

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461164

研究課題名(和文) 肺サーファクタント蛋白質の新作用を応用した肺傷害・線維化制御

研究課題名(英文) Suppression of pulmonary injury and fibrosis by applying new action of pulmonary surfactant protein

研究代表者

高橋 弘毅 (TAKAHASHI, HIROKI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：60231396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、肺傷害・線維化およびアレルギー性気道炎症の抑制因子としての肺サーファクタント蛋白質(SP-A)の重要性とそのメカニズムを明らかにし、その機能を応用した治療法へ橋渡しとなる成果を得ることを目的として遂行された。SP-Aのノックアウトマウスでは野生型マウスに比べ、ブレオマイシン刺激下で肺内炎症と線維化が有意に増強した。さらにSP-Aを気道から投与したところ、炎症が抑制された。さらに*in vitro*実験によって、SP-Aの炎症抑制効果はブレオマイシンと可溶性トル様受容体(sTLR2)との結合阻害作用に基づくことを明らかにした。また、気道のアレルギー反応を抑制する効果も確かめられた。

研究成果の概要(英文)：This study was performed to clarify the importance of pulmonary surfactant protein (SP-A) as an inhibitor of lung injury / fibrosis and allergic airway inflammation and its mechanism, and to show the results that will be a bridge to the therapeutic strategy. In SP-A knockout mice, intrapulmonary inflammation and fibrosis were significantly enhanced under bleomycin stimulation compared with wild type mice. When SP-A was further administered from the respiratory tract, the inflammation was suppressed. Furthermore, *in vitro* experiments revealed that the inhibitory effect of SP-A against inflammation was based on the inhibition of binding of bleomycin and soluble Toll-like receptor (sTLR2). In addition, the effect of suppressing allergic reaction in respiratory tracts was also confirmed.

研究分野：医歯薬学

キーワード：急性肺傷害、ブレオマイシン、肺コレクチン、肺サーファクタントタンパク質A、トル様受容体、アレルギー性気道炎症

### 1. 研究開始当初の背景

肺コレクチンとして知られるサーファクタント蛋白質(SP)-A と SP-D は Sf の主要成分であり、肺内の自然免疫機構の調整を司っている。これらの蛋白質は、細菌、ウイルス、真菌など種々の病原体と結合し、肺泡マクロファージとの相互作用を通して、恒常的に生体から外来因子を排除する働きを持っている。一方、申請者らを含む最近の研究では、非感染性病態において、抗炎症・抗線維化作用を示すことが明らかにされつつある。例えば、SP-A ノックアウト(k/o)マウスは、野生種に比し、Bleomycine 惹起による薬剤性肺障害が重症化し易く致死的である(高橋弘毅, H21 年度科学研究費報告書, Goto H, et al Am J Respir Crit Care Med 2010)。また、SP-A が気道感染防御因子のひとつである Defensin 3 による上皮細胞障害を軽減し、上皮保護作用を持つことが示された(Saito A, Takahashi H, et al. J Biol Chem 2012)。さらに、肺移植に関する臨床研究では肺内 SP-A が低値であると拒絶反応が亢進し生存率を低下させることが示された(D' Ovidio F, Takahashi H, et al. J Biol Chem 2013)。一方、アレルギー性気道炎症に対する保護的作用を示唆する報告も散見される。例えば、SP-A k/o マウスでは気道過敏性が亢進している(Erpenbeck VJ et al. 2006)。SP-A はマスト細胞と結合し、TNF- $\alpha$  を介するアレルギー反応に関与すること等が知られている(Malherbe DC, et al. 2005, Hsia BJ, et al. 2012)。このように、SP-A は感染症以外にも様々な病態において、生体防御に関わる機能をもつことが明らかにされつつある。

本研究では、肺サーファクタント蛋白質(Sf)の新作用である「抗炎症・抗線維化作用」に着目し、Sf が急性肺傷害、肺線維化、アレルギー性気道炎症に対する保護的作用を示すこと明らかにし、最終的には Sf リコンビナント製剤を治療薬として臨床応用するための橋渡し研究を行うこととした。

### 2. 研究の目的

本研究は、傷害肺に強発現する TLRs の特定と肺コレクチン(SP-A)投与によるシグナル抑制効果、肺線維化に関わる肺コレクチンの量的質的变化、アレルギー性気道炎症に関わる肺コレクチンの量的質的变化及び TLRs との関連性を分析することにより、肺サーファクタント蛋白質の新作用を応用した肺傷害・線維化を制御する治療法へ橋渡しとなる成果を得ることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) SP-A(-/-)マウスを用いた肺傷害モデル及び肺線維化モデルを作成し、気管支肺泡洗浄液の成分分析やホルマリン固定肺組織の病理学的検討を行った。

