

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：74314

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10551

研究課題名(和文) 急性肺障害の慢性化過程に動的な生体内レドックスリモデリングが果たす役割の追究

研究課題名(英文) The role of cellular redox system in inflammatory disorders of acute lung injury

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：低酸素から酸素ホメオスタシスの破綻まで解析対象を広げ、生体内レドックス制御因子であるチオレドキシシン(TRX)を中核として、その結合タンパク質TXNIPと転写因子hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)との相互作用の解析を通して敗血症から急性肺障害への過程の理解と臨床への応用を指向した研究を遂行した。TXR1はHIF-1活性化を促進すること、HIF-1はTXNIPの発現を促進するが、TXNIPはTRX1の活性化を抑制するという関係が存在することが明らかになった。このことから細胞のレドックス環境が複数の分子の微妙なバランスの上に存在することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to evaluate the clinical significance of the cellular redox system consisting of thioredoxin and thioredoxin interacting protein (Txnip) for the protection against inflammatory disorders including septic shock, ALI, and ARDS. Since inflammation has been associated with hypoxia and the resulting dysregulation of oxygen homeostasis, we investigated the functional interaction between the thioredoxin system and hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) under inflammatory conditions. We showed that thioredoxin enhanced the transcriptional activity of HIF-1. Thioredoxin-induced HIF-1 activation up-regulated the expression level of Txnip, which could, in turn, suppress the function of thioredoxin. These results revealed that the cellular redox environment was maintained by a subtle balance and interplay between these redox-related molecules.

研究分野：麻酔科学

キーワード：酸素環境 敗血症 急性肺障害 thioredoxin TXNIP HIF-1

1. 研究開始当初の背景

分子状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シスの乱れは、細胞が曝露される酸素分圧の変化や分子状酸素に直接由来する活性酸素種(ROS)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。これは肺が外界と体内のインターフェース臓器であることに起因する。

このようなダイナミズムが典型的に観察される病態の代表は、敗血症性ショックである。進行した敗血症では、血圧の低下に加え、血管内の微小血栓の発生、間質の浮腫、血管内皮細胞の機能不全が起こり組織低灌流状態となる。これに加えて、敗血症状態の各種臓器は炎症性サイトカインへの暴露、持続する細胞内低酸素状態によりミトコンドリア電子伝達系の異常が起こり、酸素利用効率が低下している。この状態では比較的に多量の酸素が供給されたとしても十分な酸素利用がなされない場合があり、酸素消費量が酸素供給量に依存して増加していく現象が観察される。

このような酸素代謝の破綻状況では分子状酸素の分圧の低下と活性酸素種の増加が共に観察されるという状況が観察される場合があり、臓器、細胞のレドックスバランスの逸脱が出現する。

このように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。

申請者らは共同してこの15年間低酸素が惹起する遺伝子応答のマスター転写因子として知られる低酸素誘導性因子1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)の研究に従事して周術期医学におけるHIF-1が果たす役割について報告してきたが最近では肺の病理的状态にテーマを絞った研究を継続している。

一方、チオレドキシン(thioredoxin, TRX)とは大腸菌からヒトまでほとんどの生物種で存在が確認されている生物に存在する酸化還元タンパク質である。ヒトでは105アミノ酸残基から構成されて分子量が約13kDaの蛋白質である。TRXは、他の蛋白質のシステイン残基が形成するジスルフィド結合の還元・切断を促進することで、抗酸化物質として機能することに加えて活性酸素種の一部を消去する機能を持つとする報告もある。

申請者らは1977年に転写因子HIF-1の活性化にTRXを中心とした細胞内調整因子のカスケードからなるレドックス制御が存在することつまりTRXとHIF-1システムのクロストークの存在を証明した。さらに結合蛋白質として申請者らが同定した

2/thioredoxin-interacting protein (TBP-2/TXNIP)がインフラマソームの構成タンパク質NLRP3 (NALP3)との結合を介してDAMPs(damage-associated molecular patterns:傷害関連分子パターン)への細胞の免疫応答が制御しているという報告がある。またTXNIPは低酸素状態で転写因子HIF-1依存的に発現の誘導を受けるという報告がある。

