

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790762

研究課題名（和文）膜脂質の酸化がカベオラの動態および肺線維化に与える影響

研究課題名（英文）Regulation of fibrotic process and dynamics of caveolae by oxidized lipid

研究代表者

久田 修 (HISATA SHU)

東北大学・高等教育開発推進センター・助教

研究者番号：60466571

研究成果の概要（和文）：

肺における脂質の線維化調節機構を検討する中で、核内受容体の肝臓 X 受容体 (LXR) に対する生理的・合成リガンドが抗線維化作用を示す事を新たに見出した。すでに線維化調節への関与が知られている核内受容体 PPAR γ を介さない経路で、作用を示すと考えられた。また、SMAD のリン酸化や核移行には影響を与えずに、抗線維化作用を示すと考えられた。これらの結果は、肺における脂質の線維化調節機構の解明につながると共に、新たな治療薬開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：

We first showd that natural and synthetic ligands for Live X receptors (LXRs) have anti-fibrotic effects in human lung fibroblast. LXR agonists showed anti-fibrotic effects independently of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ . LXR agonists did not inhibit Smad2/3 phosphorylation and nuclear transport. LXR agonists have novel and potent anti-fibrotic effects in human lung fibroblasts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：線維化、脂質、酸化、核内受容体、肝臓 X 受容体

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症患者の肺組織では、特殊な膜構造であるカベオラの機能異常を有する事が報告されている。カベオラは、コレステ

ロール、グリコスフィンゴミエリン、グリコスフィンゴリピッドなどの脂質が濃縮した構造をとり、多くのシグナル伝達に関わる蛋白が集積をしている。本研究では、活性酸素

種による脂質の質的・量的変化が、カベオラの構造変化につながり、肺の線維化に関与するのではないかと、という仮説の元に実験を行った。

培養細胞に酸化コレステロールを加え変化を調べた実験では、カベオラの主要構成蛋白であるカベオリン1の動態に変化を認めなかった。また、カベオラ分画の単離が技術的に困難である事などから、カベオラの動態変化に関しては、当初予定していたような研究が進まなかった。

そこで、酸化コレステロールを生理的リガンドとする核内受容体群に焦点を移し、生体内脂質と線維化制御に関して検討を行った。

2. 研究の目的

酸化脂質の核内受容体を介した線維化調節機構を解明する。

3. 研究の方法

ヒト肺胎児線維芽細胞 (MRC5) を実験に用いた。MRC5 に TGFβ を加える事により、筋線維芽細胞に分化させ、肺線維化のモデルとした。

上記の系に、PPARα、β、γ、LXR 合成アゴニスト、および酸化コレステロールなどの生理的リガンドを加え、線維化に与える影響をウェスタンブロッティング法により検討をした。

4. 研究成果

(1) 最初に、PPARα、β、γ、LXR 合成アゴニストの線維化抑制能を確認した。MRC5 に TGFβ と共に各種アゴニストを加えて、筋線維芽細胞の指標であるα-SMA をウェスタンブロッティング法で測定をした。その結果、すでに報告がある PPARγアゴニストに加えて、合成 LXR アゴニストである T0901317 もα SMA の発現を低下させた (図 1)。

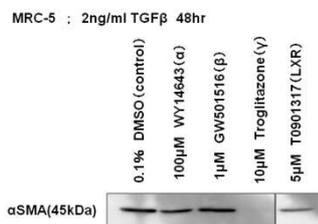


図1、PPARα、β、γ、LXR合成アゴニストによるTGFβ誘導筋線維芽細胞分化の抑制効果。

(2) 次に、T0901317 の量をふり、TGFβ により誘導されるα SMA を定量した所、用量依存的に発現が抑制された (図 2)。さらに、生理

的 LXR アゴニスト 22(R)-hydroxycholesterol、22(S)、25-epoxycholesterol を用いて同様にα SMA の発現を定量した。その結果、22(R)-hydroxycholesterol は、用量依存的にα SMA の発現を抑制した (図 3)。一方、22(S)、25-epoxycholesterol は、わずかにしかα-SMA の発現を抑制しなかった (図 4)。

