

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591827
 研究課題名（和文） 低酸素誘導性遺伝子発現変化が肺胞上皮機能に及ぼす影響の細胞生物学的検討
 研究課題名（英文） Cellular and molecular biological analysis of hypoxia-inducible genetic responses in lung epithelial cells
 研究代表者
 足立 健彦（ADACHI TAKEHIKO）
 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

研究成果の概要：

肺障害の成因または進展を細胞の低酸素誘導性遺伝子応答の観点から理解して肺障害治療法の評価を新たな観点から下し、また新たな治療法の開発の基礎的な知見を得ることが本研究の目的であった。

培養細胞株、マウスを用いた検討により肺胞水分量の調節に重要な働きをしている amiloride-blockable ENaC (SCNN1) の 3 種類のサブユニットと水チャネル(aquaporin)の酸素分圧依存性の発現変化を観察して hypoxia-inducible factor 1 の活性化との相関に関する知見を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：周術期管理学

1. 研究開始当初の背景

I型細胞とII型細胞で構成される肺胞上皮は生体が外界と直接相互作用する最前線の一つを形成している。サーファクタントの産生、分泌に加え肺胞上皮細胞はタイトジャンクションで結合して肺胞腔と体内のバリアと

して機能している。肺胞上皮のジャンクションが破綻すれば蛋白質濃度の高い膠質液が肺胞内へと漏洩していく。肺炎、敗血症、誤嚥、輸血などを契機とした炎症反応はタイトジャンクション破綻の引き金を引く。

またサーファクタント産生能を有し、I型肺胞上皮細胞への分化能をもつII型肺胞細胞の細胞死は、肺胞の低酸素が肺水腫の発症を引き起こすだけでなく肺障害の発症につながる可能性を示している。

酸素は生命に必須の分子であり、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な酸素分圧の変化に晒される“場”の一つである。

細胞の酸素感知機構とりわけ低酸素感知機構の詳細は酸素が生体に必須の分子であることが18世紀に証明された時からの課題であった。この課題の解決におけるブレイクスルーは1995年のSemenza博士らによる転写因子HIF-1の遺伝子単離である。HIF-1は低酸素刺激に反応し極めて特異的にかつ迅速に活性化する転写因子でありこの活性化を指標に細胞内低酸素感知機構の分子生物学が急速に発達した。最近の研究によれば2000個以上の遺伝子の酸素分圧の変化による発現変化を制御していると考えられるマスター因子である。明確な低酸素の標的としてのHIF-1の活性化とそれに至る機序が分子生物学的に解析されて低酸素研究の現代化が実現した。申請者らはさらに研究を進め、揮発性吸入麻酔薬、静脈麻酔薬、カルシウム拮抗薬、局所麻酔薬、亜硝酸製剤などの周術期使用薬剤がHIF-1の活性化に及ぼす影響を継続して報告してきた。最近では、HIF-1がエネルギー代謝とくにブドウ糖代謝の変換を司りマクロファージの機能の維持に重要な役割を果たしていることを報告してきた。一酸化窒素を含む周術期使用薬剤が酸素分圧感

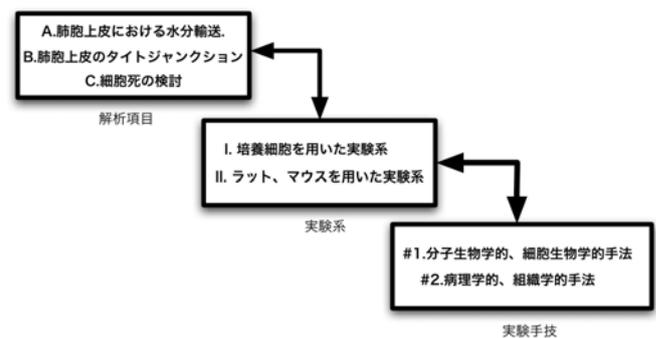
知機構への影響を介して低酸素誘導性のHIF-1の活性化を調節していることを報告するとともに、炎症担当細胞の成熟過程にHIF-1の果たす役割についても報告してきた。さらに最近炎症促進ケモカインマクロファージ遊走阻止因子MIFがHIF-1の活性化をもたらすことも報告してきた。