さらに研究協力者である淀井淳司博士らはTRXが肺の炎症の進展を予防する作用を持つことを今まで報告してきている。(Redox regulation of lung inflammation by thioredoxin. Antioxid Redox Signal. 2005 vol7 :p60)

これらの事実を背景にして、本申請では、従来からの申請者らの研究範囲を、低酸素から酸素ホメオスタシスの破綻まで解析対象を広げ、生体内レドックス制御因子であるチオレドキシン(TRX)を中核として、その結合タンパク質TXNIPとHIF-1との相互作用の解析を通して生体の炎症反応の敗血症と続発する急性肺障害(acute lung injury, ALI)またadult respiratory distress syndrome (ARDS)のよりよい理解と臨床への応用・展開を指向した研究計画を発想した。

2. 研究の目的

全身の酸素ホメオスタシスを適正に保つことは周術期患者管理の要諦である。

本申請では、敗血症と続発するALI/ARDSモデルにおいて肺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TRX/HIF-1バランスの観点から解析することを目指した。

生体内レドックス制御因子であるチオレドキシン(thioredoxin, TRX1)を中核として、その結合タンパク質thioredoxin-interacting protein(TXNIP)と低酸素誘導性因子1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)との相互作用の解析を通して生体の炎症反応を敗血症から急性肺障害を経て肺線維症にまでいたる生体内機序を理解することを具体的な目的として設定した。

この目的のため培養細胞を用いた実験系と実験小動物で敗血症と続発するALI/ARDSモデルを用いた実験系を作出してTRXシステムとHIF-1システムを構成する各分子の動態、相互作用また細胞内レドックス環境の変化を細胞生物学的、分子生物学的に解析してALIからARDSを経て最終的には肺線維症にいたる肺内病変の推移を理解してこれらを標的とした治療戦略の策定を試みた。

3. 研究の方法

実験系は以下に示した要素で構成される。

(1) 培養細胞を用いたin vitro実験系
樹立細胞株と初代培養細胞を用いた実験系を用いた。

(2) 実験小動物を用いた in vivo 実験系

(1) 培養細胞を用いた in vitro 実験

細胞株: 肺胞上皮由来樹立細胞株 A549、ヒト末梢血単球由来 THP-1 細胞、ヒト単球様細胞 U937、マウスマクロファージ Raw264.7 を用いる。

初代培養細胞: 肺胞マクロファージ、腹腔マクロファージ(チオグルタレート刺激)、樹状細胞を TRX トランスジェニック、TXNIP 遺伝子破壊マウスなどから調整して用いる。

培養細胞については、plasmid, ウィルスベクターなどを用いて HIF-1, TRX1, TXNIP の発現を操作する実験系を構築する。培養酸素分圧を 20% から 1% まで変化させて検討を行う。外因性物質である PAMPs と内因性物質である alarmins を含む DAMPs (damage-associated molecular patterns: 傷害関連分子パターン)(表を参照)に暴露して以下の項目について検討を加える。

- ・細胞内レドックスバランスの指標として GSH/GSSG, NAD⁺/NADP の測定

- ・代謝モード推定のための Oxygen consumption rate (OCR) の測定、ミトコンドリア機能のアッセイ

- ・サイトカイン・ケモカインの発現の検討: mRNA, 蛋白質

- ・解糖系代謝の活性化の指標として乳酸, ピルビン酸の測定

- ・インフラマソームとくに NLRP3 インフラマソームの活性化のアッセイ

以上の検討により、DAMPs への応答における HIF-1, TRX1, TXNIP 分子間の相互作用の存在とその相互作用がインフラマソーム活性に与える影響を細胞レベルで知ることができる。

(2) 実験小動物を用いた in vivo 実験系の構築

主としてマウス(C57B/6 マウス、TRX-1 トランスジェニックマウス、TXNIP 遺伝子破壊マウス)を用いる。(遺伝子改変マウスは研究協力者 淀井博士から入手)

