

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：19591789
 研究課題名(和文) 低酸素誘導性因子 1 を介した生体内酸素代謝維持機構への周術期使用薬剤の影響の検討
 研究課題名(英文) Investigation of effect of perioperatively used drugs to *in vivo* oxygen metabolism regulation mediated by hypoxia-induced factor 1
 研究代表者
 高淵 聡史(TAKABUCHI SATOSHI)
 京都大学・医学研究科・客員研究員
 研究者番号:90402841

研究成果の概要：

麻酔薬を含めた周術期に使用する薬剤の低酸素誘導性転写因子 1 (Hypoxia-Inducible Factor 1, HIF-1) を介した遺伝子発現への影響を介して細胞・生体の酸素代謝への影響を検討して、以下の結果を得た。バルビツレートが HIF-1 の活性を阻害する事、一方、ケタミン、ミダゾラムなどは HIF-1 活性に有意な影響を与えない事、さらにカルシウムブロッカーの作用を検討し cilnidipine がカルシウム拮抗作用非依存的に HIF-1 活性化を抑制することを見いだした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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

① 周術期における患者管理の要諦は、麻酔技術を駆使して手術侵襲を受ける生体のホメオスターシス、とくに細胞レベルにおける酸素需給バランス、すなわちエネルギー需給バランスを保つことにある。この観点に立ち、麻酔薬を含め、周術期に使用する薬剤が、どのような影響を及ぼすかについての知見を得ること

は周術期管理に資するところが大きいと考えられる。

② 周術期における生体の低酸素応答は大きく2つに分類できる。ひとつは、頸動脈小体の興奮、肺血管の低酸素性収縮など、イオンチャネルの活性変化を介する反応で、これまで数多

くの検討がなされている。もうひとつは、転写因子を介する遺伝子応答を本体とする反応で、報告は少ない。HIF-1は、ブドウ糖代謝、細胞増殖、血管新生など多岐にわたる生理的現象に関わる遺伝子の発現を誘導し、細胞の機能維持に寄与している重要な転写因子であり、Semenzaらによって、蛋白精製およびcDNAクローニングされて以来、生理学的、あるいは、病理学的に果たす役割について多くの検討が加えられてきた。ブドウ糖代謝においては、大部分の解糖系酵素やグルコーストランスポーターの誘導に関わり、細胞内のエネルギー供給が、酸化リン酸化から解糖系へとシフトするのに有利な複数の遺伝子発現を誘導することが明らかになっている。HIF-1の活性は種々の検討から酸素濃度5%以下で急激に増大することが明らかになっている。生体を構成する大部分の細胞は、より低い酸素濃度下にあることから、HIF-1は恒常的に発現し、機能していることが推察される。周術期には、手術侵襲などのストレスを受け、循環血液量低下、血圧低下、貧血、浮腫、などから末梢組織の血流障害に至り、低酸素血症、アシドーシスを来す。麻酔および周術期治療においては、これらのストレスに抗して、生体のホメオスターシスを維持するため麻酔薬、鎮痛薬、循環作動薬などの薬剤が使用されるが、これらの使用薬剤が周術期のエネルギー需給バランスに及ぼす影響についての知見はこのような病態の理解につながると考えられる。

これらの関連性が明らかになれば、申請者らがこれまでに報告してきた周術期薬剤がHIF-1に及ぼす影響についての結果から、周術期のエネルギー需給バランスに及ぼす影響についての議論が可能となり、その知見は、臨床における周術期患者管理に還元されるものと考えられる。

③ 申請者らはこれまで、転写因子HIF-1に着目して、周術期使用薬剤が及ぼす影響について検討してきた。その結果、すでに報告のあった吸入麻酔薬のハロタン[1]に加え、静脈麻酔薬のプロポフォール[2]がHIF-1の活性を酸素濃度依存的に抑制すること、局所麻酔薬[3]はHIF-1の活性に影響を及ぼさないこと、亜硝酸薬[4]のうちニトロプルシドナトリウムは、ニトログリセリン等と異なり、HIF-1の活性を抑制すること、オピオイド受容体の刺激はHIF-1の活性に影響を及ぼさないこと等を報告してきた。ブドウ糖代謝にHIF-1が深く関与していることは明らかにされている[5]。また、麻酔薬のプレコンディショニング効果については、数多くの報告があり、例えば、プロポフォールは乳酸の産生を抑え、虚血再灌流障害を軽減することが報告されている[6]。虚血再灌流障害を軽減するプレコンディショニングにHIF-1は深く関与している[7]。申請者らは、当該研究において、自らが報告してきた、周術期使用薬剤がHIF-1に与える影響と、細胞のエネルギー需給バランスとが如何に関連しているかについて検討する。

参考文献

1. Itoh T, Namba T, Fukuda K, Semenza GL, Hirota K (2001) Reversible inhibition of hypoxia-inducible factor 1 activation by exposure of hypoxic cells to the volatile anesthetic halothane. *FEBS Lett* 509:225-229
2. Takabuchi S, Hirota K, Nishi K, Oda S, Oda T, Shingu K, Takabayashi A, Adachi T, Semenza GL, Fukuda K (2004) The intravenous anesthetic propofol inhibits hypoxia-inducible factor 1 activity in an oxygen tension-dependent manner. *FEBS Lett* 577:434-438
3. Nishi K, Hirota K, Takabuchi S, Oda S, Fukuda K, Adachi T, Shingu K (2005) The

effects of local anesthetics on cellular hypoxia-induced gene responses mediated by hypoxia-inducible factor 1. *J Anesth* 19:54-59

