

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：32409

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790800

研究課題名(和文) 肺胞のバリア機能に着目した急性呼吸不全の病態解明と治療への試み

研究課題名(英文) Alveolar barrier function

研究代表者

太田 洋充(Ohta, Hiromitsu)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：40451562

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：急性呼吸不全は上皮細胞の障害と密接に関連する。特に肺胞上皮細胞の細胞間の結合が子肺胞のバリア機能に密接に関連していると考えられる。急性肺障害時にはさまざまなサイトカインの発現が亢進しているが、これらのサイトカインが上皮細胞にどのような影響を与えるのかは解明が進んでいない。株化している肺胞上皮細胞は、ほとんどが癌細胞由来であり、本来の肺胞上皮細胞と性質が異なる。そのため、ラットの肺より肺胞上皮細胞を分離し初代培養細胞を作成した。肺胞上皮障害に特に上昇するサイトカインであるHMGB1は、培養細胞による予備実験で細胞接着分子が抑制されており、今後、初代培養細胞を用いて実験を行う予定である。

研究成果の概要(英文)：Acute respiratory failure is closely related with dysfunction of pulmonary epithelial cells. Especially cell-cell junctions of alveolar epithelial cells are thought to be the barrier of lung, and impairment of cell-cell junctions could fall into respiratory distress. Many cytokines are up-regulated in the acute lung injury; however, how those cytokines affect functions of pulmonary epithelial cell are not clear enough.

Most cell lines of pulmonary epithelial cells derive from cancer cells, and have quite different characters from pulmonary epithelial cells in vivo. We made primary cultures of pulmonary epithelial cells from Rat Lungs. We also revealed that HMGB1 suppressed expression of junction proteins of A549 cells. Now we plan the experiment which will reveal the effect of HMGB1 on primary cells of pulmonary epithelial cells.

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：肺胞上皮障害 上皮細胞

(1) 研究開始当初の背景

敗血症による ARDS、ウイルス性肺炎、間質性肺炎の急性増悪は、時間単位で起こるが、有効な治療法はほとんどない。その病態としては、急性呼吸不全は、肺胞腔内の恒常性が破綻し、肺胞腔内に浸出液が漏出し正常なガス交換が阻害された結果といえる。

肺胞腔内の恒常性は、肺胞隔壁のバリアにより維持されている。そのうち肺胞上皮細胞・血管内皮細胞のバリアは細胞間の Tight Junction によるところが大きい。Tight Junction は細胞間の距離をほとんどゼロまで接近し、液体成分や小分子の透過性を制御する。Tight Junction の主要な構成タンパクは claudin であり、claudin の発現パターンが、細胞のバリアとしての性質を決定していることが報告されている (*Trend cell Biol.* 16: 181-188, 2006)。

腸管や脳など他臓器での研究では、Tight Junction の障害により上皮のバリアが破綻し、局所の炎症が悪化することが既に報告されている (*Ann N Y Acad Sci*, 1165:294-300, 2009)。したがって、肺胞壁のバリアを強化させることができれば、肺胞腔内の恒常性が維持され、呼吸不全の悪化を回避することができると予想される。また、多くのウイルスの上皮細胞への感染経路は細胞側面の受容体であり体内への侵入経路としても上皮のバリアを通過する必要があるため、Tight Junction のバリア機能は感染防御の点からも重要である (*J Virol.* 10639-10648, 2011)。

研究代表者は、H21-22年度に若手Bの研究費を得て、正常肺における claudin と肺障害後の変化について検討した。正常肺、特に肺胞上皮細胞では、claudin-18 が主要な Tight Junction であり、血管内皮細胞では、claudin-5 であった。ブレオマイシンによる肺障害モデルでは、肺の線維化に伴い、上皮細胞、血管内皮細胞の Tight Junction が障害され、claudin の発現は低下する。claudin の発現低下は TGF- β による上皮間葉転換 (EMT) に関係し、間質性肺炎の急性増悪に関与する可能性を指摘した (*Am J Physiol Cell Physiol. Lung Cellular and. Molecular Physiology*, 2011, in press)。しかし、これらの変化は線維化の進行とともに認められるものである。急性期では、TGF- β は上皮細

胞に対して抗炎症性サイトカインをして保護的に作用するとする報告もあり、急性期 (浸出期) のバリアの障害は TGF- β 以外の調節因子が作用していると想定される。

これまで、Tight Junction の調節因子としては、サイトカインや脂質 mediator などが報告されている。炎症性サイトカインである、IFN- γ 、TNF- α 、IL-12、IL-1 β は上皮細胞で Tight Junction の透過性を亢進させることが報告されている。抗炎症性サイトカイン IL-10 は逆に Tight Junction の透過性を低下することが報告されている (*Biochimica et Biophysica Acta*, 864-871, 2009)。また、脂質 mediator である、スフィンゴシン 1 リン酸により肺胞上皮細胞のバリアを低下させることが報告されている (*PNAS*, 9270-9275, 2005)。さらに、腸疾患で microRNA を介した機構により Tight Junction の発現抑制が報告されている (*Gastroenterology*, 141:1323-1333, 2011)。

研究代表者のグループは、間質性肺炎急性増悪の前後のサイトカインの解析を行い、MCP1 と HMGB1 が急性増悪後に次第に上昇することを発見した。さらに免疫染色により HMGB1 は肺胞マクロファージと肺胞上皮細胞に分布することを示した (*Pulmonary Medicine*, 2011)。HMGB1 はもともと核内 DNA 結合タンパク質として発見されたが、近年、炎症性サイトカインとして作用することが報告された (*Journal of Internal Medicine*, 255:320-331, 2004)。HMGB1 により腸管上皮では上皮のバリアが障害されることが報告されている (*Am J Physiol Cell Physiol*, 290:C990-C999, 2006)。ただし、現時点では肺障害時に上皮細胞のバリアに対してどのように作用するかは不明である。

(2) 研究の目的

本研究は、肺胞上皮細胞に対して、HMGB1 がどのような影響を与えるか、とくに tight junction や上皮の細胞接着分子の機能について解明することを目的とした。

(3) 研究の方法

細胞株化した肺胞上皮細胞、A549 等は癌化した細胞であり、癌遺伝子 RAS などが活性化しており、正常の肺胞上皮細胞の評価に適さない。また、claudin-18 の発現を認めず、本来の肺胞上皮細胞と性質が異なると考えられる。(Fig1)そのため、まず、マウス・ラット肺より肺胞上皮細胞を分離し初代培養を行う。また、そのうえで、培養上皮細胞に TGF-β や HMGB1 といったサイトカインを添加し反応を観察する方針とした。

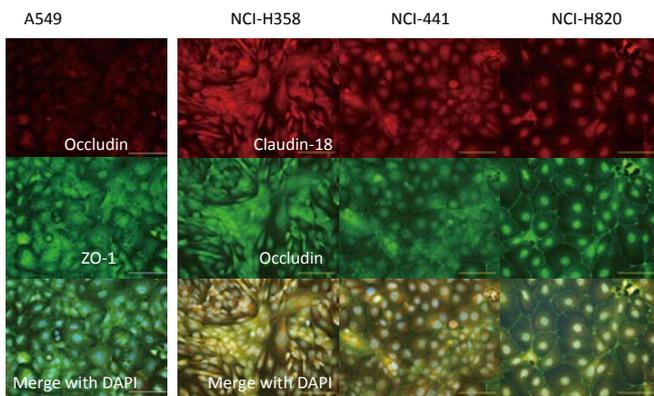


Figure. 1

培養細胞では、肺胞上皮細胞の特徴的な接着分子である claudin-18 の発現は認められない。

(4) 研究の成果

当初、マウス肺からの肺胞上皮細胞の初代培養を試みた、マウス肺を生理食塩水で洗浄後、コラゲナーゼで処理、抗 CD45 抗体、抗 CD31 抗体で negative selection を行い、フィルター上で培養を行った。

しかし、培養後の細胞の生存性が不良であり、実験を行うために十分な細胞をえることができなかった。そのため、ラット肺から肺胞上皮細胞の初代培養細胞を得る方針とした。ラット肺を麻酔下に摘出し、Krebs-Hepes Buffer で洗浄、メトリザマイドを含む Buffer を注入、30 分程度、37°C で培養し、その後、コラゲナーゼ処理し、比重遠心法にて肺胞上皮細胞を分離する。本方法を用いることにより、1 匹のラットの肺より 1 X 10⁷ 個以上の肺胞上皮細胞を一次培養することに成功した。(Fig. 2)

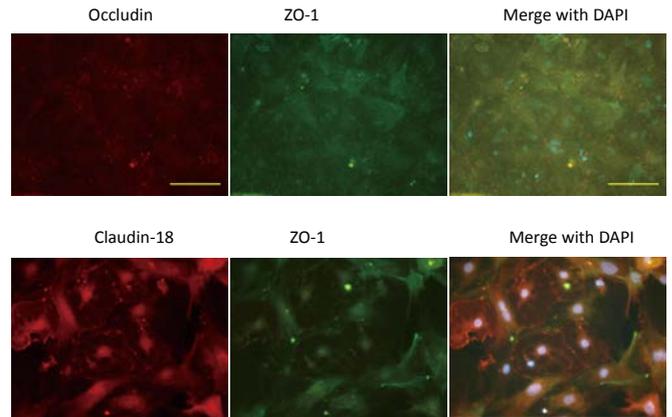


Figure. 2

上皮細胞に発現する接着分子である Occludin や ZO-1 に加え、特徴的な肺胞上皮細胞の特徴的な細胞接着分子である claudin-18 の発現を認める。

次に初代培養された肺胞上皮細胞の性質について検討した。肺胞上皮細胞の性質が維持されているか検討するため、分離した肺胞上皮した培養細胞を 3 日間培養して、mRNA を回収、RT-PCR を行った。

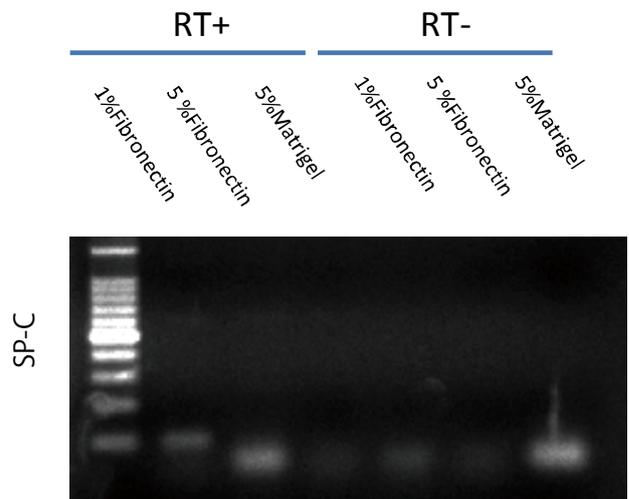


Figure. 3

肺胞上皮細胞の初代培養細胞による RT-PCR。SP-C の発現は 1% Fibronectin でコートし培養した細胞にのみ弱く認める。

過去の文献を参考にフィルターを 1% Fibronectin、5% Fibronectin、5% Matrigel にコートするなどいろいろな培養条件を検討したが、SP-C の発現は 1% Fibronectin でコートした場合のみにわずかに認めただけであった。(Fig. 3) また、培養肺胞上皮細胞 (A549、NCI-H292) を用いて、TGF-β、HMGB1 添加に対する

反応を検討した。(Fig. 4) TGF- β は、E-cadherin の発現を抑制し、N-cadherin の発現を亢進する上皮間葉転換に相当する反応を確認した。HMGB1 はN-cadherin の発現を誘導しなかったが、E-cadherin の発現の発現に関しては、特に A549 細胞で抑制する傾向を示した。

