

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460875

研究課題名(和文) 高濃度酸素曝露肺傷害に於けるc-Mycシグナル伝達系の解析

研究課題名(英文) c-Myc signaling networks of diffuse alveolar damage (DAD) induced by oxygen poisoning

研究代表者

島田 一郎 (Shimada, Ichiroh)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：20272908

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)：マウス肺 および 線維芽細胞様細胞株 NIH/3T3 に於いて、高濃度酸素曝露により c-Myc 遺伝子の発現亢進を認め、マウス肺 および 肺腺癌細胞株 A549 に於いて、高濃度酸素曝露により Bax 遺伝子の発現亢進を認めた。

人工呼吸器管理時などの高濃度酸素曝露状態では、肺に於いて活性酸素種が発生する。その結果、線維芽細胞では c-Myc signal 経路の活性化と apoptosis 誘導が生じ、肺胞上細胞では intrinsic apoptosis signal 経路の活性化が生じることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Hyperoxia induced a decrease in SP-C/A expression in mouse lungs, and the SP-C downregulation was also confirmed in A549 cells. In addition to enhanced c-Myc expression, Bax expression also increased following mouse exposure to hyperoxia. In vitro analysis showed that expression of these genes was regulated in a cell-type-dependent manner, i.e., upregulation of c-Myc in NIH/3T3 cells and Bax in A549 cells occurred regardless of whether there was a similar decrease in cell viability and increase in caspase-3/7 activation in response to hyperoxia. ROS production and caspase-8 activation were also detected in both cells.

We concluded that hyperoxia induces ROS production and cell death in lung tissues through a cell-type specific mechanism involving upregulation of c-Myc/Bax, and caspase-8 and -3/7 activation-dependent pathways, thereby leading to the development of diffuse alveolar damage (DAD).

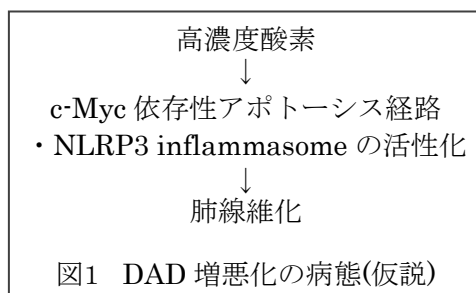
研究分野：法医病理学

キーワード：高濃度酸素曝露 瀰漫性肺胞傷害 c-Myc Bax 肺サーファクタント蛋白 カスパーゼ 活性酸素種 アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは酸素中毒に基因する瀰漫性肺胞傷害 (DAD) の発症機構を研究し、高濃度酸素曝露マウスの肺には肺硝子膜が形成され、c-Myc が高発現し、アポトーシスが進行することを報告した。更に、高濃度酸素曝露マクロファージでは、アポトーシスに伴い c-Myc が高発現することを見出した。

本申請研究で図1の仮説を検証し、高濃度酸素に基因するマクロファージの分子・免疫学的変化が肺線維化進展にかかわっている可能性について明らかにしようとした。



## 2. 研究の目的

人工呼吸器管理時のルートの繋ぎ間違え事例等の司法解剖に於いて、事件後に施された高濃度酸素を用いた人工呼吸器管理が、瀰漫性肺胞傷害 (Diffuse alveolar damage : DAD) の発症に関与していた可能性が存在した。

DAD 終末期には、不可逆性変化が出現して低酸素血症が増悪するが、この進行性の低酸素血症に対して高濃度の酸素が投与されると、更に肺胞傷害が増悪し、肺線維症に進展する場合がある。DAD の予後の改善のためにも、種々の原因で発症する DAD の病態解明は、法医病理学・救急医学に於いて、喫緊の課題である。

