

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591169

研究課題名(和文) 肺の炎症終息と組織修復における小胞体ストレスのインパクト

研究課題名(英文) The impact of ER stress on resolution of inflammation and tissue repair in lung

研究代表者

森本 浩之輔 (MORIMOTO, Konosuke)

長崎大学・熱帯医学研究所・准教授

研究者番号：50346970

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、動脈硬化や糖尿病などでその原因と密接に関連あるとされている、小胞体ストレスが肺の疾患とどのように関連があるのかを明らかにするのが目標である。小胞体ストレスとは、細胞にある小胞体において過剰な蛋白産生などのストレスがかかる状態であり、これが原因で炎症が起きたり、最終的には細胞死が誘導され、炎症性疾患や慢性疾患の原因となる。マクロファージの、炎症細胞を除去する機能は炎症を終息させ障害された組織を修復するのに重要であるが、これが小胞体ストレスによって有効に働かなくなるという仮説を証明した。また、そのメカニズムを、RhoAというシグナル伝達物質に着目して解明した。

研究成果の概要(英文)：Endoplasmic Reticulum (ER) stress plays crucial roles in pathogenesis of chronic disease such as atherosclerosis and diabetes. ER stress is induced by over production of protein or accumulation of abnormal protein in cell. I focused on the contribution of ER stress to pathogenesis of chronic lung disease. First we tested the effect of ER stress on alveolar epithelial cells, and proved that it induced hyporesponsiveness to inflammatory stimulation. Then we proved that ER stress may decrease apoptotic cell clearance by alveolar macrophages, that is important in resolution of inflammation, through RhoA activation. Next we used streptozotocin induced hyperglycemic mice to see the effect of ER stress on resolution of inflammation and tissue repair in lung. During lung inflammation by LPS, hyperglycemic mice showed lower production of hepatocyte growth factor in lung but apoptotic cell clearance. We will continue to try to clarify the mechanisms.

研究分野：呼吸器病学

キーワード：小胞体ストレス 慢性肺疾患 efferocytosis

1. 研究開始当初の背景

遺伝子変異や炎症、感染症などによって生じた異常な蛋白の産生に誘導される小胞体ストレスは、その防御機構である小胞体ストレス反応を凌駕する状態になると細胞機能が損なわれ、糖尿病や動脈硬化、アルツハイマーなどの様々な慢性疾患の原因となることが知られている (*FEBS Journal*. 2007;274:630, *J Clin Invest*. 2005;115:2656)

近年では、呼吸器疾患においても、*SFTPC* の遺伝子変異による家族性肺線維症の研究を発端として、特発性肺線維症や慢性閉塞性肺疾患(COPD)においても病態への関与が明らかになりつつある (*Am J Respir Crit Care Med* 2008;178:838, *Am J Respir Crit Care Med* 2009;180:1196)が、その機序は依然十分に解明されているとは言えない。

II型肺胞上皮と肺胞マクロファージに生じた小胞体ストレスが、肺の組織修復機能に及ぼす影響に焦点をあて、慢性肺疾患の病態への関与のメカニズムを明らかにすることは、これらの疾患の理解と治療法の開発において重要である。

2. 研究の目的

小胞体ストレスが炎症終息と障害組織の正常な修復を妨げていることを、マクロファージのアポトーシス細胞貪食除去や、組織修復因子である肝細胞増殖因子(**HGF**)をはじめとする組織修復を担う増殖因子の役割に着目して証明する。これにより、肺における小胞体ストレスと肺の線維化や気腫化の病因における関係性をより明確にし、新しい治療法開発の礎となることを目指す。

申請者らは、日本で初めての報告となる新規*SFTPC*遺伝子の変異による家族性肺線維症の家系を同定した(*Eur Respir J* 2011 : 38;861)。この新規変異*SFTPC*遺伝子をII型肺胞上皮細胞A549に強発現させたところ、

wild type *SFTPC*を発現させた株に比べて小胞体ストレス反応蛋白の発現が著しかった。これにより、小胞体ストレスと肺線維症の関連性をあらためて確認した。しかし、II型肺胞上皮の小胞体ストレスとそれに続くアポトーシスという現象だけでは、肺の慢性炎症や線維芽細胞の増殖など線維化に至る過程を十分には説明ができないため (*Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011: 108;10562)、この点を明らかにする。

申請者はこれまで、肺の炎症終息期において、肺胞マクロファージが積極的にアポトーシス好中球を貪食(efferocytosis)し、それによって肺胞マクロファージは肝細胞増殖因子(HGF)を産生して傷害された肺胞上皮を修復することを証明した(*Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2001;24:608)。喫煙などによって肺胞マクロファージに生じた小胞体ストレスが、efferocytosisを抑制し、慢性炎症や組織の修復不全がリンクして発生している可能性を検証した。

