

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461183

研究課題名(和文) 肺線維症モデルマウスにおいてSRT1720がHSP47発現に与える効果

研究課題名(英文) The effect of SRT1720 on HSP47 expression in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis

研究代表者

山田 徹 (YAMADA, Toru)

富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・特命助教

研究者番号：40512091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：線維芽細胞CCD33Lu細胞においてTGF- $\beta$ 1とSRT1720との同時刺激ではHSP47発現はTGF- $\beta$ 1単独刺激に比べて増強しなかった。しかし、SRT1720を2時間前に前処置した場合はTGF- $\beta$ 1刺激でのHSP47のmRNAの発現が増加した。SRT1720摂取群と非摂取群での肺線維症モデルマウス肺でHSP47の発現を免疫組織化学染色で比較したが、目視では有意な差は見出せなかった。培養細胞においてSRT1720がHSP47のmRNA発現を増加させたが、蛋白レベルでのHSP47の発現増加は確認できず、SRT1720がHSP47発現を経由して線維化を増強させているかは結論が得られなかった。

研究成果の概要(英文)：In lung fibroblast CCD33Lu cells, simultaneous stimulation of TGF- $\beta$ 1 and SRT1720 did not enhance the expression of HSP47 in comparison with single stimulation of TGF- $\beta$ 1. However, pre-incubation of SRT1720 two hours before enhanced the expression of HSP47 mRNA. Immunohistochemistry could not show the significant difference of the expression of HSP47 in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis between SRT1720 treated group and untreated group. Although SRT1720 enhanced the expression of HSP47 mRNA, HSP47 did not increase in protein levels. We could not conclude that SRT1720 increased the pulmonary fibrosis via HSP47 expression.

研究分野：(呼吸器病学)

キーワード：細胞・組織 呼吸器学 肺線維症 熱ショック蛋白

## 1. 研究開始当初の背景

(1)特発性肺線維症は慢性の経過で発症し、高度の線維化をきたし、特徴的な蜂巣肺を呈して呼吸不全が進行する予後不良の疾患である。特発性肺線維症の線維化は肺胞上皮細胞障害が繰り返されることにより異常な創傷治癒反応が惹起され、その結果、線維化が進行していくと考えられている。肺胞上皮細胞の障害には過剰なアポトーシスが関連しており、線維増殖反応の促進、線維芽細胞の活性化にはマクロファージなどの炎症細胞や局所の上皮細胞が産生する TGF- $\beta$  や PDGF、TNF- $\alpha$ 、IL-1 などの成長因子やサイトカインが重要な役割を果たす。例えば TGF- $\beta$  は線維芽細胞に働いて細胞外マトリックス産生を促進し、 $\alpha$ -SMA 陽性の筋線維芽細胞へ分化を誘導する。

(2)SIRT1 は寿命やストレス抵抗性に大きく寄与する長寿遺伝子として知られており、NAD<sup>+</sup>依存性蛋白脱アセチル化酵素として機能するが、SIRT1 は炎症や酸化ストレスによる反応などの制御に関与すると報告されている。我々は SIRT1 の活性化による酸化ストレス抵抗性の誘導やアポトーシスの抑制により肺の線維化を抑制できるのではないかと考え、SIRT1 を活性化する SRT1720 の摂取群と非摂取群で C57BL/6J マウスのプレオマイシン肺臓炎モデルにおいて肺組織の比較検討を過去に行ったが、その結果、当初の我々の予想に反して SRT1720 を投与した群ではプレオマイシン投与後に肺線維化が増強していた。我々は SIRT1 activator が肺の線維化を増強するメカニズムに興味を持ち、線維化と関連のあるコラーゲンの分子シャペロンである熱ショック蛋白 HSP47 発現と SIRT1 の関連に注目することとした。

(3) 多くの研究で HSP47 とコラーゲンの発現量は相関を示すことが報告されている。また、ヒトの胚線維芽細胞において TGF- $\beta$  や IL-1 が熱ショック転写因子 Heat shock factor 1(HSF-1)の heat shock element (HSE) への結合活性を高めることにより HSP47 の発現を増強させることが報告されている。

