

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 17 日現在

機関番号：74314

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591992

研究課題名（和文）：低酸素誘導性遺伝子発現変化が肺胞炎症に及ぼす影響の細胞生物学的検討

研究課題名（英文）：Cell biological analysis of the effect of hypoxia-induced gene expressions on progression of pulmonary alveolar inflammation

研究代表者

足立 健彦（ADACHI TAKEHIKO）

公益財団法人田附興風会・医学研究所 第9研究部・部長

研究者番号：90252428

研究成果の概要（和文）：

敗血症などの全身性のショックや喫煙はガス交換の単位である肺胞上皮細胞、肺胞間質、肺胞毛細血管の生理的恒常性を阻害し、病態生理学的な変化をもたらす。これら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、生体の低酸素誘導性の遺伝子発現において中心的な役割を果たしている 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た。

研究成果の概要（英文）：

Systemic shock manifested as a symptom of sepsis and tabaco smoking disturb physiological homeostasis and induces phothophysiological changes in epithelium, interstitial tissue and capillary vessels of pulmonary alveoli as a unit of gas exchange. To review these pathological phenomena from the point of signal transduction and gene expression elicited by systemic and tissue hypoxia and understand molecular mechanisms behind the phenomena, we analysed cells and mice adopting methodology of molecular biology in relation to hypoxia-inducible factor 1 activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：肺胞上皮，肺障害，低酸素誘導性因子 1, タバコ，水チャンネル，遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

I型細胞とII型細胞で構成される肺胞上皮は生体が外界と直接相互作用する最前線の一つを形成している。サーファクタントの産生、分泌に加え肺胞上皮細胞はタイトジャンクションで結合していて肺胞腔と体内のバリアとして機能している。肺胞上皮のジャンクションが破綻すれば蛋白質濃度の高い膠質液が肺胞内へと漏洩していく。肺炎、敗血症、誤嚥、輸血などを契機とした炎症反応はタイトジャンクション破綻の引き金を引く。またサーファクタント産生能を有し、I型肺胞上皮細胞への分化能をもつII型肺胞細胞の細胞死は、肺胞の低酸素が肺水腫の発症を引き起こすだけでなく肺障害の発症につながる可能性を示している。

酸素は生命に必須の分子であり、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。肺胞上皮は生体内でもっとも過酷な酸素分圧の変化に晒される“場”の一つである。

細胞の酸素感知機構とりわけ低酸素感知機構の詳細は酸素が生体に必須の分子であることが 18 世紀に証明された時からの課題であった。この課題の解決におけるブレイクスルーは 1995 年の Semenza 博士らによる転写因子である低酸素誘導性因子 1(hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)の遺伝子単離である。HIF-1 は低酸素刺激に反応し極めて特異的にかつ迅速に活性化する転写因子でありこの活性化を指標に細胞内低酸素感知機構の分子生物学が急速に発達した。最近の研究によれば 2000 個以上の遺伝子の酸素分圧の変化による発現変化を制御してい

ると考えられるマスター因子である。明確な低酸素の標的としての HIF-1 の活性化とそれに至る機序が分子生物学的に解析されて低酸素研究の現代化が実現した。申請者らはさらに研究を進め、揮発性吸入麻酔薬、静脈麻酔薬、カルシウム拮抗薬、局所麻酔薬、亜硝酸製剤などの周術期使用薬剤が HIF-1 の活性化に及ぼす影響を継続して報告してきた。最近では、HIF-1 がエネルギー代謝とくにブドウ糖代謝の変換を司りマクロファージの機能の維持に重要な役割を果たしていることを報告してきた。一酸化窒素を含む周術期使用薬剤が酸素分圧感知機構への影響を介して低酸素誘導性の HIF-1 の活性化を調節していることを報告するとともに、炎症担当細胞の成熟過程に HIF-1 の果たす役割についても報告してきた。さらに最近炎症促進ケモカインマクロファージ遊走阻止因子 MIF が HIF-1 の活性化をもたらすことも報告してきた。

