

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861725

研究課題名(和文)低酸素応答システムによる代謝制御を用いた多臓器不全に対する臓器保護戦略

研究課題名(英文)Organ protection by hypoxia response system through metabolic modulation

研究代表者

柳 大介(Yanagi, Daisuke)

横浜市立大学・市民総合医療センター・助教

研究者番号：80638586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：LPS腹腔内投与，および気管内投与モデルマウスの肺におけるHIF-1タンパク，ATPの定量を行った．どちらのモデルにおいてもHIF-1タンパクは早期(6時間後)に増加していたが，24時間後には通常レベルに戻っていた．同様にATPも早期に増加する傾向がみられたが，統計学的に有意な変化はなかった．次にPHD阻害剤DMOGのLPS気管内投与肺傷害への効果を検討した．DMOG気管内投与は肺のHIF-1タンパクを増加させ，LPS投与による肺胞バリアー破綻を抑制した．また，このDMOGによる肺胞バリアー保護効果は好中球性炎症の抑制以外のメカニズムによることが示唆された．

研究成果の概要(英文)：We quantified the HIF-1 protein and ATP in the lungs of mice intraperitoneally or intratracheally treated with LPS. HIF-1 protein significantly increased at early time point (6h after the LPS challenge), and returned to the normal level within 24h in the both models. ATP concentration in lungs were also increased at early time point, however the changes were not statistically significant. Next, we evaluated the effects of a PHD inhibitor; DMOG on LPS induced lung injury. Intratracheal DMOG treatment significantly increased HIF-1 protein in lungs, and attenuated the increase of alveolar permeability induced by intratracheal LPS administration. However, neutrophilic inflammation was not attenuated by DMOG treatment. It was suggested that the protective effects of DMOG is not mediated by suppression of neutrophilic inflammation.

研究分野：敗血症，肺傷害

キーワード：肺傷害 低酸素誘導性因子

1. 研究開始当初の背景

(1)多臓器不全の病態

多臓器不全は感染症、ショック、蘇生後などに生じる共通の重症病態であり、一旦、多臓器不全に陥ると、その予後は極めて不良であるため治療法の開発は急務である。過大な生体侵襲が加わると、組織酸素需要は増大するにも関わらず、低血圧やシャント血流の増加によって酸素供給は低下し、組織酸素代謝失調が生じることで、多臓器不全が引き起こされると考えられている(Abraham E et al. Crit Care Med. 2007)。

(2)PHD-HIF 経路

PHD (プロリン水酸化酵素) -HIF (低酸素誘導性因子) 経路は生体の低酸素応答の主要軸である。低酸素によって PHD の働きが阻害されることによって HIF の活性化が生じ、低酸素に対応するための多彩な遺伝子が転写される。さらに、HIF は低酸素応答のみならず、癌細胞や敗血症などでも活性化され、癌細胞の転移・増殖や炎症の制御においても重要な役割を果たすことが知られるようになってきた。(Semenza GL. Cell.2012) HIF 活性化の作用の一つとして細胞代謝を電子伝達系から解糖系にシフトすることで、低酸素下においても有効なエネルギー代謝を可能にするということが挙げられる(Semenza GL. Biochem. J. 2007)。さらに、電子伝達系を使わないことによるアポトーシス促進性 Bcl-2 ファミリーの活性化抑制(Tomiyama A et al JNCI 2006)、オートファジー促進によるホメオスタシス維持機構(Rabinowitz JD et al.Science 2010)などを介して細胞が低酸素環境等の高ストレス下においても生存することを可能としている。癌細胞においては HIF の活性化機構が癌の増殖を助けることから、HIF を抑制することが治療戦略として研究されている(Semenza GL.Oncogene.2010)。

以上を踏まえて、多臓器不全の病態においては PHD の阻害による HIF の活性化が炎症、低酸素に暴露されている組織に対して、代謝の制御により保護効果を示すという仮説を立てた。

2. 研究の目的

LPS を用いた臓器傷害モデルにおける HIF-1 タンパク、エネルギー代謝の挙動を明らかにするとともに、HIF-1 を増加させるプロリルヒドロキシラーゼ(PHD)阻害剤によって臓器を保護することができるか検討することが本研究の目的である。傷害臓器として敗血症などによって影響を受ける頻度が最も多い肺に注目し、LPS を肺胞上皮細胞株、及びマウスに対して投与し、HIF-1 タンパク、エネルギー指標である ATP の挙動を

討した。また、PHD 阻害剤ジメチルオキサリルグリシン(DMOG)を気管内投与することで LPS 誘導性傷害による肺胞バリアーの破壊を抑制できるか検討を行った。

3. 研究の方法

細胞培養

マウスの肺胞上皮細胞株 MLE15 細胞をサブコンフルエントとなるまで培養し、LPS 1 μ g/ml-100 μ g/ml の濃度で 24 時間刺激した。細胞を RIPA バッファーで溶解し保存した。

動物モデル

敗血症モデルマウスとして、8-10 週令のオス C57BL6J マウスに 10mg/kg の LPS(O111, B4, SIGMA)を腹腔内投与した。また、肺傷害モデルとして同様のマウスに、1mg/kg もしくは 25 μ g/body の LPS を経気管投与した。いずれにおいても LPS 投与後 6 時間後、24 時間後に全身麻酔下に頸動脈から脱血安楽死させ、肺を採取、凍結保存を行った。

また、PHD 阻害剤の DMOG の LPS 経気管投与モデルマウスにおける治療効果の検討するために、8-10 週令のオス C57BL6J マウスに PBS に溶解した PHD 阻害剤ジメチルオキサリルグリシン(DMOG)2.5mg を経気管投与、さらにその 1 時間後に 25 μ g の LPS を経気管投与した。LPS 投与 15 時間後に頸動脈から脱血安楽死させ、気管支肺胞洗浄液(BALF)、肺組織を採取した。

肺胞バリアー透過性の評価

BALF 中のタンパク濃度、IgM 濃度を測定することで肺胞バリアー透過性を評価した。

ELISA

凍結保存した臓器を RIPA バッファー(Abcam)中でホモジナイズし、ホモジネートを保存した。

ホモジネート中の HIF-1 α 、ミエロペルオキシダーゼ(MPO)、また、BALF 中の MPO を ELISA 法にて定量した。ホモジネート中 HIF-1 α 、MPO 濃度は BCA 法で測定した総タンパク量で標準化した。

ATP 濃度の測定

LPS 腹腔内あるいは気管内投与モデルマウスから採取した左肺から ATP 抽出キット(AMERIC)を用いて ATP を抽出し、ATP 濃度測定試薬(Roche)を用いて、濃度を測定した。ATP 濃度は肺水腫の影響を避けるために、肺あたりの濃度に標準化した。

統計学的解析

データは mean \pm SEM で表した。二元配置分散分析及び post hoc 解析として Bonferroni 補正を伴う Student's t 検定を行った。P<0.05 を統計学的有意水準として設定した。

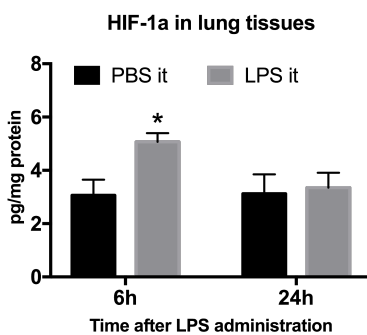
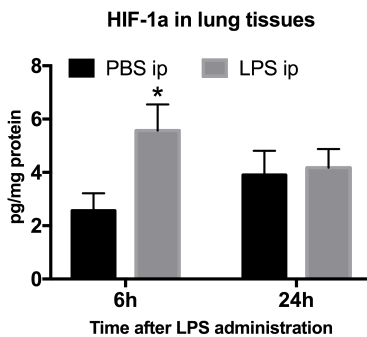
4. 研究成果

(1) LPS 刺激が培養細胞中の HIF-1 濃度に与える影響の検討

肺胞上皮細胞株 MLE15, 肝細胞株 Hepa1-6 いずれにおいても, LPS 刺激によって HIF-1 の明らかな変化は見られなかった (Data not shown). これらの細胞では LPS の単独刺激では HIF-1 の量が変化しないと考えられた.

(2) LPS 腹腔内投与モデルマウス, LPS 気管投与モデルマウスにおける HIF-1 タンパクの定量

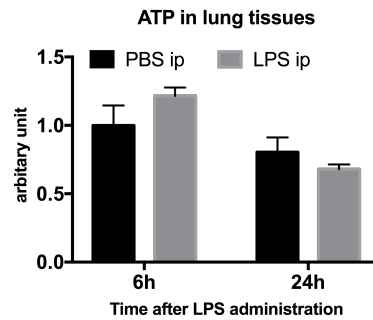
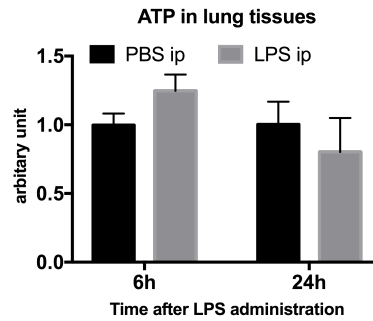
培養細胞においては LPS 刺激だけでは HIF-1 の変化は見られなかったが, 動物の体内では炎症細胞の作用や, 血流の低下などによって HIF-1 タンパク量に変化が見られる可能性があると考えた. LPS 投与を行った動物においては HIF-1 タンパク量に変化が見られないか検討を行った. LPS 腹腔内投与, 気管投与いずれにおいても LPS 投与後 6 時間の時点で肺組織において HIF-1 タンパクの増加が見られた. しかしながら, 24 時間後には有意な差は見られなかった



*P<0.05 compared with PBS group

(3) LPS 投与モデルマウスにおける肺組織 ATP 濃度の検討

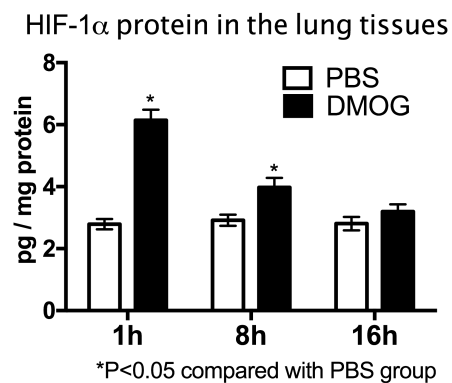
次に同様に LPS を投与したマウスの肺組織 ATP 濃度を測定した. いずれのモデルにおいても統計学的に有意ではないものの, LPS 投与群において 6 時間後には ATP 濃度が増加, 24 時間後には低下する傾向が見られた.



(4) PHD 阻害薬 DMOG が LPS 気管内投与肺傷害モデルに与える影響の検討

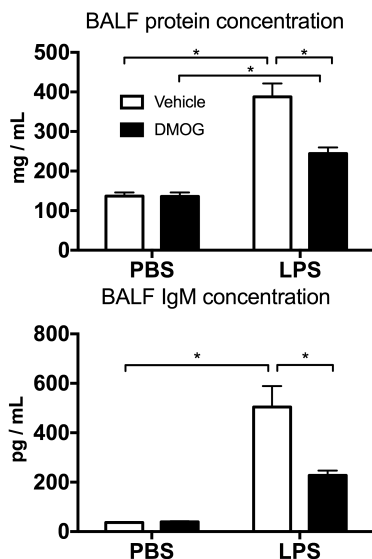
以上の結果から, HIF-1 は LPS 投与早期のエネルギー代謝を最適化している可能性があると考え, PHD 阻害薬 DMOG の投与により, HIF-1 タンパクを増加させることが肺傷害を軽減させるか検討することとした. 本実験においては明らかな肺傷害を引き起す LPS 気管内投与モデルを用いて検討を行った.

最初に PBS50 μ l に溶解した DMOG2.5mg を気管内に投与することで, 肺組織中の HIF-1 タンパクが増加することを確かめた. HIF-1 タンパクレベルは投与後 16 時間後には通常レベルまで戻っていた.

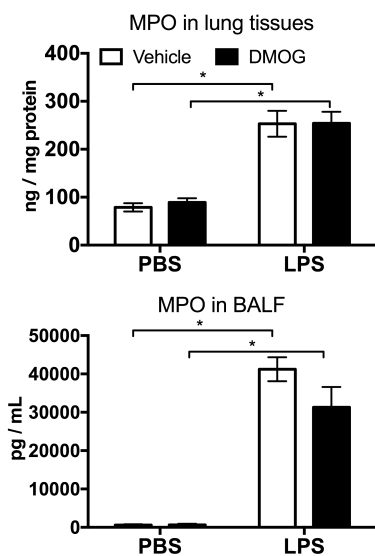


*P<0.05 compared with PBS group

次に DMOG2.5mg を気管内投与後 1 時間後に 50 μ l の PBS に溶解した LPS 25 μ g を投与, 15 時間後の肺傷害の検討を行った. LPS を投与することで, BALF 中のタンパク, IgM 濃度が著明に増加しており肺胞バリアーが破綻していることが確かめられた. BALF 中のタンパク, IgM 濃度の増加は予め DMOG を気管内に投与しておくことで抑制された.



また、LPSを投与することでBALF中、肺ホモジネート中のMPOが著明に増加しており、好中球の集積、活性化が生じていると考えられた。DMOG投与によってMPOに有意な変化は見られなかった。これらから、DMOGは好中球性の炎症を抑制する以外のメカニズムを通して、LPS誘導性肺傷害による肺胞バリアーの破綻を抑制していると考えられた。



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 0件)

[学会発表](計 0件)

[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

柳 大介 (YANAGI, Daisuke)

横浜市立大学附属市民総合医療センター

一助教

研究者番号: 80638586