週齢 8 週の野生型マウス(C57BL/6)または SP-A(-/-)マウスに腹腔麻酔下にマイクロス

プレイヤーを用いてプレオマイシン(10mg/kg)を経気道投与し、1日後、7日後、21 日後に気管支肺泡洗浄液や肺組織を回収し検討した。

(2) SP-A 経気道投与による肺傷害抑制作用を検討した。

C57BL/6 マウスの肺傷害モデルおよび肺線維化モデルに SP-A を経気道投与した。SP-A(-/-)マウスで作成したプレオマイシン肺傷害モデルでも同様に SP-A を経気道投与し、気管支肺泡洗浄液を分析した。

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プレオマイシンによる NF- $\kappa$ B の誘導を検討した。

(3) SP-A と TLR2 の結合性について表面プラズモン共鳴(ピアコア)を用いて検討を行った。

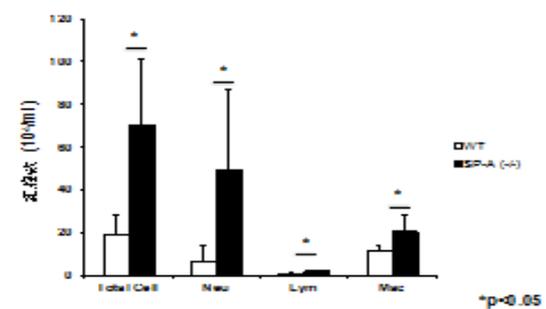
分子間の結合を調べるため、プレオマイシンと TLR2 の細胞外ドメイン(sTLR2)を合成した蛋白との結合を検討した。さらに、プレオマイシンを ELISA プレートに固相し、sTLR2 との結合を検討した。また、その結合が SP-A により阻害されるかどうか調べた。

(4) アレルギー性気道炎症の評価のためヒト ディフェンシン 3(hBD3)を用いてマウスにおける肥満細胞や血管透過性を検討した。SP-A と hBD3 の結合性をピアコアを用いて検討した。また、肺コレクチン活性部位(SAP01)の合成化合物をもちいて治療への応用を検討した。

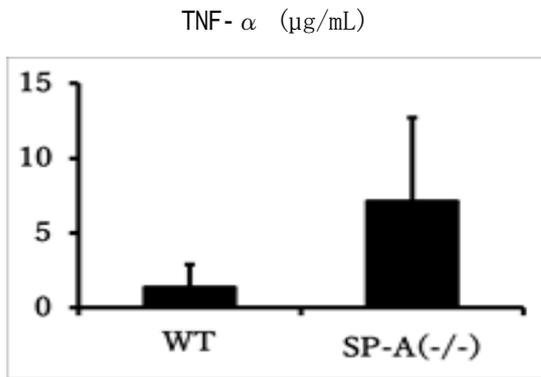
### 4. 研究成果

#### (1)

C57BL/6マウスの胎生幹細胞gene-targeting 法によって作成された SP-A(-/-)マウスを使用した。週齢8週の SP-A(-/-)マウス、及び野生型 C57BL/6 マウスに経気道的に LPS、プレオマイシンを投与し肺傷害モデルおよび肺線維化モデルを作成した。マイクロプレイヤーを用いてプレオマイシンを経気道投与したところ、薬剤投与7日目に気管支肺泡洗浄液中の好中球数、TNF- $\alpha$  の増加を認め、SP-A(-/-)マウスでは有意に増強していた(Fig. 1A-B)。ホルマリン固定肺組織の病理組織学的評価では薬剤投与21日目に肺組織の線維化を認め、SP-A(-/-)マウスでは病変の増悪がみられた。



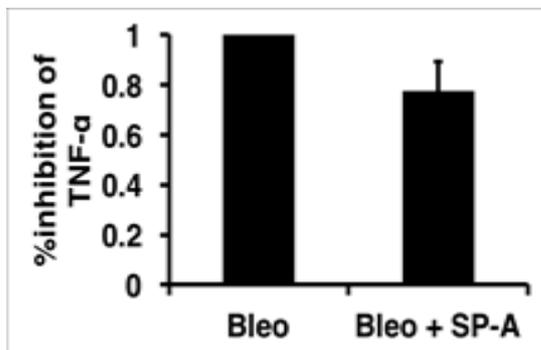
(Fig. 1A)



(Fig.1B)

(2)

Native SP-A、はシリカ投与で刺激したラットの気管支肺胞洗浄液より分離精製し、recombinant SP-A は CHO 細胞を用いて作成した。SP-A(-/-)マウス、及び野生型 C57BL/6 マウスの肺傷害モデルおよび肺線維化モデルに肺コレクチン (SP-A) を投与したところ、気管支肺胞洗浄液中の好中球数減少、TNF- $\alpha$  の低下を認め、炎症が制御されていた。(Fig.2)

