

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462368

研究課題名(和文) 虚血再灌流障害に対するプレコンディショニングの機序解明と薬物治療にむけた基盤研究

研究課題名(英文) A basic research to elucidate the mechanism of preconditioning against ischemia-reperfusion injury and its therapy

研究代表者

倉橋 清泰 (Kurahashi, Kiyoyasu)

国際医療福祉大学・大学病院・教授

研究者番号：50234539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)： 生体において虚血と低酸素は表裏一体をなす。低酸素の組織において hypoxia-inducible factor (HIF)-1が発現し、これが抗炎症作用を持つことが明らかとなっている。低酸素症の要因となる急性呼吸窮迫症候群(ARDS)ではFas/FasL系を介したアポトーシスが重要である。PHD阻害薬である DMOGを投与するとFasが抑制され、FasLによるアポトーシスが減少し、肺胞バリア機能が保たれる。siRNAなどによりHIF-1経路を阻害するとDMOGの抗アポトーシス効果およびFas抑制作用が見られなかったことから、DMOGの抗アポトーシス作用はHIF-1依存的であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： Ischemia occurs in accordance with hypoxia. It is well known that hypoxia-inducible factor (HIF)-1 expresses in hypoxic tissue and has an anti-inflammatory property. Acute respiratory distress syndrome (ARDS), a major cause of hypoxia, causes apoptosis through Fas/FasL pathway. Dimethyloxalylglycine (DMOG), a prolyl hydroxylase domain protein (PHD) inhibitor, suppresses Fas and thus diminishes apoptosis, which preserves the alveolar barrier function. Anti-apoptotic effects of DMOG and the suppression of Fas effects were not observed when HIF-1 pathway was inhibited by some ways such as siRNA. These findings suggest that anti-apoptotic effects of DMOG are dependent of HIF-1.

研究分野：肺傷害

キーワード：ARDS 再灌流傷害 HIF 低酸素 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

虚血再灌流障害 (IRI) を、先行するごく短時間の虚血 (PC) が臓器保護になることが各種臓器で確かめられている。申請者は先行研究において、低酸素の組織において hypoxia-inducible factor (HIF) -1 が発現し、この HIF-1 が抗炎症作用を持つことを明らかにした。

2. 研究の目的

低酸素症の重大な要因となる急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) は Fas/FasL 系を介した系が重要である。HIF-1 の発現レベルを調整することにより、ARDS の炎症あるいは組織障害を軽減できるかを調べる。

3. 研究の方法

プロリル水酸化酵素 (prolyl hydroxylase domain proteins, PHDs) を阻害すると HIF-1 は活性化する (図 1)。FasL 誘導性の肺胞上皮細胞のアポトーシスの系に置いて PHD 阻害薬である dimethyloxalylglycine (DMOG) の効果を検証した。

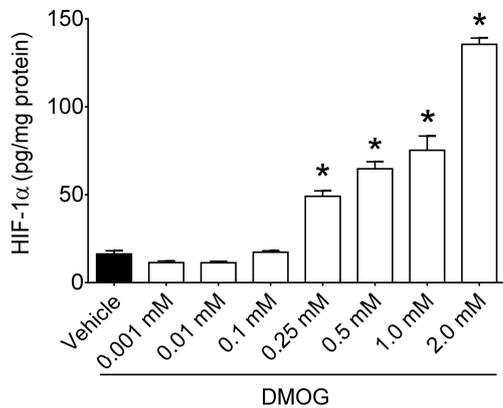


図 1. DMOG の HIF-1 タンパク増加効果  
MLE-12 細胞に 様々な濃度の DMOG を 24 時間作用させ、細胞溶解液中の HIF-1 タンパクを ELISA で定量した。  
\*:  $P < 0.05$  (vs Vehicle)

*in vitro*: マウスの肺胞上皮細胞株である MLE-12 細胞を DMOG 1 mM または対照液とともに 24 時間培養した。その後、FasL で刺激しアポトーシスを誘導させ細胞生存率を測定、さらに細胞抽出液中の caspase-3 活性を調べた。

