のトランスクリプトームを解析したところ、インスリン抵抗性経路に変化が見られ、エネルギー代謝の変化に関係している可能性が示唆された。これを踏まえ、インスリンシグナルを阻害したところ、肺胞上皮細胞の傷害を抑制することができたことから、インスリン抵抗性経路は肺傷害の治療標的になりうる可能性があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではARDSを模した培養細胞実験系を用いることで、傷害を受けた肺胞上皮細胞において大きなエネルギー代謝パターンの変化が生じ、包括的な遺伝子発現の解析からインスリン抵抗性経路がその背景機序の一つである可能性が示唆された。インスリン抵抗性は高血糖をもたらすことから忌避すべきものと考えられているが、本研究の結果からはインスリン抵抗性の活性化が臓器保護効果を持つ可能性が示唆され、今後の研究の発展につながる成果をえることができた。

研究成果の概要(英文)：We have established an in vitro model of ARDS by co-culture of alveolar epithelial cells and LPS-activated neutrophils. In that model, energy metabolism of injured alveolar epithelial cells is significantly altered. Transcriptomic analysis by microarray revealed that insulin resistance pathway may be associated with the altered energy metabolism. Moreover, pharmacological inhibition of insulin signaling pathway protects alveolar epithelial cells from the injury. These results suggest that insulin resistance pathway may be a therapeutic target for lung injury.

研究分野：集中治療医学

キーワード：ARDS エネルギー代謝

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

急性呼吸促進症候群 (ARDS) による肺傷害は決め手となる治療法が未だになく、集中治療領域における大きな課題である。ARDS では感染症や外傷などをきっかけに肺における強い炎症が組織傷害を引き起こす。肺組織が傷害される過程においては、エネルギー代謝が病態に大きく寄与していると考えられている。例えば、低酸素誘導性因子 (Hypoxia-Inducible Factor: HIF) は、高容量人工呼吸をされた肺において活性化されることが知られ、細胞のグルコース代謝フローを最適化し、エネルギー指標: アデノシン三リン酸 (ATP) を増加させることによって臓器保護効果をもたらす (Eckle et al, Plos Biol, 2013) と考えられている。また、近年、注目されている間葉系幹細胞 (MSC) も肺胞上皮細胞へミトコンドリアを受け渡すことによって ATP を増加させ、肺胞上皮を保護することが報告されている (Islam et al, Nat Med, 2012)。このようなエネルギー代謝の変化は敗血症性臓器不全においても見られ、炎症に伴う臓器不全の共通の機序の一つであると考えられる。

肺組織は様々な細胞種によって構成されているが、肺胞上皮細胞は I 型、II 型の 2 種類が存在する。I 型肺胞上皮細胞は肺胞におけるガス交換、バリアー及び免疫機能を担っており、一方の II 型肺胞上皮細胞はサーファクタント分泌や肺における固有幹細胞の役割を持つことから、肺胞上皮細胞の傷害は ARDS において重篤な組織傷害および呼吸不全につながる。従って ARDS 肺での肺胞上皮細胞の ATP 低下を抑制し、機能を維持、さらに細胞死を抑制することは肺傷害の有望な治療アプローチになりうる。申請者は、これを踏まえ、肺胞上皮細胞のエネルギー代謝を直接制御するという戦略によって、より効率的に肺胞上皮保護をもたらすことが期待できると考えた。しかしながら、ARDS における肺胞上皮細胞の代謝変化の全貌は明らかになっていない。近年、メタボロミクスをはじめとするオミックスの手法により、生命現象について網羅的にその全貌を捉えることができるようになってきている。申請者はこれらの手法を応用することで、ARDS における肺胞上皮細胞の代謝変化を明らかにし、治療応用に繋げられる可能性があると考えた。