## 2. 研究の目的

研究背景に記したように、マウスのプレオマイシン肺臓炎モデルにおいて SIRT1 を活性化する SRT1720 の投与が肺の線維化を増強することを我々は報告している。本研究の目的は、前述の結果をふまえて、SIRT1 の活性化が肺の線維化を増強するメカニズムについて、熱ショック蛋白 HSP47 に注目して解析を行うことである。そこで我々は急性ストレス下において、SIRT1 を活性化することが、HSF1 の活性化を起し、転写活性が増強することにより HSP47 の発現を増加させ、その結果として肺線維化の増強を招くのではないかと仮説をたて、その仮説を検証することとした。

## 3. 研究の方法

### (1)細胞培養

肺線維芽細胞 CCD33Lu (ATCC CRL-1490) を American Type Culture Collection(ATCC)より購入し使用した。培養液は Eagle's Minimum Essential Medium(EMEM)を用い、加熱して不活化した fetal calf serum を加えて使用した。

### (2)ウエスタンブロッティング

HSP47 の測定のため抗体として HSP47(E-1) (Santa Cruz Biology sc-13150) を使用した。10%ポリアクリルアミドゲルを用い、100V、90 分電気泳動をおこない、100V、90 分でメンブレンに転写、ブロッキングを行い、一次抗体、二次抗体と反応させ、バンドの検出を行った。

### (3)定量 RT-PCR

ISOGEN、RNA 抽出キットを用い RNA を抽出し、逆転写により cDNA を作成して TaqMan Gene Expression Assays を用いてリアルタイム PCR を行った。HSP47 の検出には Serpinh1 の TaqMan Gene Expression Assays を用いた。測定機器は Mx3000P リアルタイム定量 PCR システムを使用した。

### (4)免疫組織化学染色

SRT1720 の非摂取群と摂取群の C57BL/6J マウスにおいて経気道的にプレオマイシンを投与したマウスの肺組織を用いた。肺組織は以前に我々のグループで SRT1720 投与が肺の線維化を増強することを報告 (Food and Nutrition Science, 2012, 3, 157-163) した際にパラフィン包埋されていた検体を用いた。今回、新たに HSP47 の抗体を用い免疫組織化学染色を行い検討した。HSP47 の検出には HSP47 monoclonal antibody (ENZO ADI-SPA-470) を使用した。

### (5)統計解析

Tukey-Kramer の HSD 検定を行い、P 値 < 0.05 を有意とした。

## 4. 研究成果

(1)肺線維芽細胞 CCD33Lu 細胞を用いて、TGF- $\beta$  1(0.5ng/ml)と SRT1720(1 $\mu$ M)を同時に刺激し 48 時間後に細胞を回収しウエスタンブロッティングにて HSP47 の発現を蛋白レベルで測定した。(図 1A,B) TGF- $\beta$  1 と SRT1720 の同時共刺激では HSP47 発現の増強効果は得られなかった。

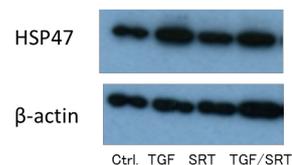


図 1A

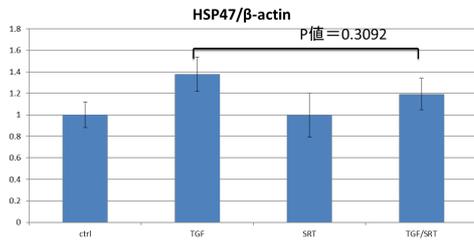


図 1B

(2) 肺線維芽細胞 CCD33Lu 細胞を用いて、TGF- 1(0.5ng/ml)と SRT1720(1 μ M)を同時に刺激し 48 時間後に細胞を回収し RT-PCR にて HSP47mRNA の発現を測定した。(図 2) TGF- 1 と SRT1720 の同時共刺激では HSP47mRNA 発現の増強効果は得られなかった。