2. 研究の目的

敗血症などの全身性のショックは、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が、この変化を細胞内シグナル伝達、遺伝子発現の観点から見直し、生体の低酸素誘導性の遺伝子発現において中心的な役割を果たしている転写因子である低酸素誘導性因子1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)の活性化と関連づけて解析し、肺障害の成因または進展を細胞生物学的また分子生物学的に理解してさらに実験小動物を用い検証し、従来の肺障害治療法の評価を新たな観点から下し、また新たな治療法の開発の基礎的な知見を得ることが本研究の目的であった。

3. 研究の方法

以下に図示したとおりのアプローチで計画



調書に則り研究を遂行した。

(1) 培養細胞を用いた実験系について

II型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)とSV40-T2細胞(ラット由来)を初代培養細胞としてラット

より定法に従い調整したII型肺胞上皮細胞を用いた。

(2)ラット、マウスを用いた実験系についてIの培養細胞を用いた実験結果をふまえ、モデルを実験小動物で構築した。

ラットはII型肺胞細胞を単離する目的で使用するほか、in vivo実験に使用した。

マウスの肺よりII型肺胞細胞を単離し培養細胞としての解析に供するほか、in vivo実験に使用した。

分子生物学的解析

解析に使用した実験手技と対象遺伝子とその産物は以下に示した。

アッセイ法

半定量的リアルタイムRT-PCR(reverse transcriptase-polymerase chain reaction)法 / Western blot法 / in situ hybridization法
アッセイ対象

amiloride-blockable ENaCは現在少なくとも4つのサブタイプと3種類のサブユニット（抗体が得られないものはRT-PCRで解析） / $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ / aquaporinとくにAQP5 / タイトジャンクション蛋白質 (ZO-1, occludin, claudin) / 転写因子HIF-1について解析

病理学的、組織学的解析

肺の病理的な検索や組織学的な検索を行った。

4. 研究成果

研究を遂行し以下の実験結果を得た。

研究成果は学会・研究会、公刊などにより報告した。一部の成果についてはさらなる検討を要する事項もある。

(1)

II型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)において、

半定量的リアルタイムRT-PCR(reverse transcriptase-polymerase chain reaction)法 / Western blot法を用いてamiloride-blockable ENaC (SCNN1)の3種類のサブユニットの酸素分圧依存性の発現変化について検討した。

SCNN1A, SCNN1Bサブユニットは酸素分圧依存性に発現が変化した。つまり1% O₂条件下12時間暴露によりmRNAの発現が上昇した。一方、SCNN1Cは、1% O₂条件下12時間暴露によりmRNAの発現が減少した。これらの遺伝子発現変化は、20%O₂条件下で、hypoxia-inducible factor 1(HIF-1; 低酸素誘導性因子 1)の活性化を人為的に引き起こす事により同時に観察される事よりHIF-1により発現制御を受けている事が示唆された。

(2) 細胞死の検討

II型肺胞上皮の細胞死が低酸素(1%酸素分圧)暴露により生じる事、またその細胞死の形式はnecrosisよりはapoptosisの成分が多い事を確認した。

(3) タバコ抽出液が肺胞上皮機能に与える影響の検討

II型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細胞において、タバコ抽出液(CSE)処理によりhypoxia-inducible factor 1(HIF-1)の強い活性化が起こることを見いだした。

CSE処理によりHIF-1 α の細胞内発現が増強し、VEGF, GLUT1などのHIF-1制御下にある一群の遺伝子のmRNAの発現が増強した。またこの誘導は抗酸化剤N-acetyl-cysteine処理で抑制されることから活性酸素腫が発現誘導に重要な役割を果たしていることが示唆された。さらにマウスに喫煙させることによりHIF-1の活性化とHIF-1支配遺伝子の発現上昇が肺に起こること