2. 研究の目的

上記背景を踏まえ、本研究においては *in vitro* において傷害された肺胞上皮細胞のエネルギー代謝を包括的に解析した上で、変化の見られた代謝経路の制御をすることが肺胞上皮を傷害から保護できるかどうか検討を行うことが本研究の目的である。具体的には ARDS を模した *in vitro* 肺胞上皮細胞傷害系を確立し、最初に、傷害を受けた肺胞上皮細胞の解糖系、ミトコンドリア代謝について細胞の Extra Cellular Acidification Rate (ECAR) 及び、Oxygen Consumption Rate (OCR) を測定することで評価をした。その後、傷害を受けた肺胞上皮細胞のトランスクリプトーム解析を行った上で、一つの候補として変化が見られたインスリン抵抗性経路に関わる薬剤が *in vitro* において肺胞上皮細胞傷害にどのような影響を与えるか検討を行った。

3. 研究の方法

(1) ARDS を模した *in vitro* 肺胞上皮細胞傷害系の確立

マウスの肺胞上皮細胞株 MLE12 細胞の培養系に、LPS、好中球さらに好中球 + LPS を添加したうえで、WST-8 を用いた肺胞上皮細胞の生存率、フローサイトメトリーを用いた死細胞解析を行った。また、半透膜上に MLE12 細胞を培養した上で、同様の傷害系を作成し、FITC にて標識された 4kDa デキストラン (FITC-Dextran) の透過性を測定し、バリア機能が障害されるか検討を行った。

(2) 傷害を受けた肺胞上皮細胞の OCR, ECAR の測定

上記と同様にマウスの肺胞上皮細胞株 MLE12 細胞の培養系に、LPS、好中球さらに好中球 + LPS を添加したうえで、一定時間後に好中球を PBS で洗浄して取り除いた。細胞の OCR および ECAR 測定プローブ (Mito-Xpress 及び pH-Xpress, Luxel Biosciences) を添加し、蛍光プレートリーダーを用いて OCR, ECAR の経時的変化を測定した。ベースラインからの蛍光シグナルの変化率を、細胞数で補正することで 1 細胞あたりの OCR, ECAR を算出し、比較を行った。

(3) 傷害を受けた肺胞上皮細胞のトランスクリプトーム解析

LPS + 好中球によって傷害を受けた肺胞上皮細胞から RNA を抽出した上で、マイクロアレイに解析によるトランスクリプトーム解析を行った。マイクロアレイは Clariom™ S Assay Chip (マウス) を用いて外注サービスを利用し、Metascape (<http://metascape.org/>) を用いて Gene Ontology 解析を行った。

(4) インスリン抵抗性の制御による細胞保護効果の検討

インスリン抵抗性に関わるアダプタータンパクである Insulin Receptor Substrate (IRS) の発現量を RT-PCR および Western Blotting 法で測定した。さらに、Insulin Receptor および Insulin-like Growth Factor Receptor 双方の阻害剤である BMS-536924 を培養細胞傷害系に加えることで細胞の生存率および死細胞解析にどのような影響があるか検討を行った。

4. 研究成果

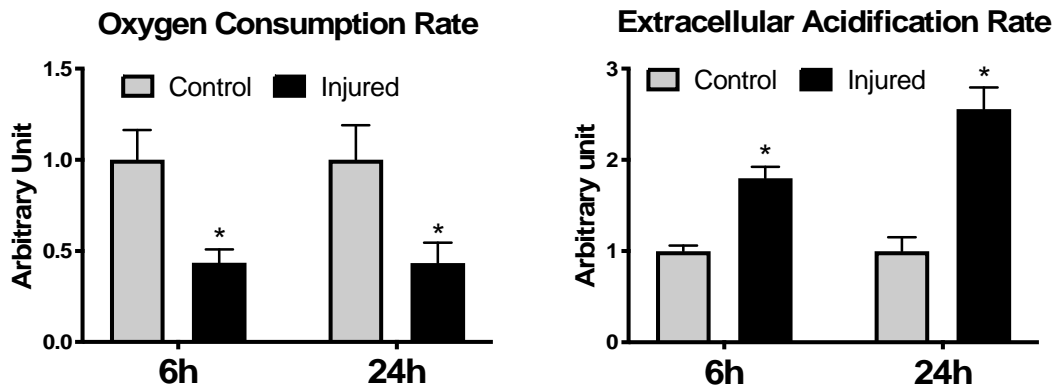
(1) ARDS を模した in vitro 肺胞上皮細胞傷害系の確立

マウス肺胞上皮細胞株 MLE12 細胞に LPS, 好中球, もしくは好中球 + LPS を添加し, 培養を行ったところ, 好中球 + LPS を添加することで, 細胞の生存率が大きく低下した. 一方, LPS のみでは細胞の生存率は全く低下せず, 好中球のみではわずかな低下しか見られなかった. フローサイトメトリーを用いた死細胞解析においても, 好中球 + LPS 添加群で明らかな死細胞の増加が認められた. さらに, 好中球 + LPS 添加によって半透膜上で培養した肺胞上皮細胞単層膜の FITC-Dextran の透過性が亢進することも確かめられた.

以上から, in vitro において肺胞上皮細胞培養系に好中球を添加した上で, LPS によって活性化させることで ARDS を模した肺胞上皮細胞の傷害が生じることが明らかとなった.

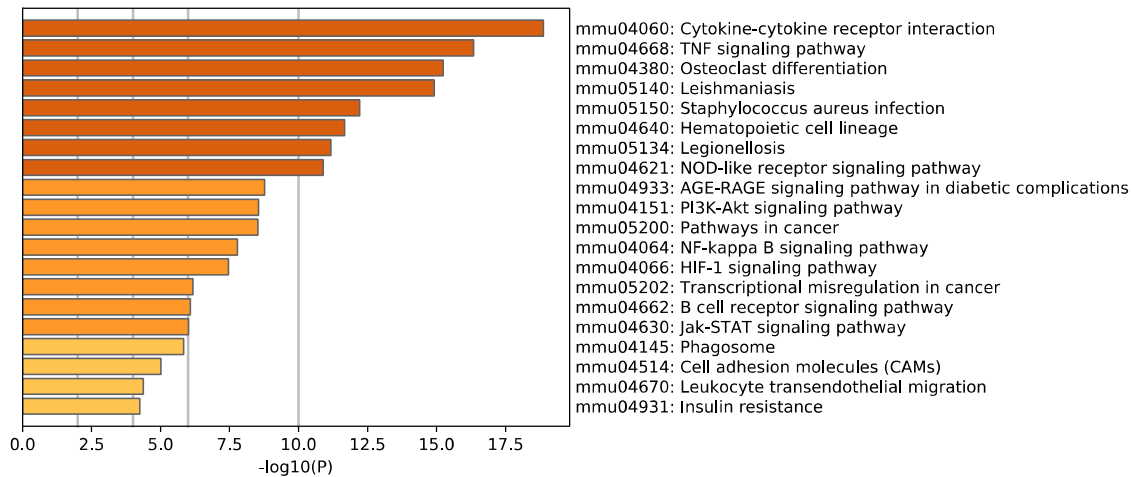
(2) 傷害を受けた肺胞上皮細胞の OCR, ECAR の測定

好中球 + LPS によって傷害を受けた MLE12 細胞において OCR の低下, ECAR の増加が見られた. 傷害を受けた肺胞上皮細胞では, ミトコンドリア代謝が抑制され, 解糖系による代謝が亢進することが明らかとなった.



(3) 傷害を受けた肺胞上皮細胞のトランスクリプトーム解析

好中球 + LPS によって傷害を受けた MLE12 細胞のトランスクリプトーム解析において傷害 24 時間後に有意に変化していると考えられた遺伝子群について Metascope を用いて Gene Ontology 解析を行ったところ, 炎症に関わるパスウェイ, PI3/Akt シグナルパスウェイ, HIF パスウェイ等に加えてインスリン抵抗性に関わる遺伝子群が変化していた.

