

令和元年6月19日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10974

研究課題名(和文) 低酸素誘導性因子1機能調節解析を基軸としたタバコ誘導性肺・気道炎症機構の検討

研究課題名(英文) Investigation of involvement of hypoxia-inducible factor 1 on cigarette smoke-induced airway and lung pathological events

研究代表者

西 憲一郎 (NISHI, Kenichiro)

関西医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50340716

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)：タバコは、多くの疾患の発症・増悪化に大きく寄与している。しかし、肺疾患におけるタバコの影響の根底にある分子メカニズムはほとんど知られていなかった。これらの病態生理学的過程を解明するために、我々は転写因子低酸素誘導因子1(HIF-1)に対するタバコ抽出物(CSE)とタバコ煙の影響をin vitroおよびin vivo条件下で検討した。CSEとタバコ煙は、非低酸素条件下でヒト肺上皮様細胞とマウスにおけるHIF-1タンパク質の濃度依存性および時間依存性の蓄積を誘導することを見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体の低酸素応答研究の流れに沿った本申請の研究は、細胞内に内在する酸素分圧感知機構とその下流の転写因子、HIF-1の機能と喫煙が生体にもたらす影響を関連づけて解析するという従来にはなかった観点をもち新規性を有している。このような周術期合併症との関連に加えて慢性的なタバコへの暴露が肺上皮機能の機能のみならず肺の解剖学的な再構築を経た肺線維症にいたる過程も視野に収めた研究成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Cigarette smoke (CS) is a major contributor to the development of a large number of fatal and debilitating disorders. However, the precise molecular mechanisms underlying the effects of CS in lung disease are largely unknown. To elucidate these pathophysiological processes, we examined the *in vitro* and *in vivo* effects of CS extract (CSE) and CS on the transcription factor, hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1). CSE induced concentration- and time-dependent accumulation of HIF-1 protein in human lung epithelial-like cells under non-hypoxic conditions. Further investigation revealed that reactive oxygen species were generated in cells exposed to CSE and were required for CSE-mediated induction of HIF-1 protein, as was activation of phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase pathways. In conclusion, we demonstrated that CSE and CS induced HIF-1 activation *in vitro* and *in vivo*, respectively.

研究分野：麻酔科学

キーワード：タバコ HIF-1 低酸素誘導性因子1 酸素代謝 慢性閉塞性肺疾患 活性酸素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

喫煙が健康に及ぼす影響については長い研究の歴史があり、肺癌などの悪性腫瘍、虚血性心疾患、慢性呼吸器疾患などの主要な原因となりうるということが証明されてきた。喫煙は全身の臓器・システムに障害をもたらすのが、とりわけ気管支肺胞系はその刺激に直接暴露されるため障害の第一標的となり周術期の患者全身管理に影響を与え予後に影響することは広く知られていて麻酔科医にとって患者管理の最重要課題の一つとなっている。

申請者らは喫煙のもたらす気管支肺胞系のみならず免疫系の機能障害を肺の酸素代謝と関連づけて生体の酸素代謝調節のマスター転写因子として機能している低酸素誘導性因子 1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)の活性化状態解析を基軸とした検討により明らかにするという申請者らの独自の視点からの研究を着想した。

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。気管支・肺胞系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。

ガス交換の単位である肺胞上皮細胞、肺胞間質、肺胞毛細血管の病理的な解剖学的または機能的な変化は上記のパターンのいずれかの範疇に収まる。これらの臨床上の病態の病理学的な変化の基盤には肺胞上皮細胞-間質-毛細血管で構成されるガス交換ユニットの炎症があり喫煙はこれらの病理変化の進行の最大の要因の一つである。さらに喫煙は気道分泌を誘導し低酸素血症、呼吸器感染症を通して周術期管理の困難の要因となる。逆に組織の酸素分圧は炎症の消長に大きな影響を与えることが知られている。低酸素と炎症を結ぶ物質的基盤として低酸素誘導性因子 1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)が同定されている。

研究代表者と研究分担者は共同してこの 14 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狀態にテーマを絞った研究を継続してきた。申請者らはすでにタバコ抽出物が II 型肺胞由来樹立細胞株 A549 細胞において用量依存的な HIF-1 (HIF-1 の制御サブユニット)蛋白質の誘導を引き起こし粘液産生酵素 MUC5AC の発現を誘導するという予備実験結果を得ていた。

2. 研究の目的

喫煙は気管支肺胞系を直接刺激し周術期の患者全身管理に影響を与え予後に影響することは広く知られている。

喫煙が気管支肺胞系のみならず免疫系の機能障害を及ぼす分子機構を、肺の酸素代謝と関連づけて生体の酸素代謝調節のマスター転写因子として機能している低酸素誘導性因子 1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)の活性化状態解析を基軸とした検討により明らかにすることが本申請の目的である。