*in vivo*: C57BL/6 マウスに DMOG 10 mg または対照液を 2 時間毎に計 3 回腹腔内投与し、2 回目の DMOG 投与と同時に気管内に FasL を注入、ARDS モデルを作成した。FasL の気管内注入 16 時間後のマウス肺を摘出し、肺ホモジェネート、気管支肺胞洗浄液、肺病理組織を用いて解析した。

4. 研究成果

*in vitro*: DMOG 投与は FasL 誘導性の caspase-3 活性の上昇 (図 2) やアポトーシスによる細胞死 (図 3) を有意に軽減させた。DMOG を投与した MLE-12 細胞では、細胞表面

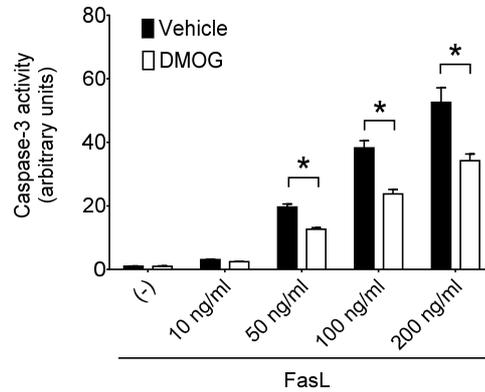


図 2. FasL 刺激された MLE-12 細胞の caspase-3 活性に対する DMOG の効果  
DMOG 1 mM もしくは対照を 24 時間作用させた後に様々な濃度の FasL で 2 時間刺激した。刺激後の MLE-12 細胞の細胞溶解液中の caspase-3 活性を定量した。\*:  $P < 0.05$  (vs Vehicle)

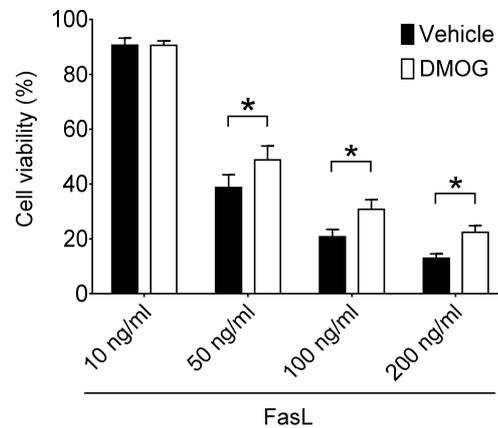


図 3. FasL 刺激された MLE-12 細胞の細胞生存率に対する DMOG の効果  
DMOG 1mM もしくは対照を 24 時間作用させた後に、様々な濃度の FasL で 4 時間刺激した。FasL 刺激後の MLE-12 細胞の細胞生存率を定量した。\*:  $P < 0.05$  (vs Vehicle)

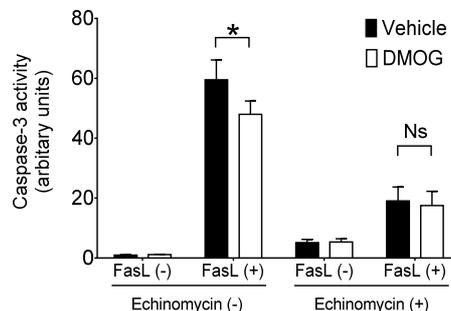


図 4. Echinomycin 100 nM を 2 時間前に投与した後、DMOG 1 mM または対照を 24 時間作用させ、FasL 200 ng/ml で 2 時間刺激した。刺激後の細胞溶解液中の caspase-3 活性を定量した。\*:  $P < 0.05$  (vs Vehicle)

の Fas 発現が有意に減少していた。HIF-1 の転写活性阻害薬である echinomycin の投与

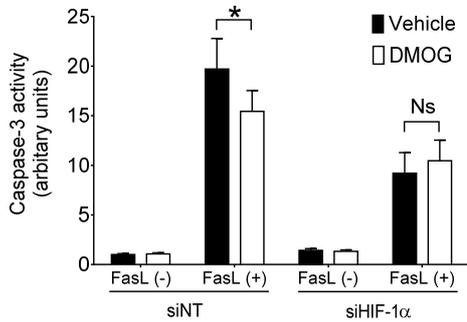


図 5. HIF-1 siRNA をトランスフェクションさせた MLE-12 細胞に、DMOG 1 mM または対照を 24 時間作用させた後、FasL 200 ng/ml で 2 時間刺激した。細胞溶解液中の caspase-3 活性を定量した。\*: P < 0.05 (vs Vehicle)

(図 4) 並びに HIF-1 small interfering RNA (siRNA) のトランスフェクション (図 5) によって HIF-1 経路を阻害すると DMOG による抗アポトーシス効果は観察されなかった。

*in vivo*: DMOG を投与したマウスでは肺ホモジェネート中の HIF-1 タンパクの上昇 (図 6) と Fas タンパクの減少が認められた。DMOG を投与したマウスでは FasL の気管内注入による caspase-3 活性の上昇 (図 7) やアポトーシスによる細胞死が有意に抑制された (図 8)。さらには肺胞透過性亢進の指標である気管支肺胞洗浄液中の高分子タンパクである IgM 濃度も有意に抑制された。FasL の気管内投与により炎症反応が惹起されることが知られているが、肺ホモジェネート中の

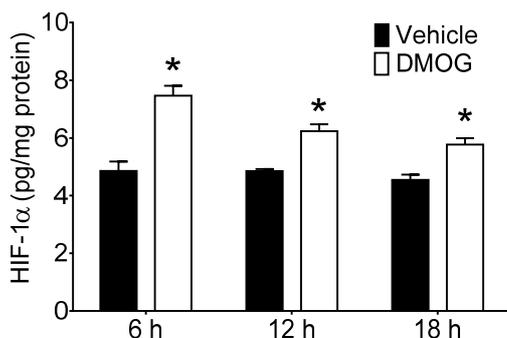


図 6. マウス肺ホモジェネート中の HIF-1 タンパクを ELISA で定量した。\*: P < 0.05 (vs Vehicle) \*: P < 0.05

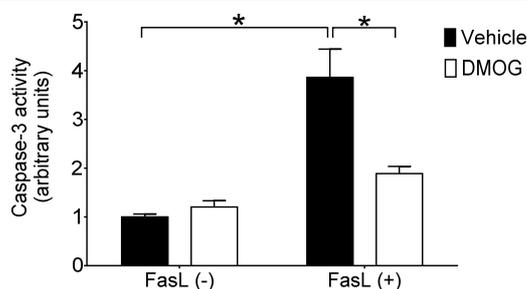


図 7. FasL 気管内注入後 16 時間後のマウス肺のホモジェネート中の caspase-3 活性。\*: P < 0.05

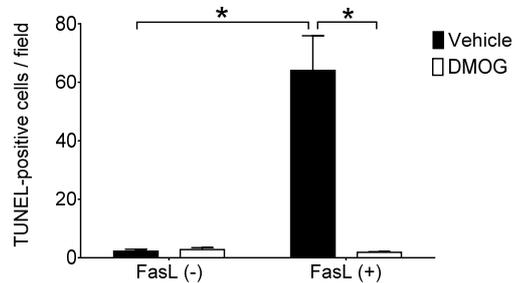


図 8. 肺切片における TUNEL 陽性細胞数。\*: P < 0.05

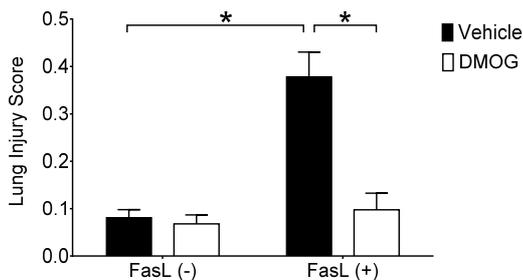


図 9. Lung injury score による肺障害の評価。数値が高い方が障害が強い。\*: P < 0.05

炎症性メディエーター (CXCL1 ケモカイン, ミエロペルオキシダーゼ (myeloperoxidase, MPO)) の上昇や病理組織学的変化 (lung injury score) も DMOG 投与マウスで有意に改善していた (図 9)。

