

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2006-2008
 課題番号：18390429
 研究課題名（和文）低酸素誘導性因子 1 システムによる酸素ホメオスターシス維持の分子機序の解明
 研究課題名（英文） Investigation on the molecular mechanism of maintenance of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 system
 研究代表者
 広田 喜一 (HIROTA KIICHI)
 京都大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号:00283606

研究成果の概要：

酸素濃度感知性転写因子である hypoxia-inducible factor 1(HIF-1; 低酸素誘導性因子 1) と低酸素センサーの活性を指標に酸素ホメオスターシスを分子生物学を援用しリアルタイムでモニターする実験系を構築し、大きく分類して以下の実験結果を得た。

培養細胞、実験動物を用いて HIF-1 活性化をアッセイする実験系を確立した。in vitro 実験系で細胞酸素消費測定系を確立した。マウスを用いて HIF-1 の活性化をリアルタイムで検出する実験系を確立した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2007年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2008年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学 麻酔・蘇生学

キーワード：周術期管理学

1. 研究開始当初の背景

酸素は酸化的リン酸化の基質であり、その不足つまり低酸素、無酸素状態への生体の応答の研究は歴史的に古く酸素の発見の直後から行われてきた。このような低酸素研究上の近代化は1995年に米国ジョンスホプキンス大学

のGregg. L. Semenza博士（本研究課題の研究協力者）らによりなされた低酸素誘導性因子 1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1) の遺伝子単離によりもたらされた。HIF-1は二量体蛋白質で構成される転写因子であり各種解糖系酵素、グルコース輸送蛋白、血管内皮増

殖因子、造血因子エリスロポイエチンなど、多くの遺伝子の発現を転写レベルで制御している。HIF-1は環境の酸素分圧低下に反応し極めて特異的にかつ迅速に活性化する転写因子でありこの活性化を指標に細胞内低酸素感知機構の分子生物学が急速に発達した。現在ではほぼ全ての細胞における低酸素誘導性遺伝子発現制御にHIF-1とその活性を制御する低酸素感知システムが重要な枠組みを提供していることが明らかになっている。

申請者らは、いままでHIF-1の活性化調節に関して基礎的また臨床的な多面的な研究を展開してきた。2001年には、細胞の低酸素感知機構の一翼を担う低酸素センサー factor inhibiting HIF-1 (FIH-1) の遺伝子単離に Semenza博士と共同で成功した。さらに研究を進めさまざまな周術期使用薬剤がHIF-1の活性化に及ぼす影響を継続して報告してきた。最近では、HIF-1がエネルギー代謝とくにブドウ糖代謝の変換を司りマクロファージの機能の維持に重要な役割を果たしていることを報告した。

さらに近年生体の低酸素状態を受容する転写因子と考えられてきたHIF-1が、ミトコンドリアの機能を調整することで細胞のエネルギー産生のモードを酸化リン酸化主体なものから解糖主体なものへと変換させる役割を担っていることが明らかになってきた。

このような事実を背景として、申請者らは、周術期の生体の酸素代謝の詳細を細胞・臓器レベルであきらかにするという研究を着想した。

2. 研究の目的

細胞、組織が置かれた環境下でいかに酸素分圧の変化を感知し遺伝子の発現を通じて酸素ホメオスタシスの維持が行われているかを理解す

ることは、手術室、集中治療室での患者管理の確立にとって必須のことである。

本申請ではこの分子過程を解糖系・エネルギー代謝の律速酵素、NO,COの生成酵素などの発現を制御する酸素濃度感知性転写因子である hypoxia-inducible factor 1(HIF-1; 低酸素誘導性因子 1)と低酸素センサーの活性を指標に明らかにすることを目指す。つまり、培養細胞を用いた実験系とラットや遺伝子改変マウスを用いた実験系を用い酸素供給と需要のバランスで決定される酸素ホメオスタシスを分子生物学を援用しリアルタイムでモニターする実験系を *in vitro* また *in vivo* で構築し、低酸素応答性の遺伝子発現またその結果としての細胞、組織の表現型と合わせて評価することが本申請の目的であった。

