

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 25年 6月 1日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390298

研究課題名（和文）周術期における低酸素誘導性因子による酸素代謝制御の分子機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of molecular mechanism of perioperative oxygen metabolism regulation by hypoxia-inducible factors

研究代表者

広田 喜一（HIROTA KIICHI）

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：00283606

研究成果の概要（和文）：

酸素は生命の維持に必須の分子であるが一方その過剰や代謝異常は生体にとって有害である。周術期患者管理の最重要目的の一つに患者において酸素の需給バランスを”適切に”保つということが挙げられる。さまざまな要因で変化する周術期の酸素代謝の変動を転写因子低酸素誘導性因子 1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1) の活性化状態と関連づけて培養細胞、遺伝子改変実験小動物を用いて解析する実験系を確立して研究を行った。

研究成果の概要（英文）：

Oxygen is one of the most important vital molecules for almost all higher organism including human beings. In contrast, excessive oxygen is cytotoxic. A bottom line of the perioperative patient care is to maintain oxygen supply/demand within a narrow optimized range. Hypoxia-inducible factors (HIFs) play a central role in regulation of oxygen homeostasis. To investigate the dynamism of perioperative oxygen metabolism from the point of view of HIFs, we have established the experimental systems adopting cultured cells and experimental animals and obtained several experimental results.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,100,000円	2,130,000円	9,230,000円
2011年度	3,500,000円	1,050,000円	4,550,000円
2012年度	3,500,000円	1,050,000円	4,550,000円
年度			
年度			
総計	14,100,000円	4,230,000円	18,330,000円

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：薬理学, 麻酔薬, 低酸素応答, 細胞生物学, 分子生物学

1. 研究開始当初の背景

酸素は酸化的リン酸化における最終電子受容体であり、その不足つまり低酸素、無酸素状態への生体の応答の研究は歴史的に古く酸素の発見の直後から行われてきた。このような低酸

素研究の近代化は1995年に米国ジョンズホプキンス大学のGregg. L. Semenza博士(本研究課題の研究協力者)らによりなされた低酸素誘導性因子1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1) の遺伝子単離によりもたらされた。HIF-1は二量体

蛋白質で構成される転写因子であり各種解糖系酵素、グルコース輸送蛋白、血管内皮増殖因子、造血因子エリスロポイエチンなど、多くの遺伝子の発現を転写レベルで制御している。HIF-1は環境の酸素分圧低下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。明確な低酸素の指標である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。現在ではほぼ全ての細胞における低酸素誘導性遺伝子発現制御にHIF-1とその活性を制御する低酸素感知システムが重要な枠組みを提供していることが明らかになっている

麻酔薬をふくむ周術期使用薬剤の薬理作用の追究は麻酔科学研究のメインストリームの一つである。神経系への作用、呼吸・循環系への作用への研究はいままで大きな成果を挙げてきた。最近では細胞生物学・分子生物学を駆使して標的分子を明らかにする研究も行われてきている。

一方、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。

2. 研究の目的

HIF-1を介した遺伝子発現、糖代謝におけるエネルギー需給バランス、細胞の酸素代謝の三者の相互関係について培養細胞、臓器を用いて周術期使用薬剤の影響を検討し、よりよい周術期管理法の開発のための基礎的なデータを得ることが本研究課題の目的であった。

3. 研究の方法

本研究は、研究代表者 広田 喜一に研究分担者 京都大学大学院医学研究科 星野 勇馬を加えて

また所属の大学院生四名(大条 鉦樹、甲斐 慎一、松山 智紀、鈴木 堅悟)を研究協力者として加えて期間三年で遂行された。

さらに連携研究者として東京工業大学近藤 科江が研究に参画した。

4. 研究成果

酸素は生命の維持に必須の分子であるが一方その過剰や代謝異常は生体にとって有害である。周術期患者管理の最重要目的の一つに患者において酸素の需給バランスを”適切に”保つということが挙げられる。本研究の目的は、さまざまな要因で変化する周術期の酸素代謝の変動を低酸素誘導性因子 1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1)の活性化状態と関連づけて理解しよりよい周術期管理法の開発につなげていくことであった。

計画に沿って研究を行い期間中に以下の研究結果を得た。

(1) 硫化水素が細胞のミトコンドリアへの作用と低酸素応答に及ぼす影響についての検討

硫化水素ドナーNaHSは細胞の低酸素誘導性HIF-1の活性化をミトコンドリア、VHL依存的に阻害することを培養細胞、マウスを用いた検討により示した論文を公刊した。さらに硫化水素合成酵素を培養細胞に強制発現する系を立ち上げ内因性の硫化水素が低酸素応答に及ぼす作用について検討する実験系を構築した。マウスを用いた検討を受けさらに硫化水素合成酵素を培養細胞に強制発現する系を立ち上げまた合成酵素発現をsiRANを用いて破壊する実験系を用いて内因性の硫化水素が低酸素応答に及ぼす作用について検討する実験系を構築し実験結果を得た。

(2) マイクログリアの活性化における酸素代謝の役割の検討

中枢神経系の自然免疫を司るマイクログリアの活性化における酸素代謝、低酸素誘導性因子1の活性化を活性化マーカーの発現や貪食能との関

連で検討した。マイクログリアの活性化にともないHIF-1が活性化して酸素代謝が抑制されること、いくつかの活性化表面抗原のmRNAの発現にHIF-1が深く関わっていることを見いだした。

(3) タバコ抽出液が肺胞上皮機能に与える影響の検討

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を用いて、タバコによるHIF-1の活性調節について検討した。

今年度はその活性化機序の分子機構について解析を行い、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-1 α 蛋白質の細胞内安定化によるものというよりはHIF-1 α 蛋白質のmRNAからの翻訳過程を促進する機序でHIF-1 α 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。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した。

(4) PGE1によるHIF-1活性化の検討

血管由来の内皮細胞と平滑筋細胞を用い周術期使用薬剤の一つであるPGE1がEP1またはEP3受容体依存的にHIF-1 α の蛋白質の翻訳亢進を通じて転写因子HIF-1の活性化をもたらす事を見いだした。

(5) HIF-1活性化剤n-propyl gallate(nPG)による脳細胞保護の検討

nPGは常酸素環境下においてもHIF-1の活性化をもたらす小分子化合物である。nPGがラット脳梗塞モデルにおいて脳細胞保護作用を持つことを見いだした。

(6) 低酸素誘導性EPO発現誘導に対する麻酔薬の作用の検討

ラットを用いた低酸素血症モデルにおいて吸入麻酔薬イソフルレン、セボフレン、静脈麻酔薬プロポフォール、チオペンタール、ミダゾラム、ケタミ

ンが低酸素誘導性血中erythropoetin(EPO)誘導を阻害することを見いだした。この阻害は主に中枢神経のアストロサイトにおける転写因子HIF-2の活性化阻害に依存するものであ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 11 件)

- #1. Y. Zhu, T. Zhao, S. Itasaka, L. Zeng, C.J. Yeom, K. Hirota, K. Suzuki, A. Morinibu, K. Shinomiya, G. Ou, M. Yoshimura, M. Hiraoka, H. Harada, Involvement of decreased hypoxia-inducible factor 1 activity and resultant G(1)-S cell cycle transition in radioresistance of perinecrotic tumor cells, *Oncogene* 32 (2013) 2058 – 2068.(査読有り) doi: 10.1038/onc.2012.223.
- #2. Y. Liu, H. Higashitsuji, K. Itoh, T. Sakurai, K. Koike, K. Hirota, M. Fukumoto, J. Fujita, Overexpression of gankyrin in mouse hepatocytes induces hemangioma by suppressing factor inhibiting hypoxia-inducible factor-1 (FIH-1) and activating hypoxia-inducible factor-1, *Biochemical and biophysical research communications* 432 (2013) 22-27. (査読有り)10.1016/j.bbrc.2013.01.093
- #3. Y. Kawano, M. Kawaguchi, K. Hirota, S. Kai, N. Konishi, H. Furuya, Effects of n-propyl gallate on neuronal survival after forebrain ischemia in rats, *Resuscitation* 83 (2012) 249-252. (査読有り) 10.1016/j.resuscitation.2011.07.024
- #4. S. Kai, T. Tanaka, H. Daijo, H. Harada, S. Kishimoto, K. Suzuki, S. Takabuchi, K. Takenaga, K. Fukuda, K. Hirota, 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 (2012) 203-216. (査読有り)