を見いだした。HIF-1の活性化、HIF-1支配下の遺伝子発現増強の喫煙によって誘導される急性肺障害の発生、進展に果たす役割を明らかにして治療への端緒を得るためにマウスにHIF-1aのsiRNAを導入してHIF-1の活性化を抑制して肺傷害の進展への影響を検討するモデルの作成を始めた。

(4) 低酸素環境が肺胞上皮機能に与える影響の検討

II型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)において、HIF-1 依存的に水チャネル(aquaporin)の発現増強が起こることを見いだした。

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7件)

1. Oda S, Oda T, Takabuchi S, Nishi K, Wakamatsu T, Tanaka T, Adachi T, Fukuda K, Nohara R, Hirota K. The calcium channel blocker cilnidipine selectively suppresses hypoxia-inducible factor 1 activity in vascular cells. *Eur J Pharmacol.* 2009;606:130-6. (査読あり)

2. Oda S, Oda T, Nishi K, Takabuchi S, Wakamatsu T, Tanaka T, Adachi T, Fukuda K, Semenza GL, Hirota K. Macrophage migration inhibitory factor activates hypoxia-inducible factor in a p53-dependent manner. *PLoS ONE.* 2008;3:e2215. (査読あり)

3. Nishi K, Oda T, Takabuchi S, Oda S, Fukuda K, Adachi T, Semenza GL, Shingu K, Hirota K. LPS induces hypoxia-inducible factor 1 activation in macrophage-differentiated cells in a

reactive oxygen species-dependent manner. *Antioxid Redox Signal.* 2008;10:983-96. (査読あり)

4. Kimura M, Takabuchi S, Tanaka T, Murata M, Nishi K, Oda S, Oda T, Kanai M, Fukuda K, Kizaka-Kondoh S, Adachi T, Takabayashi A, Semenza GL, Hirota K. n-Propyl gallate activates hypoxia-inducible factor 1 by modulating intracellular oxygen-sensing systems. *Biochem J.* 2008;411:97-105. (査読あり)

5. Li X, Kimura H, Hirota K, Sugimoto H, Kimura N, Takahashi N, Fujii H, Yoshida H. Hypoxia reduces the expression and anti-inflammatory effects of peroxisome proliferator-activated receptor-g in human proximal renal tubular cells. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22:1041-51 (査読あり)

6. Hiraga T, Kizaka-Kondoh S, Hirota K, Hiraoka M, Yoneda T. Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 expression enhance osteolytic bone metastases of breast cancer. *Cancer research.* 2007;67:4157-63. (査読あり)

7. Adachi T, Hirota K, Hara T, Sasaki Y, Hara Y. Exhaled carbon monoxide levels change in relation to inspired oxygen fraction during general anesthesia. *Anesth Analg.* 2007;105:696-9. (査読あり)

[学会発表] (計2件)

1. Takehiko Adachi, Seiko Oda, Satoshi Takabuchi, Kenichiro Nishi, Kiichi Hirota

The calcium channel blocker cilnidipine selectively suppresses hypoxia-inducible factor 1 activity in vascular endothelial and smooth muscle cells

2008 Annual Meeting, American Society of Anesthesiologists, Orland, 2008/10/18-22

2. Kiichi Hirota, Seiko Oda, Satoshi Takabuchi, Takuhiko Wakamatsu, Tomoharu Tanaka, Kazuhiko Fukuda

Macrophage migration inhibitory factor activates hypoxia-inducible factor 1 under hypoxic conditions in a p53-dependent manner

Keystone symposia Molecular, cellular, physiological, and pathogenic responses to hypoxia 2008/01/16 Vancouver, Canada

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 健彦 (ADACHI TAKEHIKO)

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)

京都大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号: 00283606

(3) 連携研究者

宮崎 嘉也 (MIYAZAKI YOSHIYA)

財団法人田附興風会・医学研究所 第9研究部・研究員

研究者番号: 10324625