肺胞上皮細胞は、FasL で刺激されると caspase-3 が活性化しアポトーシス細胞死が起こる。その結果、肺胞バリア機能が傷害され、肺胞透過性が亢進する。PHD 阻害薬である DMOG を投与すると、Fas が抑制され、FasL による caspase-3 活性化が抑制される。その結果、アポトーシス細胞死が抑制され、肺胞バリア機能傷害が軽減する。細胞実験において、HIF-1α siRNA のトランスフェクションにより HIF-1 経路を阻害すると、DMOG の抗アポトーシス効果および Fas 抑制作用は観察されなかったことから、DMOG の抗アポトーシス作用は HIF-1 依存的であることが示唆された。

## 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 3 件)

- Tojo K, Nagamine Y, Yazawa T, Mihara T, Baba Y, Ota S, Goto T, Kurahashi K: Atelectasis causes alveolar hypoxia-induced inflammation during uneven mechanical ventilation in rats.

- Intensive Care Med Exp.** 3:18, 2015; DOI 10.1186/s40635-015-0056-z.
- Tojo K, Goto T, Kurahashi K: Protective effects of continuous positive airway pressure on a nonventilated lung during one-lung ventilation: A prospective laboratory study in rats. **Eur J Anaesthesiol.** 33:776-83, 2016
  - Nagamine Y, Tojo K, Yazawa T, Takaki S, Baba Y, Goto T, Kurahashi K: Inhibition of Prolyl Hydroxylase Attenuates Fas Ligand-induced Apoptosis and Lung Injury in Mice. **Am J Respir Cell Mol Biol.** 55:878-888, 2016

〔学会発表〕(計 4 件)

- Tojo K, Yusuke N, Yazawa T, Mihara T, Goto T, Kurahashi K: The distinct roles of hypoxia-activated transcription factors in atelectasis-induced lung injury: a pro-inflammatory role of nuclear factor-κB and an anti-inflammatory role of hypoxia-inducible factor-1 in lung epithelial cells. EUROANAESTHESIA 2014. 31 May - 3 June 2014. Stockholm, Sweden
- 長嶺祐介, 東條健太郎, 高木俊介, 馬場靖子, 後藤隆久, 倉橋清泰: Prolyl hydroxylase 阻害はマウスにおいて Fas/Fas リガンド系アポトーシスによる肺傷害を軽減する. 第62回日本麻酔科学会総会. 2015.5.28-30, 兵庫
- Nagamine Y, Tojo K, Yazawa T, Takaki S, Baba Y, Goto T, Kurahashi K: Dimethyloxalylglycine, a prolyl hydroxylase inhibitor, attenuates Fas ligand-induced apoptosis and

- lung injury in mice. 第56回日本呼吸器学会総会, 2016.4.8-10, 京都
- Nagamine Y, Tojo K, Yazawa T, Takaki S, Baba Y, Goto T, Kurahashi K: Inhibition of Prolyl Hydroxylase Attenuates Fas Ligand-induced Apoptosis and Lung Injury in Mice. American Thoracic Society International Conference 2016, May 2016, San Francisco, California

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

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 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

6. 研究組織  
 (1)研究代表者  
 倉橋 清泰 (KURAHASHI, Kiyoyasu)  
 国際医療福祉大学・大学病院・教授  
 研究者番号: 50234539

(2)研究分担者  
 矢澤 卓也 (YAZAWA, Takuya)  
 獨協医科大学・医学部・教授  
 研究者番号: 50251054

馬場 靖子 (BABA, Yasuko)  
 横浜市立大学・附属市民総合医療センター・講師  
 研究者番号: 80453041

(3)連携研究者

齋藤 泉 (SAITO, Izumu)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：70158913