3. 研究の方法

3.1.1 肺胞上皮細胞(A549細胞)における小胞体ストレスの影響

A549細胞をツニカマイシン(TM)やタプシガルジン(TG)で刺激することにより、小胞体ストレスが誘導されることを western blotting により確認した。さらに、TM 存在下で TNF を加え、肺胞上皮の組織修復において重要とされる GM-CSF や炎症終息において重要な TGF の産生を、ELISA を用いて検討した。

3.1.2 肺胞上皮細胞(マウスII型肺胞上皮のプライマリカルチャー)における小胞体ストレスの影響

マウスからII型肺胞上皮を単離し、上記と同様に、小胞体ストレス下で TNF を加え、GM-CSF の産生や TGF の産生を、ELISA

を用いて検討した。

3.2 マクロファージにおける小胞体ストレスの影響

3.2.1 マクロファージを、TM や TG を用いて刺激し(1 μ g~10 μ g/ml)、efferocytosis とそれによる HGF の産生を評価した。最初に、TM により小胞体ストレスが誘導されることを Western blotting やリアルタイム PCR を用いて確認した。アポトーシス細胞の貪食実験には、Jarkat 細胞を UV 照射でアポトーシス誘導して用いた。Efferocytosis は顕微鏡直視により評価した。HGF の産生は ELISA と RT-PCR によって評価した。

3.2.2 小胞体ストレス下でマクロファージにおいて、efferocytosis を抑制する RhoA が活性化していることを、GLISA™ や pMYPT の ELISA キットを用いて測定した。

3.2.3 タバコ煙抽出液を用いて、喫煙によるマクロファージの小胞体ストレスの発生について検討した。

3.3 高血糖マウスにおける小胞体ストレスの影響

3.3.1 ICR マウス(8週~10週齢)にストレプトゾトシン(STZ)を投与して高血糖マウスを作成し、経気道的に LPS を投与して急性肺障害モデルを作成した。

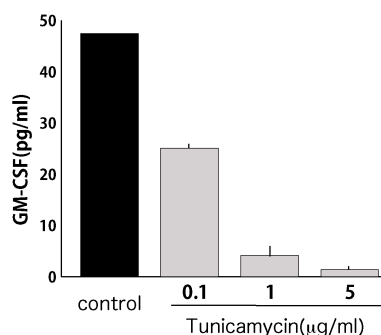
3.3.2 STZ による糖尿病マウス急性肺障害モデルを用いて、炎症終息や HGF の産生を評価し、マクロファージに生じている小胞体ストレスの意義を検討した。

4. 研究成果

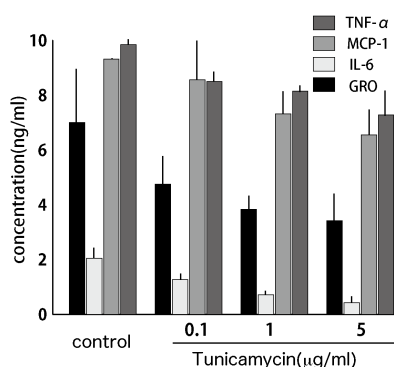
3.1.1 肺胞上皮細胞(A549 細胞)における小胞体ストレスの影響

ツニカマイシン(0.1~5 μ g/ml)の存在下で、容量依存性に小胞体ストレス反応蛋白(CHOP や Bip)の発現を認め、小胞体ストレスが誘導された。

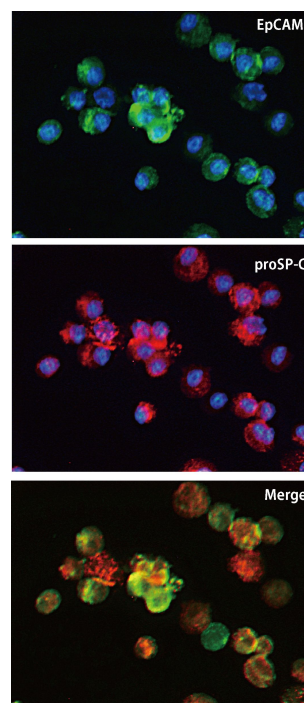
小胞体ストレスの存在下において、定常状態で A549 細胞から産生されていた GM-CSF は、



低容量の TM で抑制された(下図)。また、炎症性サイトカインやケモカイン(GRO、IL-6、MCP-1)の産生も ELISA によって検討したが、これまでの報告とはことなり、小胞体ストレスによって抑制されていた(下図)。



次に、同様のことがマウスの II 型肺胞上皮でも観察されるかを検証した。まず、マウスの肺から同細胞を分離する技術を確認した(右写真)。さらに、前述の実験同様、GM-CSF とサイトカインについて検討したところ、同様に、小胞体ストレスにより GM-CSF やサイトカインの産生抑制が見られた(データ省略)。