個体の酸素消費量のモニタリング、各種バイタルサイン(血圧、心拍数、呼吸数、体温、動脈血酸素飽和度)の記録を行える実験系を構築して研究に使用する。

敗血症モデル

盲腸結紮・穿刺法(CPL)モデルを基礎とした定法に従って腹膜炎-敗血症モデルの構築を行う。

ALI・ARDS モデル

-galactosylceramide(-GalCer) とリポポリサッカライド(LPS)を連続的に気管内投与し作出する。

低酸素血症モデル

組織低酸素状態のコントロールとして用いる。酸素分圧を管理したチャンバー中にラット・マウスを飼育することで構築する。

4. 研究成果

所期の実験計画に基づき研究所年度に以下の研究を行ったのでその成果を以下に記載する。

(1) 培養細胞を用いた in vitro 実験の確立-細胞株(肺胞上皮由来樹立細胞株 A549、ヒト末梢血単球由来 THP-1 細胞、ヒト単球様細胞 U937、マウスマクロファージ Raw264.7)を用いて plasmid, ウィルスベクターなどを用いて HIF-1, TRX1, TXNIP の発現を操作する実験系を構築した。培養酸素分圧を 20% から 1% まで変化させて検討を行う。外因性物質である PAMPs と内因性物質である alarmins を含む DAMPs (damage-associated molecular patterns: 傷害関連分子パターン)に暴露して以下の項目について検討を可能にする実験系を確立した。

細胞内レドックスバランスの指標として GSH/GSSG, NAD⁺/NADP の測定

代謝モード推定のための Oxygen consumption rate (OCR) の測定、ミトコンドリア機能のアッセイ

初代培養細胞(肺胞マクロファージ、腹腔マクロファージ、樹状細胞)を TRX トランスジェニック、TXNIP 遺伝子破壊マウスなどから調整する準備を開始した。

(2) 初代培養細胞(肺胞マクロファージ、腹腔マクロファージ(チオグルタレート刺激)を用いた実験系の確立を行った。TXR1 は HIF-1 活性化を促進すること、HIF-1 は TXNIP の発現を促進するが、TXNIP は TRX1 の活性化を抑制するという関係が存在することが明らかになった。このことは細胞のレドックス環境が複数の分子の微妙なバランスの上に存在することが明らかになった。

(3) 肺線維症の原因となり得るタバコ抽出液により肺胞、気管支上皮由来の細胞において活性酸素依存的に TRX と HIF-1 の活性化をもたらすことを見いだした。

(4) PAMPs と内因性物質である alarmins を含む DAMPs (damage-associated molecular patterns: 傷害関連分子パターン)を用いた検討を行い HIF-1 の活性化を確認した。肺線維症の原因となり得るタバコ抽出液により肺胞、気管支上皮由来の細胞において活性酸素依存的に TRX の発現誘導と HIF-1 の活性化をもたらすことを見いだした。

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)

松尾 禎之, 広田 喜一: 小胞体内レドッ

クスバランスの維持機構. 細胞 2018, 50(4):208-209.

Sumi C, Okamoto A, Tanaka H, Nishi K, Kusunoki M, Shoji T, Uba T, Matsuo Y, Adachi T, Hayashi JI, Takenaga, K., Hirota, K.: Propofol induces a metabolic switch to glycolysis and cell death in a mitochondrial electron transport chain-dependent manner. PLoS ONE 2018, 13(2):e0192796.

DOI:10.1371/journal.pone.0192796

Hirai K, Furusho H, Hirota K, Sasaki H: Activation of hypoxia-inducible factor 1 attenuates periapical inflammation and bone loss. Int J Oral Sci 2018, 10(2):12. DOI:10.1038/s41368-018-0015-0

松尾 禎之, 広田 喜一: 「酸素はいつも足りていない」の生物学の建設 - 2016 年度アルバート・ラスカー基礎医学研究賞の発表に寄せて. Life Support and Anesthesia 2017, 24:194-196.

Okamoto A, Sumi C, Tanaka H, Kusunoki M, Iwai T, Nishi K, Matsuo Y, Harada H, Takenaga K, Bono H, Hirota, K.: HIF-1-mediated suppression of mitochondria electron transport chain function confers resistance to lidocaine-induced cell death. Sci Rep 2017, 7(1):3816.