4. Takabuchi S, Hirota K, Nishi K, Oda S, Oda T, Shingu K, Takabayashi A, Adachi T, Semenza GL, Fukuda K (2004) The inhibitory effect of sodium nitroprusside on HIF-1 activation is not dependent on nitric oxide-soluble guanylyl cyclase pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 324:417-423

5. Seagroves TN, Ryan HE, Lu H, Wouters BG, Knapp M, Thibault P, Laderoute K, Johnson RS (2001) Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 21:3436-3444

6. Ishii H, Arai T, Segawa H, Morikawa S, Inubushi T, Fukuda K (2002) Effects of propofol on lactate accumulation and oedema formation in focal cerebral ischaemia in hyperglycaemic rats. *Br J Anaesth* 88:412-417

7. Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, Zweier JL, Semenza GL (2003) Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 108:79-85

2. 研究の目的

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、生体の酸素分圧感知機構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

(1) ヒト由来の各種培養細胞、すなわち **HEK293** (腎由来)、**Hep3B** (肝細胞由来)、**HUVEC** (臍帯静脈血管内皮細胞)などを用いて、周術期使用薬剤が **HIF-1** の活性に及ぼす影響について得た知見の条件検討を行った。
(2) (1)の検討結果から細胞培養条件を含め、アッセイの条件を設定し、細胞レベルにおけるブドウ糖濃度、ピルビン酸、乳酸、**ATP** の含有量を、市販のキットを用いて定量し、周術期使用薬剤が細胞内のエネルギー需給バランスについて検討する。
(3) 解糖系の阻害薬の共存下において、(2)で検討したエネルギー需給バランスの影響を検討する。

4. 研究成果

研究計画に則り研究を遂行した。研究成果は、学会、研究会、公刊などにより公表した。一部の研究成果は現在公刊の準備中である。

(1) 解糖系酵素群の発現測定法の確立

Lactate dehydrogenase A (LDHA), pyruvate dehydrogenase (PDH), PDH kinase 1の発現を mRNAレベルと蛋白質レベルで評価する実験系を確立した。

(2) 樹立細胞株を用いた検討により、サイアミラル、チオペンタールを含むバルビツレートがhypoxia-inducible factor 1(HIF-1; 低酸素

誘導性因子 1)の活性を常酸素分圧下、低酸素分圧かで阻害する事を見いだした。一方、ケタミン、ミダゾラムなどはHIF-1活性に有意な影響を与えない事も見いだした。

さらにカルシウムブロッカーの作用を検討し cilnidipineがカルシウム拮抗作用非依存的にHIF-1活性化を抑制することを見いだした。

(3) in vitro細胞酸素消費測定系の確立
クラーク電極を用いた酸素分圧測定を使い、培養細胞の酸素消費量、細胞内ATP濃度、細胞培養上清中の乳酸・ピルビン酸の濃度の実験系を確立した。各種のミトコンドリア電子伝達系の阻害薬を用いた検討により細胞の種類により酸素消費量のミトコンドリアへの依存率に差がある事が判明した。静脈麻酔薬である propofol, thiopental, thyamilalがHIF-1活性を阻害することにより解糖系主体の代謝経路の抑制が起こり細胞内ATP濃度が減少す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10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. 広田 喜一, 田中 具治. 低酸素応答と低酸素センサー. *Life Support and Anesthesia*. 2008;15:238-43. (査読無し)
3. 広田 喜一. ハイポキシア生物学-酸素代謝からみる生命現象の方程式. *医学のあゆみ*. 2008;225. (査読無し)
4. 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)

5. 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)
6. 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)
7. 広田 喜一. 細胞の低酸素応答機構-低酸素センサーを巡る論争. *実験医学*. 2007;25:2120-6. (査読無し)
8. Sommani P, Yamashita K, Miyoshi T, Tsunemine H, Kodaki T, Mori H, Hirota K, Arai T, Sasada M, Makino K. Inhibitory Effect of 6-Formylpterin on HIF-1alpha Protein Accumulation. *Biol Pharm Bull*. 2007;30:2181-4. (査読あり)
9. 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)

10. 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)

[学会発表] (計 5件)

田中 具治 他

低酸素誘導性遺伝子応答に低温が及ぼす影響

日本麻酔科学会 第54回学術集会 2007年6月1日 札幌市

リドカインは上皮成長因子受容体シグナル伝達系非依存的に細胞増殖を抑制する

若松 拓彦 他 日本麻酔科学会 第54回学術集会 2007年5月31日 札幌市

田中 具治 他

低酸素性遺伝子応答に温度変化が及ぼす影響

日本麻酔科学会 第54回学術集会 2008年6月12日 横浜市

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

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

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, physiologica, and pathogenic responses to hypoxia 2008/01/16 Vancouver, Canada

[図書] (計1件)

広田喜一、克誠堂出版、周術期の呼吸管理(低酸素性肺障害の分子生物学)、2007年、p33-p47

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高淵 聡史 (TAKABUCHI SATOSHI)

京都大学・医学研究科・客員研究員

研究者番号:90402841

(2) 研究分担者

広田 喜一 (HIROTA KIICHI)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号:00283606