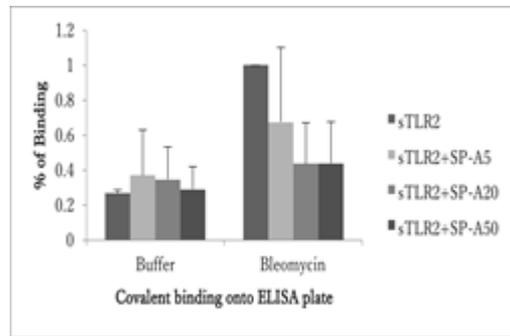


(Fig.2)

(3)

SP-A と TLR2 の結合性について表面プラズモン共鳴 (ピアコア) を用いて検討を行った。TLR2 は膜結合蛋白のため、細胞外ドメインのみ (sTLR2) を CHO 細胞を用いて合成し、結合実験に用いた。プレオマイシンは sTLR2 と特異的に結合した。また、プレオマイシンは SP-A と強く結合することが分かった。

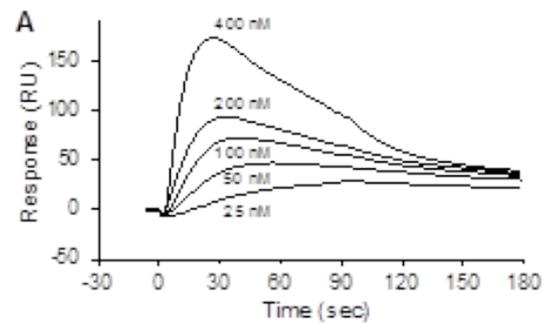
またさらに SP-A、プレオマイシン、sTLR2 の三者の結合性を検討したところ、プレオマイシンと sTLR2 との結合は SP-A により阻害された (Fig.3)。



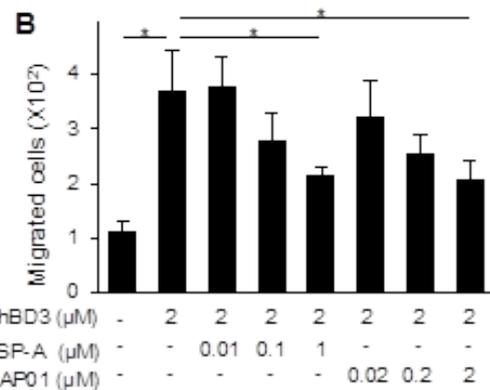
(Fig.3)

(4)

ラットに hBD3 を投与するとアレルギー性気道炎症を引き起こし、血管透過性の亢進や脂肪細胞の遊走を誘導する。hBD3 誘導アレルギーモデルを用いて肺コレクチンの機能を検討した。まず、分子間の結合能において、hBD3 は肺コレクチンや肺コレクチン活性部位 SAP01 と特異的に結合した (Fig4A)、hBD3 により肥満細胞が誘導されたが、SP-A や SAP01 によりアレルギー性気道炎症が制御され、肥満細胞の遊走が抑制された (Fig4B)。



(Fig.4A)



(Fig.4B)

本研究により、傷害肺に強発現する TLRs が TLR 2 主体であり、肺コレクチン投与によってシグナル抑制効果を確認することがで

きた。また、hBD3 によるアレルギー性気道炎症モデルにおいて、肺コレクチンと hBD3 との直接相互作用を確かめ、さらに肺コレクチン活性部位による合成ペプチド SAP01 がアレルギー性気道炎症を制御しうる結果を得た。肺傷害・線維化やアレルギー性気道炎症に対し、肺サーファクタント蛋白質の新作用が病態制御に基づく治療法へ橋渡しとなる成果を得ることができた。

#### 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5件)

1. Uehara Y, Takahashi M, Murata M, Saito A, Takamiya R, Hasegawa Y, Kuronuma K, Chiba H, Hashimoto J, Sawada N, Takahashi H, Kuroki Y, Ariki S. Surfactant protein A (SP-A) and SP-A-derived peptide attenuate chemotaxis of mast cells induced by human  $\alpha$ -defensin 3. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN. 2017;485;1(25):107-112. 査読有り
2. Kondoh S, Chiba H, Nishikiori H, Umeda Y, Kuronuma K, Otsuka M, Yamada G, Ohnishi H, Mori M, Kondoh Y, Taniguchi H, Honma S, Takahashi H. Validation of the Japanese disease severity classification and the GAP model in Japanese patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Respir Investig. 2016;54(5):327-33. 査読有り
3. Hasegawa Y, Takahashi M, Ariki S, Asakawa D, Tajiri M, Wada Y, Yamaguchi Y, Nishitani C, Takamiya R, Saito A, Uehara Y, Hashimoto J, Kurimura Y, Takahashi H, Kuroki Y. Surfactant protein D suppresses lung cancer progression by downregulation of epidermal growth factor signaling. Oncogene. 2014;34:838-845. 査読あり
4. Nishikiori H, Chiba H, Ariki S, Kuronuma K, Otsuka M, Shiratori M, Ikeda K, Watanabe A, Kuroki Y, Takahashi H. Distinct compartmentalization of SP-A and SP-D in the vasculature and lungs

of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. BMC Pulm Med. 2014 ;14(1):196. 査読あり

