

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590979

研究課題名（和文） 特発性肺線維症におけるアダプター分子の関与

研究課題名（英文） Involvement of adaptor protein in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis

研究代表者

谷野 美智枝（TANINO MISHIE）

北海道大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：90360908

研究成果の概要（和文）：特発性肺線維症は慢性進行性の肺の線維化で生命予後を改善する有効な薬物はほとんどない。近年病態メカニズムの一つとして上皮間葉移行の関与が示唆されている。本研究では患者肺のⅡ型肺胞上皮において CRKI/II の高発現が見られ、CRKII 高発現 A549 細胞株では TGF-β1 存在下で上皮間葉移行が強く誘導されることがわかった。以上の結果から、肺胞上皮における CRKII の抑制は上皮間葉移行の制御を介して肺線維化の進行をおさえる戦略の一つになる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is chronic, progressive, and fibrosing lung disease and there is no advantageous drug for longer survival in IPF patients. Recently, involvement of epithelial mesenchymal transition (EMT) is suggested as one of the pathogenesis of IPF. In this study, we have demonstrated CRKI/II is highly expressed in alveolar type II (AT II) cells in IPF/UIP specimens and CRK II overexpressed A549 cell line could be induced stronger EMT phenomenon under TGF-β1 stimulation. These results suggested suppression of CRK II in AT II cells might be one of the therapeutic strategy for regulating lung fibrosis in IPF/UIP by regulation of EMT.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	900,000	270,000	1170,000
2010 年度	1500,000	450,000	1950,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3100,000	930,000	4030,000

研究分野：医歯薬学

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：特発性肺線維症、アダプター分子、CRK、上皮間葉移行

1. 研究開始当初の背景

(1) 特発性肺線維症は慢性経過で肺の線維化が不可逆的に進行する予後不良の難治性肺疾患で、現在有効な治療法はほとんどない。この線維化は通常の炎症の修復過程である線維化とは異なり、自立的な線維化の進行であり、近年病態メカニズムの一つとして上皮間葉移行 (epithelial mesenchymal transition: EMT) の関与が考えられている。

(2) 申請者らは現在までにアダプター蛋白 CRKI/II が悪性腫瘍細胞において、その接着・増殖・運動能に関与していることを報告してきた。また、CRKI/II 過剰発現細胞株では EGF や HGF などの成長因子存在下で EMT 様変化を引き起こされることが報告されている。

(3) 特発性肺線維症における持続的な線維化のメカニズムのひとつである EMT に CRKI/II が関与している可能性があると考えた。

2. 研究の目的

上記のような背景を受け、本研究では特発性肺線維症における CRKI/II の関与を調べる。

3. 研究の方法

(1) 特発性肺線維症患者検体におけるアダプター分子 CRK 及びその下流蛋白である DOCK180, C3G の免疫組織学的検討

臨床及び画像所見により特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis ; IPF/UIP) あるいは非特異的間質性肺炎 (nonspecific interstitial fibrosis ; NSIP) を疑われ外科的肺生検を行われた 18 名について病理所見を検討した。線維化の時相、間質への細胞浸潤、膠原線維増生を伴う線維化、線維芽細胞の増生、ポリープ型腔内線維化、蜂窩肺の有無を評価し、臨床病理学的に IPF/UIP9 名、NSIP9 名に分類されたものを対象とした。

ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて CRKI/II 及びその下流蛋白である Dock180, C3G の局在及び発現強度を正常肺と比較して免疫組織学的検討によって評価する。

(2) CRKI/II 高発現肺胞上皮細胞株 A549 を用いた TGF β 1 刺激下及び非刺激下での EMT 誘導の検討

特発性肺線維症の II 型肺胞上皮にて CRKI/II の高発現が確認されたことから以下の検討を行った。

① A549 細胞に TGF- β 1 5 μ g/ml 刺激を行い

48 時間後に EMT の誘導が誘導されるかを調べる。

- 位相差顕微鏡を用いた形態変化の観察
- 上皮性マーカーである E-cadherin、間葉系マーカーである Vimentin、EMT 関連転写因子 (Slug, Snail, Twist, TCF8) の mRNA 及び蛋白発現を RT-PCR 及び Western blotting にて調べた

② 次にレトロウイルスベクター発現誘導システムを用いて CRKI 及び CRKII の過剰発現 A549 細胞株を樹立した。

③ 樹立した細胞株を用いて CRKI/II 高発現のみで EMT が誘導されるかについて①と同様の検討を行った。

④ 次に TGF- β 1 刺激下での EMT の誘導に変化がおきるかを①と同様の手法を用いて検討した。

⑤ Rac 活性を pull down assay を用いて調べた。

⑥ Matrix metalloproteinase-2, 9 の mRNA 及び蛋白発現を real time PCR, Western blotting, Zymography にて調べた。

⑦ 運動能を Wound healing assay を用いて、浸潤能を Matrigel invasion assay を用いて調べた。

4. 研究成果

(1) 特発性肺線維症患者検体における免疫組織学的検討

NSIP と比較し UIP における膠原線維増生を伴う線維化病巣部分において CRK 及び C3G、DOCK180 はいずれも線維芽細胞に発現していた。また、過形成性変化を示す II 型肺胞上皮への発現は正常肺胞上皮と比較して強く認められた。