さらに肺胞低酸素環境下で肺胞上皮細胞においてENaCとNa⁺/K⁺-ATPaseの発現や機能が阻害されたり、II型肺胞上皮細胞の細胞死により肺胞のバリア機能が低下することが報告されているが、動物種、細胞の培養条件などの違いで差が生じ結果に統一的な結論が得られていないし、AQP5やタイトジャンクションに関しては低酸素状態に特化した検討がなされてこなかった。

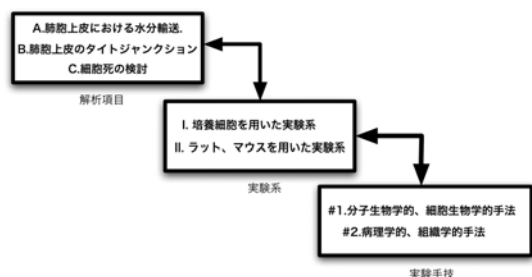
2. 研究の目的

敗血症などの全身性のショック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、生体の低酸素誘導性の遺伝子発現において中心的な役割を果たしている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すること、さらに実験小動物を用い、新たな観点から従来の肺障害治療法の評価を下し、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

研究体制は研究代表者足立が主に実験動物を用いた解析をおこない、研究分担者の広田が細胞生物学・分子生物学的な分析を担当した。京都大学大学院医学研究科の学生、田中具治、大条鋳樹も研究に参画した。



4. 研究成果

三年間の研究期間で以下の研究結果を得た。

(1) タバコ抽出液が肺胞上皮機能に与える影響について

II型肺胞上皮細胞のモデル細胞として頻用される樹立細胞株A549細胞(ヒト由来)において、タバコ抽出液(CSE)処理により活性酸素依存的にhypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)の強い活性化が起こることを見いだした。マウスを用いて生体内でこの現象を再現し、急性肺障害の発生、進展に果たす役割を明らかにして治療への端緒を得るためにマウスにHIF-1αのsiRNAを導入してHIF-1の活性化を抑制して肺障害の進展への影響を検討す

るモデルの作成を行い、RNA干渉によるHIF-1αの発現抑制に成功した。

その活性化機序の分子機構について解析を行い、ニコチンまたはアクロレイン依存性の経路とそれ以外の経路が存在することを明らかにした。また活性酸素がこの活性化において重要な役割を果たしていることを見いだすと共にこの活性化がHIF-1α蛋白質の細胞内安定化によるものというよりはHIF-1α蛋白質のmRNAからの翻訳過程を促進する機序でHIF-1αの発現増強とHIF-1の活性化をもたらすことを明らかにした。

また脳、腎臓など肺以外の臓器への影響の検討を行い、少なくとも神経由来細胞においてはタバコによるHIF-1の活性化が起こる事を明らかにした。

またさらにHIF-1依存的にタバコ暴露により活性化を受ける遺伝子としてREDD1を同定してCOPDの成立におけるHIF-1の役割についての解析に着手した。

また、樹立細胞株A549細胞を用いたタバコ抽出液(CSE)への暴露モデル、マウスを用いた喫煙モデルまた低酸素下環境への暴露モデルを用いてタバコや低酸素誘導性のHIF-1活性化が、VEGF, aquaporinなどの発現誘導をもたらす事を見いだした。この発見は肺胞の毛細血管の透過性をその病態とする肺水腫の発生にHIF-1の活性化が深く関わることを示唆するもので肺水腫の予防、治療の端緒につながる事が期待される発見であると考えられる。

(2) 低酸素環境が肺胞上皮機能に与える影響について

樹立細胞株 A549 細胞において、HIF-1 依存的に水チャネル(aquaporin-5, AQP-5)の発現増強が起こることを見いだした。この分子機

序と生物学的な意義について主に細胞死の観点から解析を行った。

さらに肺, 気道上皮で産生・分泌される粘液の主成分であるムチン(mucin)のうち膜貫通型ムチン Muc1 と Muc5AC の発現が, 低酸素環境またはタバコ抽出液への暴露で誘導を受けるとまたこの誘導が HIF-1 による発現調節下にあることを明らかにした。

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 7 件)