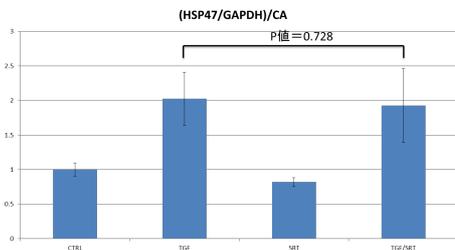


図 2

(3) 肺線維芽細胞 CCD33Lu 細胞を用いて、まず SRT1720(1 μ M)で刺激をおこない、その 2 時間後に TGF- 1(0.5ng/ml)で刺激を行い、48 時間後に細胞を回収し RT-PCR にて HSP47mRNA の発現を測定した。(図 3) その結果、TGF- 1 と SRT1720 の同時共刺激の時とは異なり、HSP47mRNA 発現は増強された。

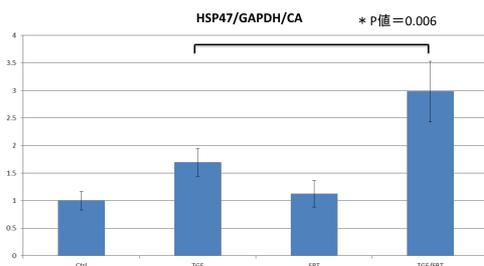


図 3

(4) 肺線維芽細胞 CCD33Lu 細胞における -SMA mRNA 発現の検討。筋線維芽細胞への分化の指標になる -SMA の mRNA の発現を RT-PCR にて測定した。SRT1720(1 μ M)と TGF- 1(0.5ng/ml)との同時刺激と、SRT1720(1 μ M)で刺激をおこない、その 2 時間後に TGF- 1(0.5ng/ml)で刺激を行ういずれの方法でも -SMA の mRNA 発現に SRT1720 は増強効果を与えなかった。(図 4A,B)

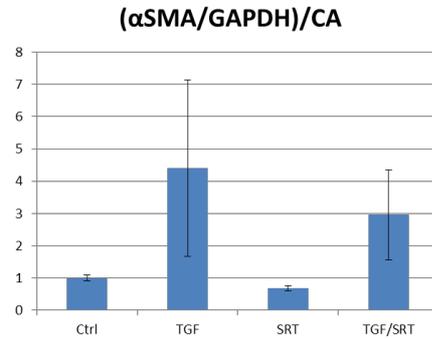


図 4A

TGF- 1(0.5ng/ml)/SRT1720 (1 μ M) 同時刺激 48 時間後

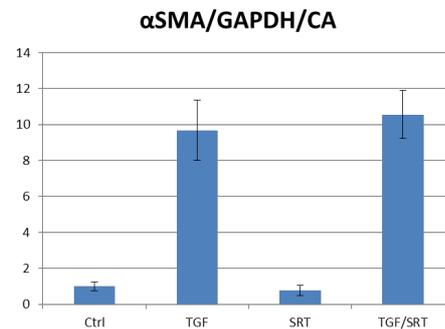


図 4B

SRT1720 (1 μ M)2 時間前に刺激、その後 TGF- 1(0.5ng/ml)刺激 48 時間後

(5) 肺線維芽細胞 CCD33Lu 細胞における Col1A2 mRNA 発現の検討。型コラーゲン遺伝子 Col1A2 mRNA の発現を RT-PCR にて測定した。SRT1720(1 μ M)と TGF- 1(0.5ng/ml)との同時刺激と、SRT1720(1 μ M)で刺激をおこない、その 2 時間後に TGF- 1(0.5ng/ml)で刺激を行ういずれの方法でも Col1A2 mRNA 発現に SRT1720 は増強効果を与えなかった。(図 5A,B)

