

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24日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790915

研究課題名（和文）肺サーファクタント蛋白質Aによる非感染性肺障害の炎症制御

研究課題名（英文）Pulmonary surfactant protein A modulates non-infectious lung injury.

研究代表者

黒沼 幸治（KURONUMA KOJI）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：40563250

研究成果の概要（和文）：非感染性肺障害は炎症性サイトカインの過剰産生により致命的な病態となりうることから、肺サーファクタント蛋白質A(SP-A)の肺保護作用の検討を本研究の目的とした。SP-A 欠損マウスを用いた検討で、ブレオマイシンの経気道投与により、生存率の低下、気管支肺胞洗浄液中の細胞数の増加、炎症性サイトカインの増加を認めた。SP-A はブレオマイシンに直接強く結合し、ブレオマイシンと Toll 様受容体との結合を阻害し、自然免疫機構を制御すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Since non-infectious pulmonary disorders can progress to a fatal clinical condition due to excessive production of inflammatory cytokine, the purpose of this study is to understand the lung protective role of pulmonary surfactant protein A (SP-A). SP-A deficient mice demonstrated the low survival rate, the increase of cell count in bronchoalveolar lavage fluid, and the production of proinflammatory cytokine following the transairway administration of bleomycin. SP-A might control innate immune system by binding to bleomycin strongly and directly, and inhibiting bleomycin from binding to toll-like receptor.

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	3,200,000円	960,000円	4,160,000円

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：非閉塞性肺疾患癌、肺線維症、呼吸器感染症、間質性肺炎

1. 研究開始当初の背景

（1）非感染性肺障害、例えば薬剤性肺障害、放射線肺炎、膠原病合併間質性肺炎、急性呼

吸窮迫症候群の一部、特発性間質性肺炎では原因の如何を問わず、炎症性カスケードの過剰増幅を介し病態が進展した結果、不幸にし

て致死的転帰をとる症例も珍しくない。最近、とくに重篤な薬剤性肺障害の報告は我が国において増加している。

(2) 肺サーファクタントは主に肺胞II型上皮細胞から分泌される脂質と蛋白質の複合体であり、主要な蛋白成分であるサーファクタント蛋白質(SP)-AとSP-Dは肺内での自然免疫制御機構の中心的役割をもつ。

(3) ブレオマイシンを用いた薬剤誘発肺障害動物モデルは、急性肺障害・特発性間質性肺炎モデルとして実験に汎用されている。この肺障害はSP-D遺伝子を欠損したマウスで明らかに肺病変が悪化し、SP-A遺伝子欠損マウスにおいても肺における炎症の増強やアポトーシスの誘導が見られた。申請者らの予備的検討において、SP-A遺伝子欠損マウスにおいても肺病変の悪化・生存率の低下を招いた。したがって、肺サーファクタント分子は、何らかの機序を介してブレオマイシン暴露に対する肺保護作用を有していると考えられる。

(4) 一方、ブレオマイシンが Toll 様受容体(TLR)2 を介して炎症を惹起すること、TLR2 欠損マウスではブレオマイシンによる肺障害が軽症化すること、病原体感染時の肺サーファクタントによる炎症制御が TLR との相互作用に依存するものであることを考慮するならば、「SP-A が示した非感染性肺障害阻止効果もまた TLR を介する機序に基づく」との仮説が成立し、本研究計画の発案に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は非感染性肺障害の発症・増悪過程における肺サーファクタントの生体防御作用機序を明らかにし、さらに分子治療の可能性を追求する事である。具体的には SP-A 遺伝子欠損マウスを用いて肺サーファクタント分子の欠損が肺障害に及ぼす影響

