

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09210

研究課題名(和文) HIF-1活性解析を基軸としたタバコ誘導性肺バリア機能低下機構の分子生物学的探究

研究課題名(英文) Molecular biology of the mechanism of tobacco-induced reduction of lung barrier function based on HIF-1 activity analysis

研究代表者

西 憲一郎 (NISHI, Kenichiro)

関西医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50340716

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)：本研究で細胞間バリアの血管透過性を測定するためのシステムを開発し、その透過性が蛍光物質FITC-デキストランの指標で定量化できることを確認した。血管透過性は、リポ多糖(LPS)処理、HIF活性化(低酸素環境とHIF-PH阻害薬の使用)およびタバコ抽出物(CSE)により変化することが観察された。次世代シーケンシング技術により、これらの処理が肺血管内皮細胞(HPMEC)の遺伝子発現に影響を与えることが確認され、特に細胞間接着分子の発現に影響を与えることが示された。これらの結果から、CSEはHIFを介して細胞間バリアの透過性を増加させることが結論付けられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

タバコ-バリア機能の低下、HIF-1-バリア機能の低下という現象同士をつなぎ、タバコ-HIF-1-バリア機能の低下という関係が存在することを主に肺胞上皮、肺血管内皮のバリア機能を標的に研究することが本研究の具体的な目的であった。この過程でシグナル伝達を改変することでタバコ-バリア機能の低下という関連を切断する端緒をつかむ事も本研究の要素であり、本研究成果は報告者らの今までの研究成果に立脚した独自性の高いものである。

研究成果の概要(英文)：We developed a system to measure the vascular permeability of intercellular barriers in this study and confirmed that the permeability can be quantified using the fluorescent substance FITC-dextran as an indicator. Vascular permeability was observed to be altered by lipopolysaccharide (LPS) treatment, HIF activation (hypoxic environment and use of HIF-PH inhibitors) and cigarette smoke extract (CSE) conditioning. Next-generation sequencing techniques confirmed that these treatments affect gene expression in human pulmonary microvascular endothelial cells (HPMECs), particularly the expression of intercellular adhesion molecules. From these results, we conclude that CSE increases the permeability of the intercellular barrier via HIF.

研究分野：麻酔科学

キーワード：喫煙 タバコ タバコ抽出液 肺胞上皮 肺血管内皮 細胞間バリア

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々の研究チームは、喫煙が気管支肺胞細胞を直接刺激して転写因子 HIF-1 (低酸素誘導性因子 1) を活性化し、結果として肺のリモデリングを引き起こし、肺機能に影響を及ぼす分子生物学的基盤を追求し、報告してきた。喫煙は、肺の構造的変化を通じて肺機能に大きな影響を及ぼし、周術期の患者管理、包括的な治療と予後にも影響を与えることが確認されている。この現象の分子基盤としては、肺胞上皮・肺血管内皮で形成される肺胞バリア機能が炎症の影響で低下すると考えられる。

また、我々は、喫煙とタバコ抽出物が細胞内で活性酸素を生成し、HIF-1 サブユニットの細胞内発現を誘導し、それが支配遺伝子の mRNA の発現を亢進させることも明らかにしていた。そこで我々は、この研究をさらに深め、細胞間バリア、特に肺胞上皮と肺血管内皮細胞間のバリア機能への影響をより詳細に調査する新たな研究を考案した。

我々のチームはまた、過去 20 年以上にわたり、炎症応答と HIF-1 の関連について研究を行ってきた。特に腸管上皮で形成されるバリア機能が HIF-1 活性化によって増強されることを発表してきた。また、タバコ抽出物が II 型肺胞細胞 A549 において活性酸素を産生し、HIF-1 蛋白質の誘導と粘液産生酵素 MUC5AC の発現を引き起こすことを報告し、肺のリモデリングに影響を与えることを示してきた。

タバコの煙には約 4,000 種類の化学物質が含まれており、これらが喫煙者の気道と肺胞で炎症反応を引き起こし、慢性気管支炎や肺気腫を発生させる。しかし周術期の喫煙による肺のガス交換能力や肺内バリア機能への影響についての詳細な細胞生物学的研究はまだ十分に行われていない。

我々の予備実験では、肺血管内皮細胞 (HPMEC) で形成した細胞間バリア機能が、タバコ抽出物 (CSE, cigarette smoke extract) の処理により低下することが観察された。低酸素状態と炎症反応の間には密接な関連性があり、HIF-1 がその間に介在するハブ分子として認識されている。炎症部位では免疫細胞の浸潤や代謝亢進により栄養や酸素が消費され、結果として低酸素状態が引き起こされる。

このような背景から、本研究を開始する事とした。

2. 研究の目的

本研究の主目的は、喫煙、酸素環境、HIF-1、そして炎症といった要素が、肺胞上皮・肺血管内皮で形成される肺胞バリア機能にどのように影響を及ぼすのかを明らかにすることであった。具体的には、喫煙によるバリア機能の低下と、HIF-1 によるバリア機能の低下という二つの現象が、どのように関連し、喫煙-HIF-1-バリア機能の低下という関係性が形成されるのか、主に肺胞上皮と肺血管内皮のバリア機能を対象に調査した。この過程で、シグナル伝達の修正を通じて喫煙によるバリア機能低下を防ぐ手がかりを見つけ出すことも本研究の重要な目標の一つであった。

本研究では、特に周術期に酸素環境の変化が激しい肺胞上皮細胞・肺血管内皮細胞の細胞間バリアの機能に焦点を当て、喫煙が HIF-1 の活性化を介してバリア機能を低下させる分子機序とその防止策の確立を、細胞生物学・分子生物学・バイオインフォマティクスの統合的手法を用いて明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

実験系は以下に示した要素で構成された。

I タバコ暴露系の確立

-CSE はたばこ煙吸入実験装置 SIS-CS 型(柴田科学株式会社)を用いて調製するがすでに稼働している実験系である。

II HIF 活性化状況の検出系の確立

III 細胞間バリアの構築

IV 分子生物学的に分子の発現量を操作する実験系の確立

V バイオインフォマティクス解析

In vitro 解析の結果取得した mRNA について次世代シーケンサを用いた RNA-Seq を行いとデータマイニングとして遺伝子オントロジーエンリッチメント解析などの解析を行う。

VI 実験小動物を用いた in vivo 実験系

マウス(C57B/6 マウス)を用いて行う。タバコ煙(CS)の吸入実験については報告者らの先行研究ですでに成功していた。

A CSE による HIF-1 活性化の評価

A-1 HIF-1 の活性の評価を行う。

A-2 用量・時間依存性・可逆性の検討も行う。

A-3 DMOG, Dapрудustat, Roxadustat などの低分子 HIF 水酸化酵素阻害薬を用いた常酸素環境での HIF-1 の人為的な活性化に加えて細胞を低酸素(1%O₂ 条件に 6 時間暴露するなど)環境に暴

露して HIF-1 の活性化を起こす条件も構築する。

B 細胞間バリアの評価

B-1 細胞間バリアの評価は、蛍光物質 FITC-デキストラン(約 70kd, アルブミンと同等の分子量)の透過性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。

C 接着関連分子の発現変化の解明

C-1 タイトジャンクションを形成する蛋白質である Occludin、Claudin-5、ZO-1、VE-cadherin の発現を mRNA、蛋白質のレベルで検討する

C-2 タイトジャンクション関連分子はその発現量のみならず細胞内分布(発現パターン)が機能発現に大きな影響を及ぼす。細胞内局在を免疫染色により検討する。報告者らは、ZO-1、VE-cadherin についてその細胞内分布の変化の実験結果をすでに得ていた。

C-3 パイオインフォマティクスを援用した RNA-Seq 解析

特に細胞接着関連の gene ontology を参照した発現解析を行いタイトジャンクション関連分子に限らない接着に関する遺伝子の動態を明らかにして解析に役立てる。

4 . 研究成果

HPMEC によって形成された細胞間バリアを使用し、蛍光物質 FITC-デキストランの透過性を指標に血管透過性を定量化する実験系を確立することに成功した。この実験系を使用して、リポ多糖(LPS)による細胞処理後の血管透過性の変化を観察した。さらに、転写因子である HIF の活性化を促進するために、低酸素環境への曝露と HIF-PH 阻害薬(DMOG、roxadustat)を使用して血管透過性の変化を観察した。次に、CSE の影響を検討した。従来の方法を使用して CSE を調整し、その効果が HIF 活性化をもたらすかどうかを検証した。この結果、LPS によって細胞間バリアの透過性が増加することを確認した。また、HIF の活性化刺激によって透過性が増加することも見いだした。さらに、CSE によって HIF の活性化が HPMEC で引き起こされることを確認した。

