

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462457

研究課題名(和文) 生体内酸素代謝がHIF-1を介して細胞間接着装置の機能調節に与える影響の探究

研究課題名(英文) Involvement of the transcription factor HIF-1 in the cell-to-cell adhesion system

研究代表者

西 憲一郎 (NISHI, Kenichiro)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：50340716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：生体内の血管内皮・上皮により構成されるさまざまなバリア機能が周術期に動的に変化する酸素代謝によりいかなる修飾を受けるかを低酸素応答のマスター転写因子低酸素誘導性因子1(hypoxia-inducible factor 1)の活性化との関連でタイトジャンクションを構成する接着分子に着目して解析した。ENaC, Na⁺-K⁺-ATPase, AQP5に加えタイトジャンクションの構成蛋白質、HMGB1, RAGEの発現が半定量的RT-PCR法を用いた検出実験系、転写因子HIF-1・NF-κB活性化の解析法を確立して低酸素環境ではHIF-1の活性化に依存した発現上昇が観察されることを確認した。

研究成果の概要(英文)：The respiratory epithelium forms an important barrier against inhaled pollutants and microorganisms, and its barrier function is often compromised during hypoxic insults. Epithelial activation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) represents one feature of airway inflammation, but the functional importance of HIF-1 within the respiratory epithelium is largely unknown. We evaluated the impact of HIF-1 activation on loss of epithelial barrier function during hypoxic insults. Using several types of cell lines, we confirmed that expression of various adhesion molecules were modulated under hypoxic conditions in an HIF-1-dependent manner and that a critical involvement of HIF-1 in dysregulation of epithelial barrier function during hypoxic and inflammatory insults.

研究分野：麻酔科学

キーワード：周術期管理 低酸素 炎症 HIF-1 細胞間バリア

1. 研究開始当初の背景

さまざまな病態の患者の周術期管理中に肺水腫，腸管浮腫，脳浮腫などの合併症が生じる。これらは体液の血管から組織間質への移動により生じる病態である。

脳，肺胞上皮，腸管上にはそれぞれ臓器の機能と密接にむすびついた特有の関門，ジャンクションが存在して血管内と組織間隙との間のバリアとなっている。中枢神経の血液脳関門，肺胞の血液空気関門，腸管の消化管バリアと呼ばれて従来からの研究対象となってきた。

これらのバリアの本体は上皮を形成する細胞同士のまたは細胞と細胞外マトリックスで存在する様々な接着分子で構成されるそれぞれそれぞれ密着結合(tight junction) 接着結合(adherence junction)と呼ばれる接着装置である。

こうした毛細血管内皮細胞の機能はリンパ球やマクロファージや神経膠細胞から放出されるサイトカインによってコントロールされ得る。このため、例えば、脳炎や髄膜炎のときは血液脳関門の機能は低下する事がすでに知られている。つまりこれらのバリア機能は生体内に惹起された炎症に強く影響されることが知られている。

一方生体内の酸素代謝と炎症反応の関連が近年研究者の興味を集めていて酸素代謝の破綻と炎症反応の進展との強い関連についての知見が蓄積されてきているが両者を結ぶ分子基盤への探究は未だ不十分である。また生体内の局所酸素代謝バランスの観点から周術期の患者の生体内で発生している生体内バリア機能を概観するという視点は従来なかった。

2. 研究の目的

生体内の血管内皮・上皮により構成されるさまざまなバリア機能が周術期に動的に変化する酸素代謝によりいかなる修飾を受ける

かを低酸素応答のマスター転写因子低酸素誘導性因子 1 (hypoxia-inducible factor 1)の活性化との関連でタイトジャンクションを構成する接着分子に着目して解析し、さらに分子生物学・細胞生物学的に理解してよりよい周術期管理につなげていくことが本課題の目的であった。

内皮細胞，細胞外マトリックスと支持細胞で構成される生体内バリア機能がそれを取り巻く酸素環境とそれに関連した炎症反応によりどのように修飾されるのかについて以下の具体的な3項目に沿ってあきらかにする計画を策定した。

(1) 血液脳関門，肺胞，血管内皮，腎臓のバリア機能を評価する実験系を培養細胞を用いてまた実験小動物で構築する。-樹立細胞株，初代培養細胞を適宜用いて定法に基づいてバリアを構築する。実験小動物を用いた検討では特に肺胞上皮バリア機能の検討に特化した解析を行う。

