

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09208

研究課題名(和文)サーファクタントSCGB3A2の慢性閉塞性肺疾患治療薬の応用を目指した基盤研究

研究課題名(英文)Basic research aiming at the application of SCGB3A2 for chronic obstructive pulmonary disease therapeutic drug.

研究代表者

黒谷 玲子(Kurotani, Reiko)

山形大学・大学院理工学研究科・准教授

研究者番号：00453043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、セクレトグロビン(SCGB)3A2の慢性閉塞性肺疾患(COPD)治療薬への応用を目指した基盤研究を目的とした。COPDは長期喫煙による生活習慣病の一つと考えられる肺の疾患であり、末梢気道壁の肥厚・狭窄、肺胞壁の破壊などの特徴を示す。SCGB3A2は抗炎症作用、肺線維症の改善効果、肺発生における成長促進効果を有する。そこで、SCGB3A2はCOPDに対しても有効な効果を発揮することを期待した。主に、Scgb3a2遺伝子改変マウスを用いて作製したCOPDマウスモデルを用いてSCGB3A2のCOPDに対する改善効果を検証した。加えて、細胞培養系でのCOPD改善メカニズムの解明を行った。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed at basic research aiming at application of secretoglobin (SCGB) 3A2 to chronic obstructive pulmonary disease (COPD) treatment. COPD is a lung disease considered to be one of lifestyle-related diseases caused by long-term smoking, and shows features such as thickening, stenosis of the peripheral airway wall and destruction of the alveolar wall. SCGB3A2 has an anti-inflammatory effect, an improvement effect of pulmonary fibrosis, and a growth promoting effect in lung development. Therefore, we expected that SCGB 3 A 2 will also have an effective effect on COPD. Mainly, the improvement effect of SCGB3A2 on COPD was examined using COPD mouse model prepared using Scgb3a2 gene modified mouse. In addition, we clarified the COPD improvement mechanism in the cell culture system. This study suggested that SCGB3A2 upregulates the expression of alpha 1 antitrypsin by phosphorylation of STAT3, and SCGB3A2 showed an effect of improving pulmonary emphysema, in particular.

研究分野：細胞生物学, 分子生物学

キーワード：SCGB3A2 COPD 肺気腫 STAT A1AT

1. 研究開始当初の背景

COPD は長期喫煙による生活習慣病の一つと考えられる肺の疾患である。COPD は喫煙によって慢性炎症により発症し、末梢気道壁の肥厚・狭窄、肺胞壁の破壊、肺胞マクロファージ増加などの特徴を示す。COPD は禁煙により疾患の進展は抑制されるが、進展してしまった COPD を根治させる治療は存在せず、気管支拡張剤吸入やリハビリテーションなどの理学療法で対処することになるが、QOL の改善は難しい。最近の日本での死亡原因としても第 9-10 位となっており、COPD に対する根治療法の開発が望まれる。肺のサーファクタントタンパク質は、肺の恒常性の維持や炎症などの呼吸器疾患に重要なタンパク質であり、本研究ではサーファクタントと考えられている Secretoglobulin (SCGB) 3A2 に着目した。申請者らは、SCGB3A2 の機能として、肺炎の改善 (抗炎症作用) (*Am J Respir Crit Care Med.* 2006, 173:958)、肺線維症の改善効果 (*J Biol Chem.* 2011, 286:19682)、肺発生における気管支分岐と成熟を促進させる増殖因子であることを報告している (*Am J Respir Crit Care Med.* 2008, 178:389)。そのため、SCGB3A2 は慢性的な炎症により発現し、肺・気道の慢性炎症を病態として呈する COPD に対しても有効な効果を発揮することを期待した。しかしながら、SCGB3A2 の COPD における効果と分子メカニズムの解明は行われていなかった。

2. 研究の目的

SCGB3A2 の COPD に対する改善効果の証明のために、SCGB3A2 の動物実験レベルでの治療効果の解析と分子メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) タバコ煙曝露による COPD マウスモデルの作製と解析

野生型 (WT) と Scgb3a2 KO および Scgb3a2 TG にタバコ煙を INH03-CIGR01A (MIPS) 装置内で曝露して COPD モデルを作製した。

