

平成21年 5月15日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590893
 研究課題名（和文）上皮間葉移行の気道リモデリングへの関与とその制御方法に関する検討
 研究課題名（英文）Epithelial mesenchymal transition during airway remodeling
 研究代表者 小林 哲（KOBAYASHI TETSU）
 三重大学・医学部附属病院・医員
 研究者番号：20437114

研究成果の概要：線維化や組織修復のリモデリング過程において、線維芽細胞はその中心的役割を担う。今回 Epithelial mesenchymal transition (EMT) の線維化に関する関与と制御方法を検討した。A549 細胞を用い、TGF- β による刺激によって EMT 変化に関する研究を実施。*in vitro* において、IL-1 β 、TNF- α と TGF- β の共刺激によってより EMT が起こりやすいことを確認した。さらにブレオマイシン肺線維症モデルにおいて線維化に関与する siRNA の投与によって *in vivo* においても線維化を抑制することを確認した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：呼吸器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：TGF- β 、EMT、siRNA、肺線維症

1. 研究開始当初の背景

(1) 線維化や組織修復のリモデリング過程において、線維芽細胞はその中心的役割を担う。特に肺における線維芽細胞の起源については明らかになっていないのが現状である。その起源における候補としては、1：末梢血中の fibrocyte、2：Epithelial mesenchymal transition (EMT)、3：

Endothelial-MT (Endo-MT)、4：resident fibroblast などである。それらを起源とした fibroblast が線維化を来たす病態に深く関与していると考えられ、その制御は治療に結びつく可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 間質性肺炎などの肺の線維化を伴う疾患

は、極めて予後不良であり、決定的な治療法もない。そこで、EMT の関与を検討し、さらにブレオマイシンによるマウス肺線維症モデルを用い、その制御方法を探る。

3. 研究の方法

(1) human alveolar epithelial cell (A549) を用い、各種サイトカイン刺激による EMT 誘導をみる。E-cadherin、 α -SMA などの EMT に関する因子の変化および morphology 変化を検討。

(2) マウスブレオマイシン肺線維症モデルを用い、線維化に影響する蛋白に関して各種 siRNA を作製し、経気道的に投与。その影響を検討し、肺線維症に対する治療の可能性を考える。

4. 研究成果

(1) A549 に関して、IL-1 β 、TNF- α 、TGF- β のサイトカインによる刺激を行った。各種単独の刺激では EMT は誘導されにくいことを確認した。また、IL-1 β 、TNF- α などの炎症性サイトカインと TGF- β の共刺激によって相乗的に EMT が誘導されることを確認した。また、IL-1 β +TNF- α によっても誘導され、これは TGF- β の autocrine によるものと考えられた。以上の結果は、疾患において、炎症を含めた何らかの障害が出現した場合、EMT が誘導されやすいことの説明として reasonable であると考えられた。

(2) さらに肺線維症に関しての *in vivo* における検討を行った。マウスブレオマイシンモデルにおいて、線維化に関与するたんぱく質数種類の siRNA を作製し、経気道的に投与した。さらに組織学的に線維化指標 score を用い、siRNA の線維化抑制効果を検討した。その結果、抑制効果を確認し、今後、この siRNA に関して肺線維症の治療戦略となり得る事が示唆された。

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 9 件)

1: Liu X, Togo S, Al-Mugotir M, Kim H, Fang Q, Kobayashi T, Wang X, Mao L, Bitterman P, Rennard S. NF- κ B mediates the survival of human bronchial epithelial cells exposed to cigarette smoke extract. *Respir Res.* 23:9:66. 2008 (査読あり)

2: Maruyama T, Niederman MS, Kobayashi T, Kobayashi H, Takagi T, D'Alessandro-Gabazza CN, Fujimoto H, Gil Bernabe P, Hirohata S, Nakayama S, Nishikubo K, Yuda H, Yamaguchi A, Gabazza EC, Noguchi T, Takei Y, Taguchi O. A prospective comparison of nursing home-acquired pneumonia with hospital-acquired pneumonia in non-intubated elderly. *Respir Med.* 102(9):1287-95. 2008 (査読あり)

3: Kamio K, Sato T, Liu X, Sugiura H, Togo S, Kobayashi T, Kawasaki S, Wang X, Mao L, Ahn Y, Holz O, Magnussen H, Rennard SI. Prostacyclin analogs stimulate VEGF production from human lung fibroblasts in culture. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 294(6):L1226-32. 2008 (査読あり)