本研究の主目的は、タバコ、酸素環境、HIF-1、炎症の相互関係の解析と関係の存在の証明である。

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肺胞・気管上皮をタバコ抽出物 (cigarette smoke extract, CSE) またはタバコ煙 (cigarette smoke, CS) に暴露させる実験系を作出して HIF-1 システムを構成する各分子の動態、相互作用また肺内の各種構成細胞の遺伝子・蛋白質発現を細胞生物学的、分子生物学的に解析して明らかにする、喫煙が肺胞におけるガス交換環境、各気道レベルにおける粘液産生・分泌に与える影響の理解を目指して標的とした治療戦略の策定を試みる、事がこの研究の具体的な目的であった。

3. 研究の方法

喫煙が肺胞におけるガス交換環境、各気道レベルにおける粘液産生・分泌に与える影響の理解を目指して以下の実験を遂行する。

- (1) 培養細胞を用いた in vitro 実験系を用いた検討
培養細胞を用いた in vitro 実験
培養細胞によって形成する肺関連生体バリア機能への CSE の影響の検討
- (2) 実験小動物を用いた in vivo 実験系を用いた検討

CS 暴露モデル
低酸素暴露モデル

(1)

培養細胞を用いた in vitro 実験

細胞株: ヒト肺胞上皮由来樹立細胞株 A549, ヒト気道上皮由来細胞株 BEAS-2B を用いる。肺胞マクロファージ由来の細胞株は存在しないのでヒト末梢血単球由来 THP-1 細胞、ヒト単球様細胞 U937 を刺激して活性化した状態で用い代用とする。対照として肺線維芽細胞由来細胞株 MRC-5、子宮頸癌由来細胞株 HeLa 細胞を用いる。(表 1)

表1

細胞株	初代培養
肺胞上皮由来: A549細胞	ヒト気管上皮細胞
気道上皮由来: BEAS-2B	マウス肺胞マクロファージ
ヒト末梢血単球由来THP-1細胞	
ヒト単球様細胞U937細胞	

申請者らによってすでに確立されている方法に従いタバコ抽出液(cigarette smoke extract, CSE)を調整して上記細胞株を CSE に暴露して転写因子 HIF-1 の活性化を検討する。HIF-1 活性化 assay は申請者ですでに確立している。主な検討項目は以下の通りであった。

-2 培養細胞によって形成する肺関連生体バリア機能への CSE の影響の検討

I 型肺胞細胞を用いて肺胞バリアを、肺血管を用いて血管バリアを構築する。

構築したモデルバリアを CSE に暴露させてバリアへの影響を検討する。

バリア機能の評価は経上皮電気抵抗(transsepithelial electric resistance: TER)測定, 蛍光物質 FITC と結合したデキストラン(FITC-dextran), またはアルブミン(FITC-albumin)の透過性を測定することにより行う。

結合部位の接着分子の発現量, パターンは抗体を用いた免疫組織法で評価する。検討する分子は表 2 に示した。

表2 解析対象分子

	PCR	Western Blot	組織染色	ELISA
HIF-1a	○	○	○	
VEGF	○			○
GLUT-1	○			
Angiotenin 1, 2	○			○
PLGF	○			○
Claudin family	○	○	○	
Occudin family	○	○	○	
ZO-1, 2	○	○	○	
VE-cadherin	○	○	○	

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)を用いる。

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 H28 年度中に構築する。

(2)

低酸素暴露モデル

HIF-1 活性化のポジティブ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マウスを飼育することで構築する。

CS 暴露モデル

たばこ煙吸入実験装置 SIS-CS 型を用いてたばこ煙を発生させ実験動物に吸入させる。

4. 研究成果

喫煙が気管支肺胞系のみならず免疫系の機能障害を及ぼす分子機構を、肺の酸素代謝と関連づけて生体の酸素代謝調節のマスター転写因子として機能している低酸素誘導性因子 1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)の活性化状態解析を基軸とした検討により明らかにすることが本申請の目的である。

研究初年度から継続して、肺胞、気道上皮由来の樹立細胞株を用いてたばこ煙抽出液に暴露して HIF-1 の活性化また HIF-1 にその発現調節が担われているとされておりかつ気道のリモデリング関連の vascular endothelial growth factor (VEGF), Matrix metalloproteinases (MMPs), DNA damage response 1 (REDD1)などの蛋白質の遺伝子発現を半定量的 RT-PCR を用いて調べた。さらに次世代シーケンサを用いた RNA-Seq 法を持ちいてたばこ煙抽出液に対する遺伝子応答を網羅的に検討する研究に着手して data を取得した。

I 型肺胞細胞を用いて肺胞バリアを、肺血管を用いて血管バリアを構築したモデルバリアをたばこ煙抽出液に暴露させてバリアへの影響を検討した。バリア機能の評価は経上皮電気抵抗(transsepithelial electric resistance: TER)測定, 蛍光物質 FITC と結合したデキストラン(FITC-dextran), またはアルブミン(FITC-albumin)の透過性を測定することにより行った。

