

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：74314

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592322

研究課題名(和文) 肺胞低酸素が低酸素誘導性遺伝子発現変化を通じて肺に及ぼす影響の細胞生物学的検討

研究課題名(英文) The impact of HIF-1 activation on respiratory epithelium during hypoxic insults.

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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：片肺換気モデル(肺胞虚脱モデル)・再拡張性肺水腫のモデルを主にラットで構築して、肺胞上皮血管のバリア機能が炎症反応によって障害されていく過程を肺胞内酸素環境の視点から捉え、低酸素誘導性因子1(hypoxia-inducible factor1; HIF-1)の活性化の関与の証明の研究を行った。肺胞上皮における水分輸送、肺胞上皮のタイトジャンクション機能へ酸素分圧が与える影響を培養細胞を用いた実験系で評価した結果、酸素分圧がHIF-1依存的に水チャネルの発現、細胞バリア機能を変化させることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：The respiratory epithelium forms an important barrier against inhaled pollutants and microorganisms, and its barrier function is often compromised during hypoxic insults. Epithelial activation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) represents one feature of airway inflammation, but the functional importance of HIF-1 within the respiratory epithelium is largely unknown. We evaluated the impact of HIF-1 activation on loss of epithelial barrier function during hypoxic insults. Involvement of HIF-1 in these protective effects was confirmed using the pharmacological inhibitor YC-1 and the activator of HIF-1 DFX adopting A549 cells derived from alveolar epithelium. Expression of mRNA and protein of a subunit of Namiloride-blockable ENaC, APQ5 and molecules involving in cell-cell tight junction ZO-1, occludin, claudin were investigated. The critical involvement of HIF-1 was demonstrated.

研究分野：麻酔科学

キーワード：低酸素誘導性因子1 無気肺 タイトジャンクション

1. 研究開始当初の背景

酸素は生命の維持に必須の分子であり、生体の酸素代謝を適切に保つことは麻酔、集中治療にとってのボトムラインである。酸素需給バランスまたは酸素ホメオスターシスの乱れは、細胞が曝露される酸素分圧の変化を通して細胞の機能ひいては臓器、個体の運命を左右する。肺胞上皮は生体内でもっとも過酷に酸素分圧の変化に晒される“場”の一つである。

肺の酸素環境は他の臓器とは決定的に異なる。これは肺が外界と酸素のインターフェース臓器であることに起因する。

持続的な肺胞低酸素は低酸素血症を引き起こすが、外科手術中、体外循環中または集中治療室での治療中に様々なタイプの肺内酸素状況が生まれる。

肺胞低酸素、低酸素血症はガス交換の単位である肺胞上皮細胞、肺胞間質、肺胞毛細血管に生理的また病態生理学的な変化をもたらす。

周術期の無気肺の原因として、高酸素分圧気体吸入による吸収性の肺胞虚脱、人工呼吸に伴うものが知られている。特に分離肺換気によって生じる無気肺は、CTなどの鋭敏な検査によれば必発である。通常の状態ではこのような周術期に発生する無気肺は患者の予後に大きな影響を与えることは少ないが、患者の予備能が低下している場合などのようにさまざまな要因が加われば、この病態が急性肺傷害(acute lung injury, ALI)または急性呼吸窮迫症候群(adult respiratory distress syndrome, ARDS)へ移行する場合がある。

これらの臨床上の病態の病理学的な変化の基盤には肺胞上皮細胞-肺胞間質-肺胞毛細血管で構成されるガス交換ユニットの炎症がある。

組織の酸素分圧は炎症の消長に大きな影響を与えることが知られている。

低酸素状態に陥った臓器においては、炎症性サイトカイン、リポポリサッカライド受容体の一つであるTLR-4の発現誘導が観察され、これらは臓器機能の障害程度とよく相関する。また、肺胞低酸素が引き金となる肺水腫、高サイトカイン血症の発症との関連が報告されている。このように組織の酸素分圧の低下は炎症の進展に好都合な環境となる。

この典型例の一つに再拡張性肺水腫が挙げられる。近年、細胞因子vascular endothelial growth factor (VEGF)の発現が再拡張性に起因する肺血管の透過性や肺水腫の成立に重要な役割を果たしているという報告がある。低酸素誘導性因子1(hypoxia-inducible factor 1; HIF-1)はVEGFに重要な役割を果たしている。HIF-1は1995年に遺伝子単離された転写因子であり、その名の由来通りに細胞の低酸素に反応して活性化して様々な遺伝子の発現の誘導または抑制を制御している。HIF-1によ