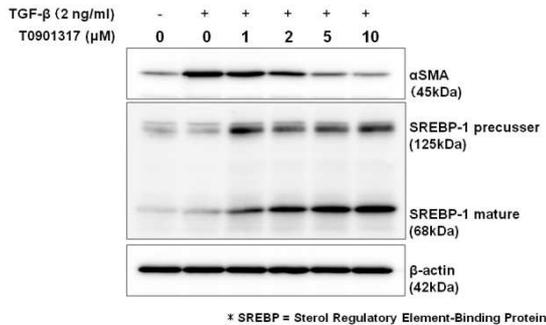


図2、合成LXRアゴニストT0901317によるTGFβ誘導筋線維芽細胞分化の抑制

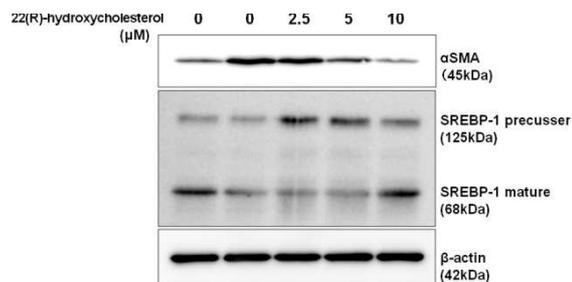


図3、生理的LXRアゴニスト22(R)-hydroxycholesterolによるTGFβ誘導筋線維芽細胞分化の抑制

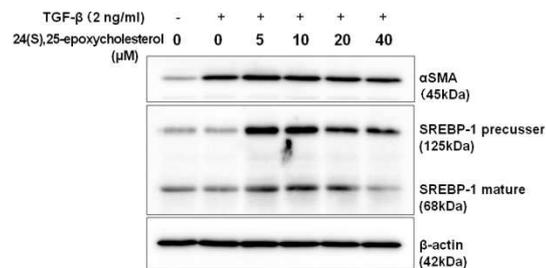
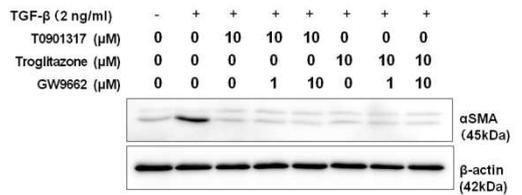


図4、生理的LXRアゴニスト24(S),25-epoxycholesterolによるTGFβ誘導筋線維芽細胞分化の抑制

(3) 以前の報告で、PPARγアゴニストが抗線維化作用を示す事が知られている。そこで、PPARγの関与を調べるために、PPARγ不可逆的アンタゴニストGW9662で前処理した後に、TGFβとT0901317を加え、αSMAの発現を測定した。その結果、GW9662はLXRのαSMA抑制効果を阻害しなかった事から、LXRアゴニストの抗線維化作用は、PPARγを介さない事が示された (図 5)。



*GW9662: 細胞透過性を有する選択的かつ不可逆的なPPARγアンタゴニスト。IC₅₀ = 3.3 nM

図5. T0901317による筋線維芽細胞分化抑制におけるPPARγの関与

(4) 次に、LXR アゴニストが TGF β による SMAD のリン酸化を阻害するかを検討した。TGF β に加えて、T0901317 を加え、SMAD2, 3 のリン酸化、および核移行を検討した。その結果、LXR アゴニストは、SMAD のリン酸化と核移行に影響を与えなかった (図 6)。この結果から、LXR アゴニストは、SMAD リン酸化阻害を介さない経路で、抗線維化作用を示すと考えられた。

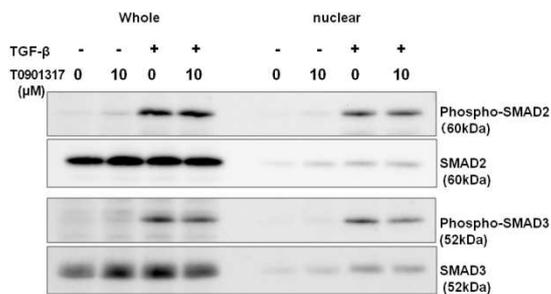


図6. T0901317のSMADリン酸化への影響

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 3 件)

- ①Ebina M, Taniguchi H, Miyasho T, Yamada S, Shibata N, Ohta H, Hisata S, Ohkouchi S, Tamada T, Nishimura H, Ishizaka A, Maruyama I, Okada Y, Takashi K, Nukiwa T. Gradual Increase of HighMobility Group Protein B1 in the Lungs after the Onset of Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Pulmonary Medicine (査読あり) : on line (<http://www.hindawi.com/journals/pm/>), 2011
- ②Hisata S, Kimura Y, Shibata N, Ono S, Kobayashi T, Chiba S, Ohta H, Nukiwa T, Ebina M. A Normal Range of KL-6/MUC1 Independent of Elevated SP-D Indicates a Better Prognosis in the Patients with

Honeycombing on High-Resolution Computed Tomography. Pulmonary Medicine (査読あり) : on line

