

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：74314  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2018～2020  
課題番号：18K08877  
研究課題名(和文) 血管内皮バリア機能制御におけるIFN- $\beta$ 1aシグナルと低酸素応答系のクロストーク

研究課題名(英文) The crosstalk between hypoxic reaction system and IFN $\beta$ -1a signal at the control of vascular endothelial barrier function

## 研究代表者

足立 健彦 (Adachi, Takehiko)

公益財団法人田附興風会・医学研究所 第9研究部・部長

研究者番号：90252428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：培養細胞を用いて、IFN- $\beta$ 1aによるCD73の発現誘導の役割と、細胞間接合タンパク質への影響を調べた。IFN- $\beta$ 1aは、内皮細胞のCD73の発現を時間および用量に依存して増加させた。IFN- $\beta$ 1aは細胞間透過性を低下させ、その保護効果はCD73の活性と発現の両方に介在することを明らかにした。また、IFN- $\beta$ 1aはCD73依存的に接合タンパク質の局在や細胞骨格のリモデリングを制御することを明らかにした。結論として、IFN- $\beta$ 1aは、CD73依存的に、ジャンクションタンパク質の発現と局在の両方を調節することで、内皮細胞のバリア機能を高めた。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

全身炎症の拡大が急性呼吸窮迫症候群(Acute Respiratory Distress Syndrome: ARDS)を含んだ多臓器不全の引き金を引く。一旦発生したARDSの治療は困難であり、治療薬もステロイド剤の使用などが試みられてきたが限定された効果のみしか得られていないという現状がある。本研究はIFN- $\beta$ 1a製剤が血管内皮の細胞間バリア機能を強化することでこの病態の改善につながる可能性をしめした。この観点で、医学的・社会的な意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of IFN- $\beta$ 1a in inducing CD73 expression and its effect on junction proteins. IFN- $\beta$ 1a increased CD73 expression in endothelial cells in a time- and dose-dependent manner. IFN- $\beta$ 1a reduced intercellular permeability, and the effect was mediated by both CD73 activity and expression. We found that effect of IFN- $\beta$ 1a was mediated by both CD73 activity and expression and that IFN- $\beta$ 1a regulates the localization of junctional proteins and cytoskeletal remodeling in a CD73-dependent manner and that IFN- $\beta$ 1a increased the expression of junctional proteins, which are important for barrier function maintenance. Analysis using adenosine and an inhibitor of CD73 enzymatic activity suggested that the protective effect of IFN- $\beta$ 1a on barrier function may be mediated through an adenosine-independent pathway.

研究分野：麻酔科学

キーワード：急性呼吸窮迫症候群 interferon- $\beta$ 1a 細胞間バリア機能 CD73 低酸素誘導性因子 CD39

## 1. 研究開始当初の背景

感染症や大規模な組織損傷を伴う状況において全身炎症(SIRS)の拡大が急性呼吸窮迫症候群(Acute Respiratory Distress Syndrome: ARDS)を含んだ多臓器不全の引き金を引く。一旦発生した ARDS の治療は困難であり、治療薬もステロイド剤の使用などが試みられてきたが限定された効果のみしか得られていないという現状がある。

多発性硬化症の治療薬として使用されている interferon  $\beta$ -1a (IFN  $\beta$ -1a)が ARDS の病態改善をもたらすことが注目されている。海外での臨床応用の結果(Lancet Respir Med. 2014 PMID 24503265)を受け本邦でも IFN  $\beta$ -1a 製剤の臨床試験が行われた。一方、IFN  $\beta$ -1a による血管内皮細胞での Ecto-5'-nucleotidase 活性を持つ CD73 分子の発現とその結果としての細胞外アデノシン濃度の上昇がその分子基盤にあると考えられているが誘導の標的細胞・責任転写因子をはじめ CD73 発現とその下流シグナル、細胞間バリア機能の増強の分子機序は十分には明らかになっていない。

代表研究者の足立と分担研究者の広田はこれまで15年間細胞の低酸素応答のマスター転写因子である低酸素誘導性因子1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)の活性化と肺傷害関連についての研究を培養細胞・動物実験を用い分子生物学・細胞生物学を手法として用いて継続してきた。その過程で HIF-1 が低酸素のみならず TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、LPS などの炎症性サイトカインや物質によっても活性化されること、HIF-1 活性化は CD73 の mRNA 転写亢進をもたらす事を明らかにしてきた。さらに HIF-1 はバリア形成において細胞間接着分子の遺伝子発現において重要な役割を果たすことも明らかにしてきた。

