

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860607

研究課題名(和文) 気道炎症におけるホスホリパーゼC の役割

研究課題名(英文) The role of phospholipase Cepsilon in airway inflammation

研究代表者

永野 達也 (Nagano, Tatsuya)

神戸大学・医学(系)研究科(研究院)・特命助教

研究者番号：80624684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000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。本研究は、PLC の遺伝子改変マウスとブレオマイシン誘導性肺線維症モデルを用いて、肺線維症におけるPLC の役割を明らかにすることを目的としている。病理組織学的に、PLC 欠損マウスでは、炎症細胞の浸潤やコラーゲンの沈着が著明に抑制されていることを明らかにした。また、PLC の欠損により、気管支肺胞洗浄液中の好中球やリンパ球の増加が抑制されることが明らかとなった。以上より、PLC は好中球やリンパ球を介する肺線維症の形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Phospholipase C (PLC) is an effector of Ras and Rap small GTPases and is highly expressed in non-immune cells. PLC has been shown to play a role in the development of T helper type 2 (TH2) cell-mediated airway inflammation. This study aimed to elucidate its role in the lung fibrosis by employing a bleomycin-induced pulmonary fibrosis model using the mutant mice where PLC is enzymatically inactive. Pathohistological studies of the sections of the lung showed that infiltration of leukocytes and collagen deposition were greatly suppressed in PLC deficient mice. The infiltration of neutrophils and lymphocytes in bronchoalveolar lavage fluid was suppressed in PLC deficient mice. These results demonstrate an important role of PLC in the lung fibrosis that mediated by neutrophils and lymphocyte.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：PLC 肺線維症

## 1. 研究開始当初の背景

PLC $\epsilon$ はC末端にGTP結合活性型RasとRap1が結合するRas/Rap1関連ドメインとN末端にCDC25ホモロジドメインを有しており、G蛋白質共役受容体やレセプターチロシンキナーゼの両方の活性化により活性化を受ける。その結果、PLC $\epsilon$ は基質であるphosphatidylinositol 4,5-bisphosphate {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Diacylglycerol (DAG)とInositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>)を産生し、それぞれProtein kinase 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 (Edamatsu et al. *Methods Enzymol.* 407:99-107, 2006)。哺乳動物においては、PLC $\epsilon$ は表皮の角化細胞、皮膚の線維芽細胞、上皮細胞において発現しているが、リンパ球、顆粒球、マクロファージ、樹状細胞などには発現が見られない (Ikuta et al. *Cancer Res.* 68: 64-72, 2008, and Hu et al. *J Immunol* 184: 993-1002, 2010)。PLC $\epsilon$ の生理学的作用には、非免疫細胞からの炎症性サイトカインの産生を介した炎症の促進があり、PLC $\epsilon$ のノックアウト (KO) マウスでは、ホルボールエステルや紫外線B波 (UVB) による皮膚の炎症が減弱することを報告してきた (Ikuta et al. *Cancer Res.* 68: 64-72, 2008, and Oka et al. *Lab Invest.* 91:711-8, 2011)。また、PLC $\epsilon$ をKOや、ノックダウンした培養細胞を用いた実験から、PLC $\epsilon$ は腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Harada et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 414:106-11, 2011)、リゾホスファチジン酸 (LPA) (Dusaban et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:3609-14, 2013)、スフィンゴシン1リン酸 (S1P) (Dusaban et al. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:3609-14, 2013)、UVB照射 (Oka et al. *Lab Invest.* 91:711-8, 2011) による炎症に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。

呼吸器領域において、申請者がこれまでに進んできた研究から、PLC $\epsilon$ は炎症応答の場となる肺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明らかにした。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 $\epsilon$ 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 $\epsilon$ 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。一方で、樹状細胞の遊走能や肥満細胞の脱顆粒などには遺伝子型による影響がみられず、上皮・間葉系細胞をTNF- $\alpha$ で刺激した後のケモカイン (C-Cモチーフ) リガンド2 (Ccl2) やケモカイン (C-X-Cモチーフ) リガンド2 (Cxc12) などの炎症性サイトカインの分泌に遺伝子型による違いがみられることを明らかにした。しかしながら、現在のところTNF- $\alpha$ 誘導性のPLC $\epsilon$ の活性化機序や炎症性サイトカインの産生機序に関し