5. Natsuzaka M, Chiba H, Kuronuma K, Otsuka M, Kudo K, Mori M, Bando M, Sugiyama Y, Takahashi H. Epidemiologic survey of Japanese patients with idiopathic pulmonary fibrosis and investigation of ethnic differences. Am J Respir Crit Care Med. 2014;190:773-779. 査読あり

[学会発表](計6件)

1. 近藤瞬, 千葉弘文, 錦織博貴, 黒沼幸治, 大塚満雄, 白鳥正典, 山田玄, 高橋弘毅. 間質性肺炎・肺線維症の疫学 日本人の特発性肺線維症における GAP model の予後予測能の検証. 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会, 2016 年 4 月 8-10 日, 国立京都国際会館(京都府京都市).
2. 大塚満雄, 梅田泰淳, 成田欣史, 黒沼幸治, 山田玄, 高橋弘毅. 原発性肺腺癌における EGFR 遺伝子変異と TTF-1, SP-A, SP-D 発現の検討. 第 55 回日本呼吸器学会学術講演会, 2015 年 4 月 17 日~19 日, 東京国際フォーラム(東京都千代田区).
3. 梅田泰淳, 大塚満雄, 成田欣史, 黒沼幸治, 高橋弘毅. FGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌におけるバイオマーカーとしての血清 SP-A, SP-D, KL-6 の有用性. 第 55 回日本肺癌学会学術集会, 2014 年 11 月 14-16 日, 国立京都国際会館(京都府京都市).
4. 池田貴美之, 白鳥正典, 横尾慶紀, 黒沼幸治, 大塚満雄, 千葉弘文, 高橋弘毅. 特発性肺線維症における血清マーカーとピルフェニドンの治療効果との関連についての検討. 第 111 回日本内科学会総会, 2014 年 4 月 11-13 日, 東京国際フォーラム(東京都千代田区).
5. 池田貴美之, 白鳥正典, 横尾慶紀, 梅田泰淳, 汐谷 心, 錦織博貴, 黒沼幸治, 大塚満雄, 千葉弘文, 高橋弘毅. 特発性肺線維症におけるピルフェニドンの治療効果予測因子としての血清 SP-D. 第 54 回日本呼吸器学会総会 2014 年 4 月 25-27 日, 大阪国際会議場他(大阪府大阪市).
6. 梅田泰淳, 大塚満雄, 成田欣史, 黒沼幸治, 高橋弘毅. 肺腺癌 EGFR-TKI 治療のバイオマーカーとしての血清 SP-A, SP-D. 第 54 回日本呼吸器学会総会, 2014 年 4 月 25-27 日, 大阪国際会議場他(大阪府大阪市).

〔図書〕(計2件)

1. 高橋弘毅 . 間質性肺疾患の診断・検査-  
画像と病理がわかる : E. 疾患マーカー・  
特殊検査の手順と解釈 : 1b. 疾患マーカー :  
サーファクタント蛋白質 ( SP-A,  
SP-D ). 久保恵嗣 , 藤田次郎編 . 間質性肺  
疾患診療マニュアル ( 改訂第 2 版 ). 南江  
堂 ; 2014 ; 146-148 .
2. 高橋弘毅 , 千葉弘文 , 大塚満雄 . 総論 治  
療 1 . 生活習慣と薬物療法 . 東田有智編 .  
インフォームドコンセントのための図解  
シリーズ びまん性肺疾患と特発性間質  
性肺炎 . 医薬ジャーナル ; 2014 ; 42-47 .

〔産業財産権〕

出願状況 ( 計 0 件 )

取得状況 ( 計 0 件 )

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

高橋弘毅 ( TAKAHASHI HIROKI )  
札幌医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 60231396

(2) 研究分担者

千葉弘文 ( CHIBA HIROFUMI )  
札幌医科大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 40347175

大塚満雄 ( OTSUKA MITSUO )  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 10398323

黒沼幸治 ( KURONUMA KOJI )  
札幌医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 40563250

高橋素子 ( TAKAHASHI MOTOKO )  
札幌医科大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 00303941

(3) 連携研究者

長谷川善弘 ( HASEGAWA YOSHIHIRO )  
札幌医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 90643180

齋藤充史 ( SAITO ATSUSHI )  
札幌医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 00768939

(4) 研究協力者

なし