

機関番号：20101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008年度～2010年度

課題番号：20590930

研究課題名（和文） 肺コレクチンを用いた薬剤性肺障害の制御

研究課題名（英文） Pulmonary collectin regulates drug-induced lung injury.

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

研究成果の概要（和文）：本研究は、薬剤性肺障害の成因や重症化において肺コレクチン(SP-A と SP-D)および Toll 様受容体(TLR)による炎症制御の機構を解明し、将来の肺治療への応用を目指してその基盤確立を目的として遂行された。まず、薬剤による肺障害のマウスモデルを確立し、SP-A ノックアウトマウスにおいては重症化していた。ラット肺胞マクロファージ細胞における薬剤刺激による炎症性サイトカイン産生は SP-A により抑制された。薬剤（ブレオマイシン）は sTLR2 と結合したが、SP-A によりその結合は阻害された。以上より、SP-A は薬剤性肺障害においても保護的な役割を有しており、TLR2 を介した炎症の増強を抑制している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The purposes of this project were to investigate the mechanisms of regulation by which lung collectins, surfactant proteins A and D (SP-A and SP-D), and Toll-like receptor (TLR) function against inflammation on the development of drug induced lung injury, and to establish the molecular basis for the clinical application of these proteins. First, the mouse model of lung injury was established using drugs, and SP-A^{-/-} mice had significantly higher mortality rates than WT mice. SP-A inhibited drug-induced inflammatory cytokine production from rat alveolar macrophages. SP-A blocked sTLR2-bleomycin binding in the dose dependent manner. These results suggest that bleomycin signals are transmitted through TLR2 dependent pathway and regulated by the molecular interaction of SP-A.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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：薬剤性肺障害、ブレオマイシン、肺コレクチン、肺サーファクタント蛋白質 A、トル様受容体

1. 研究開始当初の背景

(1) 薬剤性肺障害は呼吸不全を招き死に至

らしめる重大な医原性疾患である。最近、肺癌治療薬、抗不整脈薬、リウマチ治療薬など、様々な薬剤性肺障害が注目されている。本来治療目的に使用されている薬剤で健康被害を受ける患者にしてみれば容認しがたい事態であるが、憂慮すべきは事例報告が年々増加の一途にあることである。もっと安全な薬剤使用を可能にするため、詳細な病態解析と新規治療の開発が急がれる。

(2) 肺コレクチンとして知られる surfactant protein (SP)-AとSP-Dは肺内の自然免疫調整因子である。我々はこれまでにSP-AがLPS関与のTNF- α 産生を抑制すること、その作用はTLRとの直接結合に依ること、また、肺コレクチン内の特定のドメインがその生理活性部位であること等を明らかにしてきた。

2. 研究の目的

(1) マウスの薬剤性障害肺で強発現するTLRsを特定する。

(2) 肺コレクチンがTLRを介し肺障害の進行を抑制するかを検討し、抑制効果が確認できた場合には肺コレクチン・リコンビナント製剤の効果を検討する。

(3) 薬剤刺激とII型肺胞上皮細胞のアポトーシスとの関係やアポトーシス防御因子としての肺コレクチンを検討し、その成果を治療へ応用するための基盤とする。

3. 研究の方法

(1) 肺サーファクタント蛋白質ノックアウトマウスを用いた薬剤性肺障害モデルを形成し、ホルマリン固定肺組織やBALF液の分析を行った。

①ブレオマイシン：野生型マウス(C57BL/6)またはSP-A(k/o)マウスに腹腔麻酔下にブレオマイシン(10mg/kg)をMicrosprayerを用いて経気道投与し、1日

後に肺組織やBAL液を回収し検討した。

②アミオダロン：マウスにAlzet-pumpを用いてブレオマイシンを持続皮下投与し、21日後に肺組織やBAL液を回収し検討した。

(2) 薬剤刺激による細胞傷害を検討した。

①SDラット(週齢8週)を腹腔麻酔下に安楽死させ、気管より生理食塩水を注入して肺洗浄し、回収液から肺胞マクロファージを分離し、培養した。細胞をブレオマイシン刺激し、サイトカイン産生量をELISAで定量した。

②HEK293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ブレオマイシンによるNF- κ Bの誘導を検討した。

(3)ブレオマイシン、肺コレクチンや受容体との結合を検討した。

①分子間の結合を調べるため、ビアコアを用いてブレオマイシンとTLR2, TLR4の細胞外ドメイン(sTLR2, sTLR4)を合成した蛋白との結合を検討した。また、ブレオマイシンと肺コレクチンとの直接の結合を検討した。

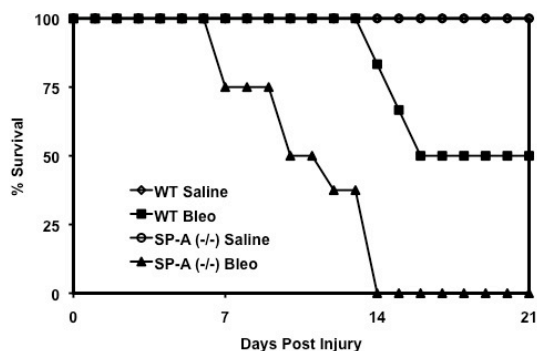
②ブレオマイシンをELISAプレートに固相し、sTLR2との結合を検討した。また、その結合がSP-A, SP-Dにより阻害されるかどうか調べた。

4. 研究成果

(1) 肺障害モデルを作成した。

SP-A(k/o)マウスでは野生型マウスと比較し、ブレオマイシンの経気道投与により死亡率が高かった(Fig.1)。ブレオマイシン投与1日後の肺組織は炎症細胞浸潤を強く認め、BALF中の炎症細胞数や炎症性サイトカインの誘導がSP-A(k/o)マウスで増強していた。また、マウスにAlzet-pumpを用いてブレオ

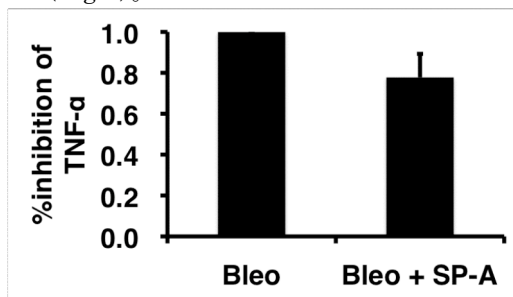
マイシンを持続皮下投与し、21日後に肺組織やBAL液を回収し検討した。ブレオマイシンの経皮持続投与モデルにおいても、SP-A(k/o)マウスで肺胞隔壁の肥厚や線維化がより強い傾向があり、BALF中のTGF- β 産生も増強していた。



(Fig.1)

(2) 薬剤刺激による細胞傷害を検討した。

①ラット肺胞マクロファージの初代培養細胞にブレオマイシン刺激すると、TNF- α 、IL-1 β 、KC が誘導された。また、その炎症性サイトカインの産生は SP-A により抑制された (Fig.2)。



(Fig.2)

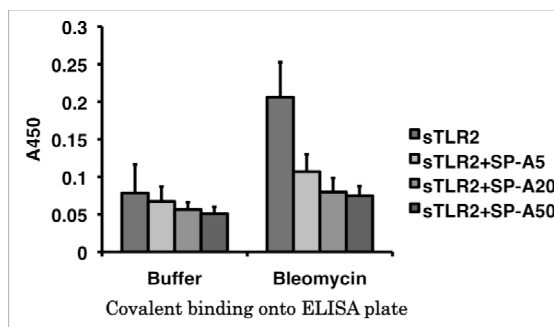
②HEK293細胞にsTLR2を遺伝子導入し、ブレオマイシン刺激するとNF- κ Bが誘導された。

(3)ブレオマイシン、肺コレクチンや受容体との結合を検討した。

①ビアコア法を用いて分子間の結合を検討すると、ブレオマイシンはsTLR2と結合しうることが分かった。またブレオマイシンはSP-Aと強く結合した。

②ELISA法ではブレオマイシンはsTLR2

と結合したが、SP-Aによりその結合は阻害された (Fig.3)。



(Fig.3)