(2) CRKI/II 高発現肺胞上皮細胞株 A549 を用いた EMT の検討

① A549 細胞における TGF- β 15 μ g/ml 刺激 48 時間後の EMT の誘導解析

一刺激後、細胞形態が紡錘形に変化した。
一刺激後、E-cadherin mRNA 及び蛋白の発現は低下し、Vimentin mRNA 及び蛋白の発現が増加した。

一刺激後 Slug, Snail, TCF8 の mRNA 及び蛋白発現は増加した。以上の結果から A549 は TGF β 15 μ g/ml 刺激下で EMT が誘導されることがわかった。

② 細胞株の樹立

Western blotting にて CRKI 及び CRKII 過剰発現 A549 細胞株の樹立を確認した。

- ③ 樹立した CRKI 及び CRKII 過剰発現 A549 細胞株ではいずれも TGF- β 1 非刺激下で形態学的変化は見られた。また CRKII 過剰発現細胞株では E-cadherin の発現に変化は認めなかったものの MMP9 及び Vimentin の発現誘導を認めた。
- ④ 樹立した CRKI 及び CRKII 過剰発現 A549 細胞株における TGF- β 1 5 μ g/ml 刺激 48 時間後の EMT の誘導解析
 - 刺激後、細胞形態は紡錘形に変化した。
 - 刺激後、CRK 過剰発現させていない A549 細胞と比較して CRKII 過剰発現 A549 細胞株では E-cadherin mRNA 及び蛋白の発現は著明に低下し、Vimentin mRNA 及び蛋白の発現が増加した。
- ⑤ CRKII 過剰発現 A549 細胞株ではコントロール細胞及び CRKI 過剰発現細胞株と比較して Rac 活性が増加していた。
- ⑥ CRKII 過剰発現 A549 細胞株ではコントロール細胞及び CRKI 過剰発現細胞株と比較して以下のことが示された。
 - MMP-9 の発現が増加した。
 - 運動能が増加した。
 - 浸潤能が増加した。

以上の結果から CRKI/II は特発性肺線維症の II 型肺胞上皮に強く発現していることがわかった。また、*in vitro* の検討から、TGF- β 存在下では CRKII 過剰発現によって EMT 誘導が強くなり起こることがわかった。特発性肺線維症の肺内において TGF- β が多く存在していることを合わせ考えると、肺胞上皮における CRKII 発現の制御が病態の進展を制御でき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 9 件)

1. Kanno H, Nishihara H, Hara K, Ozaki Y, Itoh T, Kimura T, Tanino M, Tanaka S. A case of lymphoplasmacyte-rich meningioma of the jugular foramen. *Brain Tumor Pathol.* 2011, Oct;28(4):341-5. (査読あり)
2. Kohsaka S, Sasai K, Takahashi K, Akagi T, Tanino M, Kimura T, Nishihara H, Tanaka S. A population of BJ fibroblasts escaped from Ras-induced senescence susceptible to transformation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011. Jul 15;410(4):878-84. (査読あり)
3. Tanino M, Kohsaka S, Kimura T, Tabu K, Nishihara H, Sawa H, Kawami H, Kamada

H, Shimizu M, Tanaka S. A case of clear cell variant of solid-pseudopapillary tumor of the pancreas in an adult male patient. *Ann Diagn Pathol.* 2011. Mar 9. (査読あり)

4. Takahashi K, Nishihara H, Katoh M, Yoshinaga T, Mahabir R, Kanno H, Kimura T, Tanino M, Ikeda J, Sawamura Y, Nagashima K, Tanaka S. Case of atypical teratoid/rhabdoid tumor in an adult, with long survival. *Brain Tumor Pathol.* 2011, Feb;28(1):71-6. (査読あり)

[学会発表] (計 41 件)

1. 谷野美智枝, Roshan Mahabir, Elimansri Aiman, 木村太一、西原広史、津田真寿美、白土博樹、伊東民雄、田中伸哉 神経膠芽腫細胞株における放射線照射による EMT 様変化の誘導 第 104 回北海道癌談話会 2011.9. 17 札幌 (札幌医大)
2. S Tanaka, S Kohsaka, L Wang, H Kanno, K Takahashi, T Kimura, M Tanino, H Nishihara, K Nagashima Analysis of expression mechanism of MGMT in glioblastoma The 7th Asia Pacific Congress (APIAP 2011) 2011.5.20-5.24 Taipei, Taiwan
3. M. Tanino, L. Wang, T. Kimura, H. Nishihara, M. Tsuda, Y. Matsuno, K. Okamoto, S. Yano, S. Tanaka Involvement Of Adaptor Protein Crk In Malignant Features Of Human Mesothelioma ATS (American Thoracic Society) 2011 2011.5.13-5.18 Denver, Colorado, USA
4. 谷野美智枝, 中村絃子、木村太一、大塚紀幸、深澤雄一郎、西川祐司、池田健、西原広史、田中伸哉 肺静脈閉塞症における増殖因子の関与 第 100 回日本病理学会 2011.4.28-4.30 横浜 (パシフィコ横浜)
5. 谷野美智枝, ロシヤン・マハビール、菅野宏美、鈴木宏明、山城勝重、木村太一、西原広史、丸川活史、松野吉宏、田中伸哉 放射線治療後 7 年間生存し得た原発性悪性心膜中皮腫の一例 第 99 回日本病理学会 2010.4.27-4.29 東京 (京王プラザホテル)

[その他]

ホームページ等

<http://patho2.med.hokudai.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷野 美智枝 (Tanino Mishie)
北海道大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：90360908

(2) 研究分担者

田中 伸哉 (Tanaka Shinya)
北海道大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：70261287

(3) 研究分担者 (平成 21 年度のみ)

別役 智子 (Betsuyaku Tomoko)
北海道大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号：6033605