

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 05 月 10 日現在

機関番号：14301
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22659283
 研究課題名（和文）新規臓器保護戦略 誘導性代謝リプログラミング法の確立に向けて
 研究課題名（英文）Toward the establishment of induced metabolic reprogramming, a new strategy for organ protection

研究代表者
 広田 喜一（HIROTA KIICHI）
 京都大学・医学研究科・准教授
 研究者番号：00283606

研究成果の概要（和文）：

HIF-1の人為的な活性化が細胞を用いたモデル系においてミトコンドリアに依存した代謝経路から解糖系優位な代謝経路への変換が起こり（代謝リプログラミング），虚血・再灌流障害を軽減する可能性を示唆する知見を得た。

さらに虚血性脳障害モデルをラットを用いて構築し HIF-1 活性化剤 n-propyl gallate を用いて人為的に HIF-1 活性化を生じさせて nPG によるプレコンディショニングの可能性を検討した。nPG は虚血性脳障害を軽減する作用つまりプレコンディショニング作用を持つことを示した。

研究成果の概要（英文）：

We demonstrated that forced activation of hypoxia-inducible factor 1(HIF-1) by the exogenous small molecule n-propyl gallate (nPG) induced metabolic reprogramming from cellular energy generation dependent on OXPHOS in mitochondria to glycolysis-dominant one. Moreover, we indicated that nPG pretreatment induced HIF-1 activation and expression of glycolytic enzymes resulting in protection of brain against ischemia and reperfusion injury.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,900,000	0	1,900,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,900,000	300,000	3,200,000

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：低酸素, 臓器保護, 低酸素誘導性因子 1, プレコンディショニング, 分子生物学

1. 研究開始当初の背景

心臓や脳の IPC に加えて揮発性吸入麻酔薬、麻薬やミトコンドリア ATP 依存性カリウムチャネル開口剤がいわゆる化学的プレコンデ

ィショニングを引き起こすとの報告も多数存在する。このようなプレコンディショニングの登場に先行して虚血臓器の保護のために臓器、全身の“冷却”が行われてきた。硫

化水素を用いた“人工冬眠”を原理とした戦略も検討され始めている。細胞の代謝を低く保つことにより細胞としての統合性を維持できるという考えに基づく戦略である。申請者らはこの10年ほど低酸素誘導性の遺伝子応答のマスター因子である低酸素誘導性因子1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1) についての研究に従事してきた[2]。HIF-1は各種解糖系酵素、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。またHIF-1 α の遺伝子破壊マウスにおいてはIPCが成立しないとの報告も存在する。一方申請者らは、HIF-1の活性化により細胞のエネルギー経路が酸化リン酸から解糖系によるものにシフトする可能性を見いだしてきた。解糖系の産物ピルビン酸がクエン酸回路(TCA回路)へ流入するためにはピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体(PDC)によるピルビン酸のアセチルコエンザイムAへの変換が必要である。申請者らはPDCの活性調整酵素であるpyruvate dehydrogenase kinase isomerase (PDK)のアイソザイムのいくつかは低酸素誘導性でありHIFの被支配遺伝子であることを見いだした。この事実から以下のような仮説を着想した。

人為的HIFを活性化し、ピルビン酸のアセチルコエンザイムAへの変換効率を低く保つことができ、TCA回路は基質を失い回転速度が低く抑えられる。これにより電子伝達系を動く電子の量が減り最終的な電子受容体である酸素の量が減った条件下でも活性酸素(ROS)の産生が低く抑えられる。結果としてROSによるミトコンドリアの破壊が低く抑えられ細胞は低酸素状況を生き延びるといふ仮説である。

2. 研究の目的

麻酔科領域でプレコンディショニング (ischemic preconditioning, IPC) という現象が注目を集めている。Murrayらによる最初の報告は心臓で冠動脈の閉塞・再灌流を繰り返すと心筋梗塞巣が縮小するというものであった[1]。現在では心臓の他に脳、肝臓などの臓器でも確認されている現象である。申請者らの提案はプレコンディショニングを補う新規の臓器保護戦略である誘導性代謝リプログラミング法(induced metabolic reprogramming, imRing)の確立、遺伝学的な背景の理解に向けた基礎研究を細胞、臓器でおこなう事であった。