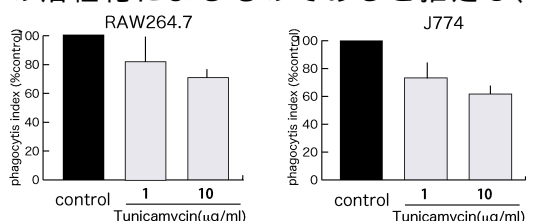


これまでの研究では、小胞体ストレスは肺胞上皮において炎症を惹起するという報告が多かったが、我々の結果は反対の反応であ

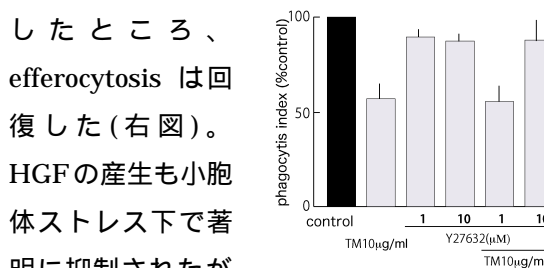
った。低濃度の TM でもこの現象は観察されており、確かな成果と考えられる。いわば、Hypo-responsive ともとれる反応は、近年では特発性肺線維症では炎症が主因であるという説が否定されていることと一致する。検証作業を進めて公表する予定である。

3.2 マクロファージにおける小胞体ストレスの影響

マウスマクロファージのセルラインである、J774 細胞と RAW に TM や TG を加えて刺激し、小胞体ストレスが生じていることをリアルタイム PCR をも加えて証明した。さらに、TM や TG 刺激下でアポトーシス細胞を加え貪食アッセイを行ったところ、抑制されていた(下図)。このメカニズムが、RhoA の活性化によるものであると推定し、



GLISA™ や pMYPT 測定 ELISA キットを用いて検討したところ、小胞体ストレス下では RhoA が活性化していた。さらに、TM 刺激により活性化した RhoA を Y27632 で抑制したところ、

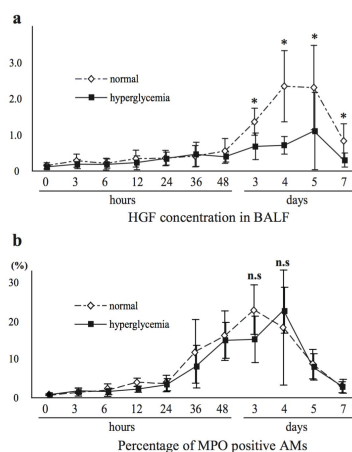


これは Y27632 によっては回復せず、他のメカニズムが示唆された。また、タバコ煙抽出液でも同様の効果が確認されており、喫煙による efferocytosis の低下の治療ターゲットとして、小胞体ストレスを選択することは有用な治療法の開発につながる可能性がある。

3.3 糖尿病マウスにおける小胞体ストレスの影響

STZ 誘導性糖尿病マウスにおける、急性肺障害を経時的に肺胞洗浄液で観察すると、炎

症のピークは同等であったが有意差をもって HGF の産生低下を認めた(下図)。これは、マウスにおいては末梢血単球で小胞体ストレスが生じているという報告があり、急性期に肺に遊走する肺胞マクロファージにおける小胞体ストレスが原因であると考えている。しかしながら efferocytosis (MPO 陽性マクロファージで評価) の顕著な差は見られず、これを完全に証明すること困難であった(下図)。組織修復の状態はこのモデルで差は見られなかったが、上皮を PCNA 染色したところ



コントロールマウスで有意に陽性細胞が多かった。

以上のことから、糖尿病における肺障害や肺炎で治癒が遷延する原因に、小胞体ストレスによる HGF の産生抑制があると考えられた。しかし、我々のモデルにおける小胞体ストレスの存在の確認に難渋し、計画通り成果を公表できていない。これ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 0 件)

[学会発表](計 3 件)

1 森本浩之輔、他 3 名 タバコ抽出液は小胞体ストレスによって RhoA 依存性に Efferocytosis を抑制する 日本呼吸器学会 学術講演会 2016 年 3 月 11 日、京都市、国立京都国際会館

2 Morimoto K, 他 3 名 Cigarette Smoke Extract Induced Endoplasmic Reticulum

Stress Suppresses Efferocytosis by Macrophages Through RhoA Activation. American Thoracic Society International Conference 2015, 2015年5月18日 Denver 米国

3 山下嘉郎、森本浩之輔、他6名 糖尿病ではERストレスにより肺の炎症終息が障害されている 日本呼吸器学会学術講演会、2014年4月26日、大阪市、大阪国際会議場

〔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

森本 浩之輔 (MORIMOTO, Konosuke)

長崎大学・熱帯医学研究所・准教授

研究者番号：50346970