

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17330

研究課題名(和文) 解糖阻害薬の早産児敗血症保護効果の解明

研究課題名(英文) Evaluation of PFKFB3 inhibition in neonatal mice with LPS-induced acute lung injury

研究代表者

生田 寿彦 (Ikuta, Toshihiko)

神戸大学・医学部附属病院・医学研究員

研究者番号：40814588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：新生児急性肺障害には肺血管内皮細胞の機能障害が深く関与しており、その細胞代謝は解糖系律速酵素である6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3 (PFKFB3)に依存している。本研究では、薬物的PFKFB3阻害が、新生仔マウスを用いたlipopolysaccharide(LPS)誘導性急性肺障害モデルにおける血管透過性を亢進させ、急性肺障害を増悪させること、さらにLPS処理を行った肺動脈血管内皮細胞における細胞間接着因子、特にtight junction関連分子であるclaudin 1の遺伝子発現を抑制することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新生児急性肺障害は高度な炎症と続発するサーファクタント欠乏を特徴とする肺障害と定義されているが、病態解明は不十分であり、特異的な治療法も少ない。本研究では、解糖系律速酵素であるPFKFB3が新生仔マウスを用いたLPS誘導性肺障害モデルにおける肺血管バリア機能の維持に重要であり、PFKFB3阻害が細胞間接着因子、特にtight junction関連分子であるclaudin 1の遺伝子発現を抑制することを明らかにした。本研究の結果は、PFKFB3が新生急性肺障害の治療標的や予後予測因子となり得ることを示唆するものであり、その学術的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：Acute lung injury (ALI) in neonates is strongly related to the dysfunction of pulmonary vascular endothelial cells in which the cellular metabolism is highly dependent on glycolysis, particularly regulated by 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3 (PFKFB3). We evaluated the effects of pharmacological PFKFB3 inhibition in a neonatal mouse model of lipopolysaccharide (LPS)-induced ALI and in LPS-treated human pulmonary artery endothelial cells (HPAEC). Inhibition of PFKFB3 exacerbates LPS-induced ALI with heightened vascular permeability in neonatal mice, and suppressed gene expression of adhesion molecules, especially Claudin1, a tight junction-related molecule in LPS-treated HPAEC. This suggests that the upregulation of PFKFB3 in response to inflammatory stimulus might play a crucial role to maintain the integrity of HPAEC and is protective in neonatal ALI through preserving pulmonary vascular barrier function.

研究分野：新生児学

キーワード：PFKFB3 glycolysis acute lung injury endothelial cells neonatal mouse

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 急性肺障害とは、高度の炎症と続発性サーファクタント欠乏を特徴とする肺疾患であり、致死的な呼吸不全の原因となるが、成人及び小児と比較して、新生児の急性肺障害の病態解明は進んでいない。急性肺障害の病態形成には、肺血管内皮細胞の機能不全が強く関係しており、特に肺血管内皮細胞が形成するバリア機構の破綻は、血管透過性亢進に伴う間質浮腫、白血球浸潤の増加に伴う炎症反応の増悪をきたし、急性肺障害の増悪につながる。小児の急性肺障害の死亡率が成人と比較して有意に低いことが分かっているが、炎症状況下での新生児マウスの血管透過性が成獣マウスと比較して有意に保たれていることから、年齢による血管内皮機能の違いが急性肺障害の病態に相違を生じている可能性がある。

(2) 細胞代謝は細胞の恒常性維持にとって重要であり、肺血管内皮細胞の代謝は解糖に大きく依存している。PFKFB3 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3) は肺血管内皮細胞に強く発現する解糖系律速酵素の一つであり、F6P から F2,6P2 の合成を促進させる。F2,6P2 は PFK1 を活性化させ、PFK1 は F6P から F1,6P2 の合成を促進するため、結果として解糖を促進させることになる。PFKFB3 による解糖亢進は、ヒストンのアセチル化を介して、血管内皮細胞の増殖や恒常性維持に関係する遺伝子発現を制御している。成獣マウスによる検討では、Lipopolysaccharide (LPS) 投与により肺血管内皮細胞における PFKFB3 の遺伝子発現が上昇すること、さらに LPS 投与または盲腸結紮穿孔により惹起させた急性肺障害が、PFKFB3 阻害薬である 3-(3-pyridinyl)-1-(4-pyridinyl)-2-propen-1-one (3PO) の投与により改善することが報告されているが (Gong Y et al. Biochem Biophys Res Commun 2017) (Wang L et al. Pharmacol Res 2019)、新生児マウスを用いた同様の検討はなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、炎症状況下における血管内皮細胞での解糖亢進は血管内皮細胞機能を維持する上で必要な変化であるとの仮定に基づいて、LPS を投与した新生児マウスを用いた LPS 誘導性急性肺障害モデルにおいて、3PO による PFKFB3 阻害の効果を検証するとともに、LPS 処理を施したヒト肺動脈血管内皮細胞 (HPAECs) を用いて、その機序を明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 新生児マウス LPS 誘導性急性肺障害モデルを用いた PFKFB3 阻害効果の検証

