

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 4月17日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790545

研究課題名（和文） 気道上皮の創傷治療における HIF-1 α の役割研究課題名（英文） Roles of HIF-1 α on wound healing of airway epithelial cells

研究代表者

白土 健 (SHIRATO KEN)

早稲田大学・人間科学学術院・助手

研究者番号：60559384

研究成果の概要（和文）：気道上皮細胞に創傷刺激を与えると、創傷部位近傍の細胞において低酸素誘導因子(HIF)-1 α の核内への集積が認められた。そこで、気道上皮細胞の HIF-1 α の発現を抑制すると、創傷治癒の速度は明らかに早くなった。一方、気道上皮細胞を HIF-1 α 発現誘導剤で刺激すると、創傷治癒の速度は明らかに遅くなり、この影響は HIF-1 α の発現を抑制することで減弱した。以上より、気道上皮細胞において創傷刺激により誘導される HIF-1 α は創傷治癒に対して負の調節因子として働くことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：When airway epithelial cells were stimulated by scratch wound, hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α is accumulated into the nucleus of the cells located at the wound margin. HIF-1 α deprivation promoted wound healing of airway epithelial cells. By contrast, HIF-1 α inducer suppressed wound healing of the cells, and this effect was attenuated by HIF-1 α deprivation. These results suggest that scratch wound-induced HIF-1 α is a negative regulator for wound healing of airway epithelial cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
22年度	2,300,000	690,000	2,990,000
23年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：気道上皮、創傷治癒、Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α 、細胞生理学、分子生物学

1. 研究開始当初の背景

肺は常に外気に曝されている特殊な臓器であり、緻密な生体防御機構が確立されてい

る。気道系の多くの疾患は、病原性微生物、粉塵、喫煙などの外的侵襲に対する生体防御機構の破綻によって惹き起こされる。このう

ち気管支喘息は慢性の炎症性気道疾患である。WHOによると、2005年の世界の喘息患者数はおよそ3億人に上り、25万人が死亡している。我が国では、近年、喘息による死亡率は減少傾向に転じているが、その罹患率・死亡率は依然として高い水準を維持している。喘息は患者本人のQOLを著しく低下させるだけでなく、労働人口の損失や医療費負担の増大などの観点からも社会問題となっており、その予防策・治療法の開発は不可欠である。

気管支喘息の特徴の一つは、肺胞マクロファージや気道上皮細胞における Inducible nitric oxide (NO) synthase (iNOS) の発現の慢性化と、それに伴って生理的レベルを超えて過剰に産生される NO である。実際に、喘息患者の呼気中の NO 量は、健常人と比べ顕著に高いことが知られており、気道炎症のバイオマーカーともなっている。

NOは、転写因子である Hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α タンパク質の構造を安定化し、その発現を促進することが報告されている。HIF-1 α は、当初は細胞の低酸素応答のマスター調節因子として発見されたが、近年、低酸素のみならず、各種のサイトカイン、細菌由来因子、活性酸素などの刺激によっても誘導されることが報告されており、炎症増悪への寄与が示唆されている。特に、骨髄系 HIF-1 α ノックアウトマウスは、野生型マウスに比べマクロファージ殺菌能が顕著に抑制されることから、HIF-1 α はマクロファージの炎症応答のキーファクターであることが明らかにされている。

一方、気道上皮細胞は、生理レベルを超える量の NO に曝されると、HIF-1 α 依存的に創傷治癒が抑制されることが報告されている。しかし、その分子機構は十分に明らかにされていない。創傷治癒は気道のホメオスタシスの維持に不可欠であることから、この不明な点を明確にすることは、慢性炎症性気道疾患の病態を理解する上でも極めて重要と考えられる。

近年、皮膚上皮細胞に創傷刺激を与えると、HIF-1 α の発現が誘導され、創傷治癒の促進において不可欠な役割を担っていることが明らかにされている。しかし、気道上皮細胞で創傷刺激により HIF-1 α が誘導されるか否か、及びその創傷治癒における機能的役割については不明である。

2. 研究の目的

本研究では、気道上皮細胞の HIF-1 α の発現に及ぼす創傷刺激の影響を明確にすると共に、その創傷治癒における機能的役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 創傷治癒の解析

ヒト気道上皮細胞株 NCI-H292 を単層コンフルエントに至るまで培養し、イエローチップを用いて直線状に擦過した。創傷部位を経時的に顕微鏡下で撮影し、創傷治癒の速度を解析した。

