

平成 29 年 4 月 28 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461188

研究課題名(和文)ホスホリパーゼC を介した急性肺障害の新規治療法の開発

研究課題名(英文)The crucial role of PLCepsilon in a mouse model of acute lung injury

研究代表者

小林 和幸 (KOBAYASHI, KAZUYUKI)

神戸大学・医学研究科・講師

研究者番号：50403275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ホスホリパーゼC (PLC) は低分子量GTP 蛋白質Ras/Rap の標的タンパク質である。好中球性の気道炎症におけるPLC の役割を明らかにするため、PLC のノックアウト(KO)マウスを用いてLPS誘導性の急性肺障害マウスモデルを作成した。PLC の野生型(WT)のマウスに比較してKOマウスでは肺胞腔内への炎症細胞の浸潤や肺組織のCXCファミリーのケモカインのmRNAの発現が著明に低下していた。以上からPLC が上皮からのCXCケモカインの産生を介して好中球性の気道炎症に重要な役割を果たしていることが示唆された。PLC はARDSの重要な分子標的となりうると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Phospholipase C (PLC) is an effector of Ras and Rap small GTPases. The aim of this study is to examine whether PLC is involved also in the pathogenesis of neutrophil-mediated airway inflammation. Acute lung injury (ALI) was experimentally induced by intratracheal administration of LPS in PLC knock out (KO) mice. In contrast with PLC wild type (WT) mice, the accumulation of inflammatory cells in the alveolar space were substantially reduced in PLC KO mice. Comparison of the cytokine mRNA levels of the total lungs by qRT-PCR of LPS-stimulated mice indicated that PLC deficiency attenuated the LPS-induced expression of the CXC family chemokines. These results suggest that PLC mediated induction of the CXC family chemokines by the structural cells plays an important role in neutrophil mediated airway inflammation and that PLC could be a molecular target for the treatment of patients with ARDS.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：PLC ALI

## 1. 研究開始当初の背景

急性肺障害 (acute lung injury: ALI) / 急性呼吸窮迫症候群 (acute respiratory distress syndrome: ARDS) は肺炎や敗血症、外傷、人工呼吸管理圧損傷などの高度の炎症に伴って生じる呼吸不全の状態であり、その本態は血管内皮、肺胞上皮を介した肺胞隔壁の透過性が亢進することによって生じる非心原性肺水腫である。ARDS の発生には、サイトカインによって過度に活性化された好中球から放出される「活性酸素」や好中球エラストラーゼを代表とする「プロテアーゼ」が重要な役割を果たす。ARDS の死亡率は依然 40% を超えており、予後不良の症候群であることから、新たな治療法の開発が望まれる。

PLC は分子量 G 蛋白質 Ras と Rap1 により活性調節を受ける唯一のホスホリパーゼ C 分子種として、当施設の片岡徹教授の研究室で発見された。PLC は低分子量 GTP 蛋白質 Ras/Rap の標的タンパク質として働くリン脂質分解酵素で、基質であるホスファチジルイノシトール 4, 5-2 リン酸 {PI(4,5)P<sub>2</sub>} を加水分解して、セカンドメッセンジャーのジアシルグリセロール (DAG) とイノシトール 3 リン酸 (IP<sub>3</sub>) を産生し、それぞれプロテインキナーゼ C (PKC) の活性化や細胞内の貯蔵カルシウムの放出を介して細胞増殖や分化に働いている (Methods Enzymol. 2006;407:99-107.)。PLC のリパーゼ活性を欠損させたノックアウト (KO) マウスを使用したこれまでの研究により、ホルボールエステルやハプテン誘導性の皮膚炎が PLC の欠損により抑制されることや (Cancer Res. 2008;68:64-72) PLC を過剰発現するトランスジェニック (TG) マウスを使用した研究により、乾癬様の皮膚炎が誘導されることが明らかにされてきた (Eur J Immunol. 2011; 41:202-213)。また、PLC は消化器系のがんや腎疾患との関連も報告され、抗炎症薬、抗がん剤開発の重要な標的分子として近年急速に注目を集めている分子の一つであるが、呼吸器領域の炎症における役割は未だ多くのことが明らかにされていない。

呼吸器領域において、申請者らがこれまでに行ってきた研究から、PLC は炎症応答の場となる肺胞上皮細胞や気管の上皮細胞さらには線維芽細胞に発現していることを確認した。また、オボアルブミン (OVA) を抗原とする急性喘息モデルを作成し、PLC の KO マウスでは野生型 (WT) マウスでみられる喘息応答がほぼ完全に抑制されること、また、PLC は Th2 細胞の活性化を介して気道の炎症反応に重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、上皮・間葉系細胞を Tumor necrosis factor (TNF-) で刺激した後の Chemokine (C-C motif) ligand 2 (Ccl2) や Chemokine (C-X-C motif) ligand 2 (Cxcl2) などの炎症性サイトカインの分泌に PLC が影響を与えることを明らかにした

(PLoS One. 2014;9:e108373)。以上の知見から、PLC は肺胞上皮の透過性低下に関与しているサーファクタントの産生を行っている肺胞上皮細胞に強く発現しており、サーファクタントの産生に関与している可能性や、更には気道炎症における TNF- を介した応答に対して、気道上皮由来の炎症性サイトカイン分泌を制御している可能性を考え、TNF- や IL-6、IL-8 等が好中球の活性化を誘導する ALI/ARDS の病態においても重要な制御因子になっているのではないかとこの着想に至った。

また、ALI/ARDS の病態において、その重症化に影響を与える事象として、肺傷害後の治癒過程における肺の線維化形成が挙げられる。先行研究としてプレオマイシンを使用して肺線維症マウスモデルを作成したところ、線維化過程においても PLC の KO マウスと WT マウスで表現型に差が見られる結果が得られている。PLC が ALI/ARDS の病態にどのように関与しているかを明らかにすることで、PLC が ALI/ARDS の新しい治療ターゲットになり得るかを検討する。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は PLC の ALI/ARDS における役割を、PLC の遺伝子改変マウスを用いて明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

PLC の表現系に与える影響を、PLC を欠損させることで検討する。

### 実験 1) ARDS モデルマウスの作成

PL WT マウス、KO マウスに LPS (Lipopolysaccharide) を 80mg/kg を腹腔内投与あるいは経気道的に投与し、ARDS モデルマウスを作成する。

### 実験 2) PLC 遺伝子改変マウスの ARDS の表現型解析

マウスの表現型解析として、具体的に以下の項目について解析を行う。

- (1) 肺の湿乾重量比
- (2) 肺の病理組織
- (3) 気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の白血球分画

### 実験 3) PLC が肺胞上皮細胞に与える影響を検討する (In vivo)

PLC WT マウス、KO マウス各 ARDS モデルマウスを作成し、肺を摘出し、炎症性サイトカインの発現に遺伝子型による違いがみられるかを解析する。

### 実験 4) PLC が上皮細胞に与える影響を検討する (In vitro)

各遺伝子改変マウスより上皮細胞を初代培養する。上皮細胞から RNA を抽出し、ARDS に関連する炎症性サイトカインの qRT-PCR を行い、各群の比較をする。

### 実験 5) 肺胞上皮内のシグナル解析

初代培養した肺胞上皮細胞を、LPS 500 ng/ml で刺激して NF- B シグナルを中心に

ウェスタンブロッティングで細胞内シグナルの解析を行った。

#### 4. 研究成果

PLC の WT マウスおよび KO マウスを使用して、LPS 誘導性 ALI マウスモデルを作成した。LPS 80mg/kg を経気道的に投与し他後、24 時間後に肺組織を取り出し、湿乾重量比を測定したところ、WT で見られた湿乾重量比の増加は KO では有意に抑制されていた (図 1)。

