

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20054

研究課題名(和文) 肺胞上皮細胞における低酸素誘導性因子の機能解析と肺傷害治療開発に向けた基盤研究

研究課題名(英文) Hypoxia-Inducible Factor as a Therapeutic Target for Acute Respiratory Distress Syndrome

研究代表者

東條 健太郎 (TOJO, Kentaro)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：80737552

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：急性呼吸促迫症候群(ARDS)では肺胞上皮細胞がミトコンドリア障害によりエネルギー代謝不全に陥ることで、傷害が引き起こされる。本研究ではARDS実験モデルを用いて、酸素センサー分子プロリルヒドロキシラーゼを薬理的に阻害することが、低酸素誘導性因子-1経路を介して解糖系を亢進させることで、ARDSにおける肺胞上皮細胞のエネルギー代謝不全を改善し、肺胞上皮細胞傷害を軽減させることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Bioenergetic failure due to mitochondrial dysfunction underlies the alveolar epithelial injury during acute respiratory distress syndrome (ARDS). In the present study, we demonstrated that inhibition of oxygen sensing prolyl hydroxylases (PHD) protects alveolar epithelial cells from bioenergetic failure and cell death caused by experimental ARDS. The protective effects are mediated by HIF-1-dependent enhancement of glycolysis. These findings suggest that activation of HIF-1 might be a novel therapeutic approach for ARDS.

研究分野：集中治療医学

キーワード：ARDS エネルギー代謝 低酸素誘導性因子 解糖系

## 1. 研究開始当初の背景

急性呼吸促進症候群 (ARDS) による肺傷害に有効な治療法はなく、未だに高い致死率を誇る。その病態は完全にはわかっていないが、ミトコンドリア機能不全によるエネルギー代謝不全が ARDS における肺胞上皮細胞傷害の重要なメカニズムの一つであることが知られており、肺胞上皮細胞のエネルギー代謝の改善は有望な治療アプローチであると考えられている。

低酸素誘導性因子 (hypoxia inducible factor: HIF) は低酸素によって活性化される転写因子で、細胞の低酸素適応反応を司っている。HIF の制御は主に生体内で酸素センサーとして働くプロリルヒドロキシラーゼ (PHD) によって行われており、PHD 阻害をすることで人為的に HIF 経路を活性化することが可能である。HIF 経路の活性化は細胞のエネルギー代謝をミトコンドリアによる酸化的リン酸化から解糖系へシフトさせる効果をもつ。

以上を踏まえ、PHD 阻害による HIF の活性化が解糖系を亢進させることで、ミトコンドリア機能不全に陥った肺胞上皮細胞のエネルギー代謝を代償し、細胞を保護できる可能性があるかと仮説をたてた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は肺胞上皮細胞において、酸素センサー分子 PHD の薬理的阻害が、HIF を介した解糖系の亢進によって、ARDS モデルにおける肺胞上皮細胞のエネルギー代謝不全、傷害を改善し、さらに肺胞バリアーの破綻を抑制できるのか、培養細胞モデル、動物モデルを用いて明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### (1) 培養細胞実験

肺胞上皮細胞株 MLE12 細胞を播種し、マウスから単離した好中球及び LPS を加えることで、肺胞上皮細胞傷害モデルを構築した。傷害の程度は細胞生存率、フローサイトメトリーによる死細胞解析によって評価した。また細胞のエネルギー代謝の指標として細胞内の ATP 濃度を測定した。この肺胞上皮細胞傷害系に PHD 阻害薬 dimethylallylglycine (DMOG) を加えることで細胞保護効果が見られるか検討をおこなった。また DMOG の効果が HIF-1 依存的であるか siRNA を用いて HIF-1 ノックダウンを行うことで検討した。さらに、2-deoxy-D-glucose (2DG) により解糖系を阻害することで DMOG の効果が解糖系に依存しているのか検討した。

