

令和 2 年 6 月 11 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16501

研究課題名(和文)プロポフォール誘導性ミトコンドリア依存性細胞障害のHIF-1活性化による抑制

研究課題名(英文) Suppression of propofol-induced mitochondria-dependent cytotoxicity by HIF-1 activation

研究代表者

岡本 明久 (OKAMOTO, Akihisa)

関西医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50509479

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：プロポフォールのミトコンドリア機能障害による呼吸鎖からの電子の漏れ出しが低減され結果としてプロポフォールによる活性酸素種(ROS)産生が抑制され細胞障害が軽減の機序であると考えられた。このHIF-1活性化によるプロポフォールの細胞障害の軽減作用は、RCC4細胞のPDK-1をノックダウン(RNA干渉法により発現を抑制)したりHIF活性阻害薬YC-1を使用することで消失した。以上の結果から人為的なHIF-1活性の制御によりROS産生を抑えることでプロポフォールによる細胞障害を抑止することができる結論した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、世界的に著名な歌手・マイケル・ジャクソン氏が常用した結果死亡したり、2歳男児に術後管理目的で大量に投与された結果死亡したりと、度々プロポフォールの危険性が注目を浴びてきた。その一方で、プロポフォールは手術麻酔や集中治療の現場で幅広く使用され、現代医療に不可欠の薬剤である。今回、培養細胞を用いてPRISの発症機序解明に取り組んで、プロポフォールによる細胞死のプロセスにROSの産生増加が大きく関与していることを明らかにし、その制御を遺伝子工学的または薬理的に行うことがPRISの発症・進展を防ぐための一つのアプローチとなりうることを示したことに本研究の意義がある。

研究成果の概要(英文)：In cells with sustained activation of the transcription factor HIF-1, we found that the glycolytic system, which metabolizes glucose from pyruvate to lactate, was converted to a dominant metabolic pathway by the action of GLUT1 and LDHA, and the supply of electrons to the mitochondrial respiratory chain was suppressed by the action of PDK1, which suppresses the pathway through which pyruvate is transported to the mitochondria and converted to acetyl-CoA. In other words, HIF-1 activation in RCC4 cells reprogrammed the cells to a metabolic state that does not rely on mitochondrial respiration. From these results, we concluded that propofol-induced cytotoxicity could be prevented by suppressing ROS production by artificially controlling HIF-1 activity.

研究分野：麻酔科学

キーワード：プロポフォール プロポフォール注入症候群 ROS ミトコンドリア 低酸素誘導性因子1 HIF-1 代謝

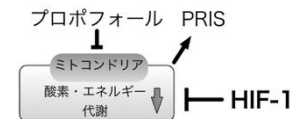
様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

プロポフォール(propofol, 2,6-diisopropylphenol)は患者管理に必須な薬剤であるがプロポフォール注入症候群(propofol infusion syndrome, PRIS)と呼ばれる致死的な副作用をまれに惹起することが知られており臨床使用上の問題となっている。手術麻酔に加えてより重篤な病態背景を持つ患者の治療にあたる集中治療領域においてプロポフォールは患者鎮静に欠かせない薬剤と認識されていて使用が数日に及ぶ場合もある。しかし一旦発症すると対症療法しか存在しないPRISは克服すべき問題であると認識されている。病態生理学から推察されるように細胞の代謝異常や細胞死が発症の細胞学的基盤にあると考えられていて、この方向性からの研究が進められてきたにもかかわらずいまだに病態の分子機構の詳細や発症予測因子・治療法の同定には至っていない。病態の進展にミトコンドリア機能異常を指摘する報告も散見するが標的システム・分子の同定には至っていない。

一方報告者は、大学院在籍時のテーマとして局所麻酔薬の細胞毒性の研究を行ってきた。リドカインを含む局所麻酔薬がミトコンドリアを標的として作用して細胞内酸素代謝を攪乱して活性酸素種(ROS)を産生して細胞死を惹起すること、ROSを抗酸化剤で除去することで障害の発生を防止できることを報告した。さらに細胞内酸素代謝のマスター因子であるHIF-1の活性化がROS産生の抑制をもたらし局所麻酔薬による毒性を抑制する作用を発揮することを報告してきた。