研究代表者らはこれまでに、酸素濃度 100% に曝露されたマウスは肺硝子膜を形成し、5日間前後で DAD により死亡することを明らかにした (図2)。

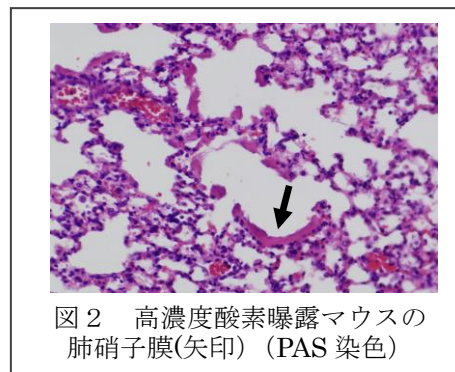
また、肺組織の分子生物学的解析により以下のことを明らかにした (Int J Legal Med 2008; 122:373-83、基盤(C)平成 17-18 年:17590574; 同平成 22-2 年:22590630)。マウスを酸素濃度 100% の密閉箱内に於いて 3 日間飼育すると、肺組織でアポトーシスが進行し、Galectin-3 と c-Myc (図3) の発現が増加した。mRNA 発現解析で

は、急性期においては、CCN Family の CYR61 および CTGF の有意な増加が認められ、血管新生等の器質化過程の進展が示唆された。また、肺サーファクタント蛋白

(SP-A/C)、シトクロム (CYP2F2)、細胞間接着装置を構成する CLDN1、ZO-1 等は有意に減少し、肺胞虚脱への進展が示唆された。更に、Lysozyme の有意な減少により免疫機能の破綻が示唆された。

抗アポトーシス作用を有する Galectin-3 は、最近では、危険シグナルに反応して活性酸素を発生させると共に IL-1 $\beta$  の産生を増強し、創傷治癒においては再生上皮細胞や毛細血管の形成促進にかかわることが報告されている。一方 c-Myc は、細胞増殖や腫瘍化のみでなく、アポトーシスをも引き起こす。研究代表者らは、最近、高濃度酸素曝露マクロファージではアポトーシスに伴い c-Myc が高発現することを見出した (未発表)。マクロファージは、DAD の発症に強くかかわる細胞である。これらのことにより、高濃度酸素曝露肺では、c-Myc により形成される noncanonical な経路を介してアポトーシスが誘導されると推定した。また、最近、NLRP3 inflammasome が活性化されて IL-1 $\beta$  を成熟させるとの報告が複数なされたことから、酸化ストレスによる NLRP3 inflammasome の活性化が肺線維化への進展要因となっている可能性を考えた。

本申請研究では、高濃度酸素により誘導される c-Myc シグナル伝達系と NLRP3 inflammasome の活性化をマクロファージ (in vitro) について解析し、マウス (in vivo) での検証を経て、マクロファージの分子・免疫学的変化の肺線維化進展への関与の有無を明らかにしようとした。



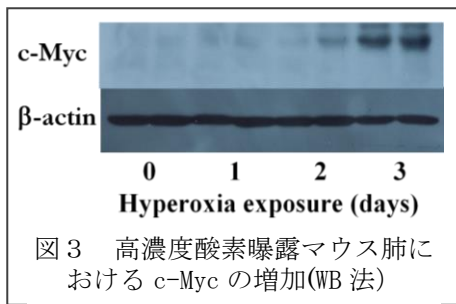


図3 高濃度酸素曝露マウス肺における c-Myc の増加(WB 法)

### 3. 研究の方法

#### (1) マクロファージを用いた in vitro の実験

HL60 細胞を PMA で分化させてマクロファージ化し、この細胞を用いて、高濃度酸素が c-Myc 依存性のアポトーシスを誘導することを明らかにする。また、c-Myc 標的分子を同定する。

- ①HL60 細胞を PMA でマクロファージに分化させる(図4：自験データ)。
- ②①の細胞に、平成 22-24 年度基盤研究 (C) (22590630) にて購入した装置(図5)を用いて種々濃度の酸素を曝露し、