その結果、たばこ煙抽出液処理によって細胞間バリア機能が減弱することが示された。

さらに肺由来の細胞に加えて子宮内膜間質細胞、子宮内膜上皮細胞への影響を検討してたばこ

煙抽出液により HIF-1 の活性化が起こる事を蛋白質定量、mRNA 発現の両面から見いだした。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 14 件)

Hirota K. An intimate crosstalk between iron homeostasis and oxygen metabolism regulated by the hypoxia-inducible factors (HIFs). *Free Radic Biol Med.* 2019;133:118-29. 10.1016/j.freeradbiomed.2018.07.018 査読有

広田 喜一. 2. 低酸素の生物学 低酸素誘導性因子 (HIF) の果たす役割. *Intensivist.* 2018;10(2):259-69. 査読無

広田 喜一. 酸素生物学を読み解く 低酸素誘導性因子研究の今昔物語. *Life Support and Anesthesia.* 2018;25(8):897-905. 査読無

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):208-9. 査読無

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. 10.1038/s41368-018-0015-0 査読有

Sumi C, Okamoto A, Tanaka H, Kusunoki M, Shoji T, Uba T, Adachi T., Iwai, K., Nishi, K., Harada, H., Bono H., Matsuo Y., Hirota K. Suppression of mitochondrial oxygen metabolism mediated by the transcription factor HIF-1 alleviates propofol-induced cell toxicity. *Sci Rep.* 2018;8(1):8987. 10.1038/s41598-018-27220-8 査読有

Sumi C, Okamoto A, Tanaka H, Nishi K, Kusunoki M, Shoji T, Uba T., Matsuo Y., Adachi T., Hayashi J.I., 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. 10.1371/journal.pone.0192796 査読有

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;24:194-6. 査読無

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):1768-77. 10.1002/2211-5463.12319 査読有

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. 10.1038/s41598-017-03980-7 査読有

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;40:549-54. 査読無

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. 査読無

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):13295-306. 10.1007/s13277-016-5260-2 査読有

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. 10.1186/s12871-016-0273-3 査読有

〔学会発表〕(計 13 件)

広田喜一

酸素による肺への影響:肺の硝子膜様変性、COPD、間質性肺炎
第 22 回日本医療ガス学会 学術大会 シンポジウム:「酸素の問題点を考える」 東京歯科大学新館 血脇記念ホール 東京 2018/11/24

田畑 凱光、松尾 禎之、広田 喜一

炎症が惹起する代謝リプログラミングの分子機序の探求
第 15 回 がんとハイポキシア研究会 ホテルグリーンタワー幕張 千葉市 2018/11/09

Munenori Kusunoki, Kiichi Hirota, Takeo Uba, Tomohiro Shoji, Chisato Sumi, Yoshiyuki Matsuo

Biphasic effect of propofol on glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic β cells
Anesthesiology 2018 (Annual Meeting of American Society of Anesthesiologist) Moscone Center San Francisco USA 2018/10/15

楠 宗矩、広田 喜一、右馬 猛生、正司 智洋、角 千里、松尾 禎之

プロポフォールは、膵 細胞のグルコース刺激誘導性インスリン分泌に対して、二相性の影響を与える
日本麻酔科学会 第 65 回学術集会 横浜 パシフィコ横浜 2018/5/17

角 千里、広田 喜一

日本麻酔科学会 第 65 回学術集会 2017 年度開始ピッチコンテスト成果発表 横浜 パシフィコ横浜 2018/5/17

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ー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 淡路夢舞台国際会議場 淡路市 2017/11/10

角 千里、広田 喜一、楠 宗矩、岡本 明久、西 憲一郎、松尾 禎之

サイブリッド細胞を用いたプロポフォール細胞毒性の検討
第 15 回がんとハイポキシア研究会 淡路夢舞台国際会議場 淡路市 2017/11/10

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 淡路夢舞台国際会議場 淡路市 2017/11/10

角 千里、広田 喜一、楠 宗矩、岡本 明久、西 憲一郎、松尾 禎之

サイブリッド細胞を用いたプロポフォール細胞毒性の検討-プロポフォー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 神戸国際展示場 神戸市 2017/6/9

岡本 明久、楠 宗矩、角 千里、西 憲一郎、松尾 禎之、広田 喜一

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 神戸国際展示場 神戸 2017/6/8

広田 喜一、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ール細胞毒性の検討-プロポフォール注入症候群の病態生理学
第 23 回日本静脈麻酔学会 コラッセ福島 福島市 2016/11/19

広田喜一

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

松尾禎之、広田喜一

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 岐阜グランドホテル 岐阜市 2016/11/5

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：広田 喜一

ローマ字氏名：(HIROTA, Kiichi)

所属研究機関名：関西医科大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：00283606

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：松尾 禎之

ローマ字氏名：(MATSUO, Yoshiyuki)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。