て、詳細は明らかとなっていない。

以上のように、Th2細胞を介するアレルギー性炎症におけるPLC $\epsilon$ の役割についての解析を進めているが、近年の研究から肺線維症においても、組織の修復過程においてTh2細胞が分泌するIL-4、IL-13などのサイトカインが線維芽細胞を活性化し、細胞外基質の産生を促進することが示唆されてきている (Liu et al. *PLoS One* 5:e15404, 2010)。このように呼吸器系の炎症においてヘルパーT細胞は中心的な役割を果たしているが、PLC $\epsilon$ は上皮間葉系細胞に強く発現し、炎症性サイトカインの分泌を介して、Th2細胞を介した炎症応答に関与していることから、肺線維症におけるヘルパーT細胞を介した炎症の修復過程で生じる上皮間葉系細胞の線維化形成機構にもPLC $\epsilon$ が関与している可能性が推測され本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、TNF- $\alpha$ 誘導性のCcl2の産生におけるPLC $\epsilon$ やNF $\kappa$ Bの関与について明らかにすること、およびPLC $\epsilon$ の肺線維症における役割を、上皮間葉系細胞とヘルパーT細胞の相互作用に着目して明らかにしていくことである。そこで、PLC $\epsilon$ のWTマウスとKOマウスを使用し、(1)プレオマイシンによる肺線維症モデルの表現型、特に炎症細胞のサブセットに与えるPLC $\epsilon$ の遺伝子型の影響を解析する。また、(2)肺線維症において重要な役割を果たしている線維芽細胞におけるPLC $\epsilon$ の発現解析を行い、TGF- $\beta$ 刺激による線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化に与えるPLC $\epsilon$ の影響を解析する。さらに、(3)上皮間葉系細胞からの炎症性サイトカインの産生に与えるPLC $\epsilon$ の役割について解明を目指すこととした。

## 3. 研究の方法

<実験1. 気道上皮細胞の初代培養とTNF- $\alpha$ による刺激実験>

PLC $\epsilon$ のWTマウスから気管を取り出し、抗菌剤入りのHam's F12培地にプロナーゼを溶解させた (1mg/ml) 溶解液中で4、一晚反応させる。気管を溶解液で洗い流し、回収した細胞懸濁液を遠沈して上清を捨て、培地と混ぜ、Primaria platesにて3時間培養を行う。その後、培地を回収して遠沈して上清を捨て、インスリン、トランスフェリン、コレラ毒素、上皮成長因子 (EGF)、ウシ脳下垂体抽出物入りの培地を使用してコラーゲンIでコートされたプレートに撒き培養する。この初代培養気道上皮細胞を3 $\mu$ MのIKK阻害剤III (IKK)あるいは5 $\mu$ MのU73122で10分間反応させた後、10ng/mlのTNF- $\alpha$ で3時間刺激する。

<実験2. 肺線維症マウスモデルの作成・線維化の評価>

8から10週齢のPLC $\epsilon$ のWTとKOマウスにプレオマイシン (60 mU) を麻酔下に経気道的

に投与して肺線維症マウスモデルを作成する。対照群には同じく麻酔下に経気道的にPBSを投与する。マウスの体重の変化を経時的に観察し、線維化が完成していると考えられるプレオマイシン投与後21日目に肺を摘出し、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色、マッソン・トリクローム染色により病理学的に線維化を評価する。

<実験3. 炎症細胞のサブセットの決定>

プレオマイシン投与後1日目および7日目にマウスの肺に麻酔下にPBSを注入(0.8 mlを3回)し、回収して得られた気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid: BALF)を使用して、プレオマイシンで誘導される炎症細胞のサブセットをDiff-Quick染色にて病理学的に評価し、PLCεの遺伝子型による影響を解析する。

<実験4. 線維芽細胞中の初代培養とPLCεの発現解析>

PLCεのWTマウスの肺を麻酔下に摘出し、DMEMにコラゲナーゼtype3とDNase Iを加えたDigestion bufferで37-90分間溶解を行う。40 μmセルストレイナーにより余分な組織を取り除いた後、10%FBSと抗菌剤入りのDMEM培地で初代培養を行う。初代培養した線維芽細胞にPLCεが発現しているかRT-PCRで解析を行う。

