

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592336

研究課題名(和文)低酸素誘導性因子と周術期使用薬剤がマイクログリア活性化制御に果たす役割の探究

研究課題名(英文)An investigation on the role of HIF-1 in the regulation of microglia activity

## 研究代表者

高淵 聡史 (Takabuchi, Satoshi)

関西医科大学・医学部・研究員

研究者番号：90402841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系における自然免疫の担い手であるグリアとくにマイクログリアの活性化に着目して中枢神経の酸素環境を司る低酸素誘導性因子1(HIF-1)の活性化とその影響を培養細胞株、ラット個体を用いた検討で明らかにするため細胞生物学的、分子生物学的な手法を用いマイクログリアの活性化がHIF-1の活性化をもたらす事、またラットモデルにおいて神経絞扼が脊髄の低酸素をもたらすHIF-1の活性化を誘導する事、さらにHIF-1が神経因性疼痛関連の遺伝子発現を支配することの分子機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Microglia is a component equivalent to macrophage serving a critical innate immunity in the central nervous system (CNS). We demonstrate that in response to activation of the microglia cell line BV-2 cells, expression of both HIF-1a and HIF-1b; increases leading to enhanced expression of HIF-1 target genes. Moreover, we also demonstrated that spinal nerve ligation (SNL) in rats dysregulated the spinal oxygen homeostasis and that spinal hypoxia induced HIF-1 activation resulting in increase of mRNA expression of ATP receptors such P2X4 and P2Y7. Our results strongly suggest that increased activation of HIF-1 occurs in the CNS in response to spinal root ligation and that HIF-1 may play a critical role in the establishment of allodynia induced by SNL in which microglia activation is essential.

研究分野：麻酔科学

キーワード：マイクログリア 低酸素誘導性因子1 神経因性疼痛 酸素代謝 自然免疫

## 1. 研究開始当初の背景

このような炎症は中枢神経系(CNS)の微小環境と免疫担当細胞の相互作用により維持されていると考えられるがその詳細はいまだ詳らかではない。さまざまなグリアの中で私たちはマイクログリアに着目した。マイクログリアの発生学的な起源については今だ諸説が並立しているが多くの研究はマイクログリアは単球、マクロファージ、樹状細胞と共通の骨髄前駆細胞に由来していることを示唆している。このようにマイクログリアは、blood-brain barrier により身体の多部位から隔絶された中枢神経系において免疫機能を担っていると考えられている。つまり中枢神経系においてマクロファージと相同の役割を果たしている。炎症性サイトカインがマイクログリアの活性に重要な役割を果たしているという報告が相次いでいる。しかし一方、末梢での神経障害や炎症がいかなる分子機序でマイクログリアの活性化をもたらすかについての知見は未だ乏しく質・量ともに不十分である。

私たちは、今までマクロファージの活性化における酸素代謝の役割についての一連の報告をしてきた。単球がマクロファージに分化する過程において、エネルギー代謝経路の転換が起る。つまりマクロファージの活動の”場”が血液内から組織間質に移行することに対応して、ミトコンドリアでの電子伝達系を用いた ATP 産生経路から解糖系主体の産生機構へと転換しているが、このスイッチに転写因子である低酸素誘導性因子 1 (hypoxia-inducible factor 1, HIF-1) が必須の役割を担っていること、またこの活性化はさまざまな静脈麻酔薬による修飾されることを明らかにしてきた。低酸素状態に陥った臓器においては、炎症性サイトカイン、リポポリサッカライド受容体の一つである TLR-4 の発現誘導が観察され、これらは臓器機能の障害程度とよく相関する。またおびたしい

数の高山医学の成果は、肺泡低酸素が引き金となる肺水腫、高サイトカイン血症の発症の機序を明らかにしている。このように組織の酸素分圧の低下は炎症の進展に好都合な環境となる。