この背景から IFN  $\beta$ -1a による細胞間バリア機能の増強の分子機序に置ける HIF-1 の役割を明らかにするという研究を計画した。

## 2. 研究の目的

IFN  $\beta$ -1a の細胞間バリア機能への影響を IFN  $\beta$ -1a シグナル伝達、肺内酸素分圧・サイトカイン環境と関連付けた転写因子 HIF-1 活性化とのクロストークの観点で解明することが本研究の目的である。この目的の達成のため血管内皮初代培養細胞、肺胞上皮・腸管上皮由来細胞株に加えてマウス急性肺障害モデルを用いて Ecto-5'-nucleotidase 活性を持つ CD73 分子とその関連分子 CD39 の発現とそれらによる細胞外アデノシン産生に依存した細胞間バリア機能維持のメカニズムを IFN  $\beta$ -1a シグナルと HIF-1 による低酸素応答システムとのクロストークの観点から細胞生物学・分子生物学・バイオインフォマティクスを統合した以下の手法で解明する。

(1) CD73・CD39 mRNA・蛋白質発現と 5'-nucleotidase 活性  
IFN  $\beta$ -1a による CD73 mRNA 誘導の分子機構を明らかにする。

(2) 細胞間バリア機能

血管透過性は、蛍光物質 FITC-デキストラン(約 70 kD, アルブミンと同等の分子量)を用いて定量化する。単層細胞をコンフルエントまで培養して細胞間接着によるバリアを形成させ FITC-デキストランが透過できない状態を作る。様々な外部刺激により細胞間接着メカニズムが破壊されると、細胞間隙中に隙間ができ、FITC-デキストランが下部のチャンバーに拡散するという測定原理を用いてバリア機能を測定する。

## 3. 研究の方法

以下の研究手法を用いて研究を遂行した。

(1)細胞

血管内皮細胞として、ヒトさい帯静脈内皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells:HUVEC)・ヒト肺微小血管内皮細胞(Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells:HPMEC)、肺胞上皮細胞の in vitro モデルとして A549 細胞株を用いた。

(2) CD73・CD39 分子の発現・酵素活性の制御機構の解明

CD73・CD39, HIF-1 分子発現を様々な手法で検出する(表1)  
HUVEC, HPMEC, A549 細胞に IFN  $\beta$ -1a, TNF- $\alpha$ , LPS 処理を 20%酸素環境または 1%酸素環境で行い CD73 分子の発現を mRNA(qRT-PCR 法), 蛋白質レベル(特異抗体を用いた Western blot 法, フローサイトメトリ法, 組織染色)で検出する。関連分子 CD39(ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1)の発現も同様に検討する。

アデノシン産生アッセイ

CD73, CD39 の活性を反映する 5'-Nucleosidase(5'-ヌクレオチダーゼ)活性測定とアデノシン産生アッセイを行う。キットが市販されているので用いる。

次世代シーケンサを用いた RNA-seq 解析  
得られた配列を元に各条件で発現比較解析を行い結果について遺伝子オントロジーエンリッチ解析を行い統計学的に発現変化量が有意なパスウェイ・遺伝子群を見いだす。

### (3) 接着関連分子の発現変化の解明

タイトジャンクションを形成する蛋白質である Occludin、Claudin、ZO-1 の発現を検討する。予備的に行ったエンリッチ解析の結果から選択した分子については特に入念に発現量の検討を行う。

### (4) 細胞間バリア機能への影響の解明

#### In vitro アッセイ

細胞間バリアを HUVEC, HPMEC, A549 細胞を用いて形成して IFN  $\gamma$ -1a やサイトカイン・培養酸素分圧がその機能に与える影響を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) CD73・CD39 分子の発現・酵素活性

HUVEC, HPMEC を IFN  $\gamma$ -1a で処理したところ 1000 U/ml, 24 h の範囲で濃度まで濃度、時間依存性に CD73 の mRNA, 蛋白質の発現誘導が観察された。同時に CD39, A2BR の発現誘導が認められた。

HIF-1 蛋白質の発現の変化は観察されなかった。

### (2) アデノシン産生アッセイ

IFN  $\gamma$ -1a 刺激により細胞培養液へのアデノシンの濃度の上昇が確認できた。

### (3) 次世代シーケンサを用いた RNA-seq 解析

網羅的な遺伝子発現を解析したところ、KEGG の Cell adhesion molecules(CAM)の pathway が enrich されて IFN  $\gamma$ -1a が細胞間接着分子の遺伝子発現に大きな関わりを持つことが示された。E-cadherin, ZO-1, Occludin, Claudin-5 については個別に RT-PCR 法を用いて mRNA の発現をアッセイした結果 IFN  $\gamma$ -1a 処理により発現上昇が観察された。

### (4) 接着関連分子の発現変化

E-cadherin, ZO-1, Occludin, Claudin-5 の細胞内局在を免疫組織染色法で調べた所、IFN  $\gamma$ -1a 処理により、これら接着分子の細胞内局在が変化して細胞膜に集積することが判明した。

### (5) 細胞間バリア機能の変化

細胞間バリア機能をアッセイするシステムを構築した。IFN  $\gamma$ -1a は LPS 処理による細胞間バリアの透過性の亢進に拮抗して細胞間バリアを強化する事を見いだした。なおこの細胞間バリア強化は CD73 分子の発現に依存的であり Ecto-5'-nucleotidase 活性阻害薬により部分的に拮抗された。一方、HIF-1 活性の 1% O<sub>2</sub> 環境への曝露や HIF-1 水酸化酵素阻害薬を用いた外因的な活性化は単独で透過性を亢進する事が判明した。

これらの実験により以下の結論が導かれた。

培養細胞を用いて、IFN  $\gamma$ -1a による CD73 の発現誘導の役割と、細胞間接合タンパク質への影響を調べた。IFN  $\gamma$ -1a は、内皮細胞の CD73 の発現を時間および用量に依存して増加させた。IFN  $\gamma$ -1a は細胞間透過性を低下させ、その保護効果は CD73 の活性と発現の両方に介在することを明らかにした。また、IFN  $\gamma$ -1a は CD73 依存的に接合タンパク質の局在や細胞骨格のリモデリングを制御することを明らかにした。また、IFN  $\gamma$ -1a は、接合タンパク質、特にバリア機能維持に重要な細胞間接着タンパク質である E-カドヘリンの発現を増加させることも明らかにした。アデノシンや CD73 活性阻害薬を用いた解析の結果、IFN  $\gamma$ -1a のバリア機能に対する保護効果は、アデノシン非依存的な経路を介している可能性が示唆された。

結論として、IFN  $\gamma$ -1a は、CD73 依存的に、ジャンクションタンパク質の発現と局在の両方を調節することで、内皮細胞のバリア機能を高めた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hirota K	4. 巻 8
2. 論文標題 Transcription Factor HIFs and its Implication for Medicine.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 2
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines8020032.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Bono H, Hirota K.	4. 巻 8
2. 論文標題 Meta-Analysis of Hypoxic Transcriptomes from Public Databases.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biomedicines8010010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 広田 喜一	4. 巻 37
2. 論文標題 2019年ノーベル生理学・医学賞解説レビュー 酸素生物学の「現代」の建設,	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 3249-3250
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 広田 喜一	4. 巻 271
2. 論文標題 【ノーベル生理学・医学賞2019】低酸素生物学から酸素・エネルギー生物学へ	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 1251-1253
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 C. Sumi, A. Okamoto, H. Tanaka, M. Kusunoki, T. Shoji, T. Uba, T. Adachi, T. Iwai, K. Nishi, H. Harada, H. Bono, Y. Matsuo, K. Hirota	4. 巻 8
2. 論文標題 Suppression of mitochondrial oxygen metabolism mediated by the transcription factor HIF-1 alleviates propofol-induced cell toxicity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 8987
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-27220-8	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 -

1. 著者名 C. Sumi, A. Okamoto, H. Tanaka, K. Nishi, M. Kusunoki, T. Shoji, T. Uba, Y. Matsuo, T. Adachi, J.I. Hayashi, K. Takenaga, K. Hirota	4. 巻 15
2. 論文標題 Propofol induces a metabolic switch to glycolysis and cell death in a mitochondrial electron transport chain-dependent manner	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0192796
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0192796	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3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 広田 喜一
2. 発表標題 「Hypoxia and Beyond:HIF-1 から炎症・肺傷害へ」
3. 学会等名 第230回 原医研セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松川志乃、甲斐慎一、松尾禎之、足立健彦、福田和彦、広田喜一
2. 発表標題 インターフェロン 1-aはCD73の発現を制御しLPSによる肺血管透過性亢進を改善する
3. 学会等名 第47回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 広田喜一
2. 発表標題 「酸素の問題点を考える」酸素による肺への影響:肺の硝子膜様変性、COPD、間質性肺炎
3. 学会等名 第22回日本医療ガス学会 学術大会
4. 発表年 2018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	広田 喜一  (Hirota Kichi)  (00283606)	関西医科大学・医学部・教授    (34417)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------