4. 研究成果

[1] TNF-α誘導性のCcl2の産生に対するPLCεとIKK-NFκB経路の関与

星状膠細胞の初代培養を使った研究によると(Dusaban et al. Proc Natl Acad Sci U S A. 110:3609-14, 2013) G蛋白質共役受容体の刺激下で、PLCεによる炎症関連サイトカインの産生にNF-κBが関与しているという報告がみられる。しかしながら、角化細胞や皮膚の線維芽細胞の初代培養を用いたこれまでの研究から、TNF-αによるPLCεの活性化は、TNF-αの刺激を受けた細胞から産生される液性因子を介して起こることを明らかにしてきたため(Hu et al. J Immunol. 184:993-1002, 2010) TNF-α受容体の活性化とPLCεの活性化は気道上皮細胞においても間接的に起こる可能性がある。また、ヒトの角化細胞を用いた研究では、TNF-αの刺激によるCcl2の産生には、PLCεだけでなく、NFκBも必要なかった。そこで、TNF-αで刺激した気道上皮細胞からのCcl2の産生に、NFκBが関与しているかどうかを、NFκBの上流でNFκBの活性化に関与するIKKに対する阻害剤を用いて調べることとした。その結果、IKK阻害剤の投与によりTNF-α刺激によるCcl2の産生がコントロール群と比較して有意に抑制されていることが明らかとなった(図1、p<0.001)。また、汎PLC阻害剤のU73122でも同様にCcl2の産生の有意な抑制が認められた(図1、p<0.001)。

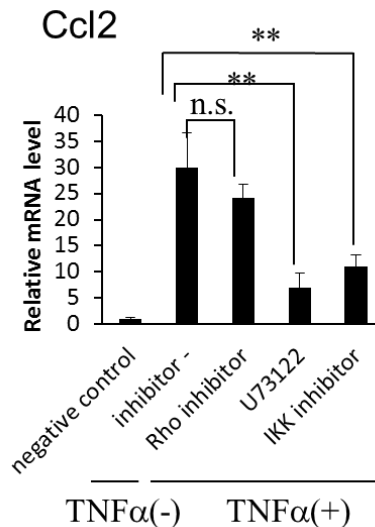


図1. TNF-α誘導性のCcl2の産生に対する細胞内シグナル阻害剤の治療効果

以上より、TNF-α誘導性のCcl2の産生に、PLCεやIKK-NFκB経路が重要な役割を果たしていることが示唆された。

[2] 肺線維症の表現型へのPLCεの遺伝子型の影響の解析

これまでの研究から、PLCεは呼吸器の上皮間葉系の細胞に発現していることを明らかとしてきたため、PLCεが肺線維症の発症にどのような影響を与えるかを明らかにするために、PLCεWTマウスとPLCεKOマウスを使用して、プレオマイシン誘導性の肺線維症モデルを作成した。その結果、WTマウスでみられる7日目での体重減少が、KOマウスでは有意に抑制されていた(図2、p<0.05)。

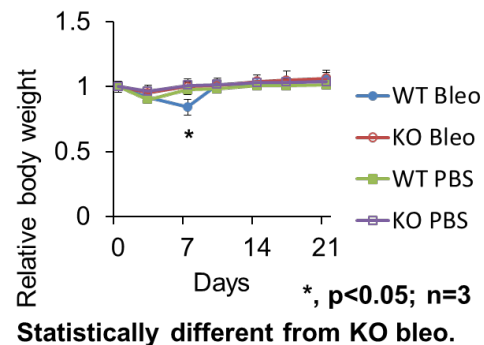


図2. プレオマイシン投与後の体重変化

また、21日目にマウスの肺を摘出し、病理切片を作成しHE染色を行ったところ、WTマウスでみられる肺胞腔内への炎症細胞の浸潤が、KOマウスでは著明に抑制されていた(図3)。

さらに、Masson trichrome染色を行うと、WTマウスでみられる肺胞腔内へのコラーゲンの沈着が、KOマウスでは著明に抑制されていることが明らかになった。

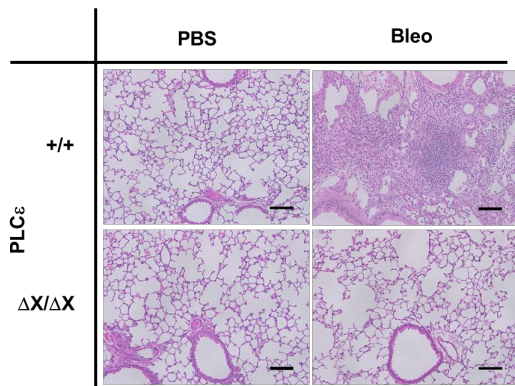


図 3. プレオマイシン投与後の肺の組織変化 (スケールバー: 100  $\mu$ m)

以上より、プレオマイシン誘導性の肺線維症の発症に PLC $\epsilon$ が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