4: Shimizu S, Shimizu T, Morser J, Kobayashi T, Yamaguchi A, Qin L, Toda M, D'Alessandro-Gabazza C, Maruyama T, Takagi T, Yano Y, Sumida Y, Hayashi T, Takei Y, Taguchi O, Suzuki K, Gabazza EC. Role of the coagulation system in allergic inflammation in the upper airways. *Clin*

Immunol. 129(2):365-71. 2008 (査読あり)

5: Yamaguchi A, Gabazza EC, Takei Y, Yano Y, Fujimoto H, D'Alessandro-Gabazza CN, Murakami E, Kobayashi T, Takagi T, Maruyama J, Suzuki K, Taguchi O. Role of thrombin in interleukin-5 expression from basophils. *Biochem Biophys Res Commun.* 28:368(1):116-20. 2008 (査読あり)

6: Hashimoto M, Wang X, Mao L, Kobayashi T, Kawasaki S, Mori N, Toews ML, Kim HJ, Cerutis DR, Liu X, Rennard SI. Sphingosine 1-phosphate potentiates human lung fibroblast chemotaxis through the S1P2 receptor. *Am J Respir Cell Mol Biol.* ;39(3):356-63. 2008 (査読あり)

7: Fang Q, Mao L, Kobayashi T, Wang X, Wyatt TA, Kim H, Liu X, Rennard SI. PKCdelta mediates thrombin-augmented fibroblast-mediated collagen gel contraction. *Biochem Biophys Res Commun.* 16:369(4):1199-203. 2008 (査読あり)

8: Liu X, Das AM, Seideman J, Griswold D, Afuh CN, Kobayashi T, Abe S, Fang Q, Hashimoto M, Kim H, Wang X, Shen L, Kawasaki S, Rennard SI. The CC chemokine ligand 2 (CCL2) mediates fibroblast survival through IL-6. *Am J Respir Cell Mol Biol.* ;37(1):121-8. 2007 (査読あり)

9: Kamio K, Liu X, Sugiura H, Togo S, Kobayashi T, Kawasaki S, Wang X, Mao L, Ahn Y, Hogaboam C, Toews ML, Rennard SI. Prostacyclin analogs inhibit fibroblast contraction of collagen gels through the cAMP-PKA pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 37(1):113-20. 2007 (査読あり)

[学会発表] (計6件)

1、M. Naito, T. Takagi, A. Fujiwara, A. Yamaguchi, T. Kobayashi, H. Kobayashi, C.N. D'Alessandro-Gabazza, J. Morser, E.C. Gabazza, Y. Takei, O. Taguchi. Procoagulant and Anticoagulant Factors in Patients with Sleep Apnea. *ATS International Congress*, May 18, 2009, San Diego, CA, USA

2、M. Naito, T. Takagi, A. Fujiwara, A. Yamaguchi, T. Kobayashi, H. Kobayashi, C.N. D'Alessandro-Gabazza, J. Morser, E.C. Gabazza, Y. Takei, O. Taguchi. Protein S Inhibits the Secretion of Inflammatory Cytokines from Alveolar Epithelial Cells. *ATS International Congress*, May 18, 2009, San Diego, CA, USA

3、H. Kobayashi, M. Masuya, M. Naito, A. Fujiwara, T. Takagi, A. Yamaguchi, T. Kobayashi, E.C. Gabazza, O. Taguchi. Circulating Fibrocytes in Bronchial Asthma. *ATS International Congress*, May 18, 2009, San Diego, CA, USA

4、小林 哲、他、呼吸器疾患における siRNA 治療戦略、第78回閉塞性肺疾患研究会、平成21年1月24日、東京

5、小林 哲、組織リモデリングにおける Matrix metalloproteinase-9 の役割、第11回間質性肺炎細胞分子病態研究会、平成20年8月23日、東京

6、T. Kobayashi, et al. Matrix metalloproteinase-9 modulates fibroblast activity through autocrine TGF- β . *6th ERS Lung Science Conference*. March 14, 2008. Estoril, Portugal

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 哲 (KOBAYASHI TETSU)
三重大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：20437114

(2) 研究分担者

田口 修 (TAGUCHI OSAMU)
三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90197244

Gabazza Esteban (Gabazza Esteban)
三重大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00293770

(3) 連携研究者