り発現制御を受けている遺伝子の数は1500種を越えていてこの意味ではHIF-1は低酸素応答のマスター遺伝子である。

肺内の酸素環境と炎症を担う細胞の相互作用について検討して、さらにHIF-1が肺病態の進展に果たす役割を片肺換気モデルを援用した持続無気肺とそれに続発する再拡張性肺水腫の発症の文脈で明らかにしてHIF-1を標的とする予防と治療の可能性について検討する必要がある。

低酸素研究の流れに沿った本申請の研究は、細胞内に内在する酸素分圧感知機構とその下流の転写因子、HIF-1の機能と肺血管のバリアの機能を結びつけて解析するという従来にはなかった観点からの解析を行う点で新規なものであり、従来申請者の研究成果の延長線上にある研究であることから実現可能性も十分に高い。臨床上遭遇する再拡張性肺水腫の成因について細胞因子の発現からの解析は存在するものの肺胞虚脱に時に進行する変化について転写因子の活性化の観点から解析した研究はほとんど存在しなかった。

2. 研究の目的

片肺換気モデル(肺胞虚脱モデル)・再拡張性肺水腫のモデルを主にラットで構築して、肺胞上皮-血管のバリア機能が炎症反応によって障害されていく過程を肺胞内酸素環境の視点から捉え低酸素誘導性因子1(hypoxia-inducible factor 1; HIF-1)の活性化と関連づけて解析することが本研究の目的であった。具体的には以下の解明であった。

- (1) 肺水腫モデルの確立と解析
- (2) 肺血管の透過性と肺胞上皮のタイトジャンクション機能の解析
- (3) ラット(マウス)での片肺換気モデル(肺胞虚脱モデル)の構築と解析

3. 研究の方法

肺胞上皮における水分輸送、肺胞上皮のタイトジャンクション機能へ酸素分圧が与える影響を培養細胞を用いた実験系で評価した。片肺換気モデルをラットで構築し肺胞低換気または無気肺状態を作出して続発する変化を病理学的、細胞生物学的、または分子生物学的に検討した。

関連遺伝子発現は半定量的リアルタイムRT-PCR(reverse transcriptase-polymerase chain reaction)法と特異抗体を用いたWestern blotで評価した。

細胞間接着によるバリア機能は、細胞培養面をまたぐ電気抵抗を測定することで評価した。

4. 研究成果

- (1) 肺水腫モデルの確立と解析

肺胞上皮細胞のモデル細胞として頻用される樹立細胞株 A549 細胞(ヒト由来)を用いた。Namiloride-blockable ENaC ファミリーと AQP5 / タイトジャンクション蛋白質 (ZO-1, occudin, claudin) の遺伝子発現の酸素分圧依存的な調節機構を mRNA の半定量的リアルタイム RT-PCR 法 で検討した。同じく蛋白質の発現は、特異抗体を用いた Western blot 法 で検討した。

A549 細胞において、これらの分子の発現が酸素分圧に依存して変化することを見いだした。

Namiloride-blockable ENaC ファミリーと AQP5 の mRNA は低酸素暴露(1%O₂, 12h)で誘導された。一方、タイトジャンクション蛋白質 (ZO-1, occudin, claudin)の mRNA 発現は同じ暴露で抑制された。

HIF 活性化剤, HIF 阻害薬を用いて HIF 活性を人為的に操作し、遺伝子発現の変化を検討した。HIF-1 活性化剤として DMOG(Dimethylloxaloylglycine), NPG (n-propyl gallate), CoCl₂, DFX (Desferrioxamine)を用いた。HIF-1 活性化阻害薬 と し て YC-1(3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole)を用いてこれらの低酸素環境における遺伝子発現変化の一部が転写因子 HIF-1 の活性化に依存していることを見いだした。

(2) 肺血管の透過性と肺胞上皮のタイトジャンクション機能の解析

タイトジャンクションの機能的な変化を検出するために特別な細胞培養法を施し、細胞上皮で形成されるバリア機能を電気抵抗の変化で観察した。

低酸素への 24 時間の暴露は、細胞接着で維持される細胞-細胞バリアにより作られる電気抵抗を低下させるつまりバリア機能を抑制することが観察された。

この抑制は、HIF-1 の人為的な活性化でも同程度に観察された。

以上より HIF-1 は細胞-細胞バリア機能を負に調整する因子である事が明らかになった。

(3)ラット(マウス)での片肺換気モデル(肺胞虚脱モデル)の構築と解析

ラットでの片肺換気モデル(肺胞虚脱モデル)の構築 ラットに気管挿管して片肺換気モデル(肺胞虚脱モデル)の構築には成功したが確実に肺水腫を作出するには至らなかった。

無気肺側で vascular endothelial growth factor(VEGF)と angiopoietin(Ang-1, Ang-2)の発現誘導が観察された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 19 件)

Hirota K. Involvement of hypoxia-inducible

factors in the dysregulation of oxygen homeostasis in sepsis. Cardiovascular & hematological disorders drug targets. 2015;15(1):29-40. doi:

10.2174/1871529X15666150108115553. (査読有り)

Goto Y, Zeng L, Yeom CJ, Zhu Y, Morinibu A, Shinomiya K, Kobayashi M, Hirota K., Itasaka S, Yoshimura M, Tanimoto K, Torii M, Sowa T, Menju T, Sonobe M, Kakeya H, Toi M, Date H, Hammond EM, Hiraoka M, Harada H. UCHL1 provides diagnostic and antimetastatic strategies due to its deubiquitinating effect on HIF-1alpha. Nature communications. 2015;6:6153. doi: 10.1038/ncomms7153. (査読有り)

広田喜一. 肺胞低酸素と炎症 -低酸素誘導性因子活性化の視点から-. 分子呼吸器病. 2014;18(1):73-5. (査読無し)

広田 喜一. 肺内酸素環境と肺疾患 -低酸素-HIF-炎症-. 呼吸器内科. 2014;25(2):270-5. (査読無し)

Zeng L, Morinibu A, Kobayashi M, Zhu Y, Wang X, Goto Y, Yeom CJ, Zhao T, Hirota K., Shinomiya K, Itasaka S, Yoshimura M, Guo G, Hammond EM, Hiraoka M, Harada H. Aberrant IDH3alpha expression promotes malignant tumor growth by inducing HIF-1-mediated metabolic reprogramming and angiogenesis. Oncogene. 2014. doi: 10.1038/onc.2014.411. (査読有り)

Miyatake S, Manabe Y, Inagaki A, Furuichi Y, Takagi M, Taoka M, Isobe T, Hirota K., Fujii NL. Macrophage migration inhibitory factor diminishes muscle glucose transport induced by insulin and AICAR in a muscle type-dependent manner. Biochemical and biophysical research communications. 2014;444(4):496-501. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.089. (査読有り)

Kai S, Tanaka T, Matsuyama T, Suzuki K, Hirota K. The volatile anesthetic isoflurane differentially suppresses the induction of

erythropoietin synthesis elicited by acute anemia and systemic hypoxemia in mice in an hypoxia-inducible factor-2-dependent manner. *European journal of pharmacology*. 2014;732C:43-9. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.03.020. (査読有り)

Inada T, Hirota K, Shingu K. Intravenous anesthetic propofol suppresses prostaglandin E and cysteinyl leukotriene production and reduces edema formation in arachidonic acid-induced ear inflammation. *Journal of immunotoxicology*. 2014;1-5. doi: 10.3109/1547691X.2014.938874. (査読有り)

Hirota K. Hypoxia-inducible Factors Are Already "Active" in the Von Hippel-Lindau-deficient Renal Cell Carcinoma-4 Cells. *Anesthesiology*. 2014;120(6):1523. doi: 10.1097/ALN.0000000000000246. (査読有り)

広田喜一. 硫化水素はミトコンドリア依存的に低酸素誘導性遺伝子応答を調節する. *Medical Gases*. 2013;15(1):25-7. (査読無し)

広田喜一. 疾患の病態生理学と低酸素誘導性因子. *細胞*. 2013;45(9):415-8. (査読無し)

Zhu Y, Zhao T, Itasaka S, Zeng L, Yeom CJ, Hirota K, Suzuki K, Morinibu A, Shinomiya K, Ou G, Yoshimura M, Hiraoka M, Harada H. Involvement of decreased hypoxia-inducible factor 1 activity and resultant G(1)-S cell cycle transition in radioresistance of perinecrotic tumor cells. *Oncogene*. 2013;32:2058 - 68. doi: 10.1038/onc.2012.223. (査読有り)

Tanaka T, Kai S, Matsuyama T, Adachi T, Fukuda K, Hirota K. General Anesthetics Inhibit LPS-Induced IL-1beta Expression in Glial Cells. *PloS one*. 2013;8(12):e82930. doi: 10.1371/journal.pone.0082930. (査読有り)

Suzuki K, Nishi K, Takabuchi S, Kai S, Matsuyama T, Kurosawa S, Adachi T, Maruyama T, Fukuda K, Hirota K. Differential roles of prostaglandin E-type receptors in

activation of hypoxia-inducible factor 1 by prostaglandin E1 in vascular-derived cells under non-hypoxic conditions. *PeerJ*. 2013;1:e220. doi: 10.7717/peerj.220. (査読有り)

