

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19590904  
 研究課題名（和文） 肺サーファクタント蛋白によるマトリックスメタロプロテアーゼ活性制御機構の解明  
 研究課題名（英文） Surfactant protein regulates the activity of matrix metalloproteinases.  
 研究代表者  
 光澤 博昭（MITSUZAWA HIROAKI）  
 札幌医科大学・医学部・講師

研究成果の概要：肺サーファクタント蛋白質D（SP-D）が、細胞外基質分解酵素であるマトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）の活性を抑制することが本研究によって示された。SP-Dは、従来より知られてきた自然免疫作用のみならず、肺組織内でのMMP活性を制御することによって、肺の組織恒常性維持に関与しており、MMP活性亢進が病態に関わるような肺気腫や間質性肺炎などの呼吸器疾患の発症を抑止している可能性が示された。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医師薬学

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：コレクチン、肺サーファクタント蛋白質、マトリックスメタロプロテアーゼ、肺気腫、間質性肺炎、自然免疫

## 1. 研究開始当初の背景

肺サーファクタント蛋白は、呼吸器領域の感染防御、自然免疫を司る蛋白である。

一方、マトリックスメタロプロテアーゼ（

Matrix metalloproteinase; MMP）は細胞外基質を分解する酵素であり、呼吸器領域においては肺気腫や間質性肺炎などの病態形成に関与していることが報告されてきている。

最近になり、肺サーファクタント蛋白質 D (SP-D) ノックアウトマウスにおいて、肺内でのMMP活性が亢進し、肺気腫等の呼吸器病変を生じることが示されるようになってきていたが、SP-DによるMMP血清制御機構のメカニズムは解明されていなかった。

## 2. 研究の目的

肺気腫や間質性肺疾患の成因について、肺サーファクタント蛋白と MMP 活性制御動態に着目し、その分子基盤を明らかにすることによって、新たな呼吸器疾患病態発症メカニズム概念を確立するとともに、その治療戦略概念を構築することを目的として研究を開始した。

## 3. 研究の方法

### (1)ラット肺胞マクロファージにおける MMP 発現に及ぼす SP-D の影響

ラット肺胞洗浄液中より回収した肺胞マクロファージ、SP-D 存在、非存在下を培養し、培養液中に分泌される MMP 蛋白を Western blotting 法によって測定する。同時に MMP-9 活性についてもザイモグラム法を用いて測定を行う。

### (2)分泌後 MMP-9 に及ぼす SP-D の直接影響の有無

ラット肺胞マクロファージより分泌された MMP-9 を回収し、一定時間 SP-D と反応させた後の MMP-9 蛋白破壊の有無、活性変化の有無を、それぞれ Western blotting 法、ザイモグラム法を用いて検討した。

### (3)ラット肺胞マクロファージ細胞内 MMP-9 に及ぼす SP-D の影響

ラット肺胞マクロファージを SP-D 存在、非存在下を培養したのちの、細胞外分泌前の細胞内貯留 MMP-9 の蛋白量について Western blotting 法を用いて検討した。

### (4)ラット肺胞マクロファージの MMP-9 メッセージャーRNA 発現に及ぼす SP-D の影響

ラット肺胞マクロファージを SP-D 存在、非存在下を培養したのち、MMP-9 メッセージャーRNA の半定量を Real time PCR 法を用いて検討した。

## 4. 研究成果

### (1)ラット肺胞マクロファージにおける MMP 発現に及ぼす SP-D の影響

SP-D非存在下に培養を行ったラット肺胞マクロファージからは、培養開始後日数を経るごとに細胞外へのMMP-9蛋白分泌は亢進して行った。一方、SP-D存在下に培養を行ったラット肺胞マクロファージからの細胞外MMP-9分泌はSP-D非存在下と比べ著明に減少していることが、Western blotting法によって確認された。

同様にMMP-9活性についても、SP-D存在下に培養を行ったラット肺胞マクロファージからのMMP-9活性は、SP-D非存在下と比べ著明に減少していることが、ザイモグラム法によって確認された。

