

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16542

研究課題名（和文）IFN-1aシグナルと低酸素応答系のクロストークによる肺血管内皮バリア機能制御

研究課題名（英文）Regulation of pulmonary vascular endothelial barrier function by crosstalk between IFN-1a signaling and the hypoxia response system

研究代表者

角 千里（SUMI, Chisato）

関西医科大学・医学部・研究医員

研究者番号：00580466

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：内皮細胞において、IFN-1aは時間および用量に依存してCD73の発現を増加させた。さらに、IFN-1aは細胞間透過性を低下させ、その保護効果がCD73の活性と発現の両方によって介在されていることを明らかにした。また、IFN-1aはCD73依存的に接合タンパク質の局在と細胞骨格のリモデリングを制御することも判明した。アデノシンやCD73活性阻害薬を用いた解析からは、IFN-1aによるバリア機能の保護効果がアデノシン非依存的な経路を通じている可能性が示された。結論として、IFN-1aはCD73依存的にジャンクションタンパク質の発現と局在を調節することで内皮細胞のバリア機能を向上させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ARDS時にダイナミックに変動する肺の酸素環境・サイトカイン環境でそのHIF-1システムとのクロストークの実態を明らかにして、血管内皮のみでなく肺泡バリアの形成に対する影響を明らかにすることが本研究の目的であった。本研究の成果は潜在的には外国での研究で臨床における有効性が確認されていたIFN-1aの作用機序を肺の酸素環境を考慮に入れて明らかにしようという試みであり独自性が高くさらに分子機序の解明によって今後広く麻酔・集中治療の現場で使用されるであろうIFN-1aの生体への作用の理解につながり製剤の適応また限界を明らかにする手掛かりを与えられる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：In endothelial cells, IFN-1a increased CD73 expression in a time- and dose-dependent manner. Furthermore, IFN-1a reduced intercellular permeability, indicating that its protective effect is mediated by both CD73 activity and expression. We also found that IFN-1a regulates junctional protein localization and cytoskeletal remodeling in a CD73-dependent manner. Analysis using adenosine and inhibitors of CD73 activity indicated that the protective effect of IFN-1a on barrier function may be through an adenosine-independent pathway. In conclusion, IFN-1a enhanced endothelial cell barrier function through CD73-dependent regulation of junction protein expression and localization.

研究分野：麻酔科学

キーワード：急性呼吸窮迫症候群 interferon-1a 細胞間バリア機能 CD73 低酸素誘導性因子 CD39

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

感染症や組織損傷がある状況下での全身炎症(SIRS)の進行は、急性呼吸窮迫症候群(Acute Respiratory Distress Syndrome: ARDS)を引き起こし、結果として多臓器不全の引き金となる。一度発生すると、ARDSの治療は困難であることが知られており、ステロイド剤などの治療薬が試みられているが、その効果は限定的である。

多発性硬化症の治療薬である interferon  $\beta$ -1a (IFN  $\beta$ -1a)が、ARDSの病態改善に効果的であると注目されており、海外での臨床応用の結果(Lancet Respir Med. 2014 PMID 24503265)を受けて、日本でもIFN  $\beta$ -1aの臨床試験が実施されている。また、IFN  $\beta$ -1aは血管内皮細胞での Ecto-5'-nucleotidase 活性を持つ CD73 分子の発現を促し、その結果として細胞外アデノシン濃度が上昇することが分子基盤にあるとされるが、CD73の発現とその下流シグナル、細胞間バリア機能の増強の分子機序は十分には明らかにされていない。

先行研究により、低酸素だけでなく TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、LPS などの炎症性サイトカインや物質によっても HIF-1 が活性化され、HIF-1 の活性化が CD73 の mRNA 転写を亢進させることが明らかにされている。さらに、HIF-1 はバリア形成における細胞間接着分子の遺伝子発現に重要な役割を果たしていることも示されている。

この背景をもとに、IFN  $\beta$ -1a による細胞間バリア機能の増強の分子機序における HIF-1 の役割を明らかにする研究を計画した。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、IFN  $\beta$ -1a シグナル伝達と肺内酸素分圧・サイトカイン環境に関連した転写因子 HIF-1 の活性化とのクロストークから、IFN  $\beta$ -1a が細胞間バリア機能に与える影響を解明することである。この目的を達成するため、血管内皮初代培養細胞、肺胞上皮および腸管上皮由来細胞株、及びマウス急性肺障害モデルを用い、Ecto-5'-nucleotidase 活性を持つ CD73 分子とその関連分子 CD39 の発現、そしてこれらによる細胞外アデノシン産生が依存する細胞間バリア機能維持のメカニズムを、IFN  $\beta$ -1a シグナルと HIF-1 による低酸素応答システムとのクロストークを通じて、細胞生物学、分子生物学、バイオインフォマティクスを統合した手法で明らかにする。

(1) CD73・CD39 の mRNA・蛋白質の発現と 5'-nucleotidase の活性について、IFN  $\beta$ -1a が CD73 mRNA を誘導する分子機構を明らかにする。

(2) 細胞間バリア機能について、血管透過性を蛍光物質 FITC-デキストラン(約 70 kD、アルブミンと同等の分子量)を用いて定量化する。単層細胞をコンフルエントまで培養し、細胞間接着によるバリアを形成させ、FITC-デキストランが透過できない状態を作る。様々な外部刺激により細胞間接着メカニズムが破壊された際、細胞間隙に隙間ができ、その結果、FITC-デキストランが下部のチャンバーに拡散するという原理を用いてバリア機能を測定する。

### 3. 研究の方法

(以下の研究手法を用いて研究を遂行した。)

#### (1)細胞

血管内皮細胞として、ヒトさい帯静脈内皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells:HUVEC)・ヒト肺微小血管内皮細胞(Human Pulmonary Microvascular Endothelial Cells:HPMEC)、肺胞上皮細胞の in vitro モデルとして A549 細胞株を用いた。

#### (2) CD73・CD39 分子の発現・酵素活性の制御機構の解明

CD73・CD39、HIF-1 分子発現を様々な手法で検出する  
HUVEC、HPMEC、A549 細胞に IFN  $\beta$ -1a、TNF- $\alpha$ 、LPS 処理を 20%酸素環境または 1%酸素環境で行い CD73 分子の発現を mRNA(qRT-PCR 法)、蛋白質レベル(特異抗体を用いた Western blot 法、フローサイトメトリ法、組織染色)で検出する。関連分子 CD39(ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1)の発現も同様に検討する。

#### アデノシン産生アッセイ

CD73、CD39 の活性を反映する 5'-Nucleosidase(5'-ヌクレオチダーゼ)活性測定とアデノシン産生アッセイを行う。キットが市販されているので用いる。

#### 次世代シーケンサを用いた RNA-seq 解析

得られた配列を元に各条件で発現比較解析を行い結果について遺伝子オントロジーエンリッチ解析を行い統計学的に発現変化量が有意なパスウェイ・遺伝子群を見いだす。

#### (3) 接着関連分子の発現変化の解明

タイトジャンクションを形成する蛋白質である Occludin、Claudin、ZO-1 の発現を検討する。予備的に行ったエンリッチ解析の結果から選択した分子については特に入念に発現量の検討を行う。

#### (4) 細胞間バリア機能への影響の解明

##### In vitro アッセイ

細胞間バリアを HUVEC, HPMEC, A549 細胞を用いて形成して IFN  $\gamma$ -1a やサイトカイン・培養酸素分圧がその機能に与える影響を検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) CD73・CD39 分子の発現・酵素活性

CD73・CD39 分子の発現と酵素活性について、HUVEC, HPMEC を IFN  $\gamma$ -1a で処理すると、24 時間の処理で最大 1000 U/ml の範囲で濃度および時間依存性に CD73 の mRNA と蛋白質の発現誘導が見られた。CD39 と A2BR の発現誘導も同時に確認できた。一方で、HIF-1 蛋白質の発現の変化は確認されなかった。

#### (2) アデノシン産生アッセイ

アデノシン産生アッセイでは、IFN  $\gamma$ -1a 刺激による細胞培養液中のアデノシン濃度の上昇が確認された。

#### (3) 次世代シーケンサを用いた RNA-seq 解析

次世代シーケンサを用いた RNA-seq 解析では、網羅的な遺伝子発現解析を行った結果、KEGG の Cell adhesion molecules (CAM) pathway が豊富に含まれており、IFN  $\gamma$ -1a が細胞間接着分子の遺伝子発現に大きく関与していることが示された。E-cadherin, ZO-1, Occludin, Claudin-5 については、RT-PCR 法による個別の mRNA 発現アッセイで、IFN  $\gamma$ -1a 処理による発現上昇が見られた。

#### (4) 接着関連分子の発現変化

接着関連分子の発現変化については、E-cadherin, ZO-1, Occludin, Claudin-5 の細胞内局在を免疫組織染色法で調べたところ、IFN  $\gamma$ -1a 処理によりこれらの接着分子の細胞内局在が変化し、細胞膜に集積することが明らかになった。

#### (5) 細胞間バリア機能の変化

細胞間バリア機能の変化に関しては、細胞間バリア機能をアッセイするシステムを構築し、IFN  $\gamma$ -1a が LPS 処理による細胞間バリアの透過性の亢進に拮抗し、細胞間バリアを強化することが明らかになった。この細胞間バリア強化は CD73 分子の発現に依存的であり、Ecto-5'-nucleotidase 活性阻害薬により部分的に拮抗された。一方、1% O<sub>2</sub> 環境への曝露や HIF-1 水酸化酵素阻害薬を用いた外因的な活性化は、単独で透過性を亢進することが判明した。

これらの実験により以下の結論が導かれた。

IFN  $\gamma$ -1a による CD73 の発現誘導と、細胞間接合タンパク質への影響を培養細胞を用いて調べた。内皮細胞において、IFN  $\gamma$ -1a は時間および用量に依存して CD73 の発現を増加させた。さらに、IFN  $\gamma$ -1a は細胞間透過性を低下させ、その保護効果が CD73 の活性と発現の両方によって介在されていることを明らかにした。また、IFN  $\gamma$ -1a は CD73 依存的に接合タンパク質の局在と細胞骨格のリモデリングを制御することも判明した。さらに、バリア機能維持に重要な細胞間接着タンパク質である E-カドヘリンを含む接合タンパク質の発現を IFN  $\gamma$ -1a が増加させることも確認された。アデノシンや CD73 活性阻害薬を用いた解析からは、IFN  $\gamma$ -1a によるバリア機能の保護効果がアデノシン非依存的な経路を通じている可能性が示された。

結論として、IFN  $\gamma$ -1a は CD73 依存的にジャンクションタンパク質の発現と局在を調節することで内皮細胞のバリア機能を向上させた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------