

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月13日現在

機関番号：12501
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2012
課題番号：23659428
研究課題名（和文） 肺胞形成の分子機構解明と慢性閉塞性肺疾患新規治療法開発への応用
研究課題名（英文） Molecular mechanism of alveolar formation
研究代表者
幡野 雅彦（HATANO MASAHIKO）
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：20208523

研究成果の概要（和文）：

肺胞形成の分子機構についてDA-Raf KOマウスを用いて解析を行った。DA-Raf KOマウスでは新生児期における肺胞隔壁形成とalveolizationが著しく阻害され、この時期に出現する筋繊維芽細胞が認められなかった。本研究によりII型肺胞細胞はDA-RafによりRas-MEKシグナルを抑制し、non-cell autonomousに筋繊維芽細胞への分化を制御することが明らかとなった。今後肺胞における筋繊維芽細胞分化およびDA-Raf/Ras/MEKシグナルによって制御されている因子の解析を進める。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed molecular mechanism of alveolization using DA-Raf KO mice. DA-Raf KO mice have defects in alveolar septum formation and alveolization during neonatal periods. Myofibroblast differentiation was severely blocked in P2~P5 of development in the KO mice. DA-Raf mRNA is highly expressed in type II alveolar epithelial cells (AEII). Lineage trace experiment using SPC-CreER and LacZ floxed mice revealed that AEII cells did not differentiate to myofibroblasts in neonatal periods. Thus, DA-Raf regulates myofibroblast differentiation by suppressing Ras-ERK cascade in non-cell autonomous manner in neonatal period of lung development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：閉塞性肺疾患

1. 研究開始当初の背景

DA-Raf は A-Raf のスプライスバリエントであり Kinase domain を欠いたタンパク質が作られる。そのため A-Raf に対し dominant negative に作用することが in vitro の実験で示されているがその生理的役割についてはわかっていない。そこで申請者らは DA-Raf を特異的に欠損する DA-Raf KO マウスを作成した。DA-Raf KO マウス

は P5 以降肺胞腔の拡張が認められ肺気腫様となった。

一方肺気腫をはじめとする慢性閉塞性肺疾患は罹患率も高く有効な治療法はない。DA-Raf KO マウスが慢性閉塞性肺疾患のモデルマウスとしてその病態解明および治療法の開発に貢献できると期待される。

2. 研究の目的

肺胞形成の分子機構について DA-Raf KO マウスを用いて解析し、慢性閉塞性肺疾患の分子標的療法の可能性について検討する。

3. 研究の方法

(1) DA-Raf KO マウスの肺胞形成過程とその異常について組織学的に解析を行った。また肺における DA-Raf の発現について *in situ hybridization* 法にて解析した。

(2) II 型肺胞上皮細胞の分化系列について追跡するために SPC-CreER ノックインマウス、LacZ floxed マウスを用い P1 よりタモキシフェン投与により II 型肺胞上皮細胞を LacZ でマーク、その分化について筋繊維芽細胞のマーカーである α -SMA など免疫染色し解析した。

(3) DA-Raf は X 染色体上に存在しているため♀ヘテロマウス肺組織では X 染色体不活性化の結果モザイク状態で KO 細胞が存在する。そこで X-linked GFP マウスと交配し DA-Raf 野生型および KO 細胞の筋繊維芽細胞への分化を解析した。

4. 研究成果

(1) 肺胞形成における DA-Raf の役割について DA-Raf KO マウスを用いて解析を行った。DA-Raf KO マウス肺は生後 2 日 (P2) までは野生型と差がないが、P14 では肺気腫様になる。P2 より P14 までの肺胞形成について詳細に解析したところ、DA-Raf KO マウスにおいては P5 から P7 における隔壁形成と alveolization が著しく阻害され、この時期に出現する筋繊維芽細胞 (α -SMA 陽性細胞) が認められなかった。一方 *in situ hybridization* の結果より DA-Raf は II 型肺胞上皮細胞で発現が認められまた正常肺胞形成過程 P2~P14 にかけて DA-Raf 発現が増加することがわかった。また活性型 MEK(P-MEK)抗体による免疫染色の結果この時期には DA-Raf の発現増加とともに Ras-MEK シグナルは抑制されていることがわかった。一方 KO マウスでは Ras-MEK シグナルは活性化されたままであった。また、MEK 阻害剤を新生児 KO マウス胸腔内に注入し肺胞形成について組織学的に解析したところ、隔壁形成が認められた。以上の結果により肺胞形成には DA-Raf による Ras-MEK シグナルの抑制が重要であることが明らかとなった。

(2) 次に筋繊維芽細胞は II 型肺胞上皮細胞から分化するか否かを調べる目的で II 型肺胞細胞を LacZ でマークしその lineage trace を試みた。その結果 LacZ 陽性細胞と α -SMA 陽性細胞の共染色像は認められず、P2~P5 における筋繊維芽細胞は II 型肺胞上皮細胞由来ではないことが確認された。さらに、野生型マウスでは肺胞 PDGFR 陽性細胞より α -SMA 陽性筋繊維芽細胞が分化するが