10.1089/ars.2011.3882

#5. H. Harada, M. Inoue, S. Itasaka, K. Hirota, A. Morinibu, K. Shinomiya, L. Zeng, G. Ou, Y. Zhu, M. Yoshimura, W.G. McKenna, R.J.

Muschel, M. Hiraoka, Cancer cells that survive radiation therapy acquire HIF-1 activity and translocate towards tumour blood vessels, *Nature communications* 3 (2012) 783. (査読有り)doi: 10.1038/ncomms1786

#6 広田 喜一, 大条 敏樹, 甲斐 慎一, 鈴木 堅悟, 岸本 俊, 松山 智紀, 炎症の制御点としての低酸素誘導性因子, *麻酔* 60 (2011) S69-74. (査読なし)

#7 広田 喜一, 周術期医学としてのハイポキシア生物学の探究, *麻酔* 60 (2011) S183-S188. (査読なし)

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

#9. T. Kadonosono, T. Kuchimaru, S. Yamada, Y. Takahashi, A. Murakami, T. Tani, H. Watanabe, T. Tanaka, K. Hirota, M. Inoue, T. Tsukamoto, T. Toyoda, K. Urano, K. Machida, T. Eto, T. Ogura, H. Tsutsumi, M. Ito, M. Hiraoka, G. Kondoh, S. Kizaka-Kondoh, Detection of the onset of ischemia and carcinogenesis by hypoxia-inducible transcription factor-based in vivo bioluminescence imaging, *PLoS ONE* 6 (2011) e26640. (査読有り)

10.1371/journal.pone.0026640

#10. H. Daijo, S. Kai, T. Tanaka, T. Wakamatsu, S. Kishimoto, K. Suzuki, H. Harada, S. Takabuchi, T. Adachi, K. Fukuda, K. Hirota, Fentanyl activates hypoxia-inducible factor 1 in neuronal SH-SY5Y cells and mice under non-hypoxic conditions in a mu-opioid receptor-dependent manner, *Eur J Pharmacol* 667 (2011) 144-152. (査読有り)

10.1016/j.ejphar.2011.06.014

#11. T. Tanaka, T. Wakamatsu, H. Daijo, S. Oda, S. Kai, T. Adachi, S. Kizaka-Kondoh, K. Fukuda, K. Hirota, Persisting mild hypothermia suppresses hypoxia-inducible factor-1alpha protein synthesis and hypoxia-inducible factor-1-mediated gene expression, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298 (2010) R661-671. (査読有り)10.1152/ajpregu.00732.2009

[学会発表] (計 15 件)

#1 広田喜一 シンポジウム「低酸素応答が制御する多彩な生命現象」炎症・インフラマソームのレドックス制御とTXNIP/HIF-1システム 第85回日本生化学会大会 2012/12/14 福岡市

#2. 広田喜一 シンポジウム「低酸素研究の10年」hypoxia-inducible factorの20年と5つの未解決課題 第10回ガンとハイポキシア研究会 2012/12/06 横浜市

#3. 広田喜一、甲斐慎一 シンポジウム「生体ガスと臓器保護」硫化水素はミトコンドリア依存的に低酸素誘導性遺伝子応答を調節する 第16回医療ガス学会学術大会 2012/11/17 東京都

#4. 広田喜一 特別講演 ハイポキシア生物学ー酸素代謝から見る生命現象の方程式 第47回日本高気圧環境・潜水医学会学術総会 2012/11/16 札幌市

#5. Tomonori Matsuyama, Kiichi Hirota, Kengo Suzuki, Shinichi Kai, Kazuhiko Fukuda

Possible Involvement of Hypoxia-Inducible Factor 1 in Activation of Microglia and Subsequent Gene Expression Conferring Neuropathic Pain.

2012 Annual Meeting, American Society of Anesthesiologists 2012/10/15, Washington DC, USA

#6. 甲斐慎一、田中具治、松山智紀、大条紘樹、広田喜一、福田和彦 イソフルランは、急性貧血により誘導される血中エリスロポエチンの上昇を抑制する 日本麻酔科学会 第59回学術総会

2012/6/7, 福岡市

#7. 松山智紀、広田喜一、鈴木堅悟、甲斐慎一、大条紘樹、福田和彦 マイクログリアにおける活性化刺激の低酸素応答に及ぼす影響の検討日本麻酔科学会 第59回学術総会, 2012/6/7, 福岡市

#8. 広田喜一、大条紘樹、甲斐慎一、鈴木堅悟、岸本俊、松山智紀 招請講演 炎症の制御点としての低酸素誘導性因子 日本麻酔科学会 第58回学術集会 2011/05/20 神戸市

#9. 広田喜一 学会賞記念講演 周術期医学としてのハイポキシア生物学の探求 第58回 日本麻酔科学会学術集会 2011/05/19 神戸市

#10. 大条紘樹、鈴木堅固、岸本俊、甲斐慎一、広田喜一、福田和彦 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 日本麻酔科学会 第58回学術総会, 2011/5/19, 神戸市

#11. 甲斐慎一、田中具治、鈴木堅悟、大条紘樹、広田喜一、福田和彦 イソフルランは低酸素によるエリスロポエチンの上昇を抑制する 日本麻酔科学会 第58回学術総会, 2011/5/20, 神戸市

#12. 鈴木堅悟、広田喜一、大条紘樹、甲斐慎一、岸本俊、福田和彦 プロスタグランディンE1は HIF-1活性化、VEGF発現を介して血管透過性を亢進させる 日本麻酔科学会 第58回学術総会, 2011/5/20, 神戸市

#13. Kiichi Hirota, Tomoharu Tanaka, Shinichi Kai, Tomohiro Koyama, Hiroki Daijo, Kengo Suzuki, Takehiko Adachi, Kazuhiko Fukuda Isoflurane selectively inhibits the activation of

hypoxia-inducible factor 2 and the induction of erythropoietin under hypoxic conditions in mouse brain 2011 Annual Meeting, American Society of Anesthesiologists, 2011/10/16 Chicago USA

#14. 甲斐慎一、大条 紘樹、田中 具治、広田喜一、福田 和彦 硫化水素が低酸素誘導性遺伝子応答に及ぼす影響 日本麻酔科学会 第57回学術総会, 2010/6/4, 福岡市

#15. 田中 具治、広田喜一、大条 紘樹、甲斐慎一、小山 智弘、福田 和彦 全身麻酔下では、低酸素による脳内エリスロポエチン発現誘導が抑制される 日本麻酔科学会 第57回学術総会 2010/6/4 福岡市

[図書] (計 2 件)

#1 広田喜一, グルタミンリシス, in: 曾我 朋義, 江角浩安 (編), がん代謝 (実験医学 増刊), 羊土社, 東京, 2012.

#2 K. Hirota, Hypoxia and hypoxia-inducible factor in inflammation, in: S. Roy (Ed.), Chronic Inflammation: Molecular Pathophysiology, Nutritional and Therapeutic Interventions, Taylor & Francis, 2012, pp. 51-65.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

星野 勇馬 (HOSHINO YUMA)
京都大学・医学研究科・特任講師
研究者番号 : 00378746

(3) 連携研究者

近藤 科江 (KONDOH SHINAE)

東京工業大学・生命理工学研究科・教授

研究者番号：40314182