

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：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670693

研究課題名(和文)酸素含有脂質微小粒子による生体内酸素ホメオスタシス維持法開発を目指した基礎研究

研究課題名(英文)Development of oxygen gas-filled microparticles providing intravenous oxygen delivery

研究代表者

広田 喜一(HIROTA, Kiichi)

関西医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00283606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：酸素はミトコンドリアでの電子伝達系の最終的な電子受容体としての役割を担う故、生体の機能維持に絶対的に必要な分子である。にもかかわらずその内因性の産生経路は存在せず生体内への酸素供給は人工心肺下や高圧酸素療法下などの特殊な状況を除けば肺からの取り込みに完全に依存している。今回申請者らは、酸素分子を脂質二重膜からなる微小粒子へ封入した酸素担体の開発とその有効性を申請者が従来より行ってきた細胞内酸素ホメオスタシスセンサー分子である低酸素誘導性因子1の活性化の検討を援用して行うという研究を着想して研究を遂行した。

研究成果の概要(英文)：The clinical consequence after prolonged oxygen deprivation due to severe hypoxemia can be serious, including cardiac arrest and brain damage and the most significant problem in the operating theater around the world. In these situations, patients are typically fed oxygen through endotracheal tube via the mouth. Severely hypoxemic patients are typically treated with inspired oxygen, intubation, and mechanical ventilation. At this moment, few other options to overcome the event exist. Now, safe and effective intravascular delivery of oxygen gas has not been realized. In this study, we tried to develop lipidic oxygen-containing microparticles that can be injected into the veins for systemic delivery of oxygen to all of the vital organs.

研究分野：麻酔科学

キーワード：低酸素血症 脂質二重膜酸素封入微小バブル HIF-1 窒息

1. 研究開始当初の背景

酸素はミトコンドリアでの電子伝達系路の最終的な電子受容体としての役割を担う故、生体の機能維持に絶対的に必要な分子である。にもかかわらずその内因性の産生経路は存在せず生体内への酸素供給は人工心肺下や高圧酸素療法下などの特殊な状況を除けば肺からの取り込みに完全に依存している。失血などで失われたヘモグロビンを補う戦略として古典的なものは同種赤血球の移植つまり輸血である。ヒトヘモグロビンをリン脂質二重膜に被覆した細胞型のヘモグロビン小胞体を用いたいわゆる「人工ヘモグロビン」の開発も進んでいる。また近年では再生医学の成果を利用して赤血球を試験管内で作出する技術も開発途中である。しかし現在このような人工酸素担体は現在臨床現場では活用されていない。このように現在緊急的な肺胞換気停止下で生体への確実な酸素供給を保証する方法は存在しない。

超音波診断用造影剤であるペルフルブタンは直径 2-3 μm の脂質で形成されたシェルに気体であるペルフルブタンを封入したものである。このように気体含有脂質粒子の作出とヒトでの使用は技術的には可能なものとなっていて実際に医療現場で使用されている。

今回申請者らは、酸素分子を脂質二重膜からなる微小粒子へ封入した酸素担体(以下本申請では、酸素含有脂質微小粒子 (lipid oxygen-containing microparticle, LOM という呼称を用いる)の開発とその有効性を申請者らが従来より行ってきた細胞内酸素ホメオスターシスセンサー分子である低酸素誘導性因子 1 の活性化の検討を援用して行うという研究を発想した

2. 研究の目的

超音波診断用造影剤であるペルフルブタンは直径 2-3 μm の脂質で形成されたシェル

に気体であるペルフルブタンを封入したものである。このように気体含有脂質粒子の作出とヒトでの使用は技術的には可能なものとなっていて実際に医療現場で使用されている。

今回申請者らは、酸素分子を脂質二重膜からなる微小粒子へ封入した酸素担体(以下本申請では、酸素含有脂質微小粒子 (lipid oxygen-containing microparticle, LOM という呼称を用いる)の開発とその有効性を申請者らが従来より行ってきた細胞内酸素ホメオスターシスセンサー分子である低酸素誘導性因子 1 の活性化の検討を援用して行うという研究を発想した

