

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：34417

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659695

研究課題名(和文) 低酸素センサー調節による誘導代謝リプログラミングによる腎不全治療戦略の策定

研究課題名(英文) Investigation for establishment for a novel intervention to protect kidney against hypoxic injury by inducing metabolic reprogramming by manipulating the transcription factor HIF-1 activity

研究代表者

広田 喜一 (HIROTA, Kiichi)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00283606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：腎尿管上皮と糸球体の初代培養細胞を用いた検討により以下の知見を得た。小分子化合物 n-propyl gallate (nPG) は腎尿管上皮と糸球体細胞において転写因子 HIF-1 を低酸素(1%酸素環境) 暴露と同等に活性化する。おそらくその結果代謝リプログラミングが起こりこれら細胞の酸素消費量が減少した。また nPG 処理は腎尿管上皮と糸球体細胞に低酸素体制を付与した。これらは周術期の腎保護戦略の策定に一定の示唆を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：In order to establish a novel method to protect kidney from ischemic injury, we explored an intervention by manipulate the transcription factor HIF-1 activity with the small molecular compound n-propyl gallate (nPG). 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 in the primary cultured tubular and glomerular cells. Moreover, we indicated that nPG pretreatment induced HIF-1 activation and expression of glycolytic enzymes and conferred tolerance against hypoxia-induced cell death of cells derived from kidney.

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 腎臓 HIF-1 代謝 リプログラミング

1. 研究開始当初の背景

腎は生体の恒常性を保つために大量の糸球体濾過を行い、そのうちの 99%を再吸収している。この再吸収はおもにエネルギーを使ったトランスポーターによって行われるため腎臓は酸素消費、エネルギー需要の高い臓器である。

腎臓内の酸素分圧は皮質表層で 40-60 mmHg、髄質においては 15 mmHg と生理的な状態でも低酸素である。急性腎不全動物モデルでは利尿薬を投与して Na 再吸収を抑制すると腎での酸素消費が減るために酸素分圧が少々して腎障害が軽減される現象が観察されている。造影剤腎症もその発症の機序として溶質の再吸収量の増加と髄質の血流低下のために起こる低酸素状態が重要である。さらに細胞内低酸素状態はパラドキシカルにミトコンドリアでの活性酸素種の発生を伴い細胞障害の原因となっている。

このような腎臓の低酸素応答において低酸素誘導性因子 1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1) [1-3]の役割が追及されてきた。

申請者は、HIF-1 の活性化により細胞のエネルギー経路が酸化的リン酸主体の経路から解糖系によるものにシフトする可能性(代謝リプログラミング)現象を見いだしてきた。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細胞は低酸素状況を生き延びるといふ仮説を着想した。

申請者らはすでに強力な還元剤 n-propyl gallate (nPG)が細胞内低酸素センサー分子である HIF- α 水酸化酵素[2]の阻害により酸素分圧非依存的に HIF の活性化をもたらすことを見いだしていた[3]。

nPG のような細胞膜透過性をもった小分子化合物により低酸素センシング機構を人為的に操作できれば酸素分圧が正常な腎臓に

低酸素を模倣した状態を作り出すことができ酸素ホメオスターシスの維持のための遺伝子変化をあらかじめ引き起こすことができると考えられる。さらに HIF-1 の生物学的な特徴を臓器保護に利用しようとするものでプレコンディショニングと”冷却”を同時に HIF-1 を標的に行うユニークなものと考えられた。

[1] K. Hirota, Hypoxia-inducible factor 1, a master transcription factor of cellular hypoxic gene expression, *J Anesth* 16 (2002) 150-159.

[2] 広田 喜一, 田中 具治, 低酸素応答と低酸素センサー, *Life Support and Anesthesia* 15 (2008) 238-243.