以上を背景として、報告者はPRISの病態の分子機序を解明し、プロポフォールの標的としてミトコンドリアを想定しHIF-1を介した予防可能性を証明することが本研究の目的である。



この目的の達成のために、様々なタイプのミトコンドリア遺伝子の変異体を細胞質移植法を用いて細胞に導入した transmitochondrial cybrids 細胞(Cybrids 細胞)を用いてプロポフォールが細胞の有酸素・無酸素代謝のモード変換に与える影響と細胞の生死に与える影響を培養細胞を用いて明らかにする研究を構想した。

PRISの病態生理学から推察されるように細胞の代謝異常や細胞死がPRIS発症の細胞学的基盤にあると考えられていて、この方向性からの研究が進められてきたにもかかわらずいまだに病態の分子機構の詳細や発症予測因子・治療法の同定には至っていない。病態の進展にミトコンドリア機能異常を指摘する報告も散見するが標的システム・分子の同定には至っておらず発症のトリガーの同定もされていない。従来この分野の研究はなされているがその多くは単離したミトコンドリアを用いて高濃度のプロポフォールを用いた検討であり臨床使用濃度と同等のレベルで生細胞機能との関連を持った研究は文献的には存在しない。さらにPRIS発症においてミトコンドリアが標的となっていることを示唆する研究は従来存在したがどのような障害、具体的にはどのようなミトコンドリア遺伝子変異がプロポフォール注入症候群と関連があるのかについての研究報告は皆無であった。

これは様々なミトコンドリア DNA 変異を持った細胞が利用可能な状況ではなかったという技術的限界の存在に起因する。今回 Cybrids 細胞を用いた検討によりこの技術的な問題を克服できる可能性が高いと考えられた。

このように、報告者はすでに公刊している研究実績より解るようにこの研究で用いる実験系は細胞外フラックスアナライザーを用いた電子伝達系コンプレックス特異的な活性の測定法以外は確立していて本申請の課題の予備データを得ていた。

2. 研究の目的

本研究の新規性は、プロポフォールが細胞機能、特にエネルギー代謝に与える影響を、Cybrids細胞を援用してミトコンドリア機能とその制御因子であるHIF-1と関連付けて解析して最終的にはPRIS発症の分子機序の解明と予防法の開発をしようとする点にある。この発想は報告者の従来の研究の延長線上にあり独創的である。

疫学的に頻度は低いものの患者予後に甚大な悪影響を及ぼすPRISの病態生理の解明は麻酔・集中治療学の研究分野が克服すべき課題の一つである。プロポフォール毒性とミトコンドリアの機能低下、それに伴う細胞内代謝転換との関連が明らかになれば、遺伝的素因あるいは投薬によるミトコンドリア機能への影響が予想される場合にはプロポフォール使用に際して用量に配慮するなど、PRISの誘因となる危険因子の推定、発症を回避する戦略の策定が可能になる。これらの為に以下の具体的な目的を策定した。

(1) プロポフォールと細胞死

プロポフォールが細胞死へ与える影響を Cybrids 細胞を含む組織由来の異なる複数の細胞株を用いて、特に用量と時間との関連に着目して明らかにする。RCC4-VHL細胞を用いた予備実験の結果によりプロポフォールは細胞死を誘導することが判明していた。

(2) プロポフォールによるROSの産生。

プロポフォールが酸素代謝へ与える影響とエネルギー代謝への影響をROS産生、細胞内ATP、細胞外の乳酸・ピルビン酸を測定することで明らかにする。特に、ミトコンドリア電子伝達系への影響を各呼吸鎖複合体の活性を測定することで明らかにする。これらの解析には報告者の以

前の研究でも使用した細胞外フラックスアナライザー(XFp Agilent Technologies 社製)を用いる。

(3) 転写因子 HIF-1 の活性化の影響

転写因子 HIF-1 の活性化が上記に与える影響を明らかにする。作業仮説としては報告者のこれまでの予備研究から判断して HIF-1 活性化がプロポフォルによる細胞障害を抑制する、を想定していた。

3. 研究の方法

実験系は以下に示した要素で構成された。

- ・細胞外フラックスアナライザー(XFp Agilent Technologies 社製 研究機関に配備済み)を用いた細胞酸素消費量測定(oxygen consumption rate, OCR)
- ・細胞外フラックスアナライザーを用いた細胞外酸性化速度測定(extracellular acidification rate, ECAR)(乳酸産生の代理マーカー)
- ・フローサイトメトリー(FACS)やカスパーゼ活性を用いた細胞死の測定
- ・蛍光色素を用いた細胞内 ROS 産生の測定
- ・遺伝的、薬理的な手法による HIF-1 活性化状態の作出

(1) プロポフォルが細胞死へ与える影響の検討

プロポフォルの用量と作用時間は重要な検討要素である。PRIS の発症危険因子に高用量・長時間の使用が指摘されているからである。予備実験では 50 μ M, 6 時間の条件でアポトーシスの誘導が観察されたが、臨床使用濃度の範囲ではあるものの高用量と考えられるので 12.5 μ M, 25 μ M を用いて検討を行った。

使用する細胞株は表 1 に示した。

骨格筋由来の C2C12 細胞に加え、ミトコンドリア機能とプロポフォル毒性との関連を探るため、ミトコンドリア DNA に変異を導入した細胞を作製し実験に供する。親株 P29 細胞のミトコンドリア DNA を欠損させ(0 細胞)、報告者らで確立している手法を用いて Cybrids 細胞を作出した。検討するミトコンドリア DNA 異常は表 2 に示した。

FACS

フローサイトメトリーは FACSCalibur を用いて蛍光標識した annexin-V との結合で初期アポトーシスの検出を行う。同時に propidium iodide を用いて後期アポトーシスまたはネクロトーシスの検出を行った(表 3)。

Caspase 活性の測定

細胞 Caspase3/7,9 の活性を生化学的に測定して細胞死の指標とする。Promega 社製の測定キットを用いた。

(2) ミトコンドリア機能・酸素代謝・代謝モードへの影響の検討(表 4・表 5)

ミトコンドリアの一般的な機能解析を行う。

細胞の大まかなエネルギー状態は ATP 含有量で比較する(表 4)。報告者の予備実験では 50 μ M, 6 時間では統計学的に有意な OCR の抑制と ECAR の上昇が確認されていた。

細胞外フラックスアナライザーを用いた OCR 測定(表 5)

細胞内酸素消費量の測定は細胞外フラックスアナライザー(XFp Agilent Technologies 社製 研究機関に配備済み)を用いた。

細胞内 ATP, 細胞外の乳酸・ピルビン酸測定(表 5)

古典的な生化学的な手法をもちいた測定に加えて細胞外酸性化速度(ECAR)を測定することで OCR 測定と合わせて細胞の代謝モード(酸化的リン酸化 vs 解糖)の推定を行う事ができる。

細胞外フラックスアナライザーを用いた各呼吸鎖複合体の活性の測定(表 5)

ミトコンドリアを単離せずに呼吸鎖複合体(I-IV)活性を OCR 測定により推定する実験系を構築してプロポフォルがその活性に与える影響を測定した。ミトコンドリア電子伝達系複合体別に測定することでプロポフォルの直接の標的が同定できる。

(3) HIF-1 活性化がプロポフォルによる細胞障害に与える影響の検討

表1 解析対象細胞

P29細胞(肺癌由来)
C2C12細胞(骨格筋由来)
RCC4(腎癌由来 HIF-1持続活性化)
RCC4-VHL細胞(HIF-1の持続活性化がリバース)
cybrid細胞(P29細胞由来)

表2 Cybrid細胞とミトコンドリア異常

NADHヒドロゲナーゼ異常(ND6遺伝子)
チトクロームオキシダーゼC異常(COI遺伝子)
ミトコンドリアDNA大量欠損
0細胞(ミトコンドリアDNA欠損)

表3 細胞の運命解析

FACSを用いたアポトーシス解析
各種Caspase活性の測定

表4 エネルギー代謝解析

細胞ATP測定
細胞外乳酸、ピルビン酸測定

表5 酸素代謝

細胞外フラックス アナライザーを用いた酸素消費量測定
細胞外フラックス アナライザーを用いた乳酸産生測定
細胞外フラックス アナライザーを用いた呼吸鎖解析

HIF-1 を人為的に活性化する。VHL 遺伝子を欠損した RCC4-EV 細胞(ヒト腎癌由来)は HIF-1 が常酸素条件でも持続的に活性化している細胞株である。

実験の遂行に以下の文献を参照した。

- BMC Anesthesiol. 2016 16:104
- Scientific Reports 2017 7: 381
- Nat Protoc. 2014 9: 421-438.

4 . 研究成果

RCC4 細胞は腎臓癌由来の細胞株であり癌細胞の性質として VHL(Von Hippel-Lindau; フォンヒッペル・リンドウ) 遺伝子が欠損していて転写因子 hypoxia-inducible factor が通常状態でも活性化しているという性質をもっている。この RCC4 細胞に遺伝子工学的に VHL を導入した細胞 (RCC4-VHL 細胞) と元の RCC4-EV 細胞のプロポフォール毒性を比較したところ RCC4 細胞ではプロポフォールによる細胞死が起こりにくいことを明らかにした。

この現象の分子生物学的な機序を検討したところ RCC4 細胞では転写因子 HIF-1 のが持続的に活性化している事により細胞では GLUT1・LDHA の働きにより、グルコースがピルビン酸 乳酸へと代謝される解糖系が優位な代謝経路に変換されている事、さらにまた PDK1 の働きによりピルビン酸がミトコンドリアに運ばれアセチル CoA に変換される経路が抑制されるため、ミトコンドリア呼吸鎖への電子の供給が抑制されている事を見いだした。すなわち RCC4 細胞で起こっている HIF-1 活性化により細胞はミトコンドリア呼吸に頼らない代謝状態にリプログラミングされている事が判明した。

これにより、プロポフォールのミトコンドリア機能障害による呼吸鎖からの電子の漏れ出しが低減され結果としてプロポフォールによる活性酸素種(ROS)産生が抑制され細胞障害が軽減の機序であると考えられた。この HIF-1 活性化によるプロポフォールの細胞障害の軽減作用は、RCC4 細胞の PDK-1 をロックダウン(RNA 干渉法により発現を抑制)したり HIF 活性阻害薬 YC-1 を使用することで消失した。一方通常状態で HIF-1 の活性化が観察できない RCC4-VHL 細胞や SHSY-5Y 細胞に HIF 水酸化酵素阻害薬である n-PG や DMOG を加えると、VHL 遺伝子の欠損による HIF-1 活性化と同様にプロポフォール による細胞障害に対する軽減作用が見られた。

以上の結果から人為的な HIF-1 活性の制御により ROS 産生を抑えることでプロポフォール による細胞障害を抑止することができると結論した。

プロポフォールによる細胞死のプロセスに ROS の産生増加が大きく関与していることを明らかにし、その制御を遺伝子工学的または薬理的に行うことが PRIS の発症・進展を防ぐための一つのアプローチとなりうることを示したことに本研究の意義があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sumi Chisato, Okamoto Akihisa, Tanaka Hiromasa, Kusunoki Munenori, Shoji Tomohiro, Uba Takeo, Adachi Takehiko, Iwai Teppei, Nishi Kenichiro, Harada Hiroshi, Bono Hidemasa, Matsuo Yoshiyuki, Hirota Kiichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Suppression of mitochondrial oxygen metabolism mediated by the transcription factor HIF-1 alleviates propofol-induced cell toxicity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-27220-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sumi Chisato, Okamoto Akihisa, Tanaka Hiromasa, Nishi Kenichiro, Kusunoki Munenori, Shoji Tomohiro, Uba Takeo, Matsuo Yoshiyuki, Adachi Takehiko, Hayashi Jun-Ichi, Takenaga Keizo, Hirota Kiichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Propofol induces a metabolic switch to glycolysis and cell death in a mitochondrial electron transport chain-dependent manner	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0192796	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	広田 喜一 (HIROTA Kiichi)		