

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19590913

研究課題名（和文） 急性呼吸不全における低酸素反応性因子の役割に関する研究

研究課題名（英文） Role of hypoxia-inducible factor in acute respiratory failure

研究代表者

田坂 定智（TASAKA SADATOMO）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70276244

研究成果の概要（和文）：低酸素環境に置かれた際に生体に生じるさまざまな変化をつかさどる分子である低酸素反応性因子（HIF-1）の機能および HIF-1 の阻害による治療応用の可能性につき研究を行った。ヒト血管内皮細胞および気道上皮細胞の培養系を用いて、炎症性刺激後に HIF-1 の遺伝子発現が亢進することを確認した。また急性呼吸不全患者の気道上皮被覆液中でも HIF-1 の高発現が見られた。次に RNA 干渉を応用して、培養細胞の HIF-1 発現の阻害を試みた。一部の実験では HIF-1 の発現をほぼ完全に阻害できたが、阻害効率が安定しなかった。また短干渉 RNA をマウスの気道内に投与して、呼吸器系に選択的に HIF-1 発現を阻害する実験を行ったが、結果のばらつきが大きく、一定の結論は導かれなかった。

研究成果の概要（英文）：We evaluated the role of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), which mediates various changes during hypoxia, in the pathogenesis of acute lung inflammation. Inflammatory stimulus upregulated the gene expression of HIF-1 in cultured endothelial and epithelial cells. In addition, upregulation of HIF-1 was observed in the airway epithelial lining fluid in patients with acute respiratory failure. Next, we tried to inhibit the expression of HIF-1 in cultured cells using RNA interference. Although, in some studies, the HIF-1 expression was inhibited almost completely, the efficacy of inhibition was not stable. In addition, it was examined whether intratracheal administration of siRNA selectively inhibits the HIF-1 expression in the respiratory system. Since the results were widely variable, any robust conclusion could not be obtained concerning the role of HIF-1.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：(1) 低酸素反応性因子 (2) 急性呼吸不全

1. 研究開始当初の背景

呼吸器疾患患者では低酸素血症が臨床、

大きな問題となるが、低酸素環境に置かれると生体にはさまざまな変化が生じる。その機序は長い間不明であったが、近年転写因子である低酸素反応性因子 (hypoxia-inducible factor-1; HIF-1) が同定され、低酸素応答系の分子機構の研究が急速に進展しつつある。低酸素環境で誘導される蛋白質や酵素は多く、その代表的なものとして、赤血球増殖因子であるエリスロポエチン、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor; VEGF) やその受容体、血管緊張を高めるエンドセリン (ET-1)、プラスミノゲンノ活性化因子阻害因子-1 (PAI-1)、ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) などがある。これらの分子は血管新生や血管作動性物質として機能する一方、炎症の進展または抑制にも深く関与している。VEGF による血管新生のように低酸素環境への順応に有益な現象がある一方、ET-1 による血管緊張の亢進は肺高血圧を惹起する。この現象は低酸素性肺血管攣縮と呼ばれ、慢性呼吸不全患者における肺高血圧 (肺性心) の原因となり、これら患者の予後に悪影響を与えることが知られている。また最近になり、低酸素刺激ばかりでなく、炎症性刺激によっても HIF-1 の発現が亢進することが培養細胞を使った検討から明らかになっている。

## 2. 研究の目的

HIF-1 が肺の炎症病態下で果たす役割を明らかにし、さらに RNA 干渉を応用した治療の可能性について検討することを研究全体の目的とし、以下の検討を行った。

(1) 炎症性刺激による HIF-1 の発現の変化および低酸素刺激との相乗作用について検討すること。

(2) 培養細胞を用いて、RNA 干渉で HIF-1 の遺伝子発現を特異的に抑制できるかを検討すること。

(3) ウィルスベクターの気道内投与により肺細胞に siRNA を導入し、肺局所での HIF-1 遺伝子のノックダウンの効果を検討すること。

(4) 種々の原因により急性呼吸不全に陥った患者の肺内における HIF-1 の発現を検討すること。

## 3. 研究の方法

(1) 炎症性刺激による HIF-1 発現の変化の検討

マウスの気道内に大腸菌エンドトキシン (LPS) を投与し、急性肺損傷を惹起させ、肺における HIF-1 の発現を検討した。低酸素曝露したマウスと通常の空気を吸入したマウスとで HIF-1 の発現を比較した。発現の評価方法としては、リアルタイム PCR 法による遺伝子解析とウェスタンブロット法によ

る蛋白レベルでの解析を行った。また HIF-1 と関連が深い VEGF や ET-1、PAI-1 についても同様の検討を行った。

(2) 培養細胞を用いた RNA 干渉の検討

ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) および気道上皮細胞 (Bes2b) の培養系を用いて、RNA 干渉により HIF-1 の遺伝子発現を特異的に抑制できるかを検討した。HIF-1 に対する短干渉 RNA (siRNA) をデザイン、作成し、これを培養細胞に導入した。導入した細胞で HIF-1 の発現がないことを確認した後、細胞に様々な炎症性刺激を加え、HIF-1 と関連が深い VEGF や ET-1、PAI-1 などの発現の変化を検討した。

(3) 肺細胞への siRNA 導入による肺局所での HIF-1 遺伝子ノックダウン効果の検討

アデノ随伴ウィルスによるウィルスベクターを用いて、マウスの肺細胞に siRNA を導入し、肺局所での HIF-1 遺伝子のノックダウンを試みた。肺における HIF-1 の遺伝子発現が抑制されるかを検討するとともに、他臓器への影響がないかも検討した。

(4) 急性呼吸不全患者の肺内における HIF-1 の発現

重症肺炎や急性呼吸促進症候群 (ARDS) による呼吸不全のため、酸素吸入や人工呼吸器による呼吸管理を行っている患者において、気管支鏡マイクロサンプリング法 (BMS) により気道上皮被覆液 (ELF) を採取した。ELF 中の HIF-1 や VEGF、ET-1、PAI-1 の発現をウェスタンブロット法により評価した。これらの発現の程度と酸素化指数や人工換気離脱率などの臨床的指標との間の関連についても検討した。

## 4. 研究成果

(1) 炎症性刺激による HIF-1 発現の変化の検討

ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) および気道上皮細胞 (Bes2b) の培養系を用いて、LPS や腫瘍壊死因子 (TNF- $\alpha$ ) などの炎症性刺激を加えた際の HIF-1 および関連する分子である VEGF、ET-1、PAI-1 の発現を検討した。HUVEC では、LPS 投与 6 時間後に HIF-1 の遺伝子発現が亢進し、VEGF、ET-1、PAI-1 についても同様に発現の亢進が見られた。TNF- $\alpha$  による刺激でも同様の傾向であった。これらの遺伝子発現は炎症性刺激 12 時間後をピークにし、24 時間後にはほぼベースラインに復していた。また蛋白レベルでも同様に HIF-1 および関連する VEGF、ET-1、PAI-1 の発現亢進が見られた。Bes2b でも LPS 投与 6 時間後に HIF-1 の遺伝子発現が亢進し、VEGF、ET-1、PAI-1 についても同様に発現

の亢進が見られた。また TNF- $\alpha$  刺激でも同様の傾向であった。次に細胞を低酸素環境に置き、遺伝子発現がどのように修飾されるかを検討した。炎症性刺激後の HIF-1、VEGF、ET-1、PAI-1 の発現は、低酸素環境において相乗的に亢進していた。また蛋白の発現でも同様に低酸素刺激と炎症性刺激が相乗的に働くことがいずれの細胞系でも確認された。

#### (2) 培養細胞を用いた RNA 干渉の検討

HIF-1 遺伝子に相補的な短干渉 RNA (siRNA) を作成した。HUVEC および Bes2b にこの siRNA を導入して HIF-1 の発現をノックダウンすることを目指した。導入直後の細胞では HIF-1 の遺伝子発現がほぼ消失していることが確認できたものの、一定時間培養後の細胞では導入効率が一定せず、HIF-1 の発現が十分に抑えられていなかった。導入後の細胞に低酸素曝露や、LPS などの炎症性刺激またはその両者を加えて、HIF-1 および関連する分子である VEGF、ET-1、PAI-1 の発現を解析した。リアルタイム PCR 法による遺伝子解析とウェスタンブロット法による蛋白レベルでの解析を行ったが、導入効率が一定しないことを反映してか、結果のばらつきが大きく、評価困難であった。このため、配列の異なる siRNA を作成し、導入効率の向上と安定化を目指したが、導入効率の明らかな改善は得られなかった。

