

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591167

研究課題名(和文)肺サーファクタント蛋白SP-Dの肺線維症における防御的役割

研究課題名(英文)Anti-fibrotic function of Surfactant Protein-D in bleomycin induced lung fibrosis

研究代表者

青野 純典(AONO, Yoshinori)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・非常勤講師

研究者番号：50398004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：血清中SP-D濃度は特発性肺線維症患者における重要なバイオマーカーであるが、肺線維化におけるその役割は不明である。我々は、SP-D産生をコントロールできるマウスを用いてブレオマイシン(BLM)誘発肺線維症モデルを作成した。SP-D産生マウスと比較しSP-D非産生マウスにてBLM誘発肺線維化が顕著であり、肺胞洗浄液中増殖因子(TGF- β 、PDGF)の著明な上昇がみられた。SP-D非産生下BLM刺激にて肺でのマクロファージ、fibrocyteの著明な増加と同細胞からの増殖因子産生増加を認めた。以上からSP-Dがこれらの細胞活性を制御することにより肺線維化を制御している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Serum SP-D concentration is an important biomarker in patients with idiopathic pulmonary fibrosis, but its role in lung fibrosis is unknown. We examined the role of SP-D in bleomycin (BLM) induced pulmonary fibrosis model using SP-D conditional mice. BLM-treated SP-D off mice had increased lung fibrosis compared to SP-D on mice. SP-D deficiency also increased macrophage and fibrocyte-dominant cell infiltration and the expression of growth factors (TGF-beta, PDGF) from the cells in the lung of BLM treated mice. These data suggest that alveolar SP-D regulates numbers of macrophages and fibrocytes in the lungs, growth factor expression, and fibrotic lung remodeling in response to BLM injury

研究分野：呼吸器

キーワード：SP-D 増殖因子 肺線維症 fibrocyte マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

Surfactant protein (SP)-D は、SP-A およびマンノース結合レクチン (MBL) とともに Ca^{2+} 依存性に糖質に結合する C 型レクチンのコレクチン・サブグループに属しており、肺の自然免疫において重要な役割を担っている。コレクチンは、異物と結合してオプソニンとして働き白血球による取り込みを促進したり、病原体に結合してこれを凝集させ排除させるなどの働きがある。さらに Toll-like receptor (TLR)-2、TLR-4、CD14、signal inhibitory regulatory protein- α (SIRP- α) などに結合し NF- κ B を介してサイトカインの発現を制御していることが知られている。

一方で血清中 SP-D、SP-A 濃度は特発性肺線維症 (Idiopathic pulmonary fibrosis ; IPF) 患者における重要な biomarker として用いられており、さらに血清中 SP-D、SP-A 濃度が IPF の予後と相関するという報告もある。BLM モデルにおいて、SP-D ノックアウトマウスは wild type (WT) と比較し生存率が低下し、炎症細胞浸潤の増加と Nitric oxide (NO) 産生の増加により線維化が悪化することが報告されている。BLM をはじめとする急性肺損傷モデルにおいて SP-D が炎症反応を抑制することはすでに報告されているが、線維化期におけるその役割は不明である。

2. 研究の目的

SP-D が炎症反応抑制のみならず線維化期における fibrotic mediator の制御を介して肺線維化を抑制していると考え、bleomycin (BLM) 誘発肺線維化における SP-D の役割について増殖因子の制御を中心に検討した。

3. 研究の方法

iSP-D マウスと呼ばれる tet on system を利用した Dox 投与下に SP-D を産生する FVB/N バックグラウンドのコンディショナルマウスを使用した。

BLM (100U/kg/body) を 1 週間かけ持続皮下投与することにより、day35 を線維化のピークとする比較的慢性に進行する肺線維症モデルを作成した。Day35 にマウスを sacrifice し、組織学的な肺線維化評価ならびに sircol collagen assay を用いた肺コラーゲン含有量の測定を行った。1 週間おきに気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage; BAL) 施行し、細胞分類を行った。BLM 刺激マウス肺 digestion に対し抗 collagen-1 抗体、抗 CXCR4 抗体、抗 CD45 抗体による 3 重染色施行後、フローサイトメトリーを用いてマウス肺における fibrocyte 数を検討した。Fibrocyte が骨髄由来細胞であることを確認するために GFP マウス骨髄を移植した SPDKO マウスならびに wild マウスを作製し、BLM 誘

発肺線維症モデル肺における骨髄由来線維芽細胞の数を免疫組織染色にて検討した。外来性 SP-D 補充療法による抗線維化作用の検討のため BLM 刺激 SP-D ノックアウトマウスに対し、経気管的に rat SP-D 2 μ g を週 2 回投与し、day28 に肺線維化の組織学的な検討を行った。