(2) HIF-1 α の発現量及び細胞内局在の解析

HIF-1 α の発現量に及ぼす創傷刺激の影響を明確にするため、Cross scratch wound assay を用いた (図1)。HIF-1 α の mRNA 発現量は RT-PCR 法で解析し、タンパク質発現量は Western blot 法で解析した。創傷近傍及び非創傷部位の細胞内の HIF-1 α の局在変化は細胞免疫染色法で解析した。

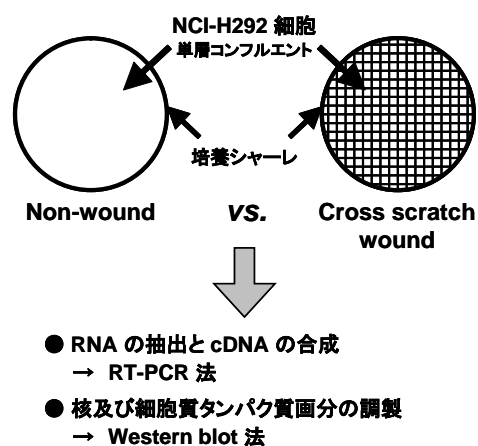


図1. Cross scratch wound assay を用いた気道上皮細胞の HIF-1 α 発現量の解析.

(3) HIF-1 α ノックダウン細胞株を用いた創傷治癒の解析

気道上皮細胞の創傷治癒における HIF-1 α の役割を明確にするため、RNA 干渉法により HIF-1 α の発現を低下させた上で創傷治癒を解析した。さらに、HIF-1 α 発現誘導剤である塩化コバルトで刺激したときの創傷治癒に及ぼす HIF-1 α ノックダウンの影響についても検討した。

4. 研究成果

(1) 気道上皮細胞の HIF-1 α の発現量と細胞内局在性に及ぼす創傷刺激の影響

NCI-H292 細胞の単層コンフルエントに創傷刺激を与えると、HIF-1 α タンパク質発現量は未刺激に比べて 24 時間後に明らかに増加した (図2A)。一方、HIF-1 α mRNA 発現量は創傷刺激後に変化が見られなかった (図2B)。さらに、HIF-1 α の核内への集積は創傷付近の細胞内で認められた (図3)。

(2) 気道上皮細胞の創傷治癒に及ぼす HIF-1 α ノックダウンの影響

NCI-H292 細胞に低分子干渉 RNA (siRNA) を導入し HIF-1 α の発現量を抑制した上で擦

過すると、対照 siRNA を導入した細胞に比べ創傷治癒の速度は 36 時間後で明らかに促進された (図 4)。

(3)HIF-1 α 誘導剤の創傷治癒抑制作用に及ぼす HIF-1 α ノックダウンの影響

NCI-H292 細胞を塩化コバルトで刺激すると、創傷治癒の速度は 36 時間後で明らかに抑制され、この影響は HIF-1 α ノックダウンにより減弱した (図 5)。

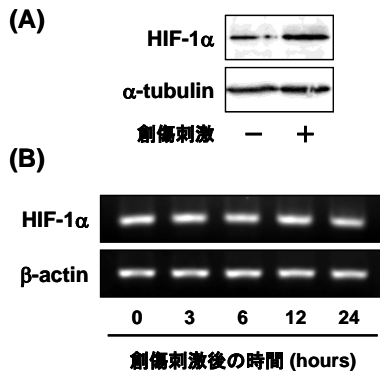


図2. HIF-1 α タンパク質 (A) 及び mRNA (B) の発現量に及ぼす創傷刺激の影響

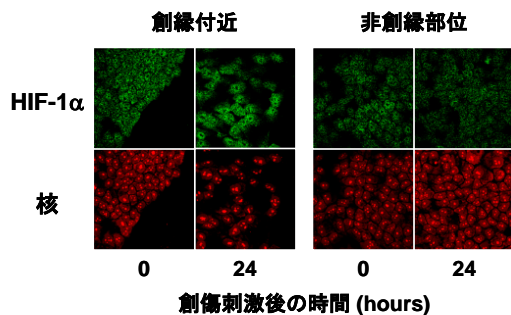


図3. 創縁付近及び非創縁部位における HIF-1 α の細胞内局在性変化

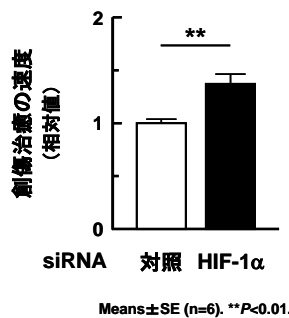


図4. 創傷治癒に及ぼす HIF-1 α ノックダウンの影響

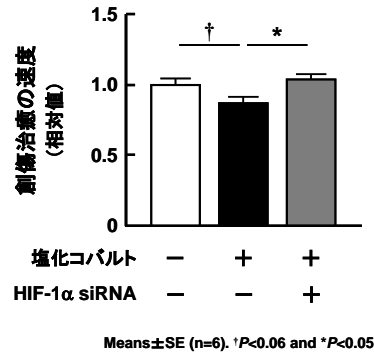


図5. 塩化コバルト刺激による創傷治癒の抑制に及ぼす HIF-1 α ノックダウンの影響

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 13 件) 全て査読あり

1. Shirato, K., Kizaki, T., Imaizumi, K., et al. (他 1 名、1 番目): Effects of exercise on the hexosamine biosynthetic pathway and glycosylation. *J. Phys. Fitness Sports Med.*, 1: in press, 2012.
2. Ohno, H., Shirato, K., Kizaki, T., et al. (他 6 名、2 番目): Effect of exercise on HIF-1 and VEGF signaling. *J. Phys. Fitness Sports Med.*, 1: in press, 2012.
3. Sato, S., Shirato, K., Imaizumi, K., et al. (他 3 名、2 番目): Effects of β_2 -agonists and exercise on β_2 -adrenergic receptor signaling in skeletal muscles. *J. Phys. Fitness Sports Med.*, 1: in press, 2012.
4. Higashino-Matsui, Y., Shirato, K., Imaizumi, K., et al. (他 9 名、2 番目): Age-related effects of fasting on ketone body productions during lipolysis in rats. *Environ. Health Prev. Med.*, 17: 157-163, 2012. (Corresponding author)
5. Gao, C., Shirato, K., Taniguchi, N., et al. (他 10 名、7 番目): Sensitivity of heterozygous $\alpha 1, 6$ fucosyltransferase knock out mice to cigarette smoke-induced emphysema: implication of aberrant TGF- β signaling and MMP gene expression. *J. Biol. Chem.*, in press, 2012.
6. Shirato, K., Nakajima, K., Taniguchi, N., et al. (他 5 名、1 番目): Hypoxic regulation of glycosylation via the N-acetylglucosamine cycle. *J. Clin.*

- Biochem. Nutr.*, 48: 20-25, 2011.
7. Sato, S., Shirato, K., Imaizumi, K., et al. (他 1 名、2 番目): Muscle plasticity and β_2 -adrenergic receptors: adaptive responses of β_2 -adrenergic receptor expression to muscle hypertrophy and atrophy. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2011: ID729598, 2011.
 8. Sato, S., Shirato, K., Imaizumi, K., et al. (他 1 名、2 番目): Synthesized glucocorticoid, dexamethasone regulates the expressions of β_2 -adrenoceptor and glucocorticoid receptor mRNAs but not proteins in slow-twitch soleus muscle of rats. *J. Toxicol. Sci.*, 36: 479-486, 2011.
 9. Sakakibara, Y., Shirato, K., Imaizumi, K., et al. (他 11 名、3 番目): Dietary zinc-deficiency and its recovery responses in the deep body thermogenesis of rats. *J. Toxicol. Sci.*, 36: 681-685, 2011.
 10. Kawashima, Y., Shirato, K., Imaizumi, K., et al. (他 4 名、3 番目): Single administration effects of ethanol on the distribution of white blood cells in rats. *J. Toxicol. Sci.*, 36: 347-355, 2011.
 11. Sato, S., Shirato, K., Imaizumi, K., et al. (他 3 名、4 番目): Casted-immobilization downregulates glucocorticoid receptor expression in rat slow-twitch soleus muscle. *Life Sci.*, 89: 962-967, 2011.
 12. Kawashima, Y., Shirato, K., Imaizumi, K., et al. (他 9 名、4 番目): Dietary zinc-deficiency and its recovery responses in rat liver cytosolic alcohol dehydrogenase activities. *J. Toxicol. Sci.*, 36: 101-108, 2011.
 13. Sakakibara, Y., Shirato, K., Imaizumi, K., et al. (他 4 名、5 番目): Different recovery responses from dietary zinc-deficiency in the distribution of rat granulocytes. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 57: 197-201, 2011.
- [学会発表] (計 20 件)
1. Shirato, K., et al.: Effects of β_2 -agonist administration and voluntary exercise training on the phagocytic capacity of splenic marginal zone macrophages in mice. 第 89 回日本生理学会大会、松本市、2012 年 3 月 29 日.
 2. Hashizume, Y., et al.: Acute effects of diallyl disulfide on the number of lymphocyte and its subsets, and plasma corticosterone levels in rats. 第 89 回日本生理学会大会、松本市、2012 年 3 月 29 日.
 3. Abe, I., et al.: Folate-deficiency-induced changes in the number of lymphocyte and its subsets and plasma homocysteine levels in rats. 第 89 回日本生理学会大会、松本市、2012 年 3 月 29 日.
 4. 高宮里奈, 他: Sialyl-Tn 抗原(sTn)の認識による活性酸素種産生を伴う単球細胞株の活性化. 第 84 回日本生化学会大会、京都市、2011 年 9 月 21 日.
 5. 佐藤章悟, 他: ギプス固定によりラットヒラメ筋のグルココルチコイド受容体発現は低下する. 第 66 回日本体力医学会大会、下関市、2011 年 9 月 16 日.
 6. 橋爪陽子, 他: ニンニク成分・diallyl disulfide 投与によるラット白血球系細胞数および胃排出能の応答変化. 第 66 回日本体力医学会大会、下関市、2011 年 9 月 16 日.
 7. 辻本尚弥, 他: ギプス固定によるラット褐色・白色脂肪組織における β -アドレナリン受容体、グルココルチコイド受容体、脱共役タンパク質発現の応答. 第 66 回日本体力医学会大会、下関市、2011 年 9 月 17 日.
 8. 白土 健, 他: マクロファージの糖鎖構造に及ぼす低酸素曝露の影響. 第 66 回日本体力医学会大会、下関市、2011 年 9 月 18 日.
 9. 三橋亮介, 他: 不活動に伴うラット各種白血球系細胞数の応答. 第 66 回日本体力医学会大会、下関市、2011 年 9 月 18 日.
 10. Nakajima, K., et al.: Novel strategy for dynamic tracing of UDP-GlcNAc metabolism—Involvement of nucleotide sugars in glucose metabolism disorders—. The 31st Naito Conference, Sapporo, September 13, 2011.
 11. Shirato, K., et al.: Hypoxia reduced β 1,6-GlcNAc branched N-glycan levels on integrin β 1 in mouse macrophage RAW264.7. The 7th Congress of the Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies (FAOPS2011), Taipei, Taiwan, September 12, 2011.
 12. Nakajima, K., et al.: Strategy for dynamic tracing of UDP-GlcNAc Metabolism. The 10th Annual World Congress of the Human Proteome Organisation (HUPO 2011), Geneva, Switzerland, September 4, 2011.
 13. Takamiya, R., et al.: Regulation of monocyte function by tumor associated sialyl-Tn antigen through ROS

- production. The 5th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asia (SFRR-Asia), 8th Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM), 11th Conference of Japanese Society of Mitochondrial Research and Medicine (J-mit), Kagoshima, August 31, 2011.
14. 高宮里奈, 他: Sialyl-Tn 糖鎖抗原 (sTn) の認識による活性酸素種産生を伴う単球細胞株の活性化. 第 64 回日本酸化ストレス学会学術集会、留寿都、2011 年 7 月 2 日.
 15. Shirato, K., et al.: β 1,6-GlcNAc branching N-glycans were reduced via GlcNAc cycle in hypoxic macrophages. 第 83 回日本生化学会大会、神戸市、2010 年 12 月 10 日.
 16. Gao, C., et al.: Molecular mechanism of the increased susceptibility of α 1,6 fucosyltransferase (Fut8) heterozygous knockout mice to cigarette smoke-induced emphysema. 第 83 回日本生化学会大会、神戸市、2010 年 12 月 10 日.
 17. Nakajima, K., et al.: Novel analytical methods for nucleotide sugar metabolites-Changes of hexosamine pathway by cellular nutrient status-. 第 83 回日本生化学会大会、神戸市、2010 年 12 月 7 日.
 18. Shirato, K., et al.: Hypoxia reduced β 1,6-GlcNAc branching N-glycans via GlcNAc cycle. The 7th International Symposium on Glycosyltransferases (GlycoT 2010), Tokyo, August 1, 2010.
 19. Takamiya, R., et al.: Cigarette smoke extract induces bisecting GlcNAc modification in RAW264.7 murine macrophage. The 7th International Symposium on Glycosyltransferases (GlycoT 2010), Tokyo, August 1, 2010.
 20. Shirato, K., et al.: HIF-1 α protein and laminin-332 subunit mRNA are upregulated by wound healing in airway epithelial cells. 2010 American Thoracic Society (ATS) International Conference, New Orleans, LA, USA, May 19, 2010.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
白土 健 (SHIRATO KEN)
早稲田大学・人間科学学術院・助手
研究者番号: 6 0 5 5 9 3 8 4
 - (2) 分担研究者
なし
 - (3) 連携研究者
なし