以上の結果より、SP-Aは薬剤性肺障害においても保護的な役割を有しており、TLR2を介した炎症の増強を抑制している可能性が示唆された。肺コレクチンと薬剤により炎症をもたらす受容体への結合を直接的に特定したことは重要であり、今後の薬剤性肺障害の発症阻止や治療において重要な分子基盤となりうる。

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12件)

1) Sawada K, Arika S, Kojima T, Saito A, Yamazoe M, Nishitani C, Shimizu T, Takahashi M, Mitsuzawa H, Yokota S, Sawada N, Fujii N, Takahashi H, Kuroki Y. Pulmonary Collectins Protect Macrophages against Pore-forming Activity of Legionella pneumophila and Suppress Its Intracellular Growth. J Biol Chem. 2010; 285: 8434-43 (査読有り).

2) Murata M, Otsuka M, Mizuno H, Shiratori M, Miyazaki S, Nagae H, Kanazawa S, Hamaoki M, Kuroki Y, Takahashi H. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for measurement of rat pulmonary surfactant protein D using monoclonal antibodies. Exp Lung Res.

2010; 36: 463-8 (査読有り).

3) Nie X, Nishitani C, Yamazoe M, Arika S, Takahashi M, Shimizu T, Mitsuzawa H, Sawada K, Smith K, Crouch E, Nagae H, Takahashi H, Kuroki Y. Pulmonary surfactant protein D binds MD-2 through the carbohydrate recognition domain. *Biochemistry* 2008; 47: 12878-85 (査読有り).

4) Yamazoe M, Nishitani C, Takahashi M, Katoh T, Arika S, Shimizu T, Mitsuzawa H, Sawada K, Voelker DR, Takahashi H, Kuroki Y. Pulmonary Surfactant Protein D Inhibits Lipopolysaccharide (LPS)-induced Inflammatory cell responses by altering LPS binding to its receptors. *J Biol Chem*: 2008; 283: 35878-88 (査読有り).

[学会発表] (計 9 件)

1) Kuronuma K, Kudo K, Kuroki Y, Takahashi H. Surfactant protein A modulate bleomycin-induced lung injury in toll-like receptor 2 dependent pathway. In: 20th European Respiratory Society Annual Congress: 2010 Sep18-22: Barcelona, Spain.

2) Kuronuma K, Chiba H, Takahashi H, Voelker D. Anionic surfactant phospholipids modulate *Mycoplasma pneumoniae*-Induced inflammatory response from alveolar macrophages and U937 Cells. In: The 19th European Respiratory Society Annual Congress: 2009 Sep12-16:Wien, Austria.

3) Sawada K, Arika S, Yamazoe M, Nishitani C, Shimizu T, Takahashi M, Yokota S, Fujii N, Takahashi H, Kuroki Y. Pulmonary collectins exhibit bactericidal activity against *Legionella pneumophila*. In: The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity: 2008 Sep 7-12, Awaji, Japan.

4) Shiratori M, Kanai A, Otsuka M, Chiba H, Takahashi H. Surfactant protein D in sera as a prognostic factor of idiopathic pulmonary fibrosis. In: The 103th International Conference of

American Thoracic Society: 2008 May 16-21:Toronto, Canada.

[図書] (計 5 件)

1) 高橋弘毅、白鳥正典、千葉弘文. III. 診断の進歩: 3.肺線維症におけるバイオマーカーの最近の知見. 永井厚志 他編. *Annual Review 呼吸器 2010* 東京:中外医学社 2010. pp136-141.

2) 高橋弘毅. 間質性肺疾患の診断・検査:E1B. サーフアクタント蛋白質 (SP-A, SP-D). 杉山幸比古、藤田次郎編. *間質性肺疾患診療マニュアル*. 東京:南光堂; 2010; pp126-128.

[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

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

黒木 由夫 (KUROKI YOSHIO)

札幌医科大学医学部・教授

研究者番号: 70161784

(3)連携研究者

白鳥 正典 (SHIRATORI MASANORI)

札幌医科大学医学部・講師
研究者番号：40295366

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

工藤 和実 (KUDO KAZUMI)
札幌医科大学医学部・助教
研究者番号：90438002

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