

平成 23 年 5 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790764

研究課題名 (和文) 間質性肺炎急性増悪の発生機序の解明。線維化肺では上皮のバリアが低下する。

研究課題名 (英文) Investigation of mechanism of acute exacerbation of interstitial pneumonia. Alveolar barrier dysfunction was observed in fibrotic lung

研究代表者

太田 洋充 (OHTA HIROMITSU)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40451562

研究成果の概要 (和文)：

肺炎、心不全やARDSなどの疾患の原因の一つとして肺胞上皮細胞間のバリアの破綻があげられる。ブレオマイシンによる肺障害モデルで、claudin やその他のタイトジャンクションに関連するタンパクの発現変化を観察した。タイトジャンクションに関連するタンパクは概ね低下したが、特に、claudin-5、claudin-18 の発現の低下が顕著であった。また、これらの claudin の発現を抑制する因子として、TGF- β であると予想した。実際、培養細胞を TGF- β で刺激すると、上皮細胞・内皮細胞で細胞間結合に関係するタンパクの発現が低下した。

研究成果の概要 (英文)：

One of the pathological change of pneumonia, heart failure, and ARDS is thought to be a failure of barrier function of alveolar epithelial cells. We used bleomycin-induced pulmonary fibrosis model. After administration of bleomycin, expressions of tight junction-related proteins, especially claudin-5 and claudin-18 were down-regulated. We also analyzed the influence of transforming growth factor- β (TGF- β), a critical mediator of pulmonary fibrosis on tight junctions *in vitro*. The addition of TGF- β disrupted expressions of claudins. These results suggest that bleomycin-induced lung injury causes pathogenic alterations in tight junctions and that such alterations seem to be induced by TGF- β .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
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：内科臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：間質性肺炎、肺障害、ARDS タイトジャンクション

1. 研究開始当初の背景

(1) 上皮細胞のバリアとタイトジャンクション 多細胞生物では体内の環境はいくつかのコンパートメントに分離されておりこの恒常性が維持されることが体内の器官の機能に重要と考えられる。特に上皮細胞では内腔と外腔の境界にタイトジャンクションが形成されており、コンパートメント間のバリア機能を担っている。

(2) 肺胞上皮のバリア機能と間質性肺炎の急性増悪

肺炎、心不全、また、ARDS などの疾患では、急速に肺胞腔内へ液体の漏出をきたし肺胞を充満することにより急性の呼吸不全をきたす。肺胞のバリア機能の低下の原因として I 型肺胞上皮細胞の脱落や water channel や Na channel、Na/K/ATPase 等のポンプ機能の低下、さらに肺胞上皮細胞間の結合の低下が考えられる。タイトジャンクションの機能の低下は air-fluid barrier の低下を意味し急性呼吸不全の病態形成に関わっている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

(1) マウスの肺に claudin を発現させることによりブレオマイシンによる肺障害とその後の線維化を軽減できるかを検討する。

(2) ブレオマイシンによる肺障害時に変化する細胞接着分子をマイクロアレイ等により網羅的に検討する。

(3) 肺胞上皮に強く発現している claudin-18 に対してノックアウトマウスを作成し肺胞の構造と維持に対する影響を検討する。

3. 研究の方法

(1) マウス肺 (in vivo) における claudin の発現パターンの検討。

① マウス肺における mRNA の発現の検討
マウス肺における claudin とタイトジャンクション関連タンパクの発現を検討するために、wild のマウス肺を採取し mRNA を回収、Northern blotting とおこなった。また、Northern blotting で発現が確認されたものについては、Real time PCR を行い、発現の程度を確認した。

② マウス肺における免疫染色による claudin 発現パターンの検討
Northern blotting において発現が確認された claudin について免疫染色を用いて発現部位を確認する。

(2) ブレオマイシンによるマウス肺線維症モデル

ブレオマイシンを腹腔内投与することにより肺線維症モデルを作成。
ブレオマイシンを 1 日目、3 日目、5 日目、7

日目に投与し肺線維症のマウスモデルを作成する。

作成したマウス肺について、タイトジャンクション関連タンパクの発現を免疫染色、western blotting、real time PCR などの手法を用いて解析する。

