

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462759

研究課題名(和文)敗血症性多臓器不全治療に向けた基盤研究：HIF-1による組織代謝制御の解明

研究課題名(英文)Analysis of HIF-1 mediated energy metabolism during septic multiple organ dysfunction syndrome

研究代表者

山口 修 (YAMAGUCHI, Osamu)

横浜市立大学・附属病院・准教授

研究者番号：20174609

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)：敗血症動物モデルを用いて、敗血症早期の肺組織においてHIF-1の増加が見られること、また同時にATP濃度が増加することを明らかにした。一方で、遅いタイミングでは肺組織のHIF-1レベルは低下し、ATP濃度が低下することが明らかになった。以上から、HIF-1の増加は敗血症において組織のエネルギー代謝を保つ保護的な効果を持つ可能性があることが示唆された。

本研究によって、今後、HIF-1の制御が、敗血症における組織エネルギー代謝を改善、ひいては治療効果をもつのかどうかの検討を行うのにつながる基盤的な知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：We measured HIF-1 protein levels and ATP concentrations in the lung tissues from septic mice. At the early stage, HIF-1 protein and ATP levels were increased. On the other hand, HIF-1 protein levels returned to the control level and ATP concentrations were decreased in the lung tissues at the late stage.

These observations suggest that modulation of HIF-1 might have therapeutic effects against septic multiple organ dysfunction syndrome through the improvement of energy metabolism.

研究分野：集中治療医学

キーワード：敗血症 臓器不全 低酸素誘導性因子

1. 研究開始当初の背景

敗血症は集中治療室における主要な死亡原因の一つである。敗血症が進行すると多臓器不全に陥るが、その背景には臓器におけるエネルギー代謝失調があると考えられている (Singer ら Crit Care Med)。エネルギー代謝失調の原因としては (1) 循環不全によって酸素供給が需要に満たなくなる (2) 臓器レベルでの酸素利用が障害されるといふ二つの機序が考えられる。(1) の循環不全に対する治療として Early goal directed therapy (EGDT) による酸素需給バランスの早期改善が死亡率を下げることで Rivers らによって示されて以来、EGDT は敗血症治療の中心に位置づけられている。

一方で、酸素供給が充分であっても、(2) の機序による臓器不全を合併している症例は予後が悪い可能性が示唆されている。例えば臓器レベルでの酸素利用が障害されると、中心静脈血酸素飽和度 (SCVO₂) は上昇すると考えられるが、敗血症後期で SCVO₂ が高い症例の予後は悪い (Textoris ら. Critical Care 2011)。また、死亡例では組織レベルのミトコンドリア機能不全が見られること (Brealey ら. Lancet 2002) も報告されている。しかしながら、臓器レベルでの代謝失調の機序は十分には解明されておらず、治療法も確立していない。

低酸素誘導性因子 (HIF)-1 は生体の低酸素応答の主要なレギュレーターであり、低酸素に適応するための種々の遺伝子の転写を制御している。しかしながら、低酸素のみならず LPS や炎症性メディエーターが HIF-1 の活性化を引き起こすことが知られており、敗血症を含むショック患者において血液中 HIF-1 の発現が亢進していること (Textoris ら. Critical Care, 2012) がわかってきた。HIF-1 の働きの一つとして好氣的代謝 (酸化リン酸化) から嫌氣的代謝 (解糖系) へ代謝の場をシフトさせることがあげられるが (Semenza. Biochem J, 2007)、この代謝のシフトによって臓器での ATP 産生量が減少し、臓器不全が引き起こされる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究における当初の目的はヒト敗血症患者における組織レベルでの HIF-1 を定量し、それが予後、重症度に影響を与え得るかどうかを検討し、HIF-1 の制御による敗血症治療法開発のための基礎的な知見を確立するであった。そのために敗血症患者において筋生検を行い HIF-1 のタンパク量を測定することを予定していたが、敗血症患者においては DIC 等による凝固機能異常が見られることが多く、筋生検は出血等の危険性がある可能性が指摘された。

そのため、本研究では (1) 敗血症動物モ

デルを用いて臓器障害の重要ターゲットである肺における HIF-1 の動態及びエネルギー指標である ATP 含有量の測定することとした。また、HIF によるエネルギー代謝の変化はエネルギー代謝不全の原因ではなく、ストレスにさらされた組織の自己防御反応である可能性があることがわかってきた。そのため、HIF の活性化が敗血症の治療アプローチになりうると考え、(2) HIF の分解を促進する酸素センサー分子プロリルヒドロキシラーゼ (PHD) をノックアウト、あるいは薬理的に阻害するための基礎的な知見を得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 敗血症モデル動物の作製