(2) 実験系を用いて酸素分圧を含む局所酸素代謝とそれにより活性化される HIF-1 がバリア機能に与える影響を検討する。-実験系をさまざまな酸素分圧の気体に暴露してバリア機能の変化を観察する。この際、常酸素分圧下で HIF-1 の活性剤または阻害剤を用いてこの変化における HIF-1 の関与についての情報を得る。

(3) 背景に存在する接着分子の機能に着目して分子生物学的に検討して背景に存在する分子機序を探る。-実験計画で詳述する接着分子，血管新生に関わる諸因子の発現について検討する。これらの検討結果により HIF-1 を介しての生体内バリア機能の調節機構を解明する。

3. 研究の方法

分子生物学的な手法と細胞生物学的な手法で分子動態を検討した。

検討した細胞、分子は以下に表で示した。

表1 細胞リスト

ヒト臍帯静脈内皮細胞
肺動脈内皮細胞
MDCK細胞(腎上皮株)
Caco2細胞(腸上皮株)
A549細胞(肺胞上皮株)
アストロサイト
THP1細胞(マクロファージ株)
BV2(マイクログリア株)

表2 解析対象分子

	PCR	Western Blot	組織染色	ELISA
HIF-1a	○	○	○	
VEGF	○			○
GLUT-1	○			
Angiostatin 1, 2	○			○
PLGF	○			○
Claudin family	○	○	○	
Occudin family	○	○	○	
ZO-1, 2	○	○	○	
VE-cadherin	○	○	○	

4 . 研究成果

本課題の目的にそって研究を遂行して以下の研究成果を得た。

(1) 培養細胞を用いた実験系に置いて肺胞上皮を含む上皮系の細胞において水分輸送、タイトジャンクション機能関連の蛋白質の発現に対して培養環境の酸素分圧が及ぼす影響の検討 - ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞由来の樹立細胞株 A549 細胞を用いて

ENaC, Na⁺-K⁺-ATPase, Aquaporin とくに AQP5 に加えタイトジャンクションの構成蛋白質(Occudin, Claudin, ZO-1 のサブタイプ)、HMGB1, RAGE の発現の半定量的 RT-PCR 法を用いた検出実験系、転写因子 HIF-1・NF-kB 活性化の解析法を確立して低酸素環境では HIF-1 の活性化に依存した発現上昇が観察されることを確認した。

(2) 細胞を用いて再構成したバリアを用いた検討 -バリア機能の評価を経上皮電気抵抗 (transepithelial electric resistance: TER)測定、蛍光物質 FITC と結合したデキストラン (FITC-dextran) , またはアルブミン (FITC-albumin)の透過性を測定することにより行った。初年度に樹立に失敗した実験系であったが腸管上皮 Caco2 細胞を用いた細胞バリアの構築に成功した。低酸素暴露、または薬理的 HIF-1 活性化がバリア機能を抑制する事が示された。

(3) *In vivo* 実験系 -再拡張性肺水腫を再現する実験系の樹立に至らなかった。ラットでの片肺換気モデル(肺胞虚脱モデル)の構築 ラットに気管挿管して片肺換気モデル(肺胞虚脱モデル)の構築には成功したが確実に肺水腫を作出には至らなかった。

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 19 件)

広田 喜一. 硫化水素による低酸素シグナル修飾. : 編集 平家俊男, 淀井淳司, レドックス UPDATE -ストレス制御の臨床医学・健康医学: 医歯薬出版; 2015. p. 112-7. (査読有り)

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 IDH3alpha expression promotes malignant tumor growth by inducing HIF-1-mediated metabolic reprogramming and angiogenesis. *Oncogene*. 2015;34:4758-66. doi: 10.1038/onc.2014.411 (査読有り)

Yamaguchi R, Perkins G, Hirota K. Targeting cholesterol with beta-cyclodextrin sensitizes cancer cells for apoptosis. *FEBS Lett*. 2015;589:4097-105. doi: 10.1016/j.febslet.2015.11.009 (査読有り)

Suzuki K, Sato Y, Kai S, Nishi K, Adachi T, Matsuo Y, Hirota K. Volatile anesthetics suppress glucose-stimulated insulin secretion in MIN6 cells by inhibiting glucose-induced activation of hypoxia-inducible factor 1. *PeerJ*. 2015;3:e1498. doi: 10.7717/peerj.1498 (査読有り)

Hirota K. Involvement of hypoxia-inducible factors in the dysregulation of oxygen homeostasis in sepsis. *Cardiovascular & hematological disorders drug targets*. 2015;15:29-40. 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-1alpha. Nature communications. 2015;6:6153. doi: 10.1038/ncomms7153. (査読有り)

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 IDH3alpha expression promotes malignant tumor growth by inducing HIF-1-mediated metabolic reprogramming and angiogenesis. Oncogene. 2015;34:4754-4761. doi: 10.1038/onc.2014.411. (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. 2015;12:261-5. doi: 10.3109/1547691X.2014.938874. (査読有り)

広田喜一. 肺胞低酸素と炎症 -低酸素誘導性因子活性化の視点から-. 分子呼吸器病. 2014;18:73-5. (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;25:270-5. (査読無し)

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;444:496-501. 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)

Hirota K. Hypoxia-inducible Factors Are Already "Active" in the Von Hippel-Lindau-deficient Renal Cell Carcinoma-4 Cells. Anesthesiology. 2014;120:1523. 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)

〔学会発表〕(計 12 件)

揮発性吸入麻酔薬は転写因子HIF-1依存的に膵細胞のグルコース刺激誘導性インスリン分泌を阻害する
鈴木堅悟, 広田喜一, 甲斐慎一, 西憲一郎
日本麻酔科学会63回学術集会 2016/05/28 福岡国際会議場(福岡市)

UCHL1はHIF-1 の脱ユビキチン化を介してがんの遠隔転移を亢進する
後藤 容子、小林 稔、広田 喜一、谷本 圭司、平岡 真寛、原田 浩
(第38回 日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会) 2015/12/01 神戸国際会議場(神戸市)

データベース生物学をめぐる個人的な体験

広田 喜一
第38回 日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会 2015/12/03 神戸国際会議場(神戸市)

田中 宏昌、広田喜一 静脈麻酔薬プロポフォールはミトコン ドリア電子伝達を阻害して細胞 ATP 産 生を抑制する
第13回がんとハイポキシア研究会 2015年6月6日 国立遺伝学研究所(三島市)

テプレノン[®]は神経由来細胞株SH-SY5Yにおいてリドカインが誘導するアポトーシスを減少させる

岡本 明久, 西 憲一郎, 広田 喜一, 新宮 興
日本麻酔科学会62回学術集会 2015/05/29 パシフィコ横浜(横浜市)

HIF-1活性化はミトコンドリア電子伝達系の阻害してリドカインの細胞障害を軽減する
岡本 明久, 西 憲一郎, 広田 喜一, 新宮 興
日本麻酔科学会62回学術集会 2015/05/29 パシフィコ横浜(横浜市)

イソフルランはグルコース刺激による細胞内低酸素依存性のHIF-1の活性化を抑制することで膵細胞のglucose-stimulated insulin secretionを抑制する

鈴木 堅悟、広田 喜一
日本麻酔科学会62回学術集会 2015/05/29 パシフィコ横浜(横浜市)

後藤 容子、小林 稔、広田 喜一、谷本 圭司、平岡 真寛、原田 浩
Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 (UCHL1) provides novel diagnostic and antimetastatic strategies due to its deubiquitinating effect on HIF-1

第12回がんとハイポキシア研究会 2014 11/22 ホテルマリタール創世佐賀(佐賀市)

初代培養アストロサイトにおける低酸素下エリスロポエチン誘導への鎮静薬の影響
The effect of sedating drugs on the erythropoietin induction under hypoxic conditions in the primary cultured astrocytes

松山 智紀 , 田中 具治, 広田 喜一, 福田 和彦

日本麻酔科学会 61 回学術集会 2014/5/16 パ

シフィコ横浜(横浜市)

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(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(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(東京都)

〔図書〕(計 0件)

〔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

西 憲一郎(NISHI, Kenichiro)

関西医科大学 医学部 講師

研究者番号: 50340716

(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