DA-Raf KO マウスではこの分化が阻害されており、PDGFR 陽性細胞が増加していることが明らかとなった。

(3) DA-Raf は X 染色体上にあり、♀では X 染色体がランダムに不活性化されるため肺においても DA-Raf KO 細胞がモザイク状に存在する。実際 DA-Raf +/- ♀マウスの肺組織を解析したところ肺胞形成が進行して細分化されている部分と肺胞形成がすすんでおらず気腫状になっている部分とが混在していた。また DA-Raf +/-マウスと X 染色体上に GFP を導入した X-linked GFP マウスを掛け合わせ、DA-Raf +/-X-linked GFP ♀マウスを解析し筋繊維芽細胞の lineage を解析した。その結果 DA-Raf +/-X-linked GFP ♀マウスにおいては GFP 陽性 α -SMA 陽性細胞も減少しており野生型細胞からの筋繊維芽細胞への分化も阻害されることが明らかになった。このことは DA-Raf を欠損した II 型肺胞上皮細胞が筋繊維芽細胞への分化を阻害する因子を分泌することが示唆された。

野生型及び KO マウスの II 型肺胞上皮細胞を分離して遺伝子発現をマイクロアレイにて網羅的に解析したところ KO マウス細胞において有為に発現の上昇している分子がいくつか同定され、real time PCR においても発現上昇が確認されている。現在肺胞における筋繊維芽細胞分化および DA-Raf/Ras/MEK シグナルによって制御されている抑制因子の解析をさらに進めている。

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 5 件)

(1) Ito C., Yamatoya K., Yoshida K., Fujimura L., Hatano M., Miyado K., Toshimori K. Integration of the mouse sperm fertilization-related protein equatorin into the acrosome during spermatogenesis as revealed by super-resolution and immunoelectron microscopy. Cell Tissue Res. 2013, In press.

DOI : 10.1007/s00441-013-1605-y. 査読有

(2) Tsuruoka N., Arima M., Yoshida N., Okada S., Sakamoto A., Hatano M., Satake H., Arguni E., Wang J-Y., Yang J-H., Nishikura K., Sekiya S, Shozu M., and Tokuhisa T. ADAR1 protein induces adenosine-targeted DNA mutations in senescent Bcl6 gene-deficient cells. J Biol Chem, 2013, 288; 826-836.

DOI : 10.1074/jbc.M112.365718. 査読有

(3) Huang J., Li X., Kohno K., Hatano M., Tokuhisa T., Murry P.J., Brocker T., Tsuji

M. Generation of tissue-specific H-2Kd transgenic mice for the study of Kd-restricted malaria epitopespecific CD8+ T-cell responses in vivo. *J Immunol Methods*, 2013, 378; 254-261.

DOI: 10.1016/j.jim.2012.10.019. 査読有

(4) Ohnuki H., Inoue H., Takemori N., Nakayama H., Sakaue T., Fukuda S., Miwa D., Nishiwaki E., Hatano M., Tokuhisa T., Endo Y., Nose M. and Higashiyama S. BAZF, a novel component of cullin3-based E3 ligase complex, mediates VEGFR and Notch cross-signaling in angiogenesis. *Blood*, 2012 119: 2688-2698.

DOI : 10.1182/blood-2011-03-345306. 査読有

(5) Seto T., Yoshitake, M., Ogasawara, T., Ikari, J., Sakamoto, A., Hatano, M., Hirata, H., Fukuda, T., Kuriyama, T., Tatsumi, K., Tokuhisa, T., and Arima, M. Bcl6 in pulmonary epithelium coordinately controls the expression of the CC-type chemokine genes and attenuates allergic airway inflammation. *Clin Exp Allergy* 2011, 41:1568-1578.

DOI: 10.1111/j.1365-2222.2011.03836.x. 査読有

[学会発表] (計 20 件)

①渡邊-高野晴子, 幡野雅彦, 坂本明美, 高野和儀, 徳久剛史, 遠藤剛 Ras-ERK カスケードのアンタゴニスト DA-Raf は肺胞形成を制御している 第 8 5 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 16 日、福岡

②寺竹洋一、長谷川勇太、藤村理紗、高野晴子、徳久剛史、幡野雅彦 Nczf disruption results in early embryonic lethality by disregulating p27 expression. 第 3 5 回日本分子生物学会、2012 年 12 月 11 日、福岡

③藤村理紗、坂本明美、有馬雅史、徳久剛史、幡野雅彦 Nitric oxide derived from enteric neurons regulates intestinal barrier function. 第 4 1 回日本免疫学会 2012 年 12 月 7 日 神戸

④飯島裕太、Pan Jing、河野麻仁、有馬雅史、幡野雅彦、徳久剛史、坂本明美 Bcl6 is required for ICOSL expression on activated B cells. 第 4 1 回日本免疫学会 2012 年 12 月 7 日 神戸

⑤Pan Jing、坂本明美、河野麻仁、有馬雅史、幡野雅彦、徳久剛史 A role of Bcl6 in differentiation of memory precursor CD8 T cells. 第 4 1 回日本免疫学会 2012 年 12 月 6 日 神戸