① Kai, S., Tanaka, T., Daijo, H., Harada, H., Kishimoto, S., Suzuki, K., Takabuchi, S., Takenaga, K., Fukuda, K., and Hirota, K. (2012). Hydrogen sulfide inhibits hypoxia- but not anoxia-induced hypoxia-inducible factor 1 activation in a von hippel-lindau- and mitochondria-dependent manner. *Antioxidants & redox signaling* 16, 203-216. (査読有り) DOI: 10.1089/ars.2011.3882

② Tanaka, T., Kai, S., Koyama, T., Daijo, H., Adachi, T., Fukuda, K., and Hirota, K. (2011). General Anesthetics Inhibit Erythropoietin Induction under Hypoxic Conditions in the Mouse Brain. *PLoS ONE* 6, e29378. (査読有り) DOI:10.1371/journal.pone.0029378

③ Daijo, H., Kai, S., Tanaka, T., Wakamatsu, T., Kishimoto, S., Suzuki, K., Harada, H., Takabuchi, S., Adachi, T., Fukuda, K., Hirota, K. (2011). Fentanyl activates hypoxia-inducible factor 1 in neuronal SH-SY5Y cells and mice under

non-hypoxic conditions in a mu-opioid receptor-dependent manner.

European journal of pharmacology 667, 144-152. (査読有り)

DOI:10.1016/j.ejphar.2011.06.014

④ 広田 喜一, 大条 鉦樹, 甲斐 慎一, 鈴木 堅悟, 岸本 俊, 松山 智紀, (2011) 炎症の制御点としての低酸素誘導性因子 麻酔 60:S69-74 (査読無し)

<http://jglobal.jst.go.jp/public/20090422/201102269918990320>

⑤ Tanaka, T., Wakamatsu, T., Daijo, H., Oda, S., Kai, S., Adachi, T., Kizaka-Kondoh, S., Fukuda, K., and Hirota, K. (2010).

Persisting mild hypothermia suppresses hypoxia-inducible factor-1alpha protein synthesis and hypoxia-inducible factor-1-mediated gene expression.

American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology 298, R661-671. (査読有り)

DOI:10.1152/ajpregu.00732.2009.

⑥ Oda, S., Oda, T., Takabuchi, S., Nishi, K., Wakamatsu, T., Tanaka, T., Adachi, T., Fukuda, K., Nohara, R., and Hirota, K. (2009).

The calcium channel blocker cilnidipine selectively suppresses hypoxia-inducible factor 1 activity in vascular cells. *Eur J Pharmacol* 606, 130-136. (査読有り)

DOI: 10.1016/j.ejphar.2009.01.012

⑦ 広田 喜一, 若松 拓彦, 田中 具治, 大条 鉦樹, 甲斐 慎一 (2009) ハイポキシア 生物学—酸素代謝から見る生命現象— 麻酔 58: S138-S146. (査読無し)

〔学会発表〕（計 3 件）

① タバコ煙抽出物はヒト肺胞Ⅱ型上皮細胞株 (A549) において低酸素誘導性因子 1 (hypoxia-inducible factor 1:HIF-1) を活性化する

大条 紘樹、鈴木堅固、岸本 俊、甲斐 慎一、広田 喜一、福田 和彦

日本麻酔科学会 第 58 回学術総会
2011/5/19 神戸市

②炎症の制御点としての低酸素誘導性因子

広田 喜一、大条紘樹、甲斐 慎一、鈴木堅悟、岸本 俊、松山智紀

日本麻酔科学会 第58回学術総会 2011/5/20
神戸市

③ Isoflurane selectively inhibits the activation of hypoxia-inducible factor 2 and the induction of erythropoietin under hypoxic conditions in mouse brain

Kiichi Hirota, Tomoharu Tanaka, Shinichi Kai, Tomohiro Koyama, Hiroki Daijo, Kengo Suzuki, Takehiko Adachi, Kazuhiko Fukuda
2011 Annual Meeting, American Society of Anesthesiologists, Chicago, 2011/10/16

6. 研究組織

(1) 研究代表者

足立 健彦 (ADACHI TAKEHIKO)
公益財団法人田附興風会・医学研究所
第9研究部・部長
研究者番号：90252428

(2) 研究分担者

広田 喜一 (HIROTA KIICHI)
京都大学・医学研究科・准教授
研究者番号：00283606