(3) TGF- β のタイトジャンクションに対する影響

肺の障害から線維化の過程において TGF- β が重要な働きをしていることはよく知られた事実である。TGF- β による、上皮細胞と内皮細胞のタイトジャンクションに対する影響を検討する。

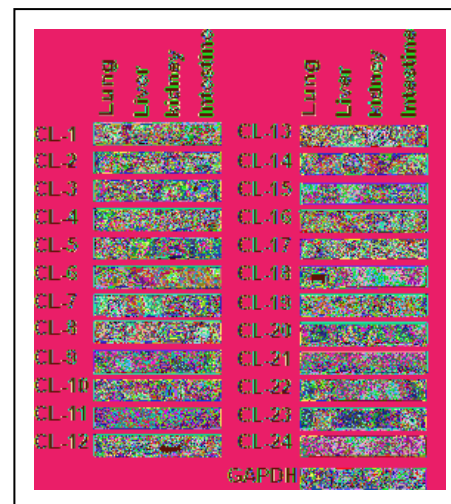
(4) マウス肺より肺胞上皮細胞を分離し一次培養を行う。

肺胞上皮細胞の培養細胞株では、claudin-18 の発現が確認されなかった。そのため、マウス肺より肺胞上皮細胞を分離し、一次培養を行った。

4. 研究成果

(1) マウス肺における claudin の発現

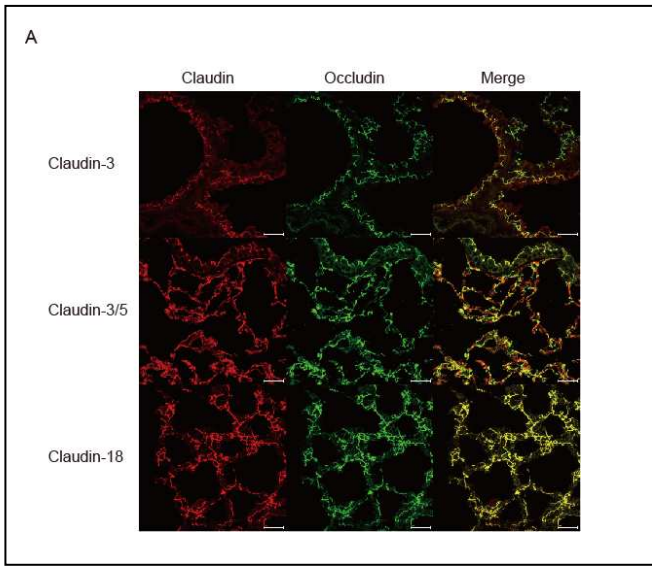
① Northern blotting



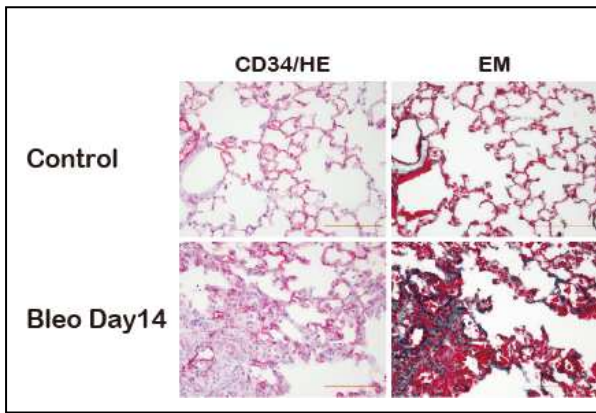
Northern blotting の結果からは、マウスの肺では特に claudin-3、claudin-5、claudin-18 の発現が高い。

② マウス肺免疫染色

Claudin-3、claudin-5、claudin-18 が強く発現しているが、claudin-3 は気道であり、claudin-5 は血管内皮細胞、claudin-18 は肺胞上皮細胞に強く発現している。