さらに CSE の影響を追求した結果、CSE 処理により透過性が増加することを明らかにした。また、HIF-PH 阻害薬である DMOG と roxadustat を使用して HIF を活性化した結果、透過性が増加することも確認した。さらに、CSE、roxadustat、および低酸素環境(1%O₂)が HPMEC の遺伝子発現に与える影響を調査するため、次世代シーケンサを使用した RNA-Seq を行い、全体的な遺伝子発現の変化を追跡するためのサンプルを調製した。

これらの処理が肺血管内皮細胞の遺伝子発現に与える影響を調査した結果、タイトジャンクションの形成に参与する遺伝子の発現に有意な変化が生じることを確認した。

以上の実験結果より以下の結論を得た。つまり CSE は HPMEC によって形成された細胞間バリアの透過性を細胞間接着分子の発現変化を通じて HIF 依存的に高める。

現在、これらの研究成果について論文のとりまとめを行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kida Naoko, Matsuo Yoshiyuki, Hashimoto Yoshiko, Nishi Kenichiro, Tsuzuki-Nakao Tomoko, Bono Hidemasa, Maruyama Tetsuo, Hirota Kiichi, Okada Hidetaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Cigarette Smoke Extract Activates Hypoxia-Inducible Factors in a Reactive Oxygen Species-Dependent Manner in Stroma Cells from Human Endometrium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 48～48
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/antiox10010048	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 Tanimoto Keiji, Hirota Kiichi, Fukazawa Takahiro, Matsuo Yoshiyuki, Nomura Toshihito, Tanuza Nazmul, Hirohashi Nobuyuki, Bono Hidemasa, Sakaguchi Takemasa	4. 巻 11
2. 論文標題 Inhibiting SARS-CoV-2 infection in vitro by suppressing its receptor, angiotensin-converting enzyme 2, via aryl-hydrocarbon receptor signal	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 16629
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-96109-w	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 Yoshida Terufumi, Okumura Tadayoshi, Matsuo Yoshiyuki, Okuyama Tetsuya, Michiura Taku, Kaibori Masaki, Umezaki Nodoka, Bono Hidemasa, Hirota Kiichi, Sekimoto Mitsugu	4. 巻 124
2. 論文標題 Activation of transcription factor HIF inhibits IL-1 β -induced NO production in primary cultured rat hepatocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nitric Oxide	6. 最初と最後の頁 1～14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.niox.2022.04.002	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 Sakai Takayuki, Matsuo Yoshiyuki, Okuda Kensuke, Hirota Kiichi, Tsuji Mieko, Hirayama Tasuku, Nagasawa Hideko	4. 巻 11
2. 論文標題 Development of antitumor biguanides targeting energy metabolism and stress responses in the tumor microenvironment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4852
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-83708-w	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 Kida Naoko, Matsuo Yoshiyuki, Hashimoto Yoshiko, Nishi Kenichiro, Tsuzuki-Nakao Tomoko, Bono Hidemasa, Maruyama Tetsuo, Hirota Kiichi, Okada Hidetaka	4. 巻 10
2. 論文標題 Cigarette Smoke Extract Activates Hypoxia-Inducible Factors in a Reactive Oxygen Species-Dependent Manner in Stroma Cells from Human Endometrium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Antioxidants	6. 最初と最後の頁 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/antiox10010048	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 Hidemasa, Hirota Kiichi	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 10
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 Hirota Kiichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Basic Biology of Hypoxic Responses Mediated by the 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 32
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 広田 喜一	4. 巻 274
2. 論文標題 ミトコンドリアの酸素代謝異常と疾患	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 医学のあゆみ	6. 最初と最後の頁 248-252
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 松川 志乃, 広田 喜一	4. 巻 27
2. 論文標題 周術期炎症マーカー：現状と課題, 今後の展望 炎症応答の一步先へ	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Support and Anesthesia	6. 最初と最後の頁 852-857
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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 Kiichi) (00283606)	関西医科大学・医学部・研究員 (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
---------	---------