3. 研究の方法

本申請の目的は誘導性代謝リプログラミング法(induced metabolic reprogramming)の成立の確認である。この目的のため、細胞レベル、臓器レベルでの検討を行う。

助成申請期間の2年間に遂行する予定の実験計画は大きく三つの柱から構成される。

- (1) 培養細胞を用いた検討
- (2) 実験小動物の臓器を用いた低酸素耐性の検討
- (3) 実験小動物の臓器における酸素メタボリズムの検討

4. 研究成果

- (1) 肝臓由来初代培養系の確立と分子生物学的な解析法の適応

マウス肝臓から肝細胞の初代培養系を確立した。

細胞を用いた虚血・再灌流モデルを樹立した。低酸素環境を含む様々な環境、物質に細胞を暴露し、虚血・再灌流障害の発生に与える影響を遺伝子応答、特に転写因子 低酸素誘導性因子1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)を介した遺伝子応答に力点を置いて解析した。

一連の解析により HIF-1 の人為的な活性化が少なくとも細胞を用いたモデル系においてミトコンドリアに依存した代謝経路から解糖系優位な代謝経路への変換が起こり (代謝リプログラミング), 虚血・再灌流障害を軽減する可能性を示唆する知見を得た。

(2) 虚血性脳障害モデルをラットを用いて構築した。このモデルを用いて HIF-1 活性化剤 n-propyl gallate を用いて人為的に HIF-1 活性化を生じさせて HIF-1 の虚血前の活性化が虚血性脳障害の程度を軽減する効果を持つ (プレコンディショニング) かを検討した。結果として HIF-1 活性化剤 n-propyl gallate は虚血性脳障害を軽減する作用つまりプレコンディショニング作用を持つことを示した。n-propyl gallate が解糖系の酵素の誘導を促すことが確認できたことからこの作用の分子機序の一つとして代謝リプログラミングがある事が示唆された。

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 12 件)

① Zuo, Y., Zhao, T., Itasaka, S., Zeng, L., Yoem, C., Hirota, K., Suzuki, K., Morinibu, A., Shinomiya, K., Ou, G., et al. (In Press).

Involvement of decreased hypoxia-inducible factor 1 activity and resultant G1-S cell cycle transition in radioresistance of perinecrotic tumor cells. *Oncogene*. (査読有り)

② 広田 喜一 (In Press). グルタミンオリシス. In がんと代謝, 曾我 朋義 江角 浩安, eds. (東京, 羊土社). (査読無し)

③ Harada, H., Inoue, M., Itasaka, S., Hirota, K., Morinibu, A., Shinomiya, K., Kadonosono, T., Kuchimaru, T., Yamada, S., Takahashi, Y., Murakami, A., Tani, T., Watanabe, H., Tanaka, T., Hirota, K.,

Inoue, M., *et al* (2012). Cancer cells that survive radiation therapy acquire HIF-1 activity and translocate towards tumour blood vessels.

Nat Commun 3, 783. (査読有り) DOI: 10.1038/ncomms1786

④ Kai, S., Tanaka, T., Daijo, H., Harada, H., Kishimoto, S., Suzuki, K., Takabuchi, S., Takenaga, K., Fukuda, K., and Hirota, K. (2012). Hydrogen sulfide inhibits hypoxia- but not anoxia-induced hypoxia-inducible factor 1 activation in a von hippel-lindau- and mitochondria-dependent manner. *Antioxidants & redox signaling* 16, 203-216. (査読有り) DOI: 10.1089/ars.2011.3882

⑤ Kawano, Y., Kawaguchi, M., Hirota, K., Kai, S., Konishi, N., and Furuya, H. (2012). Effects of n-propyl gallate on neuronal survival after forebrain ischemia in rats. *Resuscitation* 83, 249-252. (査読あり) DOI: 10.1016/j.resuscitation.2011.07.024

⑥ Daijo, H., Kai, S., Tanaka, T., Wakamatsu, T., Kishimoto, S., Suzuki, K., Harada, H., Takabuchi, S., Adachi, T., Fukuda, K., Hirota, K. (2011). Fentanyl activates hypoxia-inducible factor 1 in neuronal SH-SY5Y cells and mice under non-hypoxic conditions in a mu-opioid receptor-dependent manner. *European journal of pharmacology* 667, 144-152. (査読有り) DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.06.014