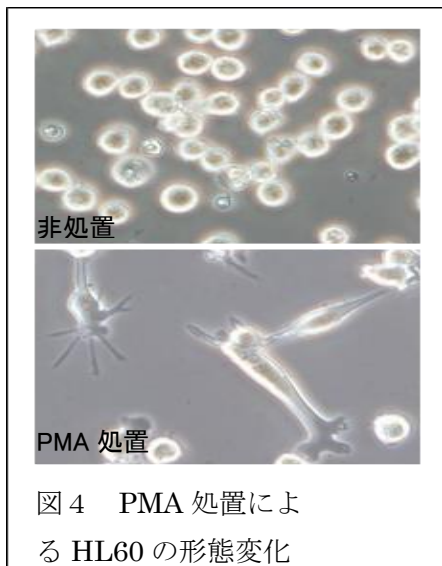


図4 PMA 処置による HL60 の形態変化

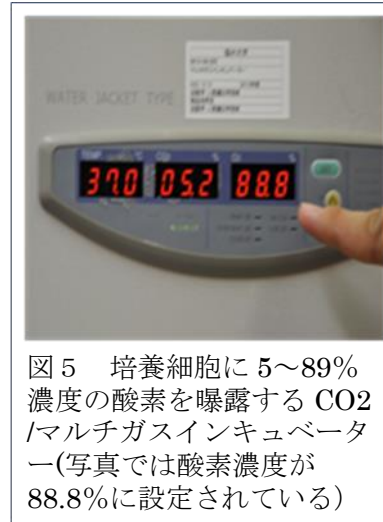


図5 培養細胞に 5~89% 濃度の酸素を曝露する CO<sub>2</sub>/マルチガスインキュベーター(写真では酸素濃度が 88.8%に設定されている)

アポトーシスレベル (Annexin V 法) と c-Myc レベル (Real-time qPCR 法、WB 法) の経時的変化を調べ、高濃度酸素によるアポトーシスの誘導が c-Myc レベルに依存していることを明らかにする (HL60 由来マクロファージは、高濃度酸素曝露により c-Myc を高発現する：自験データ)。

- ③マイクロアレイ法を用い、高濃度酸素曝露により c-Myc と共に発現レベルが変動する遺伝子を解析・抽出する。
- ④③で抽出された遺伝子のうち、転写産物が高濃度酸素曝露により増加するものを抽出する。この分子について、免疫薬理学的手法・遺伝子操作により機能を阻害または抑制し、高濃度酸素曝露によるアポトーシスの変化を指標に、c-Myc 標的分子を同定する。

#### (2) マウスを用いた in vivo の実験

高濃度酸素が c-Myc 依存性のアポトーシス経路を活性化し、生成された mtROS により NLRP3 inflammasome が活性化されることを予想している。この機序が酸素中毒肺の線維化への進展にかかわっている可能性についてマウスを用いて検証する。

酸素濃度調整器付き密閉箱(図6)で高濃度酸素を曝露したマウス、線維化を誘導することが知られているパラコート投与マウス、c-Myc を高発現する肺癌マウスを用意する。マウスは 8 週齢の C57BL/6J を用いる。これらのマウスを、pentobarbital sodium (75mg/kg) の腹腔内投与による麻酔下で全身を生食灌流した後、肺組織を摘出する。



#### 4. 研究成果

##### 研究成果 (和文)

- (1) 高濃度酸素曝露に基づき、両細胞 (NIH/3T3 および A549) に於いて細胞増殖が停止した。低酸素濃度では、細胞増殖は停止しなかった。
- (2) マウス肺 および 線維芽細胞様細胞株 NIH/3T3 に於いて、高濃度酸素曝露により c-Myc 遺伝子の発現亢進を認めた。低酸素濃度では、c-Myc 遺伝子は変化しなかった。
- (3) マウス肺 および 肺胞上皮が癌化したヒト肺腺癌細胞株 A549 に於いて、高濃度酸素曝露により Bax 遺伝子の発現亢進を認めた。低酸素濃度では、Bax 遺伝子は変化しなかった。
- (4) 両細胞に於いて、高濃度酸素曝露により、過酸化水素の生成増大、Caspase-3/7 活性の亢進、apoptosis 誘導を認めた。
- (5) マウス肺 および ヒト肺腺癌細胞株 A549 に於いて、高濃度酸素曝露により Surfactant-associated protein (SP)-C の発現抑制を認めた。尚、マウス肺では

SP-A および SP-C の mRNA 発現が抑制されていた。

- (6) 人工呼吸器管理時などの高濃度酸素曝露状態では、肺に於いて活性酸素種が発生する。その結果、線維芽細胞では c-Myc signal 経路の活性化と apoptosis 誘導が生じ、肺胞上皮細胞では intrinsic apoptosis signal 経路の活性化が生じることが示唆される。以上に基づく細胞・組織の破綻から生じた DAD、更に、SP-A および SP-C の発現抑制から、高濃度酸素曝露に基づく呼吸障害が生じることが示唆される。
- (7) HL60 細胞を PMA で分化させてマクロファージ化し、この細胞を用いて、高濃度酸素曝露時のシグナル伝達を調べた。c-Myc 遺伝子の mRNA 発現は、有意に誘導されていた。

##### 研究成果 (英文)

Background: Hyperoxia is a known cause of diffuse alveolar damage (DAD). We previously reported the transcript profiling of DAD induced by hyperoxia exposure in mouse lungs, and showed that the gene expression of myelocytomatosis oncogene (c-Myc) was significantly upregulated, whereas that of surfactant-associated protein (SP)-C was downregulated. However, the mechanism underlying hyperoxia-induced DAD remains unclear.

Methods: The hyperoxia-induced changes in SP-A/B/C/D, c-Myc, B-cell chronic lymphocytic leukemia/lymphoma (Bcl)-2, and Bcl-2-associated X protein (Bax) expression in mouse lungs was examined by cDNA microarray analysis. The expression levels, cell viability, caspase activity,

and reactive oxygen species (ROS) production were also examined in the human lung adenocarcinoma cell line A549 and mouse fibroblast-like cell line NIH/3T3. Results: Hyperoxia induced a decrease in SP-C/A expression in mouse lungs, and the SP-C downregulation was also confirmed in A549 cells. In addition to enhanced c-Myc expression, Bax expression also increased following mouse exposure to hyperoxia. In vitro analysis showed that expression of these genes was regulated in a cell-type-dependent manner, i. e., upregulation of c-Myc in NIH/3T3 cells and Bax in A549 cells occurred regardless of whether there was a similar decrease in cell viability and increase in caspase-3/7 activation in response to hyperoxia. ROS production and caspase-8 activation were also detected in both cells. Conclusions: We concluded that hyperoxia induces ROS production and cell death in lung tissues through a cell-type specific mechanism involving upregulation of c-Myc/Bax, and caspase-8 and -3/7 activation-dependent pathways, thereby leading to the development of DAD.

#### 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1件)

Shimada I, Kubota A, Katoh M, Suzuki F. Hyperoxia causes diffuse alveolar damage through mechanisms involving upregulation of c-Myc/Bax and enhanced production of reactive oxygen species. Res Inv 2016;54:59-68 (査読有)

[学会発表] (計4件)

島田一郎、鈴木史子、坪田悦子、久保田あゆみ

酸素濃度変化 に於ける 肺の病態

第100次日本法医学会学術全国集会

2016年6月15日～17日 きゅりあん (品川区立総合区民会館) (東京都品川区)

島田一郎、鈴木史子

マウス線維芽細胞様細胞株: NIH/3T3 およびヒト肺腺癌細胞株: A549 における、高濃度酸素曝露時の病態生理

第99次日本法医学会学術全国集会

2015年6月10日～12日 高知市文化プラザかるぼーと (高知県高知市)

島田一郎、鈴木史子、坪田悦子

高濃度酸素曝露肺傷害における、c-Myc シグナル伝達系の解析

第36回日本法医学会学術中部地方集会

2014年10月18日 藤田保健衛生大学医学部1号館500人ホール (愛知県豊明市)

Ichiroh Shimada, Fumiko Suzuki

Signaling networks of diffuse alveolar damage (DAD) induced by oxygen poisoning  
第9回国際法医学シンポジウム

International Symposium on Advances in Legal Medicine

2014年6月16日～20日 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://houi.med.lab.u-fukui.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

島田 一郎 (SHIMADA ICHIROH)

福井大学・学術研究院医学系部門・教授

研究者番号：20272908

### (2) 研究分担者

鈴木 史子 (SUZUKI FUMIKO)

福井大学・学術研究院医学系部門・特命助教

研究者番号：80291376

伊保 澄子 (IHO SUMIKO)

新潟大学・医歯学統合研究科・客員研究員

研究者番号：80151653

三好 憲雄 (MIYOSHI NORIO)

福井大学・遠赤外領域開発研究センター・客員教授

研究者番号：40209961

(3) 連携研究者

(0)

研究者番号：

(4) 研究協力者

(0)