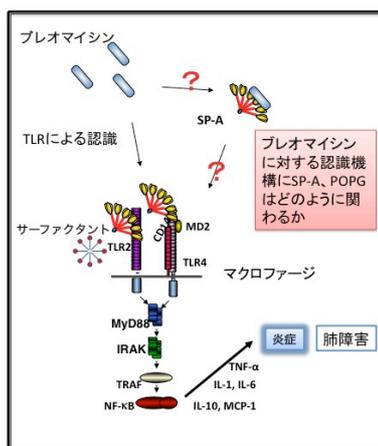
を検討し、自然免疫に関連したサイトカインや遺伝子発現変化も検証する。

3. 研究の方法

(1) マウスブレオマイシン肺障害モデルの作成

経気道投与と皮下投与の2種類のモデルを

作成し、比較検討する。



C57BL6
マウス
(週齢 8
週) 対
してペン
トバルビ

タル腹腔内投与による麻酔下にブレオマイシンをマイクロスプレイヤーを用いて経気管的に肺内投与し、肺障害モデルを作成する。

①ブレオマイシン：野生型マウス(C57BL/6)または SP-A 遺伝子欠損マウスに腹腔麻酔下にブレオマイシン(10mg/kg)を Microsprayer を用いて経気道投与し、1日後に肺組織や BAL 液を回収し検討した。

②アミオダロン：マウスに Alzet-pump を用いてブレオマイシンを持続皮下投与し、21日後に肺組織や BAL 液を回収し検討した。

(2) 薬剤刺激による細胞傷害を検討した。

① SD ラット (週齢 8 週) を腹腔麻酔下に安楽死させ、気管より生理食塩水を注入して肺洗浄し、回収液から肺胞マクロファージを分離し、培養した。細胞をブレオマイシン刺激し、サイトカイン産生量を ELISA で定量した。

② HEK293 細胞に TLR2, CD14, TLR4, MD-2 などの細胞表面受容体の遺伝子を導入し、ルシフェラーゼアッセイ法を用いてブレオマイシンによる NF- κ B の誘導を検討した。

(3) ブレオマイシン、SP-A や受容体との結合を検討した。

①分子間の結合を調べるため、ビアコアを用いてブレオマイシンと TLR2、TLR4 の細胞外ドメイン (sTLR2, sTLR4) を合成した蛋白との結合を検討した。また、ブレオマイシンと SP-A との直接の結合を検討した。

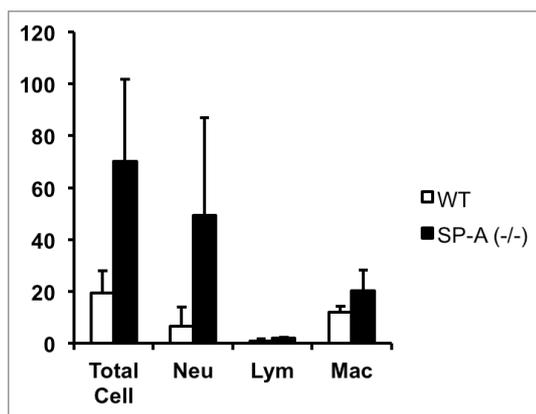
②ブレオマイシンを ELISA プレートに固相し、sTLR2 との結合を検討した。また、その結合が SP-A により阻害されるかどうか調べた。

4. 研究成果

(1) 肺障害モデルを作成した。

SP-A遺伝子欠損マウスでは野生型マウスと比較し、ブレオマイシンの経気道投与により死亡率が高かった。ブレオマイシン投与1日後の肺組織は炎症細胞浸潤を強く認め、BALF中の炎症細胞数や炎症性サイトカインの誘導がSP-A遺伝子欠損マウスで増強していた

(Fig.1)。また、マウスにAlzet-pumpを用いてブレオマイシンを持続皮下投与し、21日後に肺組織やBAL液を回収し検討した。ブレオマイシンの経皮持続投与モデルにおいても、SP-A遺伝子欠損マウスで肺胞隔壁の肥厚や線維化がより強い傾向があり、BALF中の TGF- β 産生も増強していた。

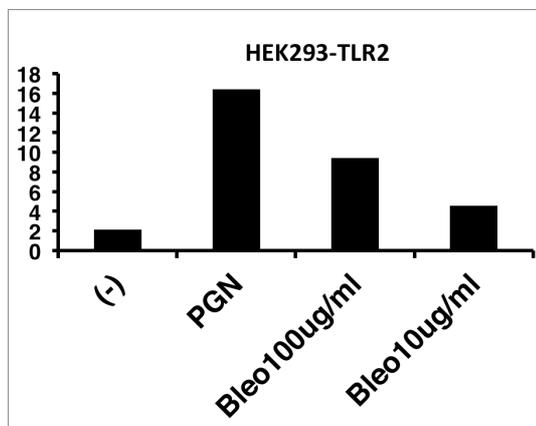


(Fig.1)

(2) ブレオマイシン刺激による細胞傷害を検討した。

①ラット肺胞マクロファージの初代培養細胞にブレオマイシン刺激すると、TNF- α 、IL-1 β 、KC が誘導された。また、その炎症性サイトカインの産生は SP-A により抑制された。

②HEK293細胞に sTLR2 を遺伝子導入し、ブレオマイシン刺激すると NF- κ B が誘導された (Fig.2)。



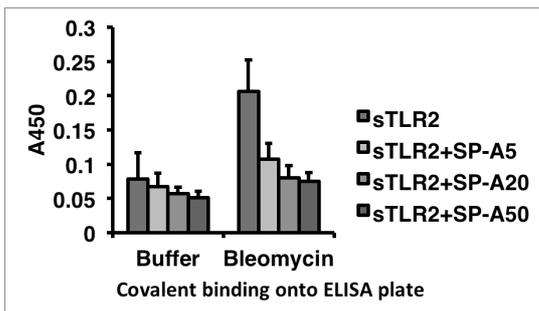
(Fig.2)

(3) ブレオマイシン、SP-A や受容体との結合を検討した。

①ビアコア法を用いて分子間の結合を検討すると、ブレオマイシンは sTLR2 と結合しうることが分かった。またブレオマイシンは SP-A と強く結合した。

②ELISA 法ではブレオマイシンは sTLR2 と結合したが、SP-A によりその結合は阻害

された (Fig.3)。



(Fig.3)

これらの結果は、SP-Aが非感染性肺障害において炎症を制御することにより保護的な役割を有していると考えられた。またその機序としてSP-AがブレオマイシンとTLR2の相互作用を直接阻害することにより、炎症性サイトカイン産生を抑制している可能性が示唆された。SP-Aの保護的な役割を特定できたことは非感染性肺障害の発症阻止や治療において重要な分子基盤となりうる。

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1件)

Pulmonary surfactant protein A protects lung epithelium from cytotoxicity of human β -defensin 3.

Saito A, Ariki S, Sohma H, Nishitani C, Inoue K, Ebata N, Takahashi M, Hasegawa Y, Kuronuma K, Takahashi H, Kuroki Y.

J Biol Chem. 2012 Apr 27;287(18):15034-43.

査読有

[学会発表] (計4件)

① The decrease of surfactant protein D in bronchoalveolar lavage fluid in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and nonspecific interstitial pneumonia.

Nishikiori H, Chiba H, Otsuka M, Kuronuma

K, Takahashi H

European Respiratory Society Annual Congress, 2012 Sep (Vienna, Austria)

② ブレオマイシン誘導肺障害に対するSP-Aの自然免疫制御作用

黒沼幸治、工藤和実、黒木由夫、高橋弘毅

日本呼吸器学会総会 2012年4月(神戸)

③ SP-AによるTLR2を介したブレオマイシン誘導肺障害の制御機構

黒沼幸治、工藤和実、黒木由夫、高橋弘毅

日本肺サーファクタント界面医学会総会 2011年10月(徳島)

④ SP-AによるTLR2を介したブレオマイシン誘導肺障害の制御機構

黒沼幸治、工藤和実、黒木由夫、高橋弘毅

日本呼吸器学会総会 2011年4月(東京)

[図書] (計 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

黒沼 幸治 (KURONUMA KOJI)

札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号：40563250

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：