Liu Y, Higashitsuji H, Higashitsuji H, Itoh K, Sakurai T, Koike K, Hirota K, Fukumoto M, Fujita J. Overexpression of gankyrin in mouse hepatocytes induces hemangioma by suppressing factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1 (FIH-1) and activating hypoxia-inducible factor-1. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013;432(1):22-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.093. (査読有り)

Kawano Y, Kawaguchi M, Hirota K, Kai S, Konishi N, Furuya H. Effects of n-propyl gallate on neuronal survival after forebrain ischemia in rats. *Resuscitation*. 2012;83(2):249-52. Epub 2011/08/02. doi: 10.1016/j.resuscitation.2011.07.024. (査読有り)

Kai S, Tanaka T, Daijo H, Harada H, Kishimoto S, Suzuki K, Takabuchi S, Takenaga K, Fukuda K, Hirota K. Hydrogen sulfide inhibits hypoxia- but not anoxia-induced hypoxia-inducible factor 1 activation in a von hippel-lindau- and mitochondria-dependent manner. *Antioxid Redox Signal*. 2012;16(3):203-16. Epub 2011/10/19. doi: 10.1089/ars.2011.3882. (査読有り)

Harada H, Inoue M, Itasaka S, Hirota K, Morinibu A, Shinomiya K, Zeng L, Ou G, Zhu Y, Yoshimura M, McKenna WG, Muschel RJ, Hiraoka M. Cancer cells that survive radiation therapy acquire HIF-1 activity and translocate towards tumour blood vessels. *Nature communications*. 2012;3:783. Epub 2012/04/19. doi: 10.1038/ncomms1786. (査読有り)

〔学会発表〕(計10件)

麻酔薬は敗血症時の視床下部における炎症性サイトカイン誘導を抑制する

田中具治, 広田喜一, 甲斐慎一, 松山智紀, 福田和彦

日本麻酔科学会 第 60 回学術集会

2013/5/24 札幌市 ロイトン札幌他

神経因性疼痛モデルラット脊髄における低酸素誘導性因子とその下流遺伝子の発現について

松山智紀, 佐々木美佳, 天谷文昌, 広田喜一, 福田和彦

日本麻酔科学会 第 60 回学術集会

2013/5/24 札幌市 ロイトン札幌他

シンポジウム 急性肺損傷・肺循環障害の分子病態

低酸素と肺胞炎症

広田喜一

日本呼吸器学会 2013/04/21 東京都 東京国際フォーラム

シンポジウム: IS12 低酸素応答が制御する多彩な生命現象 -生理機能の解明から疾患に迫る-

『炎症・インフラマソームのレドックス制御と TXNIP/HIF-1 システム』

広田喜一

第 85 回日本生化学会 2012/12/14 福岡市

「低酸素研究の 10 年」

hypoxia-inducible factor の 20 年と 5 つの未解決問題

広田喜一

第 10 回がんとハイポキシア研究会

2012/12/06 横浜市 横浜開港会館

シンポジウム「生体ガスと臓器保護」-「硫化水素はミトコンドリア依存的に低酸素誘導性遺伝子応答を調節する」

広田喜一

第 16 回日本医療ガス学会学術大会・総会

2012/11/17 東京都 東京ステーションコンファレンス

特別講演 1 「ハイポキシア生物学-酸素代謝

からみる生命現象の方程式」

広田喜一

第 47 回日本高気圧環境・潜水医学会学術集会

2012/11/06 札幌市 北海道大学 学術交流会館

33rd Naito Conference

Oxygen Biology Hypoxia, Oxidative stress and Diseases

Kiichi Hirota

2012/06/28 Sapporo

グリア細胞における LPS 刺激による IL-1beta 遺伝子の発現は、全身麻酔薬により抑制される。

田中 具治, 広田 喜一, 甲斐 慎一, 松山 智紀, 福田 和彦

日本麻酔科学会 第 59 回学術集会 2012/ 6/8 神戸市 神戸ポートピアホテル他

マイクログリアの活性化と酸素環境が低酸素誘導性遺伝子発現と神経因性疼痛関連遺伝子発現に与える影響

松山 智紀, 広田 喜一, 鈴木 堅悟, 甲斐 慎一, 大条 紘樹, 福田 和彦

日本麻酔科学会 第 59 回学術集会 2012/ 6/7 神戸市 神戸ポートピアホテル他

〔図書〕(計 1 件)

Hirota K. Hypoxia and hypoxia-inducible factor in inflammation. In: Roy S, editor. Chronic Inflammation: Molecular Pathophysiology, Nutritional and Therapeutic Interventions: Taylor & Francis; 2012. p. 51-65.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

広田 喜一 (HIROTA, Kiichi)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00283606