⑦ Harada, H., Inoue, M., Itasaka, S., Hirota, K., Morinibu, A., Shinomiya, K., Kadonosono, T., Kuchimaru, T., Yamada, S., Takahashi, Y., Murakami, A., Tani, T., Watanabe, H., Tanaka, T., Hirota, K., Inoue, M., et al. (2011). Detection of the onset of ischemia and carcinogenesis by hypoxia-inducible transcription factor-based in vivo bioluminescence imaging. *PLoS ONE* 6, e26640.

(査読あり) DOI: 10.1038/ncomms1786

⑧ Tanaka, T., Kai, S., Koyama, T., Daijo, H., Adachi, T., Fukuda, K., and Hirota, K. (2011). General Anesthetics Inhibit Erythropoietin Induction under Hypoxic Conditions in the Mouse Brain. PLoS ONE 6, e29378. (査読有り) DOI:10.1371/journal.pone.0029378

⑨ 広田 喜一 (2011). 周術期医学としてのハイポキシア生物学の探究. 麻酔 60, S183-S188. (査読無し)

(<http://jglobal.jst.go.jp/public/20090422/201102221994057673>)

⑩ 広田 喜一, 大条 鈺樹, 甲斐 慎一, 鈴木 堅悟, 岸本 俊, and 松山 智紀 (2011). 炎症の制御点としての低酸素誘導性因子. 麻酔 60, S69-74. (査読無し)

(<http://jglobal.jst.go.jp/public/20090422/201102269918990320>)

⑪ Tanaka, T., Takabuchi, S., Nishi, K., Oda, S., Wakamatsu, T., Daijo, H., Fukuda, K., and Hirota, K. (2010). The intravenous anesthetic propofol inhibits lipopolysaccharide-induced hypoxia-inducible factor 1 activation and suppresses the glucose metabolism in macrophages. J Anesth 24, 54-60. (査読あり)

DOI: 10.1007/s00540-009-0829-1

⑫ Tanaka, T., Wakamatsu, T., Daijo, H., Oda, S., Kai, S., Adachi, T., Kizaka-Kondoh, S., Fukuda, K., and Hirota, K. (2010). Persisting mild hypothermia suppresses hypoxia-inducible factor-1alpha protein synthesis and hypoxia-inducible factor-1-mediated gene expression. American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology 298, R661-671. (査読有り) DOI:10.1152/ajpregu.00732.2009.

[学会発表] (計 15 件)

① タバコ煙抽出物はヒト肺胞 II 型上皮細胞株 (A549) において低酸素誘導性因子 1

(hypoxia-inducible factor 1:HIF-1) を活性化する

大条 紘樹、鈴木堅固、岸本 俊、甲斐 慎一、広田 喜一、福田 和彦

日本麻酔科学会 第 58 回学術総会
2011/5/19 神戸市

② イソフルランは低酸素によるエリスロポエチンの上昇を抑制する

甲斐 慎一、田中 具治、鈴木堅悟、大条 鈺樹、広田 喜一、福田 和彦

日本麻酔科学会 第 58 回学術総会
2011/5/20 神戸市

③ プロスタグランジン E1 は HIF-1 活性化、VEGF 発現を介して血管透過性を亢進させる

鈴木堅悟、広田 喜一、大条鈺樹、甲斐 慎一、岸本 俊、福田 和彦

日本麻酔科学会 第 58 回学術総会
2011/5/20 神戸市

④ 炎症の制御点としての低酸素誘導性因子 広田 喜一、大条鈺樹、甲斐 慎一、鈴木堅悟、岸本 俊、松山智紀

日本麻酔科学会 第 58 回学術総会
2011/5/20 神戸市

⑤ 周術期医学としてのハイポキシア生物学の探求

広田 喜一

日本麻酔科学会 第 58 回学術総会
2011/5/19 神戸市

⑥ Isoflurane selectively inhibits the activation of hypoxia-inducible factor 2 and the induction of erythropoietin under hypoxic conditions in

mouse brain

Kiichi Hirota, Tomoharu Tanaka, Shinichi Kai,
Tomohiro Koyama, Hiroki Daijo, Kengo Suzuki,
Takehiko Adachi, Kazuhiko Fukuda

2011 Annual Meeting, American Society of
Anesthesiologists, Chicago, 2011/10/16

⑦ Differential role of prostaglandin E-type
receptors in activation of hypoxia-inducible
factor 1 by prostaglandin E1 in vascular-derived
cells under non-hypoxic conditions.