試験管内実験と培養細胞と実験小動物を用いた実験の遂行により生体内酸素代謝に関わる以下の項目を明らかにする。

- (1): 静脈内投与に最適化された脂質二重膜酸素封入微小バブルの作出法を確立する
- (2): 酸素封入微小バブルの有効性を培養細胞を用いた実験系で実証する。
- (3): 酸素封入微小バブルの有効性をマウス・ラット・野兔を用いた実験系で実証する。

低酸素血症の予防・治療は重要臓器での酸素ホメオスターシスの維持を行うことが手術室、集中治療室での患者管理の要諦の一つである。

気道閉塞などに伴う急激な低酸素血症の応急治療として静脈投与可能な酸素マイクロバブルの開発は画期的なものとなることが期待される。

封入体の径を調整することで血管壁での透過性を調節できれば梗塞巣への酸素供給が可能な酸素担体を構築できる可能性がある。

本研究は、細胞レベルでの酸素の需給バランスつまり酸素ホメオスターシスの失調を感知して活性化する低酸素誘導性因子 1(HIF-1)の活性化を同時にモニタリングする手法で酸素製剤の効果を細胞レベルで評価

できる事が期待されることも特長の一つである。

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。

さまざまな粘度の LOM を調整するために細胞外液で希釈して検討に用いる。検討した項目は以下の表に示した。

項目	方法
直径	顕微鏡観察
形状	顕微鏡観察
粘度	粘度計計測
赤血球への酸素移行効率	オキシメトリー
酸素放出効率	ガス分析法

低酸素ワークステーション(気体分圧を任意に設定できかつ、培地交換、細胞の回収さらに顕微鏡を用いての観察が可能となるチャンパーのこと)を用いてLOMの効果を確認する。

検討項目は表2に示した。

細胞内シグナル伝達、遺伝子応答の検討はHIF-1の活性化を指標として行う。

培養細胞として樹立細胞株(HeLa細胞、Hep3B細胞などを予定している)を優先的に使用した。

	RT-PCR mRNA	Western Blot	ELISA	組織染色
HIF-1a	○	○		○
HIF-1b	○	○		
VEGF	○		○	
GLUT-1	○			
EPO	○		○	
組織障害の評価				○

4. 研究成果

(1) 酸素含有脂質微小粒子 (**lipid oxygen-containing microparticle, LOM**)の作出

(2) 培養細胞を用いた実験系

(3) ラット・野兔・遺伝子改変マウスを用いた実験系

の三つを柱とした実験計画を策定した。

(1) 静脈内投与に最適化された脂質二重膜を用いた酸素封入微小バブル(LOM)の作出法を確立 - プロトタイプ of 作出には成功したが研究計画に記載した所期の性質を備えた酸

素封入微小バブルの作出には至っていない。検討を行った項目は表1に示した。

(2) 酸素封入微小バブルの有効性を培養細胞を用いた実験系での検証 -細胞内シグナル伝達、遺伝子応答の検討はHIF-1の活性化を指標とした細胞内低酸素状態の検証の実験系を確立して酸素バブルを用いて評価系を確立した。検討項目の詳細は表2に示した。

(3) 酸素封入微小バブルの有効性をラットを用いた実験系での検証-プロトタイプ of LOMを用いて実験を試みたが心停止までの時間の延長や動脈血酸素分圧の有意な上昇などの所期の結果は得られなかった。

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13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. 肺泡低酸素と炎症 -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)

〔学会発表〕(計 9 件)

揮発性吸入麻酔薬は転写因子HIF-1依存的に肺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) 2015/12/03 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 2015/6/6 国立遺伝学研究所(三島市)

テプレノン神経由来細胞株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)

〔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

広田 喜一(HIROTA, Kiichi)
関西医科大学 医学部 准教授
研究者番号: 00283606