3. 研究の方法

助成申請期間の3年間に遂行する予定の実験計画は大きく二つの柱から構成された。

つまり

- (1) 培養細胞を用いた検討
- (2) 実験小動物を用いた検討

である。

- (1) 培養細胞を用いた検討

培養細胞として各種培養細胞株と初代培養細胞を使用した。

①細胞をめぐる環境が低酸素応答に与える影響とその分子機序の探求

細胞の培養条件を変化させHIF-1の活性化状態、低酸素センサー分子の酵素活性を調べた。

培養条件はpH、グルコース濃度、グルコース代謝物（乳酸、ピルビン酸など）、血清の有無、浸透圧など項目について変化させ検討した。

② 細胞の由来する組織による低酸素応答の違いとその分子機序の探求

この研究には主に初代培養細胞を用いる。血管内皮細胞、血管平滑筋細胞の組み合わせを初期段階として検討しさらに肝臓細胞、尿細管上皮細胞（腎臓）、神経細胞を検討した。

③ ミトコンドリアにおける酸素消費が低酸素応答に与える影響とその分子機序の探求

細胞に供給された酸素の細胞内濃度は細胞での酸素消費つまりミトコンドリアの電子伝達系での酸素利用の程度によって決定されるはずである。様々なミトコンドリアの電子伝達系の阻害剤(Rotenone, antimycin, シアン化合物など)を用いHIF-1の活性化を検討する。細胞内レドックス制御状態(GSH/GSSGの測定、レドックス蛋白質の発現状況)の検討を同時に行った。

④ 培養細胞において5xHRE-ODD-Luciferaseレポーターを用いたアッセイを行い細胞レベルで酸素負荷をリアルタイムでモニターするシステムの構築を目指した。

(2) 実験小動物を用いた検討

ラットを用いる検討と遺伝改変マウスを用いる検討に分けて実施した。

マウスをもちいた検討には、5xHRE-ODD-Luciferaseレポーターを組み込んだトランスジェニックマウスを用いて局所の酸素分圧によってルシフェラーゼ蛋白質の発現がリアルタイムにモニターできる実験系を用いた。

① ラット・マウスを用いて検討する項目（担当:広田、高淵）

検討の方法は#1での項目を適応するが、組織を切片して免疫染色やin situ hybridizationも加える。血中のエリスロポイエチンやVEGFのELISA法による検出も行う。

② 人工呼吸を施し吸入酸素分圧を変化させ動脈血酸素分圧をコントロールし各臓器でのHIF-1の活性化と支配遺伝子の発現状態を検討した。

③ 開腹し手術操作を加え肝臓、腸管、腎臓への血流をコントロールしHIF-1の活性化と支配遺伝子の発現状態を検討する。

酸素電極を用いた酸素分圧の測定を同時に加えて、低酸素センサー-HIF-1系との相関を検討した。

4. 研究成果

酸素濃度感知性転写因子であるhypoxia-inducible factor 1(HIF-1; 低酸素誘導性因子 1)と低酸素センサーの活性を指標にして培養細胞を用いた実験系とラットや遺伝子改変マウスを用いた実験系を用い、また酸素供給と需要のバランスで決定される酸素ホメオスターシスをリアルタイムでモニターする実験系をin vitro また in vivo で構築し、低酸素応答性の遺伝子発現またその結果としての細胞、組織の表現型と合わせて評価するための実験系を確立し大きく分類して以下の実験結果を得た。

研究成果は、学会、研究会、公刊などにより公表した。

一部の研究成果は現在公刊の準備中である

(1) 培養細胞を用いた実験系の確立

細胞をめぐる環境が低酸素応答に与える影響とその分子機序の探求（培養条件はpH、グルコース濃度、乳酸、ピルビン酸などのグルコース代謝物、血清の有無、浸透圧など項目について変化させ検討した）、細胞の由来する組織による低酸素応答の違いとその分子機序の探求（血管内皮細胞、血管平滑筋細胞、肝臓細胞、尿細管上皮細胞、神経細胞を検討の対象とした）、ミトコンドリアにおける酸素消費