⑥有馬雅史、谷口俊文、藤村理紗、坂本明美、幡野雅彦、徳久剛史 Role of IL-33 in

a suppressive function of Bcl6 for IL-4 production by memory Th2 cells. 第 4 1 回日本免疫学会 2012 年 12 月 5 日 神戸

⑦谷口俊文、坂本明美、幡野雅彦、松本健司、斎藤博久、徳久剛史、有馬雅史 Regulation of SLAM-associated protein in follicular helper T cells by Bcl6. 第 4 1 回日本免疫学会 2012 年 12 月 5 日 神戸

⑧鶴岡信栄、吉田信也、成毛耕儀、有馬雅史、坂本明美、幡野雅彦、王継揚、徳久剛史 Roles of ADAR1 in somatic hypermutation and class switch recombination in germinal center B cells. 第 4 1 回日本免疫学会 2012 年 12 月 5 日 神戸

⑨山本拓也、谷口俊文、稲嶺絢子、藤村理紗、坂本明美、幡野雅彦、徳久剛史、有馬雅史 Phf11 promotes IgE class switch recombination in activated B cells. 第 4 1 回日本免疫学会 2012 年 12 月 5 日 神戸

⑩寺竹洋一、長谷川勇太、藤村理紗、高野晴子、徳久剛史、幡野雅彦 Nczf disruption results in early embryonic lethality by disregulating p27 expression. 第 3 4 回日本分子生物学会、2011 年 12 月 16 日、横浜

⑪藤村理紗、坂本明美、有馬雅史、徳久剛史、幡野雅彦 Ncx 欠損は腸管上皮のバリア異常により腸炎を発症する 第 4 0 回日本免疫学会 2011 年 11 月 28 日 千葉

⑫河野麻仁、坂本明美、Pan Jing、山下公大、稲毛寿美奈、有馬雅史、幡野雅彦、徳久剛史 エフェクターとセントラルメモリーの分化はナイーブ CD4 T 細胞の段階で決定されている 第 4 0 回日本免疫学会 2011 年 11 月 28 日 千葉

⑬稲嶺絢子、有馬雅史、吉田信也、坂本明美、幡野雅彦、岡本美孝、徳久剛史 長期生存型抗体産生細胞分化における IL-21 シグナルの役割 第 4 0 回日本免疫学会 2011 年 11 月 28 日 千葉

⑭花角尚子、稲嶺絢子、小橋優子、高野晴子、藤村理紗、坂本明美、幡野雅彦、徳久剛史、有馬雅史 好塩基球の TH2 サイトカイン遺伝子発現制御における GATA2 の役割 第 4 0 回日本免疫学会 2011 年 11 月 28 日 千葉

⑮小橋優子、稲嶺絢子、稲毛寿美奈、高野晴子、藤村理紗、坂本明美、幡野雅彦、徳久剛史、有馬雅史 樹状細胞による TH2 誘導サイトカイン産生に対する Bcl6 の抑制作用 第 4 0 回日本免疫学会 2011 年 11 月 28 日 千葉

⑯稲毛寿美奈、坂本明美、河野麻仁、Pan Jing、有馬雅史、幡野雅彦、徳久剛史 Bcl6 は DC からの TNF α 産生を抑制することにより TH2

分化を制御する 第40回日本免疫学会
2011年11月28日 千葉

⑰Pan Jing、坂本明美、河野麻仁、稲毛寿美奈、有馬雅史、幡野雅彦、徳久剛史 メモリープリカーサーCD8 T細胞分化におけるBcl6の役割の解析 第40回日本免疫学会
2011年11月28日 千葉

⑱有馬雅史、稲嶺絢子、小橋優子、坂本明美、幡野雅彦、久保允人、徳久剛史 TFH細胞とTH2細胞におけるIL-4は異なる調節機構で産生される 第40回日本免疫学会
2011年11月27日 千葉

⑲鶴岡信栄、有馬雅史、坂本明美、幡野雅彦、徳久剛史 ADAR1はBcl6欠損細胞において体細胞突然変異を誘導する 第40回日本免疫学会 2011年11月27日 千葉

⑳吉田信也、鶴岡信栄、成毛耕儀、有馬雅史、高野晴子、坂本明美、幡野雅彦、徳久剛史 胚中心B細胞のA-T塩基対変異におけるADAR1の役割 第40回日本免疫学会
2011年11月27日 千葉

[図書] (計1件)

Fujimura L. and Hatano M. Role of Prickle1 and Prickle2 in neurite outgrowth in murine neuroblastoma cells. Planar cell polarity methods and protocols. in "Methods in Molecular Biology" Edited by Chen P. and Turksen K. Springer, 173-185, 2012.

[その他]

ホームページ等

<http://www.m.chibau.ac.jp/class/biomedical/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

幡野 雅彦 (HATANO MASAHIKO)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：20208523

(2)研究分担者

有馬 雅史 (ARIMA MASAFUMI)

千葉大学・大学院医学研究院・講師

研究者番号：00202763