#### (3) 肺細胞への siRNA 導入による肺局所での HIF-1 遺伝子ノックダウン効果の検討

アデノウイルスベクターの気道内投与による呼吸器系の HIF-1 遺伝子ノックダウンの可能性について検討した。マウスの気道内にベクターを投与し、8 または 24 時間後に肺を摘出し、RNA を抽出した。リアルタイム PCR 法により HIF-1 遺伝子の発現を評価した。一部のマウスでは、24 時間後に HIF-1 の発現がほぼ完全に阻害されたものの、個体間での阻害効率に大きな差が見られた。このため、ベクターの投与量や肺の摘出時間を種々に設定したものの、培養細胞での検討と同様に結果のばらつきが大きかった。肺以外の臓器も摘出して HIF-1 の発現を検討したが、肺において HIF-1 の発現が高度に阻害されているマウスでも、肺以外の臓器での HIF-1 の発現に明らかな変化は見られなかった。アデノウイルスベクターの気道内投与によるノックダウンの効果は肺に選択的であると考えられた。

#### (4) 急性呼吸不全患者の肺内における HIF-1 の発現

急性呼吸不全患者から、気管支鏡的マイクロサンプリング法により気道上皮被覆液 (ELF) を採取した。HIF-1 の発現をウェス

タンブロット法により評価した。呼吸不全患者では全体として HIF-1 の発現が亢進する傾向があったものの、正常範囲内にとどまるものもあり、症例間でのばらつきが大きかった。呼吸不全の原因となった基礎疾患の影響や発症からの時間経過によって HIF-1 の発現が修飾されている可能性が考えられた。また酸素化指数や人工換気離脱率などの臨床的指標と HIF-1 の発現との関連性についても検討したが、一定の傾向は認められなかった。VEGF、ET-1、PAI-1 についても同様に、呼吸不全患者で発現が亢進する傾向が見られたが、正常範囲内にとどまるものもあり、症例間でのばらつきが大きかった。HIF-1 が高発現していた症例では、VEGF、ET-1、PAI-1 の発現も亢進する傾向にあった。今後さらに症例数を増やして検討を加えるべきと考えられた。

#### (5) まとめ

今回の検討から、HIF-1 および関連する分子である VEGF、ET-1、PAI-1 の発現が低酸素刺激のみならず、炎症性刺激によっても亢進することが示され、さらに低酸素刺激と炎症性刺激とが相乗的に作用することも明らかになった。このことは急性呼吸不全患者の ELF を用いた検討でも裏づけられ、急性呼吸不全の病態形成において、HIF-1 が重要な役割を果たしていることが示唆された。RNA 干渉による阻害実験では、阻害効率が安定しなかったものの、アデノウイルスベクターによる肺選択的な HIF-1 の発現阻害の実現可能性も示された。今回の研究では急性呼吸不全における HIF-1 の役割に関して一定の結論を導き出すには至らなかったものの、今後 HIF-1 の機能の解明と治療応用につなげていくための貴重な基礎データが得られたと考えられる。

#### 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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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：

出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.sc.itc.keio.ac.jp/medicine/pulmonary/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田坂 定智 (TASAKA SADATOMO)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：70276244

### (2) 研究分担者

山澤 稚子 (YAMASAWA WAKAKO)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：50317137

長谷川 直樹 (HASEGAWA NAOKI)  
慶應義塾大学・医学部・講師  
研究者番号：20198724

斎藤 史武 (SAITO FUMITAKE)  
慶應義塾大学・医学部・助教  
研究者番号：30338040  
(H19のみ)

### (3) 連携研究者

なし