・LPS 腹腔内投与モデル

8-10 週令の C57BL/6J マウスに対して、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に溶解した LPS (E. coli, 0111:B4) を 0.25mg を腹腔内投与した。コントロール群では PBS を同量投与した。6, 24 時間後に全身麻酔下に頸動脈より脱血、安楽死させ、肺を採取、凍結保存した。

・Cecal Ligation and Puncture モデル

8-10 週令の C57BL/6J マウスに対して、全身麻酔下に開腹し、盲腸を腹腔外に露出させた。盲腸の 50% の場所で、結紮、23 ゲージ針で穿刺を行い、腹腔内に戻した。6, 24 時間後に全身麻酔下に頸動脈より脱血、安楽死させ、肺を採取凍結保存した。

(2) 肺組織中の HIF-1 タンパク濃度の定量

採取した肺組織をプロテアーゼ阻害剤を添加し、氷冷した RIPA バッファーを加え、ホモジナイズした。4, 10000g で 10 分間遠心分離を行い、上清を回収した。上清中の HIF-1 濃度を ELISA 法で測定し、BCA 法にて測定したタンパク濃度で標準化した。

(3) 肺組織中の ATP 含有量の測定

採取した肺組織を TE 飽和フェノール中でホモジナイズした上で、クロロホルムと超純水を混合した上で 4, 16000g で 10 分間遠心分離を行い、水層を回収した。ATP 濃度をルシフェラーゼによる発光法で測定した。得られた ATP 濃度をホモジナイズに用いた組織の湿重量にて標準化した。

(4) PHD 阻害薬の HIF-1 に与える効果の検討

臨床治験が進められている PHD 阻害薬として、FG-4592, BAY85-3934, GSK1278863 の 3 種類が MLE12 肺胞上皮細胞株において HIF-1 を増加させるか検討を行った。培養した MLE12 細胞に上記 3 種類の薬剤を含む培地を添加し、24 時間後に PBS で洗浄、RIPA バッファーにて細胞ライセートを作成、上記と同様に ELISA 法にて HIF-1 タンパク濃度を測定した。

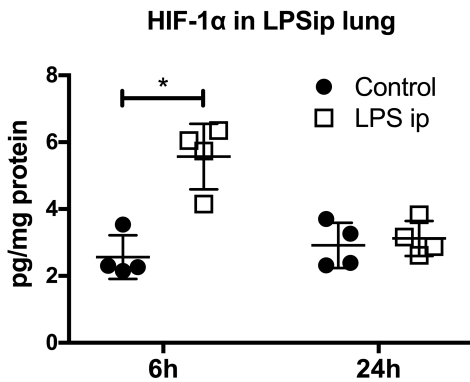
(5)PHD2 ノックアウトマウスの作製

PHD2 flox/flox マウスを入手し、上皮系細胞にて CreERT2 を発現する KRT8-Cre/ERT2 マウスとかけ合わせることで、タモキシフェン投与下に上皮系細胞にて PHD2 がノックアウトされる遺伝子改変マウスを作成し、ジェノタイプングを行った。

4. 研究成果

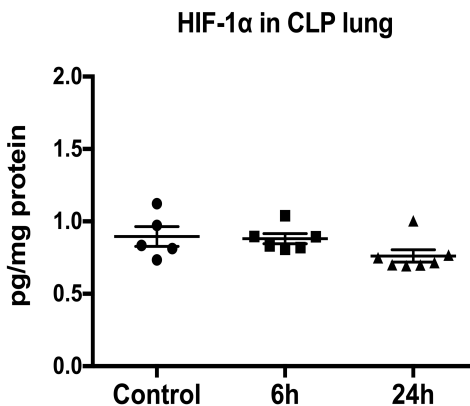
(1)LPS 腹腔内投与と敗血症モデルマウスにおける肺組織 HIF-1 濃度

LPS を腹腔内投与し 6 時間後には肺組織中の HIF-1 のタンパク濃度が有意に増加していた。しかしながら、24 時間後にはコントロールと同等のレベルまで戻っていた。