### (2) 動物実験

8-10 週齢の C57BL6J マウスに対して LPS を経気管投与することで ARDS モデルを作成した。この ARDS モデルマウスに対して LPS 投与 1 時間前に DMOG を経気管投与することで、肺胞上皮細胞傷害、肺胞バリアー透過性亢進

さらに、動脈血酸素化の悪化を軽減できるか検討した。さらに、好中球性炎症に対してどのような影響があるか検討を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 培養細胞実験

培養細胞を用いた ARDS モデルの構築

MLE12 細胞に好中球及び LPS を加えることで、細胞の生存率が低下し、フローサイトメトリーにて死細胞が増加していることが確かめられた。また、同時に細胞中の ATP 濃度が低下していた。これらの細胞死はカスパーゼ阻害剤で抑制されなかったものの、necrostatin-1 及び cyclosporine A によって阻害されたことから主にネクロシスによることが示唆された。

PHD 阻害剤 DMOG が肺胞上皮細胞に与える影響の検討

次に、MLE12 細胞に PHD 阻害剤 DMOG を加えることで、用量依存性に HIF-1 が増加することを確認した。一方で HIF-2 の増加は見られなかった。さらに解糖系の指標として培地中の乳酸濃度、グルコース濃度を測定したところ、DMOG の投与は用量依存性に乳酸濃度を増加させる一方でグルコース濃度を低下させたことから解糖系を亢進させる効果があることが確かめられた。

PHD 阻害が培養細胞 ARDS モデルに与える影響の検討

構築された好中球 + LPS による肺胞上皮細胞傷害モデルに対して DMOG を加えることで用量依存的に細胞の生存率を改善することができた。また、同時に細胞内の ATP 濃度の低下を抑制することができた。

この効果が HIF-1 依存的であることを明らかにするために、siRNA を用いて HIF-1 をノックダウンしたところ、DMOG による細胞生存率の改善効果は消失した。以上から、DMOG の効果は HIF-1 経路に依存していることが明らかになった。

さらに、DMOG の効果が解糖系依存的であることを明らかにするために、2DG による解糖系の阻害を行ったところ、DMOG はむしろ細胞生存率を低下させるという結果を得た。また、HIF-1 のノックダウンにより解糖系の亢進が抑制されたことから、DMOG による PHD 阻害は HIF-1 を介した解糖系の亢進により好中球 + LPS による傷害から肺胞上皮細胞を保護することが示された。

### (2) 動物実験

PHD 阻害剤 DMOG の経気管投与が肺に与える影響の検討

マウスの気管内に PHD 阻害薬 DMOG 2mg/50  $\mu$ L PBS を投与したところ、肺組織中の HIF-1 の増加が認められた。免疫染色を行ったところ HIF-1 は肺胞上皮、気管上皮、肺胞マクロファージにて認められ、血管内皮では明

らかではなかった。また、肺組織中の解糖系に  
関与する glucose transporter-1 及び hexokinase-2  
の増加が見られたことから、DMOG の投与は培養細胞と同様に肺組織中の HIF-1 を増加させ、解糖系を亢進させることが示唆された。

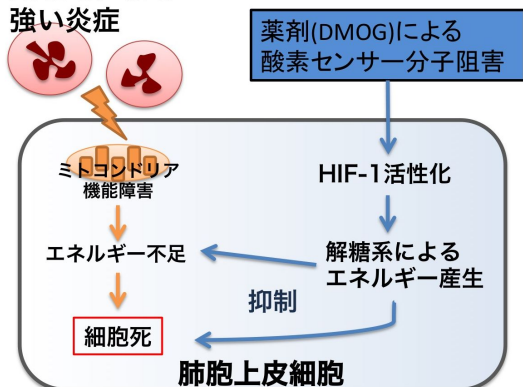
DMOG 経気管投与が LPS 誘導性 ARDS モデルマウスの肺胞バリアー、動脈血酸素化に与える影響の検討