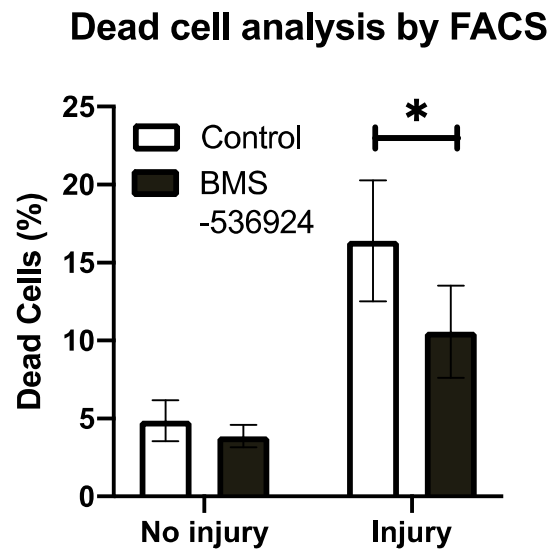
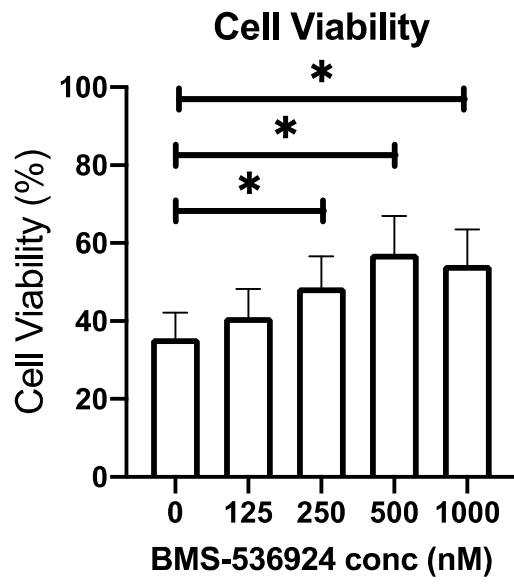


(4) インスリン抵抗性の制御による細胞保護効果の検討

好中球 + LPS によって傷害を受けた MLE12 細胞では IRS-1 の mRNA 発現およびタンパク発現量が有意に低下していることが確かめられた.

次に, インスリンレセプターおよび IGF レセプターの阻害剤である BMS-536924 を細胞障害系に加えた際の細胞生存率およびフローサイトメトリーでの死細胞解析を行ったところ, 細胞死が抑制されることが示された.

以上から ARDS を模した傷害を受けた肺胞上皮細胞ではインスリン抵抗性経路の活性化が見られ, 薬剤によってインスリン抵抗性を亢進させることは, 細胞保護効果をもたらす可能性があることが明らかになった.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tojo Kentaro, Tamada Nao, Nagamine Yusuke, Yazawa Takuya, Ota Shuhei, Goto Takahisa	4. 巻 32
2. 論文標題 Enhancement of glycolysis by inhibition of oxygen-sensing prolyl hydroxylases protects alveolar epithelial cells from acute lung injury	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The FASEB Journal	6. 最初と最後の頁 2258 ~ 2268
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201700888R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kentaro Tojo, Nao Tamada, Yusuke Nagamine, Shuhei Ota, Takahisa Goto
2. 発表標題 Metabolic reprogramming by inhibition of prolyl hydroxylases protects alveolar epithelial cells from LPS-neutrophil-induced energy derangements and cell death
3. 学会等名 Euroanaesthesia 2017, The European Anesthesiology Congress（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 東條 健太郎, 玉田 尚, 長嶺 祐介, 矢澤 卓也, 太田 周平, 後藤 隆久
2. 発表標題 Prolyl hydroxylase阻害は肺胞上皮細胞の代謝リプログラミングを介してLPS誘導性肺傷害を軽減する
3. 学会等名 第64回日本麻酔科学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	東條 健太郎 (Tojo Kentaro) (80737552)	横浜市立大学・医学・講師 (22701)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	宮崎 智之 (Miyazaki Tomoyuki) (30580724)	横浜市立大学・医学部・准教授 (22701)	
研究分担者	馬場 靖子 (Baba Yasuko) (80453041)	横浜市立大学・附属市民総合医療センター・准教授 (22701)	