4. 研究成果

(1) SP-D非存在下におけるBLM誘発肺線維化の組織学的検討

Day35におけるBLM刺激iSP-Dマウス肺組織切片の組織学的な検討において、Dox on (SP-D on) 群にて胸膜直下優位な線維化を認めるもDox off (SP-D off) 群にてその線維化はより顕著であった。コラーゲンアッセイにて同様にDox off (SP-D off) 群にて肺含有コラーゲン量の有意な増加がみられた。

(2) SP-D非存在下におけるBLM刺激マウス肺への炎症細胞浸潤ならびにサイトカイン産生の検討

BLM刺激iSP-Dマウスに対し経時的にBALを施行し、SP-Dの有無による肺への炎症細胞浸潤の違いを検討した。Dox on (SP-D on) 群と比較しDox off (SP-D off) 群にてBAL液中総細胞数の増加がday7よりみられday21をピークにday28まで持続していた。細胞分類にてマクロファージ、好中球、リンパ球ともにDox off (SP-D off) 群にて有意な増加を認めたが、その増加はマクロファージが最も顕著でありさらに泡沫マクロファージを多数含んでいた。ELISAを用いてBAL液中の各種サイトカイン量を測定したところ、炎症性サイトカインに関しては顕著な変化がみられなかった一方で、BLM刺激後のDox off (SP-D off)群にてtotal TGF- β 1とPDGF-AAの著明な上昇がみられた。

(3) SP-Dの有無における肺胞マクロファージからの増殖因子産生変化の検討

BLM刺激マウス肺組織を用いた免疫化学染色にてマクロファージからのTGF-、PDGF-A発現を確認した。マウス肺胞マクロファージ培養液中のTGF- を測定したところSP-D非産生下のマクロファージからのTGF- 産生増加がみられた。

(4) SP-D非存在下での肺におけるfibrocyte数の検討

フローサイトメトリーを用いてBLM刺激マウス肺におけるcollagen-1 + CXCR4 + CD45 + fibrocyteの数を検討したところ、day14から21にかけてSP-D非産生群にて肺におけるfibrocyteの占める割合が有意に増加していた。またBLM刺激マウス肺から分離したfibrocyteに対し、real time PCRを用いてケモカインレセプターを検討したところ、SP-D非産生下fibrocyteにて、肺への遊走に最も重要とされるSDF-1のレセプターであるCXCR4 mRNAの発現が著明に増

加していた。同時にTGF- β 1 mRNAの発現の亢進もみられた。

(5) SP-D非存在下でのBLM誘発肺線維症モデルにおける骨髄由来肺線維芽細胞数変化の検討

BLM刺激GFP骨髄移植マウス肺の免疫組織染色にてwildマウスと比較しSPDKOマウス肺ではGFP+FSP-1+cell (骨髄由来線維芽細胞; fibrocyte)が有意に増加していた。

(6) 外来性SP-D添加によるSPDKOマウスにおけるBLM誘発肺線維化の抑制効果の検討

BLM刺激SPDKOマウスに経気管的にSP-Dを投与したところ肺線維化を有意に抑制した。

以上からSP-Dは肺泡マクロファージならびにfibrocyteの活性化による増殖因子産生を制御することにより肺線維化を抑制してい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14件)

Tezuka T, Ogawa H, Azuma M, Goto H, Uehara H, Aono Y, Hanibuchi M, Yamaguchi Y, Fujikawa T, Itai A, Nishioka Y, IMD-4690, a novel specific inhibitor for plasminogen activator inhibitor-1, reduces allergic airway remodeling in a mouse model of chronic asthma via regulating angiogenesis and remodeling-related mediators. *PLoS One*. 2015 Mar 18;10(3):e0121615. 査読有

Aono Y, Kishi M, Yokota Y, Azuma M, Kinoshita K, Takezaki A, Sato S, Kawano H, Kishi J, Goto H, Uehara H, Izumi K, Nishioka Y. Role of platelet-derived growth factor/platelet-derived growth factor receptor axis in the trafficking of circulating fibrocytes in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2014 Dec;51(6):793-801. 査読有

Ogawa H, Ledford JG, Mukherjee S, Aono Y, Nishioka Y, Lee JJ, Izumi K, Hollingsworth JW. Surfactant protein D attenuates sub-epithelial fibrosis in allergic airways disease through TGF- β . *Respir Res*. 2014 Nov 29;15(1):143-149. 査読有

Sato S, Hanibuchi M, Fukuya A, Yabuki Y, Bando H, Yoshijima T, Goto H, Ogawa H, Nishioka Y. Idiopathic

pleuroparenchymal fibroelastosis is characterized by an elevated serum level of surfactant protein-D, but Not Krebs von den Lungen-6. *Lung*. 2014 Oct;192(5):711-717. 査読有

Goto H, Mitsuhashi A, Nishioka Y. Role of surfactant protein A in non-infectious lung diseases. *J Med Invest*.