(<http://www.hindawi.com/journals/pm/>), 2011

- ③Ebina M, Shibata N, Ohta H, Hisata S, Tamada T, Ono M, Okaya K, Kondo T, Nukiwa T. The disappearance of subpleural and interlobular lymphatics in idiopathic pulmonary fibrosis. Lymphatic Research and Biology (査読あり) , 8(4) : 199-207, 2010

[学会発表] (計 13 件)

- ①Shu HISATA, Yuichiro KIMURA, Shuichi ONO, Makoto KOBAYASHI, Toshihiro NUKIWA, Masahito EBINA. A normal range of KL-6/MUC1 independent of elevated SP-D indicates a better prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. European Respiratory Society, 2010/9/22, バルセロナ (スペイン)
- ②Shu HISATA, Yuichiro KIMURA, Shigeki CHIBA, Kyouko ABE, Hiromitsu OHTA, Toshihiro NUKIWA, Masahito EBINA. Elevation of serum level of SP-D with normal range of KL-6 predicts a good prognosis of patients with honeycomb lesions on HRCT. American Thoracic Society International Conference, 2010/5/17, ニューオーリンズ (USA)
- ③Shu HISATA, Yuichiro KIMURA, Toshihiro NUKIWA, Masahito EBINA : Elevation of serum surfactant protein D (SP-D) level predicts the early stage of honeycomb lesions on HRCT, APSR , 2009/11/16, 韓国 (ソウル)
- ④久田修、椎原淳、東條裕、海老名雅仁、貫和敏博 : びまん性に血管気管支束周囲に浸潤影を認めた一例 : 2011/02/22、第 3 回呼吸器病態学セミナー (仙台)
- ⑤久田修、阿部恭子、玉田勉、海老名雅仁、貫和敏博 : 労作時呼吸困難を呈するシェーグレン症候群の一例 : 2011/02/05、第 12 回膠原病肺疾患研究会 (仙台)
- ⑥久田修、阿部恭子、玉田勉、福原達郎、海老名雅仁、貫和敏博 : 抗原隔離後も進行したゼオライトによる肺傷害の一例 : 2010/11/20、第 12 回東北びまん性肺疾患研究会 (仙台)
- ⑦久田修、海老名雅仁、貫和敏博 : KL-6 は胸部網状陰影の予後予測に有用である : 2010/08/20 第 1 回びまん性肺疾患バイオマーカー研究会 (東京)
- ⑧久田修、中村雅彦、阿部恭子、玉田勉、海老名雅仁、貫和敏博 : 視野欠損で発見されゲフィチニブが著効した肺癌の一例

: 2010/02/20 第 190 回内科学会地方会 (仙台)

- ⑨久田修、阿部恭子、玉田勉、海老名雅仁、貫和敏博：著明な咳嗽を主訴に GGO を指摘された一症例：2009/10/03 第 10 回東京びまん性肺疾患研究会 (東京)
- ⑩久田修、海老名雅仁、千葉茂樹、阿部恭子、木村雄一郎、谷口博之、太田洋充、大河内眞也、貫和敏博：早期診断と生存期間の予測からみた血清バイオマーカー SP-D と KL-6 の有用性と限界：2009/11/6 第 80 回間質性肺疾患研究会 (東京)
- ⑪久田修、福原達朗、中村敦、海老名雅仁、貫和敏博：人工弁機能不全と肺のすりガラス影との関連が疑われた一例：2009/09/12 第 89 回呼吸器学会 (福島)
- ⑫森戸正顕、久田修、阿部恭子、玉田勉、井上彰、海老名雅仁、貫和敏博：意識消失で発見された SIADH 合併肺小細胞癌の 1 例：2009/08/01 第 48 回日本肺癌学会東北支部会 (郡山)
- ⑬久田修、玉田勉、海老名雅仁、石井智徳、貫和敏博：季節性気管支喘息から急速に進行した Churg-Strauss 症候群の一例：2009/07/11 第 9 回膠原病肺研究会 (仙台)

[図書] (計 5 件)

- ① 久田修、貫和敏博：わが国のガイドライン、間質性肺疾患診療マニュアル、16-17、2010 年、南江堂
- ② 久田修、貫和敏博：膠原病に伴う肺疾患、病気と薬パーフェクト BOOK2011、870-872、南山堂
- ③ 久田修、貫和敏博：分子標的薬と薬剤性肺障害、コンセンサス癌治療 9：108-110、2009
- ④ 久田修、海老名雅仁、貫和敏博：間質性肺炎の臨床経過、総合臨床 58(4)：710-715、2009
- ⑤ 久田修、貫和敏博：特発性肺線維症の急性増悪、ICU と CCU34(1)：3-10、2010

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久田 修 (HISATA SHU)
東北大学・高等教育開発推進センター・助教
研究者番号：60466571

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：