Kengo Suzuki, Satoshi Takabuchi, Hiroki Daijo,
Shinichi Kai, Tomonori Matsuyama, Shin
Kurosawa, Kazuhiko Fukuda, Kiichi Hirota
2011 Annual Meeting, American Society of
Anesthesiologists, Chicago, 2011/10/16

⑧ Hydrogen sulfide inhibits hypoxia-induced
HIF-1 activation in a mitochondria-dependent
manner

Shinichi Kai, Tomoharu Tanaka, Hiroki Daijo,
Shun Kishimoto, Kengo Suzuki, Satoshi
Takabuchi, Takuhiko Wakamatsu, Kazuhiko
Fukuda, Kiichi Hirota
2011 Annual Meeting, American Society of
Anesthesiologists, Chicago, 2011/10/16

⑨ Fentanyl activates hypoxia-inducible factor 1
in neuronal SH-SY5Y cells and mice under
non-hypoxic conditions in a μ -opioid
receptor-dependent manner

H. Daijo, K. Hirota, S. Kai, T. Matsuyama, K.
Suzuki, T. Tanaka, T. Wakamatsu, K. Fukuda
2011 Annual Meeting, American Society of
Anesthesiologists, Chicago, 2011/10/15

⑩ 静脈麻酔薬が膵 β 細胞のインスリン分泌
に与える影響の検討

鈴木 堅悟, 広田 喜一, 大条 紘樹, 甲
斐 慎一, 松山 智紀, 福田
第 18 回日本静脈麻酔学会 2011/11/26

⑪ 硫化水素が低酸素誘導性遺伝子応答に及
ぼす影響

The effects of hydrogen sulfide on the
cellular hypoxia-induced gene responses
mediated by HIF-1

甲斐 慎一、大条 紘樹、田中 具治、広田 喜一、
福田 和彦
日本麻酔科学会 第 57 回学術総会 2010/6/4
福岡市

⑫ 全身麻酔下では、低酸素による脳内エリ
スロポエチン発現誘導が抑制される

田中 具治、広田 喜一、大条 紘樹、甲斐 慎
一、小山 智弘、福田 和彦
日本麻酔科学会 第 57 回学術総会 2010/6/4
福岡市

⑬ フェンタニルはオピオイド受容体を介し、
低酸素誘導性因子 (hypoxia-inducible
factor 1:HIF-1) を活性化する

Fentanyl induces hypoxia-inducible factor
1 activation via opioid receptor-mediated
signaling pathways.

大条 紘樹、広田 喜一、甲斐 慎一、田中 具
治、福田 和彦
日本麻酔科学会 第 57 回学術総会 2010/6/3
福岡市

⑭ 硫化水素が低酸素誘導性 HIF-1 活性化に
及ぼす影響

甲斐 慎一, 鈴木 堅悟, 広田 喜一, 大
条 紘樹, 岸本 俊
第 6 回がんとハイポキシア研究会
2010/01/30 札幌市

⑮ タバコ煙抽出物は低酸素誘導性因子 1
(hypoxia-inducible factor 1:HIF-1)を活性化する
大条 紘樹, 広田 喜一, 鈴木 堅悟, 甲斐 慎一,
岸本 俊
第 6 回がんとハイポキシア研究会
2010/01/30 札幌市

[図書] (計 1 件)

Hirota, K. (In Press). Hypoxia and hypoxia-inducible factor in inflammation. In CHRONIC INFLAMMATION: NUTRITIONAL & THERAPEUTIC INTERVENTIONS, S. Roy, ed. (Taylor & Francis).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

広田 喜一 (HIROTA KIICHI)

京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号 : 00283606

(2) 研究分担者

藤森 亮 (FUJIMORI AKIRA)

独立行政法人放射線医学総合研究所・重粒子医学センター・研究員
研究者番号 : 50314183