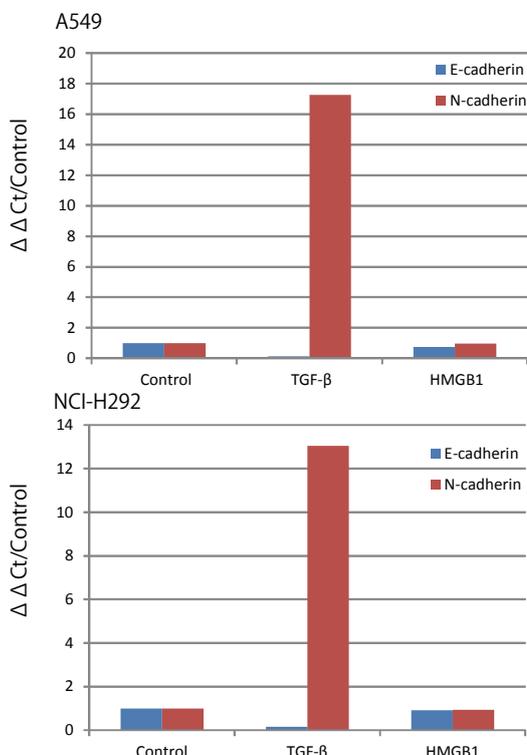


Figure. 4

TGF- β 、HMGB1 に添加による E-cadherin、N-cadherin の発現変化。 β -actin を内在性コントロールとし $\Delta \Delta$ Ct 法で示した。

これまでの実験により、肺上皮細胞の初代培養細胞の系を確立し、さらに HMGB1 が上皮細胞に直接影響を与え得ることが示された。

最近、肺上皮細胞の claudin-18 のノックアウトマウスが作成され、in vitro、で肺上皮細胞のバリアが低下し、in vitro でも正常に生まれるものの、生後の肺上皮細胞が障害を受け、肺胞の発達が阻害されること (*Am J Respir Cell Mol Biol*, 2014)、また、肺胞内容液のクリアランスが増加すること (*Am J Respir Cell Mol Biol*, 2014) が報告されており、急性呼吸不全の際に上皮細胞 claudin-18 等の細胞間接着分子がどのような影響を受けるか解明することはますます重要となっている。

今後、培養条件をさらに検討し、肺胞上皮細胞の性質を長期に維持することを目指す。その上で当初予定していた、TGF- β 、HMGB1 などのサイトカインが、上皮細胞の性質に与える影響を検討する。また、我々は、肺における組織幹細胞 (Bronchioalveolar stem cells : BASCs) をフローサイトメトリー (FACS) にて分離する法を確立した。(Fig. 5) 今後は、さらにマウスに肺胞上皮細胞の組織幹細胞に対して、HMGB1 などの炎症性サイトカインがどのように影響するかも合わせて検討したい。

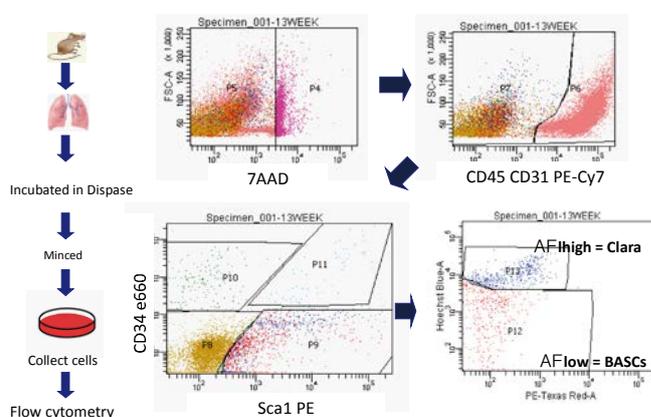


Figure. 5

FACS による BASCs の同定

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

なし。

[学会発表] (計 0 件)

なし。

(6) 研究組織

(1) 研究代表者

太田 洋充 (Ohta Hiromitsu)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：40451562