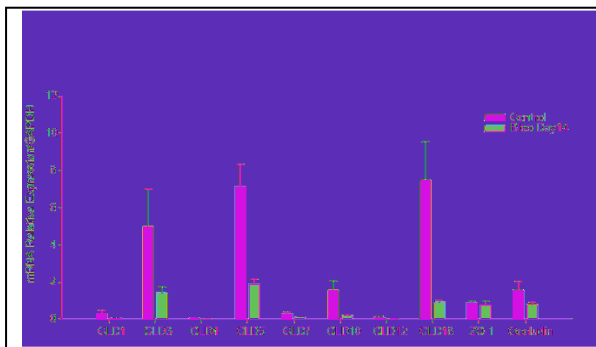


(2) プレオマイシンによるマウス肺線維症モデル

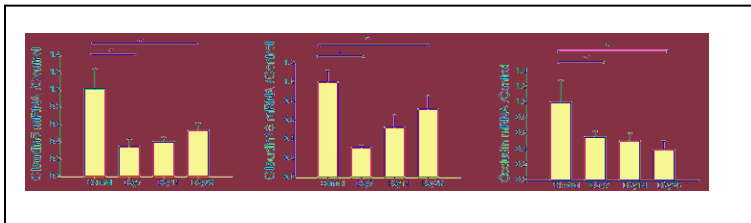


ブレオマイシン腹腔内投与によりブレオマイシン投与後 14 日目には肺に線維化病変が形成される。CD34 で血管を免疫染色したが、線維化病変周囲で血管の消失を認めた。

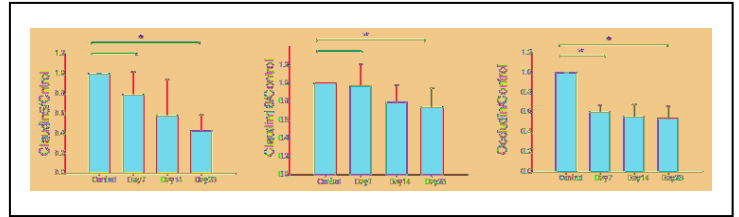
① プレオマイシン投与後のタイトジャンクション関連タンパクの変化



ブレオマイシンの投与により、タイトジャンクション関連タンパクの mRNA が低下する。特に、claudin-3、claudin-5、claudin-18 の mRNA の発現が低下する。

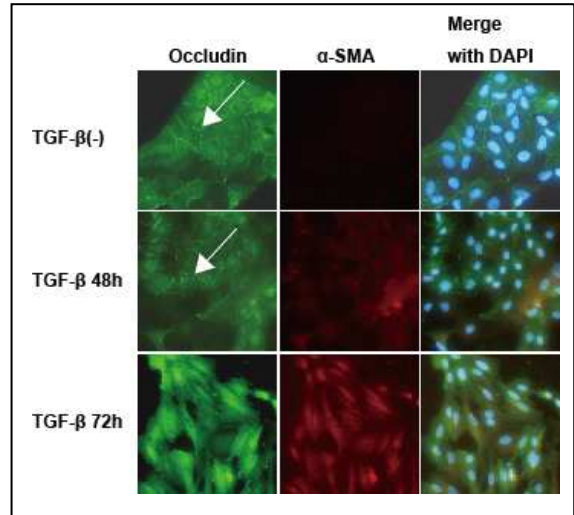


claudin-5, claudin-18 の mRNA は時間とともに回復する。ただし、Occludin の mRNA は claudin の mRNA に比較して長期間、発現の低下が遷延する。