2014;61(1-2):1-6. 査読有

Toyoda Y, Tabata S, Kishi J, Kuramoto T, Mitsuhashi A, Saijo A, Kawano H, Goto H, Aono Y, Hanibuchi M, Horikawa H, Nakajima T, Furukawa T, Sone S, Akiyama S, Nishioka Y. Thymidine phosphorylase regulates the expression of CXCL10 in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *Arthritis Rheumatol*. 2014 Mar;66(3):560-568. 査読有

Nishioka Y, Azuma M, Kishi M, Aono Y. Targeting platelet-derived growth factor as a therapeutic approach in pulmonary fibrosis. *J Med Invest*. 2013;60(3-4):175-183. 査読有

Kinoshita K, Aono Y, Azuma M, Kishi J, Takezaki A, Kishi M, Makino H, Okazaki H, Uehara H, Izumi K, Sone S, Nishioka Y. Antifibrotic effects of focal adhesion kinase inhibitor in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013 Oct;49(4):536-543. 査読有

Huang J, Tabata S, Kakiuchi S, The Van T, Goto H, Hanibuchi M, Nishioka Y. Identification of pregnancy-associated plasma protein A as a migration-promoting gene in malignant pleural mesothelioma cells: a potential therapeutic target. *Oncotarget*. 2013 Aug;4(8):1172-1184. 査読有

Abe S, Morita Y, Kaneko MK, Hanibuchi M, Tsujimoto Y, Goto H, Kakiuchi S, Aono Y, Huang J, Sato S, Kishuku M, Taniguchi Y, Azuma M, Kawazoe K, Sekido Y, Yano S, Akiyama S, Sone S, Minakuchi K, Kato Y, Nishioka Y. A novel targeting therapy of malignant mesothelioma using anti-podoplanin antibody. *J Immunol*. 2013 Jun 15;190(12):6239-6249. 査読有

Sato S, Hanibuchi M, Kuramoto T, Yamamori N, Goto H, Ogawa H, Mitsuhashi A, Van TT, Kakiuchi S, Akiyama S, Nishioka Y, Sone S. Macrophage stimulating protein promotes liver metastases of small cell lung cancer cells by affecting the organ microenvironment. *Clin Exp Metastasis*. 2013 Mar;30(3):333-344. 査読有

Makino H, Aono Y, Azuma M, Kishi M, Yokota Y, Kinoshita K, Takezaki A, Kishi J, Kawano H, Ogawa H, Uehara H, Izumi K, Sone S, Nishioka Y. Antifibrotic effects of CXCR4 antagonist in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Med Invest*. 2013;60(1-2):127-137. 査読有

Mitsuhashi A, Goto H, Kuramoto T, Tabata S, Yukishige S, Abe S, Hanibuchi M, Kakiuchi S, Saijo A, Aono Y, Uehara H, Yano S, Ledford JG, Sone S, Nishioka Y. Surfactant protein A suppresses lung

cancer progression by regulating the polarization of tumor-associated macrophages. Am J Pathol. 2013 May;182(5):1843-1853. 査読有

Miyake K, Tani K, Kakiuchi S, Suzuka C, Toyoda Y, Kishi J, Tezuka T, Yuasa S, Hanibuchi M, Aono Y, Nishioka Y, Sone S. Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor (gefitinib) augments pneumonitis, but attenuates lung fibrosis in response to radiation injury in rats. J Med Invest. 2012;59(1-2):174-185. 査読有

〔学会発表〕(計2件)

Aono Y, Kishi M, Nishioka Y. Different functions of PDGF receptor- and- in lung fibrosis. American Thoracic Society, San Francisco (U.S.A.), 2012 May 21.

Abe S, Aono Y, Nishioka Y. Fbircyte Regulates Lung Fibroblast Activation. American Thoracic Society, San Francisco (U.S.A.), 2012 May 21.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

青野 純典 (Aono Yoshinori)
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研
究部 非常勤講師
研究者番号：50398004

(2) 研究分担者

後東 久嗣 (Goto Hisatsugu)
徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研
究部 講師
研究者番号：00437641