生理機能検査：高性能呼吸機能解析コンピュータシステム flexiVent (Primetech) を用いて肺コンプライアンスを評価した。  
 病理学的解析：HE 染色後、肺組織の気腫化 (mean linear intercept, destructive index) の計測を行った。さらに、COPD マウスモデル肺組織に対し、SCGB3A2 と  $\alpha 1$ -アンチトリプシン (A1AT) の免疫組織化学を行った。

(2) SCGB3A2 による細胞内分子メカニズム解析

SCGB3A2 は STAT1 を介して線維化を抑制する。また、STAT1 は STAT3 とヘテロ二量体を形成することが知られており、STAT3 は A1AT 転写促進への関与が肝細胞を用いて報

告された。そこで、STAT1, STAT3, A1AT に着目した。

SCGB3A2 刺激による分子発現解析：マウス肺線維芽細胞 MLg に対し、SCGB3A2 刺激後の STAT1, STAT3, A1AT 発現をウエスタンブロット (WB) で検出した。

STAT1 と STAT3 の遺伝子発現調節による A1AT 発現への影響：Stat1 と Stat3 の siRNA プローブによるノックダウン (KD) と過剰発現ベクターによる過剰発現後の A1AT 発現を WB にて決定した。

ChIP アッセイによる STAT の A1at 結合解析：STAT1 および STAT3 のマウス A1at 遺伝子への直接的な結合を決定する。

4. 研究成果

(COPD マウスモデルの肺気腫評価)

COPD マウスモデルの肺気腫の評価のために、肺コンプライアンス、Lm, DI を測定した。WT と TG マウスの肺コンプライアンスはタバコ煙曝露によって有意に増加した。また、KO マウスの肺コンプライアンスは非曝露条件下でも WT マウスより有意に高く、タバコ煙曝露による有意な増加は認められなかった (図 1a)。次に、肺組織観察を行ったところ、WT マウス肺に比べ、KO マウス肺ではタバコ煙曝露による肺胞壁の破壊や気腔の拡大が顕著であった (図 1b)。この時、Lm 値と DI 値は有意に増加した。しかし、興味深いことに、TG マウス肺ではタバコ煙曝露による肺胞壁の破壊や気腔の拡大はほとんど観察されず、Lm 値と DI 値にも変化は認められなかった (図 1b-d)。

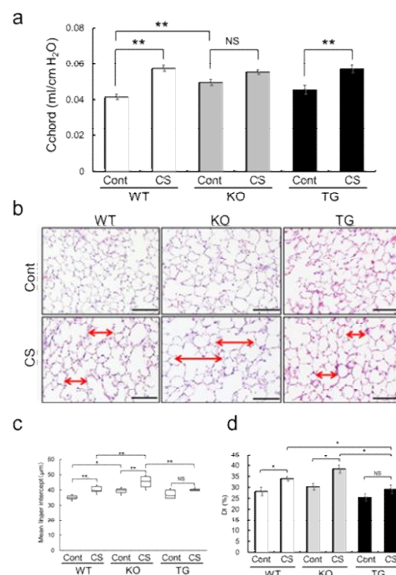


図 1. COPD マウスモデルの肺気腫評価 (a) 肺コンプライアンス, (b) HE 染色, (c) Lm 値, (d) DI 値. 値は平均値 ± 標準偏差 (student's t-test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ),  $n = 8$ , CS: タバコ煙曝露

(COPD マウスモデル肺における SCGB3A2 発現)

タバコ煙曝露後の SCGB3A2 発現を調べた。

WT マウスではタバコ煙曝露によって気管支上皮細胞での SCGB3A2 発現は減少し, TG マウスでは曝露後も SCGB3A2 発現は高く維持された(図 2)。また, タバコ煙曝露によって WT マウス肺では, 気管支上皮細胞へのダメージが観察された(図 2, 矢頭)。一方, TG マウス肺では正常に近い組織を保ち, ダメージが少ないことが確認できた。以上の結果から, SCGB3A2 による肺気腫抑制の可能性が見出された。

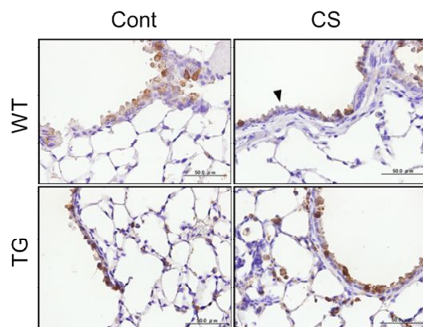


図 2. COPD マウスモデル肺における SCGB3A2 発現  
曝露による気管支上皮へのダメージ(矢頭)  
茶: SCGB3A2, 青紫: HE 染色

(SCGB3A2 による A1AT 発現制御の可能性)  
SCGB3A2 の細胞内シグナルである STAT1 に着目した時, STAT1 との関連性が高い STAT3 が A1AT 転写を促進することがヒト肝細胞で報告されていた。そこで, SCGB3A2 による肺気腫抑制メカニズムの一つとして, 肺気腫抑制で知られる A1AT に着目した。COPD マウスモデル肺での A1A に対する IHC によって, WT マウスでの気管支上皮細胞で観察された A1AT はタバコ煙曝露によって減少した(図 3)。一方, KO マウスの気管支上皮細胞での A1AT は非曝露群でも, 全く検出されず, TG マウスでは WT マウスに比べて強い A1AT 陽性像が確認され, 曝露後も発現は維持されていた(図 3)。

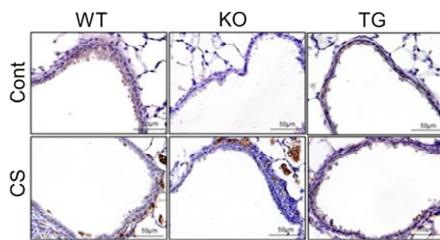
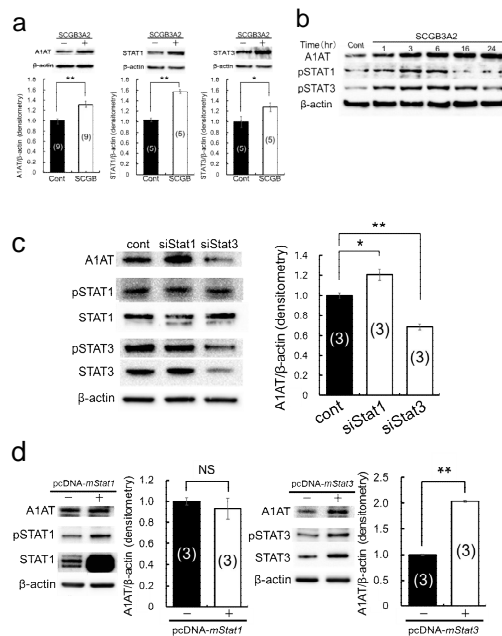


図 3. A1AT 免疫組織化学  
茶: A1AT, 青紫: HE 染色

(SCGB3A2 による細胞内分子メカニズム解析)  
MLg 細胞を SCGB3A2 刺激した結果, A1AT 発現は増加し, STAT1 だけでなく STAT3 の発現も増加した(図 4.a)。SCGB3A2 刺激後の STAT1 と STAT3 のリン酸化と A1AT 発現は刺激後 1 時間から増加し始めた(図 4b)。これらの結果から, SCGB3A2 は STAT1 と STAT3 を介して A1AT 発現を制御する可能性が示唆

された。  
STAT による A1AT 発現制御を明らかにするために, *Stat* 遺伝子の KD および過剰発現後の A1AT 発現に与える影響を解析した。A1AT 発現量は, 予想に反して, *Stat1* KD により増加し, *Stat3* KD によって減少した(図 4.c)。一方, *Stat1* と *Stat3* の過剰発現を行った結果, *Stat1* 過剰発現では STAT1 発現は顕著に増加したが, A1AT 発現量は全く変化しなかった。これに対して, *Stat3* 過剰発現では STAT3 は約 2 倍増加し, この時 A1AT も約 2 倍に増加した(図 4.d)。



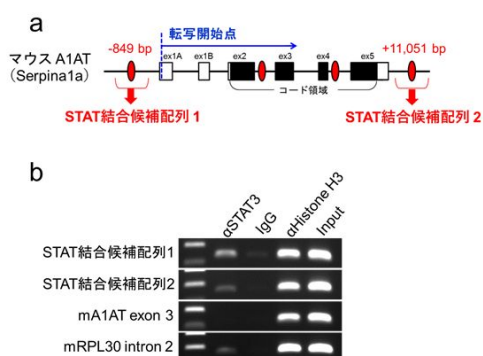
(図 4. SCGB3A2 による細胞内分子メカニズム解-1)

- (a) SCGB3A2 刺激後 16 時間後の MLg 細胞における A1AT, STAT1, STAT3 発現  
(b) MLg 細胞における SCGB3A2 刺激による経時的な A1AT, STAT1, STAT3 発現  
(c) siRNA プローブによる *Stat* 遺伝子 KD  
(d) *Stat* 遺伝子の過剰発現  
グラフ数字は実験サンプル数。タンパク質発現は  $\beta$ -actin にて標準化。値は平均値  $\pm$  標準誤差 (student's *t*-test, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ )

この結果を受け, A1AT 転写は STAT1 によって下方制御され, STAT3 によって上方制御される可能性が考えられたため, A1AT 遺伝子への STAT1 と STAT3 の結合を ChIP アッセイによって確認した。マウス A1AT 遺伝子上への STAT の結合に関する報告はなく, ヒト肝細胞における A1AT 遺伝子上への STAT3 の結合の報告のみである (*Biochem J.* 2002 Jul 15;365(Pt 2):555-60)。そこで, ヒトの報告を参考にマウス A1AT 遺伝子情報 (NCBI Reference Sequence: NC\_000078.6) を NCBI (National Center for Biotechnology Information Search database Search term) から取得し, STAT 結合候補配列 (TTCNNGAA) (*Am Rev Respir Dis.* 1985 Jul;132(1):182-5.) を検索した。この結果, マウス A1AT 遺伝子上に複数の STAT 結合候



補配列が存在することが明らかになった(図 5.a)。そこで, A1AT 転写開始点の 5' 上流領域 (STAT 結合候補配列 1) とヒトの報告と類似部位の 3' 下流領域 (STAT 結合候補配列 2) の 2 か所に対して STAT3 の結合を検討した。この結果, STAT3 はマウス A1AT 遺伝子上の 2 か所の候補配列での結合が確認され, 特に 5' 上流の STAT 結合候補配列 1 と強く結合した(図 5.b)。STAT1 については検討中である。



(図 5. STAT3 の A1AT 遺伝子への結合)

(a) マウス A1AT タンパクコード領域とその近傍にある STAT 結合候補配列。

(b) ChIP assay による STAT3 の A1AT 遺伝子上への結合解析。

本研究によって, SCGB3A2 は STAT3 のリン酸化促進を介して, A1AT 発現を増加することが明らかになった。すなわち, SCGB3A2 は肺気腫の抑制・改善効果を有することが示された。本研究は, 現在まで有効な治療薬が存在しない肺気腫の新しい治療薬としての応用に繋がるものと期待する。

## 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 10 件)

1. Kikuchi M, Kurotani R, and Konno H. Synthesis of a secretoglobin 3A2 type C (98-139) fragment by Dawson's native chemical ligation *Tetrahedron Letters*. 2017 58, 43, 4145-4148 (査読有)
2. Jin H, Fujita T, Jin M, Kurotani R, Namekata I, Hamaguchi S, Hidaka Y, Cai W, Suita K, Ohnuki Y, Mototani Y, Shiozawa K, Prajapati R, Liang C, Umemura M, Yokoyama U, Sato M, Tanaka H, Okumura S, Ishikawa Y. Cardiac overexpression of Epacl in transgenic mice rescues lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction and inhibits Jak-STAT pathway. *J Mol Cell Cardiol*. 2017;108:170-180. (査読有)
3. Kurotani R, Kimura S セクレトグロビン 3A2:呼吸器疾患可能薬の可能性 Secretoglobin 3A2: potential for treatment of

respiratory diseases アレルギーの臨床, *The Allergy in Practice* 37(4),2017, 48-53 (査読有)

4. Shibuya Y, Haga N, Asano R, Nakazawa H, Hattori T, Takeda D, Sugiyama A, Kurotani R, Kumagai I, Umetsu M, Makabe K. Generation of camelid VHH bispecific constructs via in-cell intein-mediated protein trans-splicing *Protein Eng Des Sel*. 2017 30(1):15-21. (査読有)
5. Sato M, Saito D, Shoji K, Kurotani R, Abe H, Nishidate I. Ultrathin forward-imaging short multimode fiber probe for full-field optical coherence tomography. *Optical Communications*. 2016 381:296-308. (査読有)
6. 阿部宏之, 黒谷玲子 多項目解析技術を駆使したウシ初期胚ミトコンドリア呼吸機能解析 産婦人科の実際 2015, 第 64 巻 第 6 号 815-822 (査読無)
7. Watanabe Y, Takakura K, Kurotani R, Abe H. Optical coherence tomography imaging for analysis of follicular development in ovarian tissue *Applied Optics*, 2015, (19):6111-6115. (査読有)
8. Cai Y, Yoneda M, Tomita T, Kurotani R, Okamoto M, Kido T, Abe H, Mitzner W, Guha A, Kimura S. Transgenically-expressed secretoglobin 3A2 accelerates resolution of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *BMC Pulm Med*. 2015 15:72.
9. Kurotani R, Shima R, Miyano Y, Sakahara S, Matsumoto Y, Shibata Y, Abe H, Kimura S. SCGB3A2 Inhibits Acrolein-Induced Apoptosis through Decreased p53 Phosphorylation. *Acta Histochem Cytochem*. 2015 48(2):61-68. (査読有)
10. Eguchi H, Umemura M, Kurotani R, Fukumura H, Sato I, Hoshino Y, Lee J, Amemiya N, Sato M, Hirata K, Singh DJ, Masuda T, Yamamoto M, Urano T, Tanigaki K, Yamamoto M, Sato M, Inoue S, Aoki I, and Ishikawa Y A magnetic anti-cancer compound for magnet-guided delivery and magnetic resonance imaging *Sci Rep*. 2015, 5:9194. (査読有)

[学会発表](計 18 件)

1. 佐藤鈴奈, 木下昂宗, 坂原聖士, 阿部宏之, 黒谷玲子 マウス下垂体前葉における SCGB3A2 発現制御機構の解明 山形大学医学部実験動物セミナー・第 28 回研究成果発表会 平成 29 年 12 月 21 日 山形大学医学部, 山形市
2. 車塚日明, 大島繭, 荒井康子, 阿部宏之, 黒谷玲子 セクレトグロビン (SCGB) 3A2 の加齢による肺への影響 山形大学医学部実験動物セミナー・第 28 回研究成果発表会 平成 29 年 12 月 21 日 山形大学医学部, 山

形市

3. 小野莊太郎, 木下昂宗, 坂原聖士, 荒井康子, 阿部宏之, 黒谷玲子 セクレトグロビン 3A2 の肺気腫抑制メカニズムの解明 山形大学医学部実験動物セミナー・第 28 回研究成果発表会 平成 29 年 12 月 21 日 山形大学医学部, 山形市
4. 小野莊太郎, 木下昂宗, 坂原聖士, 荒井康子, 阿部宏之, 黒谷玲子 セクレトグロビン 3A2 の肺気腫抑制メカニズムの解明 第 25 回山形分子生物学セミナー 平成 29 年 11 月 18 日 山形大学工学部百周年記念館 米沢市
5. 木下昂宗, 佐藤鈴奈, 阿部宏之, 黒谷玲子 マウス下垂体前葉において SCGB3A2 発現は転写因子 C/EBP $\beta$  および C/EBP $\delta$  により促進される 日本動物学会 第 88 回富山大会 富山県民会館, 富山県 2017 年 9 月 21-23 日
6. 木下昂宗, 佐藤鈴奈, 阿部宏之, 黒谷玲子 マウス下垂体前葉に発現する SCGB3A2 は転写因子 C/EBP $\beta$  と C/EBP $\delta$  によって転写促進される第 32 回 日本下垂体研究会学術集会 2017 年 8 月 2 日 - 4 日 鬼怒川グランドホテル
7. 佐藤鈴奈, 木下昂宗, 阿部宏之, 黒谷玲子 マウス下垂体前葉におけるセクレトグロビン 3A2 発現制御機構の解明 日本動物学会平成 29 年度東北支部大会 浅虫海洋生物学教育研究センター, 浅虫, 青森 2017 年 7 月 29-30 日
8. 木下昂宗, 宮野祐樹, 阿部宏之, 黒谷玲子 マウス下垂体前葉において SCGB3A2 は転写因子 C/EBP $\gamma$  もしくは C/EBP $\zeta$  と共存する。SCGB3A2 co-localizes C/EBP $\gamma$  or C/EBP $\zeta$  in the mouse anterior pituitary □第 94 回日本生理学会大会 アクトシティ浜松, 浜松市 2017 年 3 月 28 - 30 日
9. 小野莊太郎, 宮野祐樹, 木下昂宗, 阿部宏之, 黒谷玲子 SCGB3A2 は A1AT 発現制御によって肺気腫を抑制する。SCGB3A2 suppresses pulmonary emphysema bu the control of A1AT expression 第 94 回日本生理学会大会 アクトシティ浜松, 浜松市 2017 年 3 月 28 - 30 日
10. 小野莊太郎, 木下昂宗, 荒井康子, 阿部宏之, 黒谷玲子 セクレトグロビン 3A2 の肺気腫抑制に対する可能性 実験動物セミナー 第 27 回研究成果発表会 山形大学医学部 山形医学交流会館 大会議室 2016 年 12 月 15 日
11. Reiko Kurotani Secretoglobin3A2 suppresses pulmonary emphysema The 39<sup>th</sup> Annual Meeting of the Molecular Biology Science of Japan.2016 電子ファイル, ページ記載なし
12. Reiko Kurotani, Sotaro Ono, Takamune Kinoshita, Yasuko Arai, Hiroyuki Abe Secretoglobin3A2 suppresses pulmonary emphysema the 22<sup>nd</sup> International Congress of

Zoology and the 87th meeting of Zoological Society of Japan, Okinawa Convention Center, Okinawa 2016, Nov. 17-19

13. 佐竹 彬, 小野莊太郎, 木下昂宗, 阿部宏之, 黒谷玲子 セクレトグロビン 3A2 のマクロファージ遊走促進効果 日本動物学会・平成 28 年度東北支部大会 福島県立医大 福島市 2016 年 7 月 23-24 日
14. 小野莊太郎, 木下昂宗, 荒井康子, 阿部宏之, 黒谷玲子 慢性閉塞性肺疾患におけるセクレトグロビン 3A2 の効果の検証 日本動物学会・平成 28 年度東北支部大会 福島県立医大 福島市 2016 年 7 月 23-24 日
15. 黒谷玲子, 江口晴樹, 阿部宏之, 石川義弘 磁場誘導によるドラッグデリバリーと磁気共鳴イメージングを可能にする磁性抗がん化合物 第 17 回 山形ニューロサイエンス・医工 学研究会 山形大 山形市 2016 年 6 月 18 日
16. 黒谷玲子 呼吸器疾患におけるセクレトグロビン A 2 の役割 第 13 回肺研究フォーラム 21 グランドプリンスホテル京都, 京都 2016 年 4 月 9 日
17. Reiko Kurotani The Roles of Secretoglobin 3A2 in Respiratory Disease 第 93 回日本生理学会 札幌コンベンションセンター 2016 年 3 月 22 日 ~ 24 日
18. 黒谷玲子, 近野憲希, 小野莊太郎, 坂原聖士, 宮野祐樹, 阿部宏之 セクレトグロビン 3A2 は慢性閉塞性肺疾患を改善する Ssecretoglobin3A2 improved chronic obstructive pulmonary disease. 日本動物学会 第 86 回大会 2015 新潟 朱鷺メッセ 2015 年 9 月 17 日 ~ 19 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 1 件)

名称: 食品添加材料生成装置

発明者: 岡野朝香, 中田尚子, 山口博志,  
黒谷玲子, 石橋千穂里, 小関睦子,  
千田みゆき, 村田美紀, 伊藤有加利

権利者: DNP

種類: 特許

番号: 特願 2017-142283

出願年月日: 平成 29 年 7 月 21 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

研究室: <http://kurotani-lab.yz.yamagata-u.ac.jp/>

学科: <http://acebe.yz.yamagata-u.ac.jp/>

(1)研究代表者

黒谷 玲子 (KUROTANI Reiko)  
山形大学・大学院理工学研究科・准教授  
研究者番号：00453043

(2)研究分担者

阿部 宏之 (ABE Hiroyuki)  
山形大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：10375199

柴田 陽光 (SHIBATA Yoko)  
福島県立医大・教授  
研究者番号：60333978

今野 博行 (KONNO Hiroyuki)  
山形大学・大学院理工学研究科・准教授  
研究者番号：50325247

(3)連携研究者

熊木 伸枝 (KUMAKI Nobue)  
東海大学・医学部講師  
研究者番号：90366021

(4)研究協力者

小野 荘太郎 (ONO Sotaro)  
木下 昂宗 (KINOSHITA Takamune)