これら炎症反応で観察される低酸素-HIF-マクロファージの相互作用的な関係が、低酸素-HIF-マイクログリアでも観察されるのかまた周術期使用薬剤はこの連関をどう修飾するのかを検討することは、マイクログリアが術後認知機能障害(Postoperative Cognitive Dysfunction, POCD)、神経因性疼痛の成立に果たす役割の大きさを考えると興味深いと考えられた。

## 2. 研究の目的

中枢神経系における炎症の担い手であるグリアとくにマイクログリアの活性化に着目して CNS の酸素環境を司る低酸素誘導性因子 1(HIF-1)と周術期使用薬剤がマイクログリアの活性化に与える影響を申請者がいままで蓄積してきた骨髄由来のマクロファージ活性化機序のとの比較検討により培養細胞株、ラット個体を用いた検討で明らかにすることが本申請の目的であった。

## 3. 研究の方法

細胞生物学的、分子生物学的な手法を用いマイクログリアの活性化、神経因性疼痛関連の遺伝子発現の分子機構を明らかにするためマウス由来の樹立細胞株 BV-2 細胞とラットを用いた。

細胞を様々な活性化物質(LPS、PMA、ATP、ATRA)に処理により活性化して活性を各種マーカーで確認すると同時に活性化マイクログリアの表現型(形体の変化、マーカーの発現)を検討する。

活性化条件が確立すれば、HIF (HIF-1, HIF-2) の活性化を HIF 蛋白質発現量、HIF 支配下遺

伝子の発現量をリアルタイム RT-PCR 法を用いて検討する。HIF の阻害操作を細胞に加えマイクログリアの活性化の変化を検討する。すでに一連の検討が完了している中術期使用薬剤を用いて HIF の活性化，マイクログリアの活性化への影響を検討する。

マイクログリアの活性化の検討は、toll-like receptor, カンナビノイド受容体に加えてインテグリンなどの接着因子の細胞表面での発現、接着能、貪食能を指標にする。活性化因子としては、ATP、炎症性サイトカイン、レチノイン酸を用いる。単球-マクロファージの分化活性化との類似性を視野にいれて、ホルボールエステル(PMA)、活性化型ビタミン D を用いて検討する。本申請では特に、マクロファージの活性化に HIF-1 の活性化が必須であるという研究成果に基づいた仮説が脊髄マイクログリアにも当てはまるかの検討が主眼なので培養条件を通常の 20%酸素下で行うことに加え、5%、1%酸素分圧下でも行い、既知の活性化因子との相乗作用を検討した。マイクログリアの活性化の前後で、酸素消費量、代謝経路の変化を検討した。酸素消費量はクラーク電極を用いた機器を用いて行い、細胞内 ATP、lactate、pyruvate 含有を測定する。さらにグルコーストランスポーター、各種解糖系酵素の発現量をアッセイした。

神経因性疼痛関連の遺伝子発現の検討を行う。対象遺伝子として ATP 受容体サブタイプ P2X4、脳由来神経栄養因子 (Brain-Derived Neurotrophic Factor, BDNF) を特に選択した。対照として他の ATP の metabotropic and ionotropic 受容体を用いた。

#### 4. 研究成果

(1) マイクログリアの活性化にともなう HIF の活性化状況と中術期使用薬剤による修飾の可能性の検討

活性化刺激によりマイクログリアを活性化させ表面マーカー、サイトカイン・ケモカイン

の発現に加え代謝リプログラミングの有無など表現型の変化を確認した。

マウスマイクログリア由来の細胞株 BV-2 の活性化(LPS、PMA、ATP、ATRA)により CD14 などの活性化マーカーの発現を確認した。同時に HIF(HIF-1、HIF-2)の活性化状況をサブユニット HIF-1 $\alpha$ 、HIF-2 $\alpha$ 、HIF-1 $\beta$  蛋白質に対する特異抗体を用いて、さらに HIF により発現誘導をうけることが明らかになっている各種遺伝子(GLUT-1 (glucose transporter 1)、VEGF (vascular endothelial derived factor)、LDHA(actate dehydrogenase A)) の発現を RT-PCR 法によりアッセイした。

HIF-1 活性化の陽性対照として 1%酸素条件への暴露を用いた。

この結果、BV-2 細胞において活性化刺激に反応して 12 時間程度で HIF-1 $\alpha$  蛋白質の細胞内発現が誘導された。HIF-2 $\alpha$  蛋白質、HIF-1 $\beta$  蛋白質の有意な発現誘導は観察されなかった。同時に GLUT-1、VEGF、LDHA などの mRNA の発現誘導が観察された。

活性化の強さは 1%酸素分圧への暴露に比較して GLUT-1、VEGF、LDHA などの mRNA の発現では 50%程度であった。

単球-マクロファージで観察された現象がマイクログリアでも観察されるという当初の仮説を支持する結果が得られた。

(2) HIF の活性化がマイクログリアの機能に及ぼす影響の解明

HIF 活性化剤、HIF 阻害薬を用いて HIF 活性を人為的に操作しマイクログリアの表現型の変化を検討した。

HIF-1 活性化剤として DMOG (Dimethylloxaloylglycine)、NPG (n-propyl gallate)、CoCl<sub>2</sub>、DFX (Desferrioxamine) を用いた。HIF-1 活性化阻害薬として YC-1(3-(5'-hydroxymethyl-2'-furyl)-1-benzylindazole)を用いた。

マイクログリアにおいて炎症性サイトカインの発現や慢性疼痛の成立・維持に重要な役

割を果たしている

ATP 受容体 P2X 受容体 (P2X4), P2Y12 受容体などの神経因性疼痛関連遺伝子発現は、HIF-1 依存的に、20%酸素下においてそれぞれ LPS、PMA 刺激ならびに LSP、ATP 刺激により増加し、1%酸素下ではそれぞれさらに増加することを確認した。

(3) *In Vivo* モデルを用いた脳・脊髄内酸素代謝とマイクログリアの活性化の関心の解明

Sprague-Dawley ラット(雄, 200~250g)を用い、2%イソフルラン麻酔下に第 5 腰椎脊髄神経を 3-0 絹糸で結紮し Spinal Nerve ligation (SNL)モデルを作成した。Day3,5 に L4,5 が入射する脊髄を採取し、HIF-1 $\alpha$ 、その下流遺伝子である血管由来内皮細胞成長因子 (VEGF) マイクログリアに存在し神経因性疼痛に関連するプリン受容体 P2X4 の脊髄 L4 および L5 領域における mRNA 発現を RT-PCR を用いて検討した。マイクログリア活性化のピークと思われる day3 に、L5 領域で P2X4、HIF-1、VEGF の mRNA 発現が上昇していた。さらに障害側の脊髄領域の低酸素履歴をピモダゾールの還元状況を指標に検討したところ非障害側に比較して優位な還元が確認された。

神経因性疼痛モデル脊髄において P2X4 と HIF-1 の発現が同時期に上昇することが認められた。神経因性疼痛の成立に脊髄内 HIF-1 の上昇が関与する可能性がある結論付けられた。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 19 件)

Hirota K. Involvement of hypoxia-inducible factors in the dysregulation of oxygen homeostasis in sepsis. Cardiovascular & hematological disorders drug targets. 2015;15(1):29-40. doi: 10.2174/1871529X15666150108115553. (査読

有り)

Goto Y, Zeng L, Yeom CJ, Zhu Y, Morinibu A, Shinomiya K, Kobayashi M, Hirota K. Itasaka S, Yoshimura M, Tanimoto K, Torii M, Sowa T, Menju T, Sonobe M, Kakeya H, Toi M, Date H, Hammond EM, Hiraoka M, Harada H. UCHL1 provides diagnostic and antimetastatic strategies due to its deubiquitinating effect on HIF-1 $\alpha$ . Nature communications. 2015;6:6153. doi: 10.1038/ncomms7153. (査読有り)

広田喜一. 肺低酸素と炎症 -低酸素誘導性因子活性化の視点から-. 分子呼吸器病. 2014;18(1):73-5. (査読無し)

広田 喜一. 肺内酸素環境と肺疾患 -低酸素-HIF-炎症-. 呼吸器内科. 2014;25(2):270-5. (査読無し)

Zeng L, Morinibu A, Kobayashi M, Zhu Y, Wang X, Goto Y, Yeom CJ, Zhao T, Hirota K. Shinomiya K, Itasaka S, Yoshimura M, Guo G, Hammond EM, Hiraoka M, Harada H Aberrant IDH3 $\alpha$  expression promotes malignant tumor growth by inducing HIF-1-mediated metabolic reprogramming and angiogenesis. Oncogene. 2014. doi: 10.1038/nc.2014.411. (査読有り)

Miyatake S, Manabe Y, Inagaki A, Furuichi Y, Takagi M, Taoka M, Isobe T, Hirota K. Fujii NL Macrophage migration inhibitory factor diminishes muscle glucose transport induced by insulin and AICAR in a muscle type-dependent manner. Biochemical and biophysical research communications. 2014;444(4):496-501. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.01.089. (査読有り)

Kai S, Tanaka T, Matsuyama T, Suzuki K, Hirota K. The volatile anesthetic isoflurane differentially suppresses the induction of erythropoietin synthesis elicited by acute anemia and systemic hypoxemia in mice in an hypoxia-inducible factor-2-dependent manner. European journal of pharmacology. 2014;732C:43-9. doi:

10.1016/j.ejphar.2014.03.020. (査読有り)

Inada T, Hirota K, Shingu K. Intravenous anesthetic propofol suppresses prostaglandin E and cysteinyl leukotriene production and reduces edema formation in arachidonic acid-induced ear inflammation. *Journal of immunotoxicology*. 2014;1-5. doi: 10.3109/1547691X.2014.938874. (査読有り)

Hirota K. Hypoxia-inducible Factors Are Already "Active" in the Von Hippel-Lindau-deficient Renal Cell Carcinoma-4 Cells. *Anesthesiology*. 2014;120(6):1523. doi: 10.1097/ALN.0000000000000246. (査読有り)

広田喜一. 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. *Medical Gases*. 2013;15(1):25-7. (査読無し)

広田喜一. 疾患の病態生理学と低酸素誘導性因子. *細胞*. 2013;45(9):415-8. (査読無し)

Zhu Y, Zhao T, Itasaka S, Zeng L, Yeom CJ, Hirota K, Suzuki K, Morinibu A, Shinomiya K, Ou G, Yoshimura M, Hiraoka M, Harada H. Involvement of decreased hypoxia-inducible factor 1 activity and resultant G(1)-S cell cycle transition in radioresistance of perinecrotic tumor cells. *Oncogene*. 2013;32:2058 - 68. doi: 10.1038/onc.2012.223. (査読有り)

Tanaka T, Kai S, Matsuyama T, Adachi T, Fukuda K, Hirota K. General Anesthetics Inhibit LPS-Induced IL-1beta Expression in Glial Cells. *PloS one*. 2013;8(12):e82930. doi: 10.1371/journal.pone.0082930. (査読有り)

Suzuki K, Nishi K, Takabuchi S, Kai S, Matsuyama T, Kurosawa S, Adachi T, Maruyama T, Fukuda K, Hirota K. Differential roles of prostaglandin E-type receptors in activation of hypoxia-inducible factor 1 by prostaglandin E1 in vascular-derived cells under non-hypoxic conditions. *PeerJ*. 2013;1:e220. doi: 10.7717/peerj.220. (査読有り)

Liu Y, Higashitsuji H, Higashitsuji H, Itoh K,

Sakurai T, Koike K, Hirota K, Fukumoto M, Fujita J. 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*. 2013;432(1):22-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.01.093. (査読有り)

Kawano Y, Kawaguchi M, Hirota K, Kai S, Konishi N, Furuya H. Effects of n-propyl gallate on neuronal survival after forebrain ischemia in rats. *Resuscitation*. 2012;83(2):249-52. doi: 10.1016/j.resuscitation.2011.07.024. (査読有り)

Kai S, Tanaka T, Daijo H, Harada H, Kishimoto S, Suzuki K, Takabuchi S, Takenaga K, Fukuda K, Hirota K. Hydrogen sulfide inhibits hypoxia- but not anoxia-induced hypoxia-inducible factor 1 activation in a von hippel-lindau- and mitochondria-dependent manner. *Antioxid Redox Signal*. 2012;16(3):203-16. doi: 10.1089/ars.2011.3882. (査読有り)

Harada H, Inoue M, Itasaka S, Hirota K, Morinibu A, Shinomiya K, Zeng L, Ou G, Zhu Y, Yoshimura M, McKenna WG, Muschel RJ, Hiraoka M. Cancer cells that survive radiation therapy acquire HIF-1 activity and translocate towards tumour blood vessels. *Nature communications*. 2012;3:783. Epub 2012/04/19. doi: 10.1038/ncomms1786. (査読有り)

〔学会発表〕(計10件)

麻酔薬は敗血症時の視床下部における炎症性サイトカイン誘導を抑制する 田中具治, 広田喜一, 甲斐慎一, 松山智紀, 福田和彦  
日本麻酔科学会 第60回学術集会  
2013/5/24 ロイトン札幌(北海道・札幌市)

神経因性疼痛モデルラット脊髄における低酸素誘導性因子とその下流遺伝子の発現について 松山智紀, 佐々木美佳, 天谷文昌, 広

田喜一, 福田和彦

日本麻酔科学会 第 60 回学術集会

2013/5/24 ロイトン札幌(北海道・札幌市)

シンポジウム 急性肺損傷・肺循環障害の  
分子病態

低酸素と肺胞炎症 広田喜一

日本呼吸器学会 2013/04/21 東京国際フォー  
ラム(千代田区・東京都)

シンポジウム:IS12 低酸素応答が制御す  
る多彩な生命現象 -生理機能の解明から疾患  
に迫る-

『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』 広田喜一

第 85 回日本生化学会 2012/12/14 福岡国際  
会議場 (福岡県・福岡市)

「低酸素研究の 10 年」

hypoxia-inducible factor の 20 年と 5 つの未解  
決問題 広田喜一

第 10 回がんハイポキシア研究会

2012/12/06 横浜開港会館(神奈川県・横浜市)

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」 広田喜一

第 16 回日本医療ガス学会学術大会・総会

2012/11/17 東京ステーションコンファレンス  
(千代田区・東京都)

特別講演 1 「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」 広田喜一

第 47 回日本高気圧環境・潜水医学会学術集  
会 2012/11/06 北海道大学 学術交流会館  
(北海道・札幌市)

33rd Naito Conference

Oxygen Biology Hypoxia, Oxidative stress and  
Diseases

Kiichi Hirota

2012/06/28 Gateaux Kingdom (Hokkaido,  
Sapporo)

グリア細胞における LPS 刺激による  
IL-1beta 遺伝子の発現は、全身麻酔薬により

抑制される。

田中 具治, 広田 喜一, 甲斐 慎一, 松山 智  
紀, 福田 和彦

日本麻酔科学会 第 59 回学術集会 2012/ 6/8  
神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)

マイクログリアの活性化と酸素環境が低  
酸素誘導性遺伝子発現と神経因性疼痛関連  
遺伝子発現に与える影響

松山 智紀, 廣田 喜一, 鈴木 堅悟, 甲斐 慎  
一, 大条 紘樹, 福田 和彦

日本麻酔科学会 第 59 回学術集会 2012/ 6/7  
神戸ポートピアホテル(兵庫県・神戸市)

〔図書〕(計 1 件)

Hirota K. Hypoxia and hypoxia-inducible factor  
in inflammation. In: Roy S, editor. Chronic  
Inflammation: Molecular Pathophysiology,  
Nutritional and Therapeutic Interventions: Taylor  
& Francis; 2012. p. 51-65.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

高淵 聡史(TAKABUCHI, Satoshi)

関西医科大学・医学部・研究員

研究者番号：90402841

(2) 研究分担者

広田 喜一 (HIROTA, Kiichi)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00283606