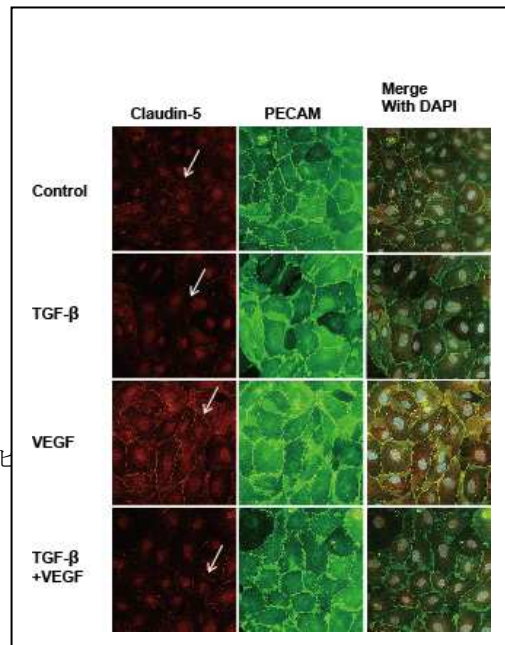


個体差が大きいですが、タンパクレベルでも低下を確認した。

(3) TGF- β のタイトジャンクションに対する影響



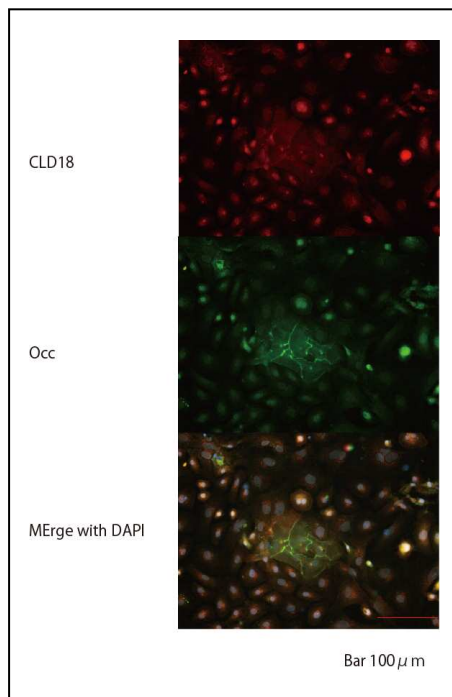
TGF- β で肺胞上皮細胞の培養細胞株である A549 を刺激すると、上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition :EMT) が誘導される。EMT の結果、タイトジャンクション関連タンパクである occludin が消失した。



HUVECs を TGF- β で刺激すると同様に claudin-5 の発現が抑制される。

これらの事実は、上皮細胞、内皮細胞ともにタイトジャンクションが TGF- β によりコントロールされていることを意味する。

(4)マウスの肺胞上皮細胞の分離と一次培養
肺胞上皮細胞の培養細胞株は surfactant protein を産生しない、claudin-18 の発現を認めないなど、性質が変化しており本来の肺胞上皮細胞と異なる。上皮細胞の機能の研究のため、マウス肺から肺胞上皮細胞を分離し一次培養することを目指した。CD45 を利用し negative selection を行い、肺胞上皮細胞を分離した。



分離された肺胞上皮細胞のタイトジャンクションに claudin-18 が発現している。これまでの実験で、マウス肺胞上皮細胞の分離と一次培養の方法をほぼ確立した。今後、さらに、claudin-18 を siRNA による抑制などの実験を行い、肺胞上皮細胞における claudin の機能解析を進める。

これまでの実験の結果、肺で特に発現の高い claudin が claudin-3, claudin-5, claudin-18 であることが判明した。さらに、このうち claudin-18 が肺胞上皮細胞に発現が強かった。さらに、ブレオマイシンによる肺障害時には、タイトジャンクションに関するタンパクの発現が低下することが示された。また、TGF- β は、上皮細胞、血管内皮細胞の両方でタイトジャンクションをコントロールする因子であることが示唆された。しかし、上皮細胞におけるタイトジャンクションの

機能はいまだ不明確であり、実際に claudin-18 の低下が上皮細胞のバリア機能の低下につながるのかは証明されていない。また、タイトジャンクションを修飾することにより、肺障害や肺の線維化が軽減できるかどうかは今後の課題である。

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)

1. Ebina M, Taniguchi H, Miyasho T, Yamada S, Shibata N, Ohta H, Hisata S, Hirota N, Nishimura H, Ishizaka A, Maruyama I, Takashi K, Nukiwa T. Gradual increase of high mobility group protein B1 (HMGB1) in the lungs after the onset of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulmonary Medicine*, 査読有り、2011年、1-9
2. Hisata 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 elevated SP-D indicates a better prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulmonary Medicine*, 査読有り、2011年、1-7
3. Ebina M, Shibata N, Ohta H et. al. The disappearance of subpleural and interlobular lymphatics in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lymphat Res Biol*, 査読有り、1809巻、2010年、176-183

[学会発表] (計 2 件)

1. Hiromitsu Ohta et. al. Lung Cancer in Patients with Pulmonary Fibrosis. American thoracic society International conference, 2010年5月19日、New Orleans
2. Hiromitsu Ohta et. al. Pivotal Roles of Transforming Growth Factor-beta 1 in

Barrier Dysfunction of Alveolar Walls in
Lung Injury Prior to Fibrogenesis,
American thoracic society International
conference, 2009年5月18日、Sandiego

〔図書〕（計0件）

〔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

太田 洋充 (OHTA HIROMITSU)
東北大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：40451562

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：