### (2)分泌後 MMP-9 に及ぼす SP-D の直接影響の有無

分泌された後のMMP-9に対するSP-Dの直接作用の有無について検討したが、MMP-9とSP-Dを一定時間反応させても、蛋白発現レベル、活性レベルいずれに帯してもSP-Dは全く影響を及ぼさなかった。

以上の結果より、SP-D は肺胞マクロファ

ージに何らかの影響を及ぼしてMMP-9分泌を抑制していることが判明した。

### (3)ラット肺泡マクロファージ細胞内MMP-9に及ぼすSP-Dの影響

SP-Dによる肺泡マクロファージMMP-9抑制効果の機序を調べるために、細胞内のMMP-9分泌また細胞内のMMP-9蛋白発現に対するSP-Dの影響について検討した。

SP-D存在下に培養したマクロファージにおいては細胞内でもMMP-9蛋白発現が抑制されていることがWestern blotting法によって確認された。

### (4)ラット肺泡マクロファージのMMP-9メッセンジャーRNA発現に及ぼすSP-Dの影響

続いてSP-DのMMP9メッセンジャーRNA発現に対する影響の有無をReal time PCR法を用いた半定量実験を行ったところ、逆にSP-D存在下で培養を行った肺泡マクロファージの方がMMP-9 mRNA発現量が増加していた。

以上の研究結果より、SP-Dはラット肺泡マクロファージに作用して、MMP-9の分泌および活性を抑制するが、その機序はラット肺泡マクロファージ内のMMP-9メッセンジャーRNAから蛋白に翻訳される過程にSP-Dが直接あるいは間接的に作用していることが示された。

本研究課題の遂行により、SP-Dが肺内でのMMP活性を制御することによって、肺の組織恒常性維持に寄与している可能性が示され、従来より知られてきた自然免疫作用のみならず、肺気腫や間質性肺炎など、MMP活性亢進が病態に関わるような各種呼吸器疾患の発症をSP-Dが抑止する働きを担っている可能性が示唆された。

## 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4件)

①Nie X, Nishitani C, Yamazoe M, Arika S, Takahashi M, Shimizu T, Mitsuzawa H, Sawada K, Smith K, Crouch E, Nagae H, Takahashi H, Kuroki Y. Pulmonary surfactant protein D binds MD-2 through the carbohydrate recognition domain. *Biochemistry*. 47:12878-85, 2008.

査読有

②Chmura K, Bai X, Nakamura M, Kandasamy P, McGibney M, Kuronuma K, Mitsuzawa H, Voelker DR, Chan ED.

Induction of IL-8 by *Mycoplasma pneumoniae* membrane in BEAS-2B cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 295:L220-30, 2008.

査読有

③Sano H, Ishino M, Kramer H, Shimizu T, Mitsuzawa H, Nishitani C, Kuroki Y The microtubule binding protein Hook3 interacts with a cytoplasmic domain of scavenger receptor A. *J Biol Chem*. 282:7973-81, 2007. 査読有

④Takeyama K, Mitsuzawa H, Nishitani C, Shimizu T, Sano H, Kunishima Y, Takahashi S, Hotta H, Matsukawa M, Shibata K, Tsukamoto T, Kuroki Y 6-Fluoro-8-methoxy-quinolone, gatifloxacin, down-regulates IL-8 production in prostate cell line PC-3. *Antimicrob Agents Chemother*. 51(1):162-8, 2007. 査読有

[学会発表] (計1件)

光澤博昭、SP-Dによるマトリックスメタロプロテアーゼ活性制御、医化学フォーラム札幌2009、平成21年3月20日、札幌

6. 研究組織

(1)研究代表者

光澤 博昭 (MITSUZAWA HIROAKI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：40325874

(2)研究分担者

黒木 由夫 (KUROKI YOSHIO)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：70161784

清水 健之 (SHIMIZU TAKEYUKI)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：10339137

西谷 千明 (NISHITANI CHIAKI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：30381255

(3)連携研究者