次に、マウスに対して LPS を経気管投与することで ARDS モデルを作成した DMOG を LPS 投与の 1 時間前に予め経気管投与しておくことで、肺組織中の ATP 低下を抑制することができた。また、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の肺胞上皮傷害マーカー RAGE、上皮細胞死マーカー CK18 の増加を抑制することができた。同時に肺胞バリアー透過性の指標である BALF 中の蛋白濃度、IgM 濃度の増加も抑制できた。さらに DMOG の投与は LPS による動脈血の酸素分圧の低下を、有意に抑制したことから、PHD 阻害剤は動物モデルにおいても炎症による肺胞上皮細胞傷害を抑制し、ARDS における低酸素血症の改善効果を持つ可能性が示唆された。

DMOG 投与が好中球性炎症に与える影響の検討

これらの PHD 阻害による肺保護効果が好中球製の炎症の抑制を介しているのか調べるために、肺組織中、BALF 中のミエロペルオキシダーゼ及び病理組織における好中球浸潤の程度を評価したところ、いずれも DMOG の影響を受けなかった。このことから、DMOG の肺保護効果は、好中球性炎症の抑制ではなく、肺胞上皮細胞への直接的な作用によるものであると考えられた。

### ARDSによる強い炎症



これらの結果から、酸素センサー分子 PHD を阻害により HIF-1 経路を活性化させ、解糖系を亢進させることが、ARDS における肺胞上皮細胞のエネルギー代謝不全を改善し、ARDS による肺胞バリアー破綻及び低酸素血症を軽減させる可能性があることを明らかにすることができた(上図)。HIF を介した解糖系の亢進は ARDS に対する新たな治療アプロー

チになりうることを示唆された。

### 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 2 件)

Tojo K, Tamada N, Nagamine Y, Yazawa T, Ota S, Goto T. Enhancement of glycolysis by inhibition of oxygen-sensing prolyl hydroxylases protects alveolar epithelial cells from acute lung injury. FASEB J. 2018 Apr;32(4):2258-2268. (査読有り)

Nagamine Y, Tojo K, Yazawa T, Takaki S, Baba Y, Goto T, Kurahashi K. Inhibition of Prolyl Hydroxylase Attenuates Fas Ligand-Induced Apoptosis and Lung Injury in Mice. Am J Respir Cell Mol Biol. 2016 Dec;55(6):878-88. (査読有り)

〔学会発表〕(計 4 件)

Tojo K, Tamada N, Nagamine Y, Ota S, Goto T. Metabolic reprogramming by inhibition of prolyl hydroxylases protects alveolar epithelial cells from LPS-neutrophil-induced energy derangements and cell death. Euroanaesthesia 2017, The European Anesthesiology Congress. 2017.

東條 健太郎, 玉田 尚, 長嶺 祐介, 矢澤 卓也, 太田 周平, 後藤 隆久. Prolyl hydroxylase 阻害は肺胞上皮細胞の代謝リプログラミングを介して LPS 誘導性肺傷害を軽減する. 第 64 回日本麻酔科学会総会. 2017.

Tojo K, Nagamine Y, Goto T. The hydroxylase inhibitor dimethylallyl glycine protects lung epithelial barriers from LPS-induced injury in mice. Euroanaesthesia 2016, The European Anesthesiology Congress. 2016.

Nagamine Y, Tojo K, Yazawa T, Takaki S, Baba Y, Goto T, Kurahashi K. Inhibition of Prolyl Hydroxylase Attenuates Fas Ligand-induced Apoptosis and Lung Injury in Mice. American Thoracic Society International Conference. 2016.

〔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

[https://www.yokohama-cu.ac.jp/res\\_pro/news/20171214Tojo.html](https://www.yokohama-cu.ac.jp/res_pro/news/20171214Tojo.html)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

東條 健太郎 (TOJO, Kentaro)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：80737552