4日齢の FVB/NJcl マウスに対して LPS (Escherichia coli, serotype O111, 10 or 20mg/kg) を腹腔内投与することで作成した LPS 誘導性急性肺障害モデルに、LPS と同時に 3PO (20mg/kg) または vehicle (dimethyl sulfoxide, DMSO and corn oil) を投与し、次いで以下の評価を行なった。

a) *Pfkfb3* 遺伝子発現の評価

LPS (20mg/kg) 投与 6 時間後の新生児マウス肺を採取し、定量的 Polymerase chain reaction (PCR) により *Pfkfb3* の遺伝子発現を測定した。

b) 生存率の評価

LPS (20mg/kg) 投与後 5 日間の生存率を観察した。

c) 組織学的な急性肺障害の評価

LPS (10mg/kg) 投与 24 時間後の新生仔マウス肺を採取し、Hematoxylin and eosin (HE) 染色を行い、肺胞壁肥厚、好中球遊走、Hyaline 膜形成等の急性肺障害に特徴的な所見を観察した。

d) Evans' blue を用いた肺血管透過性の評価

LPS (20mg/kg) と同時に Evans' blue を腹腔内投与し、LPS 投与 6 時間後の新生仔マウス肺を採取し、formamide を用いて溶出した Evans' blue の濃度を、吸光度計を用いて測定した。

(2) LPS 処理を施した HPAECs を用いた PFKFB3 阻害効果の機序解明

a) PFKFB3 の遺伝子発現及びタンパクレベルの評価

LPS (10 µg/mL) 投与 4 時間後の PFKFB3 の遺伝子発現及びタンパクレベルを定量的 PCR、Western blotting により測定した。

b) RNA sequencing による網羅的遺伝子発現解析

LPS (10 µg/mL) と同時に 3P0 (10 µM) を投与し、4 時間後の遺伝子発現の変化を次世代シーケンサー (NovaSeq6000) を用いて網羅的に解析した。

c) 定量的 PCR

RNA sequencing の結果から注目された遺伝子の発現変化を定量的 PCR により確認した。

4. 研究成果

炎症刺激による PFKFB3 遺伝子発現の変化

LPS による炎症刺激は、HPAECs の PFKFB3 遺伝子発現及びタンパクレベルを有意に上昇させ (各々、 $p < 0.01$ 、**図 1a,b**)、新生仔マウス肺の Pfkfb3 の遺伝子発現を有意に上昇させた ($p < 0.05$ 、**図 1c**)。

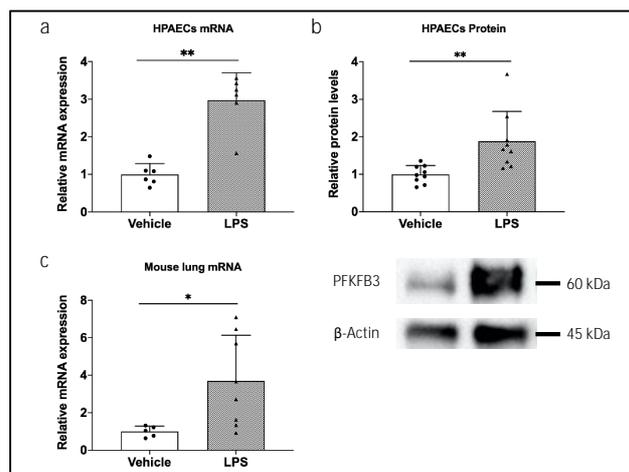


図 1. LPS 投与後の PFKFB3 遺伝子発現及びタンパクレベルの変化

新生仔マウスを用いた LPS 誘導性急性肺障害モデルにおける薬物的 PFKFB3 阻害

新生仔マウス LPS 誘導性急性肺障害モデルにおける薬物的 PFKFB3 阻害は、新生仔マウスの死亡率を有意に増悪させた (LPS 群: 35.7%、LPS+3P0 群: 100%、 $p < 0.001$ 、log-rank test、**図 2**)。また、薬物的 PFKFB3 阻害は、急性肺障害に特徴的な所見である肺胞壁肥厚 ($p < 0.01$ 、**図 3a**)、Hyaline 膜形成を有意に増悪させた ($p < 0.01$ 、**図 3b**)。さらに、Evans' blue を用いた肺血管透過性試験では、LPS のみでは有意な変化を認めなかった肺血管透過性を薬物的 PFKFB3 阻害が亢進させた ($p < 0.05$ 、**図 3b**)。

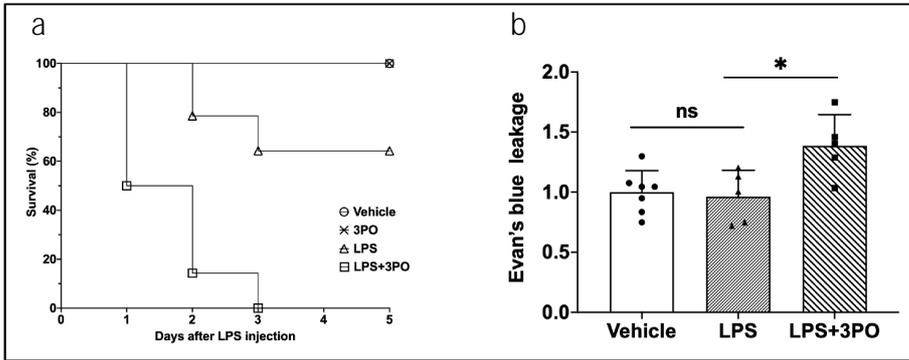


図 2. 生存率及び肺血管透過性の評価

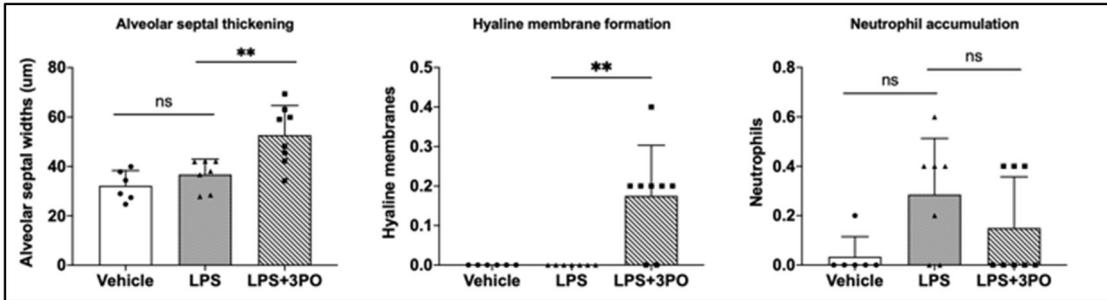


図 1. 組織学的な急性肺障害の評価

LPS 処理を行なった肺動脈血管内皮細胞における薬物的 PFKFB3 阻害

RNA sequencing の結果、LPS 処理を行なった肺動脈血管内皮細胞における薬物的 PFKFB3 阻害は、細胞間接着に関連する遺伝子の発現を抑制した (図 4)。

さらに、これらの遺伝子のうち、Tight junction 関連分子の一つである Claudin 1 の遺伝子発現は、LPS 投与により亢進し、PFKFB3 阻害により抑制された。

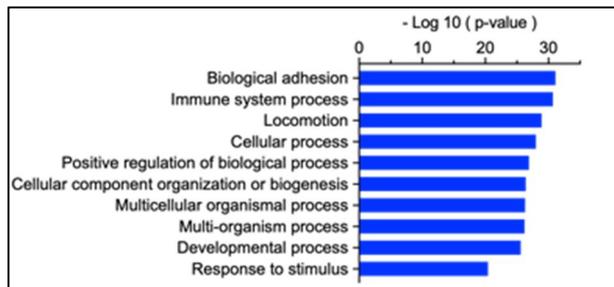


図 4. RNA sequencing

結論

新生仔マウスを用いたLPS誘導性急性肺障害モデルに対するPFKFB3阻害は肺血管透過性を亢進させ、急性肺障害を増悪させた。本研究の結果から、炎症条件下におけるPFKFB3依存性の解糖亢進が、血管内皮細胞の恒常性維持を介して、急性肺障害に対して保護的に働いている可能性が示唆された。

総括

今回の検討では、炎症条件下における PFKFB3 依存性の解糖亢進が、血管内皮細胞の恒常性維持を介して、急性肺障害に対して保護的に働いている可能性が示唆された。今後、血管内皮細胞の解糖に着目することで、新生児急性肺障害の新規治療開発や予後因子同定へと発展させていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 0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 Tanimura Kenji, Shi Yutoku, Uchida Akiko, Uenaka Mizuki, Imafuku Hitomi, Ikuta Toshihiko, Fujioka Kazumichi, Morioka Ichiro, Deguchi Masashi, Minematsu Toshio, Yamada Hideto	4. 巻 143
2. 論文標題 Immunoglobulin fetal therapy and neonatal therapy with antiviral drugs improve neurological outcome of infants with symptomatic congenital cytomegalovirus infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Reproductive Immunology	6. 最初と最後の頁 103263 ~ 103263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jri.2020.103263	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 Nishida Kosuke?, Fujioka Kazumichi, Sugioka Yusuke, Abe Shinya, Ashina Mariko, Fukushima Sachiyo, Ohyama Shohei, Ikuta Toshihiko, Tanimura Kenji, Yamada? Hideto, Iijima Kazumoto, Morioka Ichiro	4. 巻 117
2. 論文標題 Prediction of Neurodevelopmental Impairment in Congenital Cytomegalovirus Infection by Early Postnatal Magnetic Resonance Imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neonatology	6. 最初と最後の頁 460 ~ 466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000508218	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 Miyuchi Harunori, Fujioka Kazumichi, Okubo Saki, Nishida Kosuke, Ashina Mariko, Ikuta Toshihiko, Okata Yuichi, Maeda Kosaku, Iijima Kazumoto, Bitoh Yuko	4. 巻 62
2. 論文標題 Insulin therapy for hyperglycemia in neonatal sepsis using a preterm mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pediatrics International	6. 最初と最後の頁 581 ~ 586
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ped.14126	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 Ashina Mariko, Fujioka Kazumichi, Nishida Kosuke, Okubo Saki, Ikuta Toshihiko, Shinohara Masakazu, Iijima Kazumoto	4. 巻 10
2. 論文標題 Recombinant human thrombomodulin attenuated sepsis severity in a non-surgical preterm mouse model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-57265-2	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 Ohyama Shohei, Fujioka Kazumichi, Fukushima Sachiyo, Abe Shinya, Ashina Mariko, Ikuta Toshihiko, Nishida Kosuke, Matsumoto Hisayuki, Nakamachi Yuji, Tanimura Kenji, Yamada Hideto, Iijima Kazumoto	4. 巻 20
2. 論文標題 Diagnostic Value of Cytomegalovirus IgM Antibodies at Birth in PCR-Confirmed Congenital Cytomegalovirus Infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3239 ~ 3239
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20133239	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 Fujioka Kazumichi, Nishida Kosuke, Ashina Mariko, Abe Shinya, Fukushima Sachiyo, Ikuta Toshihiko, Ohyama Shohei, Morioka Ichiro, Iijima Kazumoto	4. 巻 60
2. 論文標題 DNA methylation of the Rtl1 promoter in the placentas with fetal growth restriction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pediatrics & Neonatology	6. 最初と最後の頁 512 ~ 516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pedneo.2019.01.001	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Toshihiko Ikuta, Kazuya Miyagawa, Kazumichi Fujioka, Noriaki Emoto
2. 発表標題 Inhibition of PFKFB3 Attenuates LPS-induced Endothelial Apoptosis via Reducing ROS Accumulation
3. 学会等名 42nd Annual Conference on Shock (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 生田寿彦、宮川一也、藤岡一路、飯島一誠、江本憲昭
2. 発表標題 解糖系酵素PFKFB3阻害は肺動脈血管内皮細胞のLPS誘導性アポトーシスをROS非依存的に抑制する
3. 学会等名 第34回日本Shock学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 生田寿彦、宮川一也、藤岡一路、飯島一誠、江本憲昭
2. 発表標題 新生児マウスを用いたLPS誘導性急性肺障害モデルにおいて解糖系酵素PFKFB3は肺血管内皮細胞の血管透過性維持に寄与する
3. 学会等名 第64回新生児成育医学会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 生田寿彦、宮川一也、藤岡一路、江本憲昭
2. 発表標題 新生児マウスを用いたLPS誘導性急性肺障害モデルにおいて 解糖系酵素PFKFB3は肺血管内皮細胞の血管透過性維持に寄与する
3. 学会等名 第25回日本エンドトキシン・自然免疫研究会
4. 発表年 2019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

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