[3] M. Kimura, ... K. Hirota, n-Propyl gallate activates hypoxia-inducible factor 1 by modulating intracellular oxygen-sensing systems. *Biochem J* 411 (2008) 97-105

2. 研究の目的

マウス AKI モデルを用いて nPG による HIF-1 の人為的な活性化により腎臓の酸素分圧の維持効果が得られるのかまた腎機能の維持効果が得られるのかを助成申請期間中にあきらかにする事、つまり、nPG により腎臓由来の培養細胞で酸素消費をめぐる代謝リプログラミングが起こるかどうか、また腎臓保護効果が観察できるかどうかを検討する事が本研究の目的であった。

その目的の為に腎由来培養細胞を用いた検討も同時に遂行する計画も含んでいた。

3. 研究の方法

本申請の目的は nPG による腎臓酸素分圧の上昇効果と急性腎不全(AKI)に対する保護効果の確認であった。

この目的のため、細胞レベル、臓器レベルでの検討を行った。

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た。

すなわち

(1) 培養細胞を用いた検討

(2) マウス・ラットの腎臓を用いた AKI に対する保護効果の検討

(3) マウス・ラットの腎臓を用いた酸素メタボリズムの検討または酸素分圧のイメージングの三つであった。

(1) 培養細胞を用いた検討

培養細胞として腎尿細管上皮と糸球体の初代培養細胞を使用する。細胞は市販のものを購入する。

測定項目は以下の通りであった。

① ATP 産生量の測定

② HIF-1, 下流産物の遺伝子発現

hemeoxygenase-1, cytoglobin, erythropoietin, nitric oxide synthase, VEGF

解糖系酵素-TCA 回路系遺伝子産物 glucose transporter1-3, Pdk1-4, hexokinase4, lactate dehydrogenase A, phosphofructokinase-M, Phosphoglycerate kinase, Pyruvate kinase の発現を quantitative RT-PCR で行う。対照として β -actin, 18S ribosomal RNA の RT-PCR も行う。

③ 酸素消費量のアッセイ

培養細胞を用いた検討はクラーク電極を用いた実験手技を採用する。

(2) マウス・ラットの腎臓を用いた AKI に対する保護効果の検討

マウス・ラットを用いた AKI モデルの作成を行う。

現在の計画では、片側尿管結さつ (UUO) による腎尿細管・間質障害モデルと片側腎動脈の遮断による虚血再灌流による傷害モデルの定法に従い作成する。

HIF 活性化剤 n-propyl gallate を投与して

AKI を作成して障害の程度を定法を用いて腎障害の検索を行う。すなわち組織学的に腎細胞障害の程度を検討する。8-OHdG (dehydroguanosine oxidation のマーカー) を用いた酸化的ストレスの検討, アポトーシス関連の分子の活性化の検討を加える。

(3) マウス・ラットの腎臓を用いた酸素メタボリズムの検討または酸素分圧のイメージング

腎臓内の酸素分圧を測定することで酸素の需給バランスのレベルを知ることができる。蛍光クエンチング法を測定原理とした OxyLabp02™ (Oxford Optronix 社製) を用いてリアルタイムに臓器の酸素分圧を測定する実験系を構築する。

ピモニダゾール (pimonidazole) を用いて臓器内の低酸素領域の解析も行う。

さらに低酸素誘導性遺伝子を luciferase による化学発光で検出できるマウス-申請者で作出済み-を対照に共焦点レーザー顕微鏡 (研究機関に配備済み) を用いた検討も行う。

4. 研究成果

(1) 培養細胞を用いた検討

培養細胞として腎尿細管上皮と糸球体の初代培養細胞を使用した。細胞は市販のものを購入した。

これらの細胞を 20%酸素分圧下また 1%酸素分圧下で培養して、nPG に暴露した。

HIF-1 の各サブユニットの蛋白質・mRNA 発現量を検討したところ 1%酸素分圧または 20%酸素分圧下においても nPG 暴露群では HIF-1a 蛋白質・mRNA の発現の増強が観察された。転写因子 HIF-1 の支配遺伝子発現 (hemeoxygenase-1, cytoglobin, erythropoietin, nitric oxide synthase, VEGF, 解糖系酵素-TCA 回路系遺伝子産物

glucose transporter1-3, Pdk1-4, hexokinase4, lactase dehydrogenase A, phosphofructokinase-M, Phosphoglycerate kinase, Pyruvate kinase)の解析を行ったところこれらの遺伝子発現は 1%酸素分圧環境への暴露と同等に nPG 処理により亢進することが判明した。

以上の事実により nPG は腎細胞において HIF-1 の活性化を低酸素と同等にもたらす事が示された。

次に腎尿細管上皮と糸球体の初代培養細胞を用いて酸素消費量のアッセイをクランク電極を用いて行った。nPG 処理は腎尿細管上皮と糸球体細胞の酸素消費量を減少させる事が判明したが腎尿細管上皮における作用が強かった。

さらに腎尿細管上皮と糸球体細胞を 0.5%酸素分圧環境に 24 時間暴露すると細胞死(アポトーシス)の誘導が確認できるが nPG による処理(24 時間)を先行させるとアポトーシスに陥る細胞数が有為減少した。この nPG による細胞保護効果は HIF-1 α inhibitor である YC-1 処理により減少した。糖代謝リプログラミング成立の指標として細胞培養液中の lactate, pyruvate 濃度を測定して対象群との比較でその増加を確認した。

(2) マウス・ラットの腎臓を用いた AKI に対する保護効果の検討-マウスを・ラットを用いた AKI モデルの作成を試みた。片側尿管結さつ(UUO)による腎尿細管・間質障害モデルと片側腎動脈の遮断による虚血再灌流による傷害モデルの定法に従い作成を試みたが動物モデルの確立には至らなかった。すなわち in vivo モデルにおける nPG による腎保護効果を確認することはできなかった。

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 15 件)

- ① 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;18:73-5. (査読無し)
- ② 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;25:270-5. (査読有り)
- ③ 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. Biochem Biophys Res Commun. 2014;444:496-501. (査読有り)
- ④ 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. Eur J Pharmacol. 2014;732C:43-9. (査読有り)
- ⑤ 広田喜一. 疾患の病態生理学と低酸素誘導性因子. 細胞. 2013;45:415-8. (査読有り)
- ⑥ 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;15:25-7. (査読有り)
- ⑦ 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. (査読有り)

⑧ 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:e82930.

doi:10.1371/journal.pone.0082930 (査読有り)

⑨ 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)

⑩ 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. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;432:22-7. (査読有り)

⑪ 広田 喜一. グルタミンノリシス. In: 朋義 曾, 浩安 江, editors. *がんと代謝 (実験医学 増刊)*. 東京: 羊土社; 2012. (査読有り)

⑫ 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;83:249-52. (査読有り)

⑬ 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. *Antioxidants & redox signaling*. 2012;16:203-16. (査読有り)

⑭ 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. (査読有り)

⑮ 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. (査読有り)

[学会発表] (計 11 件)

① 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

② 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

③ 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

④ シンポジウム:1S12 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

⑤ 「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

⑥ 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

⑦ 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

⑧ 33rd Naito Conference

Oxygen Biology Hypoxia, Oxidative stress
and Diseases

Kiichi Hirota

2012/06/28 Sapporo

⑨ 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 札幌市

⑩ 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, 廣田 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 札幌市

⑪ イソフルランは、急性貧血により誘導さ
れる血中エリスロポエチンの上昇を抑制す
る

甲斐 慎一, 田中 具治, 松山 智紀, 大条
紘樹, 広田喜一, 福田 和彦

日本麻酔科学会 第 59 回学術集会 2012/
6/7 札幌市

[図書] (計 0 件)

[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

広田 喜一 (HIROTA, Kiichi)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号: 00283606

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし