

機関番号：24303

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791772

研究課題名（和文） 細胞骨格制御タンパク質による肺胞構築恒常化機構の解明

研究課題名（英文） Advances in the understanding of alveolar architectural maintenance and homeostasis by the cytoskeletal linker protein.

研究代表者

橋本 壮志 (HASHIMOTO SOSHI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：60515279

研究成果の概要（和文）：

細胞骨格制御タンパクのひとつであるモエシンは、免疫組織学的検討により、マウス正常肺の肺胞上皮細胞に強い発現を認めた。ブレオマイシン肺線維症モデルマウスを用いた検討では、モエシンが肺線維化過程において、肺間質内の線維芽細胞や浸潤細胞にも強い発現を示すことが示されたものの、その機能的役割までは解明できなかった。一方で、モエシンとの相互作用が報告されている中性エンドペプチダーゼ (NEP) の活性を調査し、ALI/ARDS 病態下での血漿中の活性低下および気管支肺胞洗浄液中の活性増加を見出した。

研究成果の概要（英文）：

We found out that moesin, a member of the ERM family of cytoskeletal linker proteins, was specifically localized in the distal lung epithelium using immunohistochemical analysis. Although we also found that interstitial cells, including interstitial fibroblasts and infiltrating inflammatory cells expressed moesin protein in the lung of mice treated with bleomycin, we failed to figure out the physiological function of moesin protein. On the other hand, in this experimental and clinical study of ALI/ARDS, we found that the activity of NEP, reported to interact with moesin, was significantly decreased in plasma and increased in the alveolar air space.

交付決定額

(金額単位：円)

|         | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2009 年度 | 2,400,000 | 720,000 | 3,120,000 |
| 2010 年度 | 900,000   | 270,000 | 1,170,000 |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 年度      |           |         |           |
| 総計      | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・救急医学

キーワード：急性肺損傷、肺線維化、肺胞構築、細胞骨格制御タンパク

## 1. 研究開始当初の背景

炎症反応過程に伴う不適切な肺損傷および肺線維化による機能的肺胞障害に対する臨床的に有効な治療法は未だ存在せず、肺組織の損傷・修復メカニズムの解明は ALI/ARDS

を含む重篤な炎症性肺疾患に対する治療を確立する上でも重要である。従来より、ARDS に対しては、過剰に産生され病態形成の中心的役割を担う炎症性メディエーターを標的とした治療薬の開発、臨床試験が行われてき

たものの、その有効性はすべて否定されている。確かに、炎症反応それ自体は組織の恒常性維持機構の一環として合目的な生体反応であり、炎症反応を仲介するメディエーターの多くが組織障害に働く一方で、組織修復因子としての側面をも併せ持つことが示されている。

一方で近年、再生医療分野の目覚ましい発展とともに、内在する肺組織構成細胞自体に注目が集まっている。とりわけ ARDS に対してはその本態である肺胞障害に対して、肺胞上皮細胞の増殖・分化を促進する試みにより肺組織の修復過程が改善され、線維化の抑制のみならず炎症反応をも抑制されることが報告されている。この事実はメディエーターを中心とした「炎症－抗炎症バランス」という従来の考えから、構成組織に焦点を置いた「損傷－修復・維持バランス」という新たな概念への可能性を予期させる。内在性の肺胞構造における形態維持、修復機構の解明は今後の薬物治療、遺伝子治療、あるいは細胞治療などの肺保護戦略治療にとっても重要であるものと思われる。

## 2. 研究の目的

細胞骨格制御タンパク質の一つである ERM タンパク質は哺乳動物においては互いに構造・機能とも高い相同性を有する三種類のタンパク質、エズリン・ラディキシン・モエシンから成る。ERM タンパク質は細胞膜とアクチン系細胞骨格を架橋することで、細胞・組織構造の維持、細胞運動・遊走、さらには膜タンパク質との相互作用により細胞内外のシグナル伝達機序への関与が様々な細胞実験から証明されている。ERM タンパク質は互いに機能的重複性を有しており、三重もの安全機構をもって細胞組織形態維持に関与する。

研究代表者は以前、この ERM タンパク質の中のモエシンが *in vivo* で肺胞上皮細胞に特異的に発現し、肺組織の損傷修復過程において重要な役割を果たしていることを報告した (Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 295(4) : L566-74, 2008)。しかしながら、モエシンタンパク質がいかにして肺胞上皮細胞における細胞－細胞間あるいは細胞－基

質間相互作用を介して肺胞構造の安定化を司るのか、その細胞分子メカニズムに関しては明らかにされていない。

本研究では、細胞骨格制御タンパク質であるモエシンが、肺組織において特徴的発現を示す肺胞上皮細胞において、Rho シグナル経路に対して負のフィードバック機構を介して肺胞上皮細胞の極性維持、細胞間接着による上皮間 integrity 維持機構への関与を検証することにより、内在性の肺胞構造維持タンパク質としての役割を探求することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)モエシン欠損による肺胞上皮細胞の細胞極性・細胞接着等の影響を観察する。加えて、細胞骨格制御機構に関与する細胞内シグナル伝達経路による修飾の有無を評価する。

### ①マウス肺胞上皮細胞の分離培養

マウスからの肺胞上皮細胞の分離は Corti らの手法に基づき行う (Am J Respir Cell Mol Biol. 14(4) : 309-315, 1996)。モエシン欠損および野生型 C57BL/6 マウスより肺組織を摘出し、dispase 溶液にて 37°C、45 分間 incubate させ、肺細胞を分離する。不純物を濾過した後、マウス IgG をコーティングさせた培養皿にて反応させ、接着細胞を除去する。得られた II 型肺胞上皮細胞は Nile Red 染色にて同定後、fibronectin、collagen をコーティングした培養皿内で 10%FBS を含んだ DMEM 培地にてコンフルエントになるまで培養する。

②ヒト肺胞上皮細胞株を用いた siRNA 導入 遺伝子改変マウスの飼育・繁殖あるいはマウスからの肺胞上皮細胞の回収が不十分な場合には、ヒト肺胞上皮細胞株 (A549 細胞) を用い、siRNA を導入することにより、モエシン機能をノックダウンさせる。

### ③単層肺胞上皮細胞における ERM タンパク質の細胞内発現解析

単層配列された肺胞上皮細胞における ERM タンパク質の発現を免疫組織学的手法を用い共焦点レーザー顕微鏡にて確認することにより、ERM タンパク質の細胞内局在を検討する。加えて、モエシン機能阻害による他の ERM タンパク質の影響を検討する。

#### ④肺胞上皮細胞極性、細胞配列、細胞間接着分子の解析

倒立顕微鏡下に上皮細胞配列変化をモエシン欠損の有無にて比較検討する。肺胞上皮細胞における F-actin の細胞内局在変化を検討するため、蛍光 phalloidin にて免疫細胞染色する。上皮細胞の端頂部-基部軸に沿った極性化の制御を細胞極性マーカーである E-cadherin 等の局在を検討することにより考察する。加えて、細胞接着に關与する Zo-1、Occludin、Connexin 等のタンパク質発現変化に關して主に免疫学的手法にて解析する。

⑤低分子 GTP 結合タンパクの細胞内活性測定 Rho ファミリー低分子 GTP 結合タンパクはアクチン細胞骨格の制御に中心的役割を果たしており、細胞運動や細胞接着に深く關与している。本研究では、Rho ファミリー低分子 GTP 結合タンパクのエフェクター分子である RhoA、Rac、Cdc42 による制御に影響を受けるかどうか、その活性を測定する。GST に融合させたエフェクタータンパク質結合領域を用いて、細胞内の活性型 Rho ファミリータンパク質を特異的に回収し、各々に特異的な抗体を用いてウェスタンブロッティング法にて検出する。

(2)肺胞上皮単層に損傷を加え、損傷後修復機転における moesin の關与を検討する。また、損傷治癒過程における moesin と膜タンパク質との關連性、相互作用につき考察を加える。

#### ①in vitro での肺胞上皮損傷モデル

肺胞上皮損傷モデルは肺胞上皮単層を 200  $\mu$  l ピペットチップにて掻き取り損傷を与えることにより作成する (scrape-wounding)。

#### ②肺胞上皮損傷過程に伴う細胞骨格制御タンパクの動態

損傷治癒過程に伴う細胞形態の変化、細胞遊走には細胞内骨格の再編成が重要であり、細胞骨格制御タンパク質である ERM タンパク質およびそのリン酸化状態を蛍光染色にて可視化するとともにウェスタンブロッティングにて定量評価する。

#### ③モエシン欠損が肺胞上皮修復に与える影響

チップスクラッチにて作成した肺胞上皮損傷を 12 時間・24 時間・48 時間と時系列を追

って創傷治癒過程を倒立顕微鏡にて観察する。また、KGF や HGF 添加による創傷治癒促進に対する影響を比較検討する。

#### ④肺胞上皮細胞遊走試験

加えて、Boyden chamber を用い肺胞上皮細胞の遊走能の変化を調査する。

#### ⑤損傷治癒過程における膜タンパク質との相互作用の解明

モエシンタンパク質は、細胞膜タンパク質との相互作用により細胞外環境に応じて細胞骨格を制御する可能性が報告されている。モエシンと相互作用すると考えられている膜タンパク質として、CD44 や ICAMs、中性エンドペプチダーゼ (NEP) などが想定されている。これら膜タンパク質との相互作用の解明、ならびに肺胞上皮の修復過程における役割に關しても検討を加える。

## 4. 研究成果

研究代表者は以前より、ERM タンパク質中のモエシンが in vivo で肺胞上皮細胞に特異的に発現し、肺組織の損傷修復過程において重要な役割を果たしている可能性を報告してきた (図 1)。また、ブレオマイシン肺線維化モデルマウスを用いた検討では、ブレオマイシン投与 14 日後の線維化期に、肺間質の線維芽細胞および浸潤細胞に強いモエシンの発現を認め (図 2)、これは、モエシンが肺損傷・線維化過程において、何らかの機能的役割を有する可能性を強く示唆するものであった。

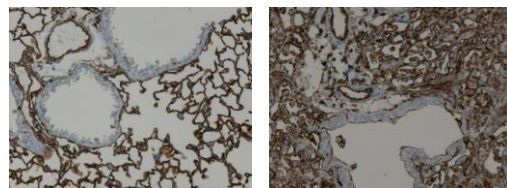


図 1

図 2

図 1. 正常肺のモエシンの発現

図 2. 線維化肺におけるモエシンの発現

そこで、モエシンのさらなる機能的役割を検討すべく、野生型マウスならびにモエシン欠損マウスの肺組織より II 型肺胞上皮細胞を分離培養し、in vitro において生体内での肺胞上皮構造を模倣することを考えた。しかしながら、モエシン遺伝子の改変マウスの繁

殖が困難を極め、加えてマウスからのⅡ型肺胞上皮細胞の回収率・生存率の低下が問題となり、予定していたプロトコールでの実験遂行は困難と判断した。このため、代替方法を用い、ヒト肺胞上皮細胞を使用し遺伝子ノックダウン技術を用いて、モエシン遺伝子の発現を抑制することにより、研究計画の継続遂行が図れるよう現在努めている。

一方で、われわれはモエシンを含むERMタンパク質群と細胞膜上で相互作用を示すと考えられる中性エンドペプチダーゼ(NEP)に着目した。中性エンドペプチダーゼ(NEP)は、種々の神経性ペプチドや血管作動性ペプチドなどを加水分解し、その生理作用の調節を司るメタロプロテアーゼである。NEPはALI/ARDS病態下で炎症反応を制御しようが、生体内では酵素活性が低く、このため詳細な生理活性変化は明らかにされていない。このため、高感度測定法であるHPLC蛍光法にて、NEP活性を測定した。NEP活性はNEP活性阻害剤thiorphanで抑制される水解活性を指標とした。これにより、食道癌根治術後にALI/ARDSを発症した患者血漿中で、NEP活性が低下することを見出した(図3)。また同様に、肺損傷モデルマウスの血漿中および肺組織中におけるNEP活性の低下を認めた。肺組織におけるNEP活性の低下は、免疫組織染色あるいは免疫ブロッティング法におけるタンパク質の発現抑制を伴っていた。一方で、気管支肺胞洗浄液(BALF)中においては、NEP活性は対照的に増加していることが判明した(図4)。こうしたNEP活性の動態は、ALI/ARDSの病態に少なからず影響を与える可能性がある。またNEP活性の変化は、ALI/ARDSの重症度指標としての可能性を示唆するものであり、本研究内容を2010年にRespiratory Research誌において発表した。

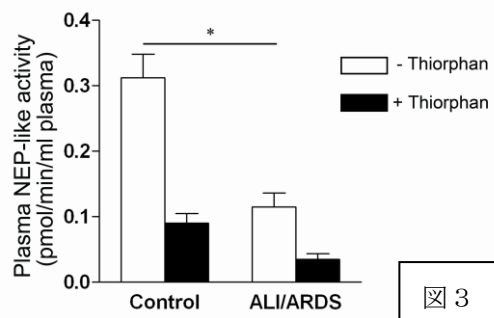


図 3

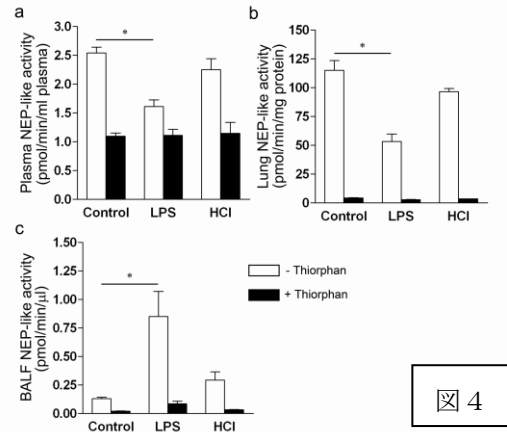


図 4

## 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 Soshi Hashimoto, Fumimasa Amaya, Kentaro Oh-hashii, Kazutoshi Kiuchi, Satoru Hashimoto. Expression of neutral endopeptidase activity during clinical and experimental acute lung injury. Respiratory Research 2010, 11:164. (査読有)

[学会発表] (計2件)

① 橋本壮志、志馬伸朗、木村彰夫、松山広樹、黄瀬ひろみ、稲見直子、竹下淳、橋本悟、佐和貞治. 急性呼吸窮迫症候群に対する人工呼吸管理法の年次的変遷. 2011. 2. 24. 第38回日本集中治療医学会学術集会. 横浜

② 橋本壮志、天谷文昌、橋本悟. ALI/ARDS病態下における中性エンドペプチダーゼ(NEP)活性の実験的ならびに臨床的検討. 2010. 3. 4. 第37回日本集中治療医学会学術集会. 広島

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

橋本 壮志 (HASHIMOTO SOSHI)  
 京都府立医科大学・医学研究科・助教  
 研究者番号：60515279