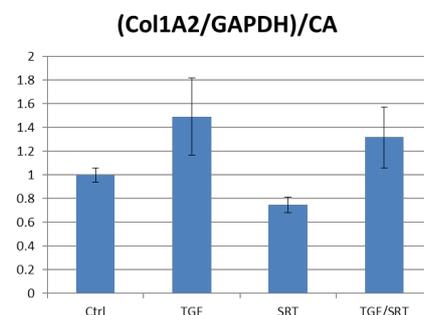


図 5A

TGF- 1(0.5ng/ml)/SRT1720 (1 μ M) 同時刺激 48 時間後

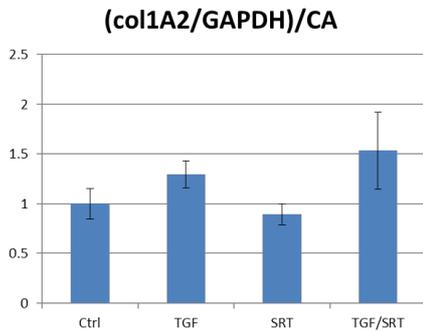


図 5B

SRT1720 (1 μM) 2 時間前に刺激、その後 TGF-1 (0.5ng/ml) 刺激 48 時間後

(6) CCD33Lu 細胞の培養上清中のコラーゲンタイプ 1 を ELISA にて測定した。測定キットは ACEL のヒトコラーゲンタイプ 1 ELSA (EC-E105) を用いた。TGF-1 の刺激によりコラーゲンタイプ 1 の濃度は上昇するが、TGF-1 と共に SRT1720 を加えても、コラーゲンタイプ 1 の濃度は更なる上昇を認めなかった。(図 6)

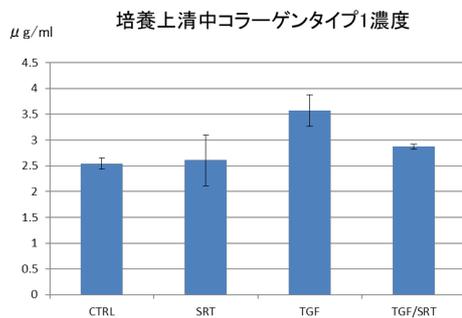


図 6

(7) C57BL/6J マウスの経気道的プレオマイシン肺臓炎モデルによる HSP47 の発現を SRT1720 非摂取群と接種群の肺組織の免疫組織化学染色にて比較した。顕微鏡による目視での観察では非摂取群 (図 7A) と摂取群 (図 7B) との間で HSP47 陽性細胞の差は明瞭ではなかった。

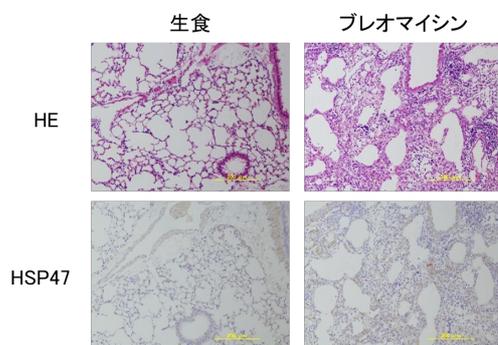


図 7A SRT1720 非摂取群

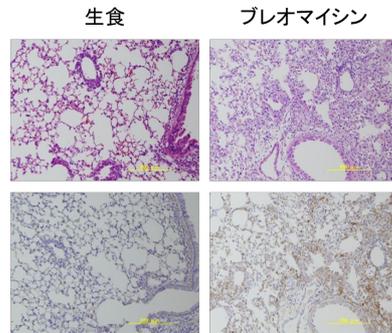


図 7B SRT1720 摂取群

(8) その他

核内への HSF1 の移行をみるために核蛋白抽出キット (ENZO ENZ-45015) を用い、核内蛋白を抽出し、HSF1 antibody (Cell Signaling #4356) を用いてウエスタンブロッティングを施行したが、再現性のあるデータが得られなかった。

(まとめ)

線維芽細胞 CCD33Lu 細胞において SRT1720 を前処置することにより TGF-1 刺激による HSP47 の mRNA の発現が増加した。SRT1720 が線維化を増強させる可能性を示唆しているが、蛋白レベルでの HSP47 の発現増加は確認できず、確定的な結論には至らなかった。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

演者: 山田 徹

共同演者: 林 龍二、戸辺 一之 他

発表表題: 肺胞上皮細胞および線維芽細胞における SIRT1 activator (SRT1720) による HSP47 発現に関する研究

学会名: 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会

発表年月日: 2016 年 4 月 9 日

発表場所: 国立京都国際会館、京都府京都市

〔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：

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

山田 徹 (YAMADA, Toru)  
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・  
特命助教  
研究者番号：40512091

##### (2) 研究分担者

戸辺 一之 (TOBE, Kazuyuki)  
富山大学・大学院医学薬学研究部(医学)・  
教授  
研究者番号：30251242

林 龍二 (HAYASHI, Ryuuji)  
富山大学・附属病院・講師  
研究者番号：60345585

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )