

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09344

研究課題名(和文) 周術期管理における低酸素応答と免疫応答を指標とした生体侵襲回復能の評価

研究課題名(英文) Evaluation of recovery from hypoxic tissue damage in perioperative management

研究代表者

川前 金幸 (Kawamae, Kaneyuki)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：70254026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本件研究では、細胞内二次伝達物質ジアシルグリセロール(DG)のリン酸化酵素DGキナーゼ(DGK)ファミリーのゼータ型DGK(DGK ζ)について、その低酸素応答機構を解析した。DGK ζ ノックアウト(KO)細胞では、低酸素環境下において低酸素応答転写因子HIF1 α の誘導が減少した。またNAD依存性脱アセチル化酵素SIRT1の発現とNADの減少が認められ、「エネルギー節約」を指揮する脱アセチル化反応が低下すると考えられた。また細胞内ATP量は約1.2倍に増加しているにもかかわらず、エネルギーセンサーAMPKが活性化し(リン酸化の亢進)、これはTAK1リン酸化酵素を介することが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

損傷を受けた脳や臓器の生体応答は、急性期離脱後の回復を大きく左右すると考えられ、その評価は重要である。生体細胞を解析対象とした生体応答の評価法を確立することができれば、周術期管理に非常に有用と思われる。本研究では、臓器損傷に対する生体応答を、血管破綻による血流障害によって生じる「低酸素に対する生体応答」として捉え、種々の細胞・動物モデルを用いてその評価法を検討した。これらの研究結果は、将来的に臨床現場における生体侵襲応答評価法を確立するのに役立つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the functional implications of zeta type diacylglycerol kinase (DGK ζ), a family of second messenger DG-metabolizing enzyme, after 1% hypoxic insults. Of hypoxia-responsive molecules, induction of hypoxia-inducible transcription factor HIF1 α was attenuated. In addition, NAD-dependent deacetylase SIRT1 and NAD were also downregulated, suggesting that energy saving mechanism is not working. On the other hand, energy sensor AMPK was activated (increased phosphorylation) by upstream kinase TAK1. Since ATP level was increased by 1.2-fold after hypoxia, activation mechanism of energy sensor AMPK was dysregulated in DGK ζ -KO cells. These results suggest that DGK ζ deficiency results in suppressed prosurvival response via HIF1 α and SIRT1 together with dysregulation of energy sensing system via AMPK.

研究分野：麻酔科学

キーワード：細胞内情報伝達機構 ジアシルグリセロールキナーゼ 低酸素応答 エネルギーセンサー AMPK ATP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 外科的手術、種々の要因による人工呼吸管理、および重症肺炎等において集中治療が選択される場合、その過程における生体応答が病態の予後と大きく相関すると考えられる。現在の周術期モニターシステムは、薬物の投与時間と連動して血圧や血ガス等の変動を経時的にモニタリングすることが可能である。しかし生体応答は個体により大きく異なるので、生体細胞を用いて低酸素や炎症に対する生体応答等を定量的に解析することが出来れば、生体損傷に対する応答メカニズムから回復能を予測し、そしてその解析結果を臨床現場へ応用することが可能になると思われる。

(2) 申請者は、日常の手術麻酔および集中治療管理に従事する傍ら、研究グループとして細胞内情報伝達機構に関する研究に従事し、細胞内二次伝達物質ジアシルグリセロール (DG) のリン酸化酵素 DG キナーゼ (DGK) ファミリーに関して、種々の病態モデルを用いて、生体臓器における機能解析を行ってきた。その結果、サブタイプの一つである DGK (ゼータ) が生体ストレス応答と密接に関連し、一過性虚血ストレスなどの低酸素応答メカニズムに関与することを報告してきた。

2. 研究の目的

(1) 生体は、臓器損傷等に対して、その危機的状況からの回復をはかるため、様々な応答メカニズムを作動させる。本研究では、これまでの申請者等の研究グループによる研究成果を考察し、動物実験モデルでの臓器損傷に対して起こる応答を、血管破綻による血流障害によって生じる「低エネルギー、低酸素に対する生体応答」および、組織損傷によって作動する「炎症応答の主要転写因子 NFκB 経路」という2つの生存シグナルに着目して、損傷からの回復能を解析することを当初の研究目的とした。

(2) 日本人研究者によって初めて遺伝子クローニングがなされた DGK は、申請者等を含む日本人の研究グループにより研究が推進されてきた歴史を持つ。申請者等はこれまで、幾つかの動物モデルを用いて、DGK アイソザイムの機能解析に従事してきた。本研究はその企画立案から、独自の視点に立つ研究である。

(3) 本研究は、術中および集中治療を指揮・管理する麻酔科医と、独自の研究を進めてきた基礎研究者との共同研究によるもので、臨床現場で得られた問題点を、これまでの基礎研究から得られたデータに基づいて解析する、真にオリジナルな企画である。

(4) 将来的に本研究を発展させ、生体細胞 (血球細胞と肺胞および腹腔マクロファージ) を用いた生存シグナル解析法を確立することにより、大きな生体侵襲ストレスを受けたハイリスク患者の回復能を予測し、術後管理に大きく役立つ可能性を持つ。

(5) 集術期管理は臨床医学最前線の現場の一つであり、本研究により、現在の最新のモニターシステムに加え、生体細胞サンプルを用いた生体侵襲回復指標を実験的に考察し、将来的な周術期管理に役立てたいと考える。

3. 研究の方法

(1) 野生型および DGK ノックアウト (DGK -KO) マウスから不死化したマウス胎児線維芽細胞 (MEF) を作製した。また siRNA による一過性 DGK ノックダウン HeLa 細胞も用いた。MEF は 20% ウシ胎児血清 (FBS)、HeLa 細胞は 10%FBS を含むダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) で培養した。インキュベーター内を 37、20%O₂、5%CO₂ としたものを通常酸素条件とし、37、1%O₂、94%N₂、5%CO₂ に管理したものを低酸素条件とした。

(2) HIF-1、AMPK、SIRT1 および AMPK 上流のリン酸化酵素 LKB1、CaMKK、TAK1 などの関連タンパク質の発現をウェスタンブロット法および RT-PCR により解析した。またホタル・ルシフェラーゼ発光法を用いて、細胞内 ATP を測定した。

4. 研究成果

(1) HIF-1 の発現誘導
これまでの実験では、正常酸素の培養条件下では、コントロール細胞および DGK ノックダウン細胞の両者ともに、ウェスタンブロット解析において HIF-1 蛋白は、ほとんど検出限界以下であった。しかし、低酸素負荷により HIF-1 蛋白発現の増加が認められたが、発現誘導は DGK ノックダウン細胞において有意に減少しており、コントロールと比較して約 50%程度であった。次に、この発現誘導が転写レベルで調節されているかを検討するために、RT-PCR 法を施行し

た。その結果、DGK⁻KO 細胞では、低酸素環境下において HIF1 mRNA の発現誘導が減少しており、転写レベルで抑制されることが明らかとなった。

(2) SIRT1 の発現解析および NAD⁺ 定量

カロリー制限等により誘導され、長寿遺伝子とも呼ばれる脱アセチル化酵素 SIRT1 の発現を解析した。SIRT1 は、NAD⁺ 依存性に活性化され、エネルギー需要を抑えることにより ATP の消費を抑制し、低エネルギー状態への適応を誘導する。野生型および DGK⁻KO MEF を 1% 低酸素環境下で 24 時間培養を行い、SIRT1 の蛋白発現をウェスタンブロットにて解析をしたところ、正常酸素条件下では、DGK⁻KO MEF の SIRT1 蛋白発現は野生型に比べて約 50% に低下していた。低酸素負荷によって、野生型および DGK⁻KO MEF の両者ともに、SIRT1 の蛋白発現は減少するが、DGK⁻KO MEF における減少の程度が顕著であった。

次に、この発現調節が転写レベルで調節されているかを検討するために、RT-PCR を施行した。その結果、DGK⁻KO MEF における SIRT1 mRNA は、正常酸素下ではコントロール MEF の約 80% に、低酸素負荷条件下では、約 50% に減少することが明らかとなった。この結果より、DGK⁻KO 細胞では、SIRT1 発現は、転写レベルで抑制され、さらに低酸素負荷によって著しく低下することが判明した。

SIRT1 の活性は NAD⁺ 依存性であることから、NAD⁺ の定量を行ったところ、DGK⁻KO MEF では野生型と比較し、NAD⁺ 量は約 50% 減少していた。以上をまとめると、DGK⁻KO 細胞では、正常酸素および低酸素環境下において、SIRT1 のタンパク発現ならびにその活性化因子である NAD⁺ が減少しており、脱アセチル化活性が低下する可能性が示唆された。

(3) AMPK の活性化機構

細胞内のエネルギーセンサー AMPK は、細胞内 ATP の消費により増加した ADP や AMP に応答して活性化される。活性化した AMPK は、蛋白合成等の同化作用によるエネルギー消費を抑制し、また ATP 産生に働く異化作用を促進させ、エネルギー枯渇状態への適応をもたらす。実験結果から、AMPK の発現は、野生型においては低酸素負荷により時間依存的に増加する一方、DGK⁻KO MEF においては、正常酸素圧で既に高い発現レベルを示し、逆に低酸素負荷により次第に減少した。

次にリン酸化抗体を用いて AMPK の活性化を検討したところ、1% 低酸素負荷により野生型および DGK⁻KO MEF 共に、AMPK のリン酸化レベルは増加するが、DGK⁻KO MEF においては野生型と比較してより高いリン酸化レベルが検出された。以上より、DGK⁻KO 細胞では AMPK の活性化が亢進する可能性が示唆された。

この時、細胞内 ATP を測定すると、正常酸素圧において、DGK⁻KO MEF の細胞内 ATP は、野生型の 1.2~1.5 倍と増加することが判明した。低酸素負荷条件下では、細胞内 ATP は両者とも正常酸素圧の約 50% 程度に減少するが、相対的には DGK⁻KO MEF の細胞内 ATP は野生型の約 1.5 倍と高値を示した。

AMPK は Thr172 のリン酸化により活性化される。これまでの報告により、AMPK は LKB1、CaMKK、TAK1 によりリン酸化されるので、AMPK のリン酸化は DGK⁻KO 細胞においてどのキナーゼにより行われ、どのように変化するかを検討した。低エネルギー状態における AMPK

の活性化は、細胞内 ATP 枯渇に応答して活性化される LKB1 により制御される。DGK⁻KO 細胞における LKB1 のリン酸化は、野生型の約 40% と著しく低下していた。この理由は、DGK⁻KO MEF においては、細胞内 ATP が増加することにより、LKB1 活性化が抑制されているためと考えられた。

次に、CaMKK と TAK1 の関与を検討した。CaMKK あるいは TAK1 のシングルノックダウン実験と、DGK⁻/CaMKK、あるいは DGK⁻/TAK1 のダブルノックダウン実験結果を総合すると、CaMKK による AMPK のリン酸化は、DGK⁻ とは無関係である一方、TAK1 による AMPK のリン酸化は、DGK⁻ により抑制されており、DGK⁻KO 条件下では TAK1 による AMPK のリン酸化が亢進することが明らかとなった。以上より、DGK⁻KO 細胞では、AMPK を介する細胞内エネルギーセンサーシステムに異常が認められることが示唆された。

(4) グルコース欠乏実験

生体の血流障害は、酸素のみならずグルコースによるエネルギー自体の供給も停滞する。そこで、低酸素負荷実験に加え、グルコース供給低下による影響も検討した。この実験では、DGK⁻KO MEF をグルコース除去培地で培養することにより、エネルギーストレス負荷条件とした。野生型細胞をグルコース不含培地に置換すると 10 時間以内にほとんどの細胞が培養上清中に浮遊する一方、予想に反して、DGK⁻KO 細胞は約 90% の細胞が接着しているのが観察された。アポトーシス関連タンパクの発現を解析すると、負荷後野生型および DGK⁻KO 細胞のいずれにおいてもカスパーゼの発現は検出されず、野生型細胞ではカスパーゼ非依存性にアポトーシスを惹起する apoptosis inducing factor (AIF) の発現亢進が認められた。DGK⁻KO 細胞では野生型細胞に比較して細胞内 ATP が約 1.2~1.5 倍に増加しており、またミトコンドリア電子伝達系での NAD⁺/NADH を測定したところ、還元型 NADH が顕著に増加していた。これまでの研究成果から、DGK⁻KO 細胞は DNA ダメージに対して脆弱性を示すことが報告されているが、今回のグルコース欠乏刺激に対しては耐性を示すことが明らかとなった。

現在までのデータを考察すると、DGK⁻KO 細胞では、増大した ATP によるエネルギー欠乏への耐性が生じ、また NADH 増加にともなって二量体を形成する AIF がミトコンドリアに係留され、アポトーシスを起こしにくい状態になっているためと考えられた。今後、低酸素とグルコース欠乏負荷実験の比較検討を行い、エネルギーストレス要因の詳細な解析を行う予定である。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akimoto R, Tanaka T, Nakano T, Hozumi Y, Kawamae K, Goto K.	4. 巻 71
2. 論文標題 DGK depletion attenuates HIF-1 induction and SIRT1 expression, but enhances TAK1-mediated AMPK phosphorylation under hypoxia.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Signal	6. 最初と最後の頁 109618
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cellsig.2020.109618.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka T, Hozumi Y, Martelli AM, Iino M, Goto K.	4. 巻 1866
2. 論文標題 Nucleosome assembly proteins NAP1L1 and NAP1L4 modulate p53 acetylation to regulate cell fate.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochim Biophys Acta Mol Cell Res	6. 最初と最後の頁 118560
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbamcr.2019.118560.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田中俊昭、後藤薫
2. 発表標題 DGK 欠失はDNA修復の機能不全をもたらす
3. 学会等名 第125回日本解剖学会
4. 発表年 2020年～2021年

1. 発表者名 Kaoru Goto, Ryo Akimoto, Tomoyuki Nakano, Toshiaki Tanaka
2. 発表標題 DGK AND ENERGY METABOLISM
3. 学会等名 60th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON " BIOLOGICAL REGULATION AND ENZYME ACTIVITY IN NORMAL AND NEOPLASTIC TISSUES (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中 俊昭、後藤 薫
2. 発表標題 DGK 結合タンパク NAP1-like proteins による p53 アセチル化修飾は細胞増殖と細胞死を制御する
3. 学会等名 第65回日本解剖学会 東北・北海道地方会
4. 発表年 2019年

〔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
研究分担者	後藤 薫 (GOTO KAORU) (30234975)	山形大学・医学部・教授 (11501)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------