(2)CLP 敗血症モデルマウスにおける臓器 HIF-1 濃度

CLP を施行後のマウスでは 6 時間後、24 時間後共に肺組織中の HIF-1 の変化は見られなかった。

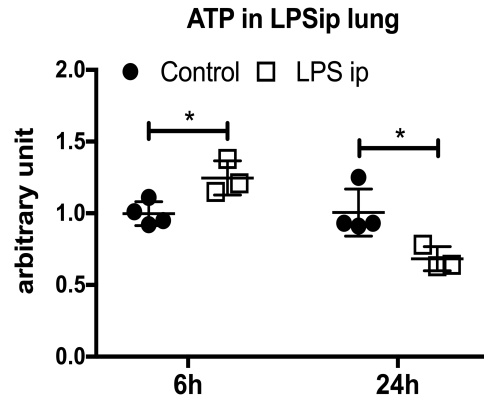


これは、CLP では病態の進行が LPS 腹腔内投与と比べて緩徐であることが影響している可能性があると考えられた。

(3)LPS 腹腔内投与と敗血症モデルマウスにおける臓器 ATP 濃度

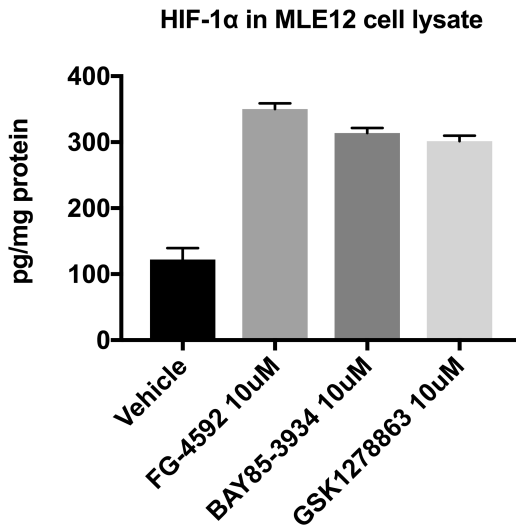
LPS を腹腔内投与した敗血症モデルマウスにおいて 6 時間後には肺組織中の ATP 濃度が有意に増加していた。

一方で 24 時間後には肺組織中の ATP 濃度は著明に低下しており、エネルギー代謝不全が生じている可能性が示唆された。



(4)PHD 阻害剤が肺胞上皮細胞株の HIF-1 濃度を与える影響の検討

FG-4592, BAY85-3934, GSK1278863 いずれの PHD 阻害薬も MLE12 細胞中の HIF-1 濃度を著明に増加させた。



(5)上皮細胞特異的 PHD2 ノックアウトマウスの作製

PHD2 flox/flox マウスを入手し、上皮系細胞にて CreERT2 を発現する KRT8-Cre/ERT2 マウスとかけ合わせ、目的の遺伝子型のマウスを得ることが出来た。

以上の成果から、敗血症早期の肺組織において HIF-1 の増加が見られること、また同

時に ATP 濃度が増加することが明らかになった。一方で、遅いタイミングでは肺組織の HIF-1 レベルは低下し,ATP 濃度が低下することが明らかになった。以上から, HIF-1 の増加は敗血症において組織のエネルギー代謝を保つ保護的な効果を持つ可能性があることが示唆された。

また, PHD 阻害薬が HIF-1 の増加作用を持つことが確かめられた。

本研究によって, 今後, PHD ノックアウトや薬理的な PHD 阻害が, 敗血症における組織エネルギー代謝を改善, ひいては治療効果をもつのかどうかの検討を行うのにつながる基盤的な知見を得ることができた。

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1件)

Tojo K, Tamada N, Nagamine Y, Yazawa T, Ota S, Goto T. Enhancement of glycolysis by inhibition of oxygen-sensing prolyl hydroxylases protects alveolar epithelial cells from acute lung injury. FASEB J. 2018 Apr;32(4):2258-2268. (査読有り)

[学会発表](計3件)

Tojo K, Tamada N, Nagamine Y, Ota S, Goto T. Metabolic reprogramming by inhibition of prolyl hydroxylases protects alveolar epithelial cells from LPS-neutrophil-induced energy derangements and cell death. Euroanaesthesia 2017, The European Anesthesiology Congress. 2017.

東條 健太郎, 玉田 尚, 長嶺 祐介, 矢澤 卓也, 太田 周平, 後藤 隆久. Prolyl hydroxylase 阻害は肺胞上皮細胞の代謝リプログラミングを介して LPS 誘導性肺傷害を軽減する. 第 64 回日本麻酔科学会総会. 2017.

Tojo K, Nagamine Y, Goto T. The hydroxylase inhibitor dimethyloxallyl glycine protects lung epithelial barriers from LPS-induced injury in mice. Euroanaesthesia 2016, The European Anesthesiology Congress. 2016.

[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

山口 修 (YAMAGUCHI, Osamu)
横浜市立大学・附属病院・准教授
研究者番号: 20174609

(2)研究分担者

東條 健太郎 (TOJO, Kentaro)
横浜市立大学・医学部医学科・助教
研究者番号: 80737552

柳 大介 (YANAGI, Daisuke)

横浜市立大学・
附属市民総合医療センター・助教
研究者番号: 80638586

倉橋 清泰 (KURAHASHI, Kiyoyasu)

横浜市立大学・
附属市民総合医療センター・准教授
研究者番号: 50234539

(3)連携研究者

(4)研究協力者