### [3] 炎症細胞の分画へ与える PLC $\epsilon$ の遺伝子型の影響の解析

プレオマイシン誘導性の肺線維症で急性期に起こる炎症応答と、その炎症応答に与える PLC $\epsilon$ の遺伝子型の影響を調べるために、プレオマイシン投与後 1 日目と 7 日目に BAL を行い、BALF 中の炎症細胞の分画を解析した。その結果、プレオマイシンの投与後 1 日目の BALF 中では、好中球数とリンパ球数に PLC $\epsilon$ の遺伝子型による影響は見られなかったが、WT マウスでみられる 7 日目での好中球の増加が、KO マウスでは抑制されている傾向や、WT でみられる 7 日目でのリンパ球の増加が、KO マウスでは有意に抑制されている傾向がみられた (図 4,  $p < 0.05$ )。

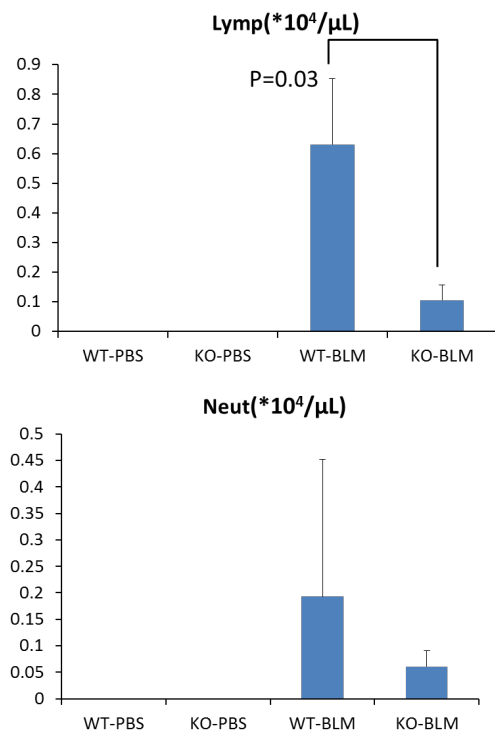


図 4. プレオマイシン投与後 7 日目の BALF 中の炎症細胞分画

以上の結果より、PLC $\epsilon$ はプレオマイシンによる主としてリンパ球性の炎症に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

### [4] 線維芽細胞中の PLC $\epsilon$ の発現解析

現在のところ、炎症の制御だけで肺線維症の制御を行うことは難しく、線維化の制御が重要な臨床課題となっている。そこで、線維化の中心的な病態である線維芽細胞の筋線維芽細胞への形質転換に PLC $\epsilon$ が直接的に関与しているかどうかを確認することとした。まず、WT マウスより肺を摘出し、線維芽細胞を単離培養し PLC $\epsilon$ の発現を RT-PCR で確認した。pan-cytokeratin と vimentin に対する抗体で免疫染色を行い、前者が陰性で、後者が陽性の間葉系への分化が確認できた細胞で、PLC $\epsilon$ が発現していることが明らかとなった (図 5)。

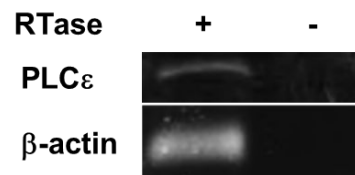


図 5. 線維芽細胞における PLC $\epsilon$ の発現解析

以上より、線維芽細胞に PLC $\epsilon$ が発現しており、線維化に何らかの役割を果たしている可能性があることが示唆された。

以上の結果より、TNF- $\alpha$ 刺激による Ccl2 の産生に PLC $\epsilon$ に加えて、IKK-NF $\kappa$ B 経路が重要な役割を果たしていること、PLC $\epsilon$ はリンパ球性の炎症を介してプレオマイシン誘導性の肺線維症の形成に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。今後の計画として、PLC $\epsilon$ の Th2 系炎症への関与について、BALF 中の Th2 細胞由来サイトカインを ELISA により定量する予定である。また、気道・肺胞上皮細胞での PLC $\epsilon$ の発現が認められることから、マウス初代培養細胞を用いてプレオマイシン刺激に伴うケモカインの測定を予定している。

### 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 1 件)

1. Nagano T, Edamatsu H, Kobayashi K, Takenaka N, Yamamoto M, Sasaki N, Nishimura Y, Kataoka T, Phospholipase C $\epsilon$ , an effector of Ras and Rap small GTPases, is required for airway inflammatory response in a mouse model of bronchial asthma, PLoS One. 9(9):e108373. 2014.

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 永野達也、気管支喘息におけるホスホリパーゼ C $\epsilon$ の役割、第 42 回兵庫県臨床アレル

ギー研究会、2014年6月7日、神戸、兵庫県、  
神戸東急インホテル

〔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

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