DOI:10.1038/s41598-017-03980-7

Matsuo Y, Hirota K: Transmembrane thioredoxin-related protein TMX1 is reversibly oxidized in response to protein accumulation in the endoplasmic reticulum. FEBS Open Bio 2017, 7(11):1768-1777. DOI:10.1002/2211-5463.12319

Inada T, Sumi C, Hirota K, Shingu K, Okamoto A, Matsuo Y, Kamibayashi T: Mitigation of inflammation using the intravenous anesthetic dexmedetomidine in the mouse air pouch model. Immunopharmacol Immunotoxicol 2017, 39(4):225-232. DOI:10.1080/08923973.2017.1327964

甲斐 慎一, 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. ICU と CCU 2016, 40:549-554.

広田 喜一: Oxygen, Hypoxia & Beyond -2016 年アルバート・ラスカー基礎医学研究賞に寄せて. 医学のあゆみ 2016, 259(9):961-963.

Yamaguchi R, Harada H, Hirota K: VHL-deficient renal cancer cells gain resistance to mitochondria-activating apoptosis inducers by activating AKT through the IGF1R-PI3K pathway. Tumour Biol 2016, 37(10):13295-13306. DOI:10.1007/s13277-016-5260-2

Okamoto A, Tanaka M, Sumi C, Oku K, Kusunoki M, Nishi K, Matsuo Y, Takenaga K,

Shingu K, Hirota K: The antioxidant N-acetyl cysteine suppresses lidocaine-induced intracellular reactive oxygen species production and cell death in neuronal SH-SY5Y cells. BMC Anesthesiol 2016, 16(1):104. DOI:10.1186/s12871-016-0273-3

Daijo H, Hoshino Y, Kai S, Suzuki K, Nishi K, Matsuo Y, Harada H, Hirota K: Cigarette smoke reversibly activates hypoxia-inducible factor 1 in a reactive oxygen species-dependent manner. Sci Rep 2016, 6:34424. DOI:10.1038/srep34424

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, E. M., Hiraoka, M., Harada, H.: Aberrant IDH3alpha expression promotes malignant tumor growth by inducing HIF-1-mediated metabolic reprogramming and angiogenesis. Oncogene 2015, 34:4758-4766. DOI: 10.1038/onc.2014.411

Yamaguchi R, Perkins G, Hirota K: Targeting cholesterol with beta-cyclodextrin sensitizes cancer cells for apoptosis. FEBS Lett 2015, 589(24 Pt B):4097-4105. DOI: 10.1016/j.febslet.2015.11.009

Suzuki K, Sato Y, Kai S, Nishi K, Adachi T, Matsuo Y, Hirota K: Volatile anesthetics suppress glucose-stimulated insulin secretion in MIN6 cells by inhibiting glucose-induced activation of hypoxia-inducible factor 1. PeerJ 2015, 3:e1498. DOI: 10.7717/peerj.1498

〔学会発表〕(計 17 件)

田中宏昌, 角 千里, 松尾 禎之, 広田 喜一: HIF-1 活性化はミトコンドリア電子伝達系を抑制してプロポフォルの細胞障害を軽減する (第 15 回がんとハイポキシア研究会 2017/11/10 淡路夢舞台国際会議場 淡路市)

角 千里, 廣田 喜一, 楠 宗矩, 岡本 明久, 西 憲一郎, 松尾 禎之: サイプリッド細胞を用いたプロポフォル細胞毒性の検討 (第 15 回がんとハイポキシア研究会 2017/11/10 淡路夢舞台国際会議場 淡路市)

松尾 禎之, 広田 喜一: グルタチオンシステムと連動した小胞体酸化還元酵素の活性制御およびレドックス恒常性維持の分子機構解析 (第 15 回がんとハイポキシア研究会 2017/11/10 淡路夢舞台国際会議場 淡路市)

松尾 禎之, 広田 喜一: 小胞体内レドックスバランスの維持とストレス感知機構の解析: タンパク質のレドックス状態を指標としたストレスモニタリング (第 70 回日本酸化ストレス学会学術集会 2017/6/28 つく

ば国際会議場 つくば市)

角 千里, 廣田 喜二, 楠 宗矩, 岡本 明久, 西 憲一郎, 松尾 禎之: サイプリッド細胞を用いたプロポフォル細胞毒性の検討-プロポフォル注入症候群の病態生理学 (第 64 回日本麻酔科学会学術集会 2017/6/9 神戸国際展示場 神戸市)

岡本 明久, 楠 宗矩, 角 千里, 西 憲一郎, 松尾 禎之, 広田 喜二: 抗酸化物質の N-アセチルシステインはリドカインが誘導する活性酸素種産生や細胞死を抑制する (第 64 回日本麻酔科学会学術集会 2017/6/8 神戸国際展示場 神戸市)

松尾 禎之, 広田 喜二: 膜結合型酸化還元酵素 TMX1 のレドックス状態を指標とした小胞体ストレスのモニタリング (第 39 回日本分子生物学会年会 2016/11/30 パシフィコ横浜 横浜市)

広田 喜二, 角 千里, 楠 宗矩, 岡本 明久, 田中 宏昌, 西 憲一郎, 松尾 禎之: transmitochondrial cybrids細胞を用いたプロポフォル細胞毒性の検討-プロポフォル注入症候群の病態生理学 (第 23 回日本静脈麻酔学会 2016/11/19 コラッセ福島 福島市)

松尾 禎之, 広田 喜二: 膜結合型酸化還元酵素 TMX1 のレドックス状態を指標とした小胞体ストレスのモニタリング (第 14 回がんとハイポキシア研究会 2016/11/5 岐阜グランドホテル 岐阜市)

広田 喜二: 2016 年アルバート・ラスカー基礎医学賞を記念して (第 14 回がんとハイポキシア研究会 2016 11/5 岐阜グランドホテル 岐阜市)

鈴木 堅悟, 広田 喜二, 甲斐 慎一, 西 憲一郎: 揮発性吸入麻酔薬は転写因子 HIF-1 依存的に膵細胞のグルコース刺激誘導性インスリン分泌を阻害する (第 63 回日本麻酔科学会学術集会 2016/5/27 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡 福岡市)

広田 喜二: データベース生物学をめぐる個人的な体験 (第 38 回 日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会 2015/12/03 神戸市)

後藤 容子, 小林 稔, 広田 喜二, 谷本 圭司, 平岡 真寛, 原田 浩: UCHL1 は HIF-1 の脱ユビキチン化を介してがんの遠隔転移を亢進する

(第 38 回 日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同大会) 2015/12/01 神戸市

田中 宏昌, 広田 喜二: 静脈麻酔薬プロポフォルはミトコンドリア電子伝達を阻害して細胞 ATP 産生を抑制する (第 13 回がんとハイポキシア研究会 2015/6 月/日 国立遺伝学研究所 三島市)

岡本 明久, 西 憲一郎, 広田 喜二, 新宮 興: テブレノン は神経由来細胞株 SH-SY5Y においてリドカインが誘導するアポ

トーシスを減少させる

(日本麻酔科学会 62 回学術集会 2015/05/29 横浜市)

岡本 明久, 西 憲一郎, 広田 喜二, 新宮 興: HIF-1 活性化はミトコンドリア電子伝達系の阻害してリドカインの細胞障害を軽減する

(日本麻酔科学会 62 回学術集会 2015/05/29 横浜市)

鈴木 堅悟, 広田 喜二: イソフルランはグルコース刺激による細胞内低酸素依存性の HIF-1 の活性化を抑制することで膵細胞の glucose-stimulated insulin secretion を抑制する

(日本麻酔科学会 62 回学術集会 2015/05/29 横浜市)

〔図書〕(計 3 件)

広田 喜二: 癌細胞のアミノ酸・蛋白質代謝と栄養. In: 癌と臨床栄養 2 版. edn. Edited by 丸山 道生. 東京: 日本医事新報社; 2016: 12-16.

Hirota K: Fentanyl and Its Impact on Cell Functions. In: Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse Volume 3: General Processes and Mechanisms, Prescription Medications, Caffeine and Areca, Polydrug Emerging Addictions and Non-Drug Addictions Volume 3, edn. Edited by Preedy V: Academic Press; 2016: 497-507.

広田 喜二: 硫化水素による低酸素シグナル修飾. In: レドックス UPDATE - ストレス制御の臨床医学・健康医学. edn. Edited by 平家俊男, 淀井淳司: 医歯薬出版; 2015: 112-117.

〔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・教授

研究者番号: 00283606

(3) 連携研究者

該当なし

(4)研究協力者
該当なし