が低酸素応答に与える影響とその分子機序の探求、培養細胞において5xHRE-ODD-Luciferaseレポーターを用いたアッセイを行い細胞レベルで酸素負荷をリアルタイムでモニターするシステムの構築を遂行した。

(2) in vitro細胞酸素消費測定系の確立
クランク電極を用いた酸素分圧測定を使い、培養細胞の酸素消費量を測定する実験系を確立した。

各種のミトコンドリア電子伝達系の阻害薬を用いた検討により細胞の種類により酸素消費量のミトコンドリアへの依存率に差がある事が判明した。

同時に、細胞内ATP濃度、細胞培養上清中の乳酸・ピルビン酸の濃度の測定系を確立した。

(3) 5xHRE-ODD-Luciferaseレポーターを組み込んだ遺伝子改変マウスを用いて、内腸骨動脈の結紮モデルを構築しレポーターを用いたリアルタイムのHIF-1の活性化が、実際の遺伝子発現と良く相関する事を見いだした。

(4) 内毒素LPSがHIF-1の活性化を引き起こす事細胞のブドウ糖代謝経路を解糖主体のものに変換させる活性を持つ事を見いだした。

(5) 低体温が生体の低酸素誘導性の遺伝子発現に及ぼす影響を検討するため培養細胞とマウスを用いた実験系を構築して以下の様な結果を得た。

摂氏32度程度の低温は4時間以内では培養細胞、脳における低酸素誘導性のHIF-1活性化やその下流遺伝子発現に大きな影響を及ぼさない。一方24時間にわたる低温への暴露によりHIF-1の活性化が阻害された。

(6) マウス個体を低酸素環境下で飼育し薬剤を処理を施し脳、肝臓、心臓、肺、筋肉など各種臓器のHIF-1活性化をアッセイする実験系を確立した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計15件)

1. Oda S, Oda T, Takabuchi S, Nishi K, Wakamatsu T, Tanaka T, Adachi T, Fukuda K, Nohara R, Hirota K. The calcium channel blocker cilnidipine selectively suppresses hypoxia-inducible factor 1 activity in vascular cells. *Eur J Pharmacol*. 2009;606:130-6.(査読あり)

2. 広田 喜一, 田中 具治. 低酸素応答と低酸素センサー. *Life Support and Anesthesia*. 2008;15:238-43. (査読無し)

3. 広田 喜一. ハイポキシア生物学-酸素代謝からみる生命現象の方程式. *医学のあゆみ*. 2008;225. (査読無し)

4. Oda S, Oda T, Nishi K, Takabuchi S, Wakamatsu T, Tanaka T, Adachi T, Fukuda K, Semenza GL, Hirota K. Macrophage migration inhibitory factor activates hypoxia-inducible factor in a p53-dependent manner. *PLoS ONE*. 2008;3:e2215. (査読あり)

5. Nishi K, Oda T, Takabuchi S, Oda S, Fukuda K, Adachi T, Semenza GL, Shingu K, Hirota K. LPS induces hypoxia-inducible factor 1 activation in macrophage-differentiated cells in a reactive oxygen species-dependent manner. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10:983-96. (査読あり)

6. Kimura M, Takabuchi S, Tanaka T, Murata M, Nishi K, Oda S, Oda T, Kanai M, Fukuda K, Kizaka-Kondoh S, Adachi T, Takabayashi A, Semenza GL, Hirota K. n-Propyl gallate activates hypoxia-inducible factor 1 by modulating intracellular oxygen-sensing

systems. Biochem J. 2008;411:97-105. (査読あり)

7. 広田 喜一. 細胞の低酸素応答機構-低酸素センサーを巡る論争. 実験医学. 2007;25:2120-6. (査読無し)

8. Sommani P, Yamashita K, Miyoshi T, Tsunemine H, Kodaki T, Mori H, Hirota K, Arai T, Sasada M, Makino K. Inhibitory Effect of 6-Formylpterin on HIF-1alpha Protein Accumulation. Biol Pharm Bull. 2007;30:2181-4. (査読あり)

9. Li X, Kimura H, Hirota K, Sugimoto H, Kimura N, Takahashi N, Fujii H, Yoshida H. Hypoxia reduces the expression and anti-inflammatory effects of peroxisome proliferator-activated receptor-g in human proximal renal tubular cells. Nephrol Dial Transplant. 2007;22:1041-51. (査読あり)

10. Hiraga T, Kizaka-Kondoh S, Hirota K, Hiraoka M, Yoneda T. Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 expression enhance osteolytic bone metastases of breast cancer. Cancer research. 2007;67:4157-63. (査読あり)

11. Adachi T, Hirota K, Hara T, Sasaki Y, Hara Y. Exhaled carbon monoxide levels change in relation to inspired oxygen fraction during general anesthesia. Anesth Analg. 2007;105:696-9. (査読あり)

12. 広田喜一. 低酸素センサー-細胞は低酸素をいかに関知するか-. Anesthesia Network. 2006;10:11-5. (査読無し)

13. Tsukiyama F, Nakai Y, Yoshida M, Tokuhara T, Hirota K, Sakai A, Hayashi H, Katsumata T. Gallate, the component of HIF-inducing catechins, inhibits HIF prolyl hydroxylase. Biochem Biophys Res Commun. 2006;351:234-9. (査読あり)

14. Oda T, Hirota K, Nishi K, Takabuchi S, Oda S, Yamada H, Arai T, Fukuda K, Kita T, Adachi T, Semenza GL, Nohara R. Activation of hypoxia-inducible factor 1 during macrophage differentiation. Am J Physiol Cell Physiol. 2006;291:C104-C13. (査読あり)

15. Hirota K, Semenza GL. Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. Crit Rev Oncol Hematol. 2006;59:15-26. (査読あり)

[学会発表] (計 7件)

広田喜一 生体の低酸素応答の分子生物学：基礎から臨床応用まで 日本麻酔科学会 第53回学術集会 第53回学術集会 2006年6月1日 神戸市

若松拓彦 他 低酸素誘導性遺伝子発現に及ぼすチオペンタールの影響 日本麻酔科学会 第53回学術集会 2006年6月1日 神戸市

田中 具治 他 低酸素誘導性遺伝子応答に低温が及ぼす影響 日本麻酔科学会 第54回学術集会 2007年6月1日 札幌市

リドカインは上皮成長因子受容体シグナル伝達系非依存的に細胞増殖を抑制する

若松 拓彦 他 日本麻酔科学会 第54回学術集会 2007年5月31日 札幌市

田中 具治 他 低酸素性遺伝子応答に温度変化が及ぼす影響 日本麻酔科学会 第54回学術集会 2008年6月12日 横浜市

Takehiko Adachi, Seiko Oda, Satoshi Takabuchi, Kenichiro Nishi, Kiichi Hirota

The calcium channel blocker cilnidipine selectively suppresses hypoxia-inducible factor 1 activity in vascular endothelial and smooth muscle cells

2008 Annual Meeting, American Society of Anesthesiologists, Orland, 2008/10/18-22

Kiichi Hirota, Seiko Oda, Satoshi Takabuchi, Takuhiko Wakamatsu, Tomoharu Tanaka, Kazuhiko Fukuda

Macrophage migration inhibitory factor activates hypoxia-inducible factor 1 under hypoxic conditions in a p53-dependent manner

Keystone symposia Molecular, cellular, physiological, and pathogenic responses to hypoxia 2008/01/16 Vancouver, Canada

〔図書〕（計1件）

広田喜一、克誠堂出版、周術期の呼吸管理(低酸素性肺障害の分子生物学)、2007年、p33-p47

6. 研究組織

(1) 研究代表者

広田 喜一(HIROTA KIICHI)

京都大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号:00283606

(2) 研究分担者

高淵 聡史(TAKABUCHI SATOSHI)

京都大学・大学院医学研究科・研究員

研究者番号:90402841

近藤 科江(KONDOH SHINAE)

京都大学・大学院医学研究科・特任教授

研究者番号:40314182

原田 浩(HARADA HIROSHI)

京都大学・大学院医学研究科・特任講師

研究者番号:80362531