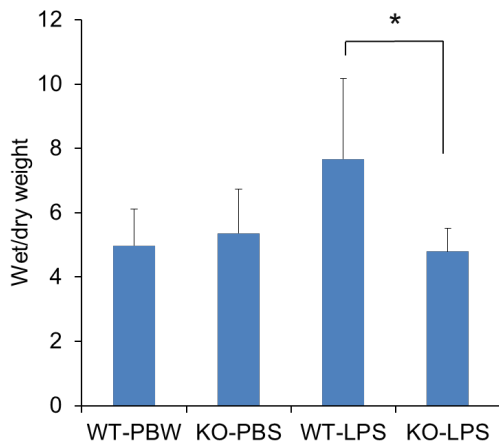
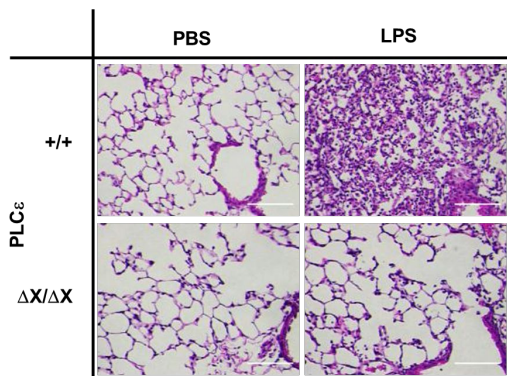


図 1. ALI マウスモデルの肺の湿乾重量比

\* : P<0.05, n=3-7

また、ALI マウスモデルの肺を LPS 投与 24 時間後にホルマリン固定し、パラフィン包埋したのち病理切片を切り出して HE 染色をしたところ、WT でみられる肺胞隔壁の肥厚や炎症細胞の浸潤は KO では著明に抑制されていた (図 2)。



HE staining (x200), bars, 100 μm, n=3

図 2. ALI マウスモデルの肺の HE 染色標本

同様に LPS 投与 24 時間後に行った気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の好中球の増加は WT に比較して KO で著明に産生が抑制されていた (図 3)。以上から LPS 誘導性の ALI の表現型は PLC の KO で抑制されることが明らかとなった。

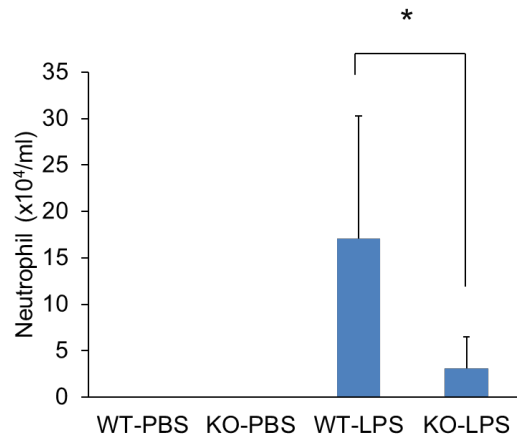


図 3. ALI マウスモデルの BALF 中の好中球数

\* : P<0.05, n=6-9

次に、マウスの LPS 誘導性 ALI モデルから LPS 投与 24 時間後に肺を取り出し、qRT-PCR で好中球の遊走、活性化に關与する炎症性サイトカインの発現を解析したところ、WT に比較して KO では Cxcl1, 2, 5, 15 などの炎症性サイトカインの発現が抑制されていた (図 4)。

LPS (WT/KO)

CCL3	8.19
CCL8	1.76
CXCL1	2.13
CXCL2	2.20
CXCL3	60.41
CXCL4	2.95
CXCL5	4.39
CXCL12	1.21
CXCL15	2.46



0.25 0.5 1 2 4 8 16

図 4. ALI マウスモデルの肺の炎症性サイトカイン

上記を in vitro で確認するために WT と KO のマウスの肺から肺胞上皮細胞を単離、初代培養し LPS500 ng/ml で刺激したところ、これらのサイトカインは in vivo での実験と同様に qRT-PCR で発現が抑制されていた (図 5)。以上の事から、PLC は CXC ケモカインの産生を介して、ARDS の病態に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

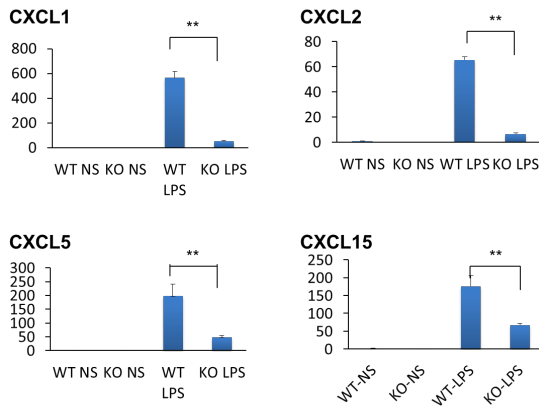


図 5. 初代培養肺上皮細胞株を LPS で刺激した際の炎症性サイトカインの産生

\* : P<0.05、\*\* : P<0.01、n=6

最後に PLC $\epsilon$  がどのようなシグナル経路を介して好中球性炎症に関わっているのかをマウスの肺上皮細胞を LPS500 ng/ml で刺激した後に蛋白を回収しウェスタンブロッティングを行った。またケモカインの産生に関わる時間経過を知るために LPS 刺激後 30 分、1 時間、2 時間、4 時間、8 時間、16 時間で蛋白を回収した。P65 ( S536 ) NF- $\kappa$ B のリン酸化は LPS の刺激により増加し、1 時間、2 時間の比較的短時間の時相にて WT マウスと比較して KO マウスでのリン酸化が抑制された。同様に NF- $\kappa$ B の活性化を IK $\beta$  $\alpha$  ( S32 ) のリン酸化で確認したが LPS 刺激により IK $\beta$  $\alpha$  のリン酸化は増加するものの WT と KO では大きな違いは認めなかった。また p38MAPK のリン酸化は LPS 刺激によって増強し、2 時間、8 時間、16 時間で WT と比較して KO マウスでリン酸化が抑制された。よって PLC $\epsilon$  は NF- $\kappa$ B、p38MAPK シグナルを介して CXC ケモカインの産生に関わっていると考えられた。

ALI/ARDS については、その詳細なシグナル経路、上皮細胞と炎症細胞との相互作用などについては未だ明らかにはされておらず、本研究によって初めて LPS 誘導性の好中球性炎症における PLC の役割が明らかとなった。PLC は有効な治療法がなく、極めて死亡率の高い本疾患に対する、新しい治療ターゲットになりうると期待される。

#### 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 2 件)

- (1) 梅澤 佳乃子、永野 達也、小林 和幸、西村 春佳、田村 大介、西村 善博、急性呼吸窮迫症候群におけるホスホリパーゼ C の役割、第 56 回日本呼吸器学会学術講演会、2016 年 4 月 9 日、国立京都国際会館(京都府・京都市)

- (2) Kanoko Umezawa、Tatsuya Nagano、Hironori Edamatsu、Haruka Nshimura、Daisuke Tamura、Kazuyuki Kobayashi、Tohru Kataoka、Yoshihiro Nishimura、A mouse model of acute lung injury implicates phospholipase C in neutrophilic inflammation through CXC chemokine production、ERS International Congress 2016、September 4, 2016、London (UK)  
〔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

小林 和幸 (KOBAYASHI KAZUYUKI)  
神戸大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：50403275

##### (2) 研究分担者

西村 善博 (NISHIMURA YOSHIHIRO)  
神戸大学・医学部附属病院・教授  
研究者番号：20291453  
永野 達也 (NAGANO TATSUYA)  
神戸大学・大学院医学研究科・特命助教  
研究者番号：80624684  
田村 大介 (TAMURA DAISUKE)  
神戸大学・医学部附属病院・特定助教  
研究者番号：80646597

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )