

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07050

研究課題名(和文) 間質性肺炎発症における肺胞腔内HMGB1の制御機構の解明

研究課題名(英文) Research for the regulation of HMGB1 in the interstitial lung disease

研究代表者

柳原 豊史 (Yanagihara, Toyoshi)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：40778841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者は「取り残された生活習慣病への挑戦-肺の生活習慣病の克服を目指した医療ネットワークの構築-」(略：肺の生活習慣病研究)(所管コード GAXU0118)という、福岡県下の九州大学を含む4大学と関連病院の連携により、特発性間質性肺炎を追跡する、前向きコホート研究に従事しており、日本人における特発性間質性肺炎のゲノム研究を行うことが可能な立場にある。このコホート研究で入手した特発性間質性肺炎患者のヒトゲノムを用いて日本人の遺伝子多型を探索を開始し、一部解析結果を得られた。

研究成果の概要(英文)：We have conducted a prospective cohort study to fully investigate tobacco-related lung diseases including idiopathic interstitial pneumonitis in 29 hospitals in Fukuoka Prefecture. Using genome from this cohort, we have started searching polymorphisms in idiopathic interstitial pneumonitis in Japanese populations.

研究分野：呼吸器内科学分野

キーワード：間質性肺炎 ゲノム

1. 研究開始当初の背景

間質性肺炎とは、肺間質を炎症や線維化病変の主座とする疾患である。間質性肺炎の原因は多岐にわたり、職業(じん肺)・環境性(過敏性肺炎)や薬剤など原因の明らかな場合や、膠原病・サルコイドーシスなどの全身性疾患に付随して発症する場合と、原因が特定できない場合がある。

後者を特発性間質性肺炎と称し、我が国の指定難病に認定されている。とりわけ、最も患者数の多い特発性肺線維症は慢性進行性であり、平均生存年数が3-4年と予後不良である。

また、急速に呼吸状態が悪化する病態を急性増悪といい、ステロイドパルス療法や血液浄化療法など集学的治療を行っても、今なお致死率が高く、その機序解明と治療法の確立は喫緊の課題である。注目すべきことに、急性増悪は欧米人よりも日本人を含む東アジア人で多く、何らかの遺伝的素因が推察される。

【HMGB1は肺の線維化に関与している】

核内タンパク質であるHMGB1は、転写制御やDNA構造維持といった役割を担っている反面、各種刺激により核内から細胞質中に移動し、細胞外へ放出され、炎症・組織傷害のメディエーターとしても働くことが知られている(Nat Rev Immunol. 5: 331-42, 2005)。

申請者の所属する研究グループは、特発性間質性肺炎の患者肺組織、及び気管支洗浄液中でHMGB1発現が亢進していること、マウスブレオマイシン肺線維症モデルにおいても気管支肺胞洗浄液中のHMGB1が増加し、同モデルは抗HMGB1中和抗体を投与することで肺線維症が抑制されることを見出した(Am J Respir Cell Mol Biol. 39: 440-7, 2008)。

【レクチン様ドメインはHMGB1作用を抑制する】

トロンボモジュリンは血管内皮に存在する膜タンパク質で、活性型プロテインCを介した抗凝固因子として知られており、遺伝子組み換えトロンボモジュリン製剤は2008年以来、我が国で播種性血管内凝固症候群(DIC)の治療薬として臨床使用されている。

トロンボモジュリンのN末端に存在するレクチン様ドメイン(Fig. 1参照)がHMGB1と会合し、抗炎症効果を持つことが報告されている(J Clin Invest. 115: 1267-74, 2005)。

また、近年では特発性肺線維症の急性増悪に遺伝子組み換えトロンボモジュリン製剤を用いることで、生存率が改善するという報告が相次いでいる(Respiration 89: 201-207, 2015)(Chest 148: 436-443, 2015)。

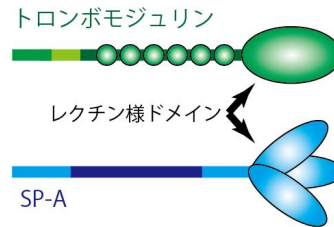


Fig.1 トロンボモジュリンとSP-Aはレクチン様ドメインを持つ

一方で、特発性間質性肺炎患者の全ゲノム連鎖解析により、一部の患者においてはSFTPA2(SP-Aをコードする遺伝子)の遺伝子点変異が海外において報告されてきており、その遺伝子点変異はSP-Aのレクチン様ドメイン(Fig.1参照)に存在していることが判明している。

SP-AはII型肺胞上皮細胞が産生する肺胞サーファクタントタンパク質で、主に肺胞における自然免疫系に関与していると言われていたが、点変異による間質性肺炎発症の病態機序については未だ分かっておらず、原因解明の足がかりになると考えられる。

また、研究代表者は、文科省特別経費プロジェクト広域ネットワーク型臨床研究事業である、「取り残された生活習慣病への挑戦-肺の生活習慣病の克服を目指した医療ネットワークの構築-」(略:肺の生活習慣病研究)(所管コードGAXU0118)という、福岡県下の九州大学を含む4大学と関連病院の連携により、特発性間質性肺炎および慢性閉塞性肺疾患約1000例を追跡する、前向きコホート研究に従事しており、日本人における特発性間質性肺炎のゲノム研究を行うことが可能な立場にある。

2. 研究の目的

(1) HMGB1とSP-Aの相互作用が認められるのか。認められる場合はどのような意味を持つのか。

(2) 肺の生活習慣病研究で得られたゲノムをもとに、海外で報告されたような、SFTPA2の点変異が検出されるかを探索する。

(3) 肺の生活習慣病研究で得られたゲノムをもとに、SFTPAの遺伝子変異のみならず、海外で報告されている遺伝子多型についても検索し、日本人における間質性肺炎に対するリスクを検討する。

3. 研究の方法

(1) HMGB1と相互作用するタンパク質の探索

(主に SP-A)

GFP や HA などのタグ付き HMGB1 と SP-A 発現プラスミドを作製し、HEK293T 細胞や、ヒト肺胞上皮の cell line である A549 細胞に強制発現させ、免疫沈降を用いて会合が見られるかを確認する。

HMGB1 と会合するタンパク質が SP-A である場合は、SP-A の以下の 4 つの基本ドメイン：N 末端非コラーゲン領域、コラーゲン領域、ヘリカルコイル領域、レクチン様ドメイン領域について、それぞれを欠失させる。

(2) ヒトゲノムは全て SRL に委託して抽出し凍結保存している。これらゲノムを用いて SP-A 遺伝子に新規変異が存在しないか、プライマーを用いて PCR を行い、PCR 産物のダイレクトシーケンスを行い確認する。

(3) 特発性肺線維症のリスクとして海外で報告されている遺伝子多型(SNP)(MUC5B, TERT, TERC, OBFC1)について、日本人での頻度とリスク要因となるかを検討する。

4. 研究成果

(1) HMGB1 は SP-A と会合する

GFP もしくは mCherry タグ付き human HMGB1 と human SP-A2 (human SP-A homolog) を発現するプラスミドを作製し、HEK293T 細胞で強制発現させたところ、Fig.2 のように HMGB1 は SP-A2 と会合することが判明した。会合部位を同定するため、現在各基本ドメイン欠失変異体を作製し実験を行っている。

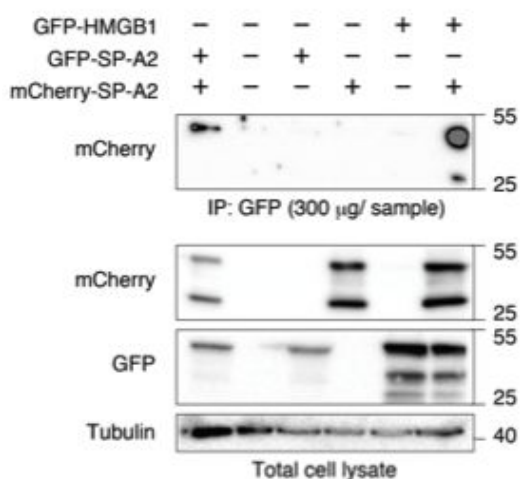


Fig. 2 HMGB1はSP-A2と会合する

(2) SP-A における遺伝子変異

病的変化をもたらす SP-A の点変異は全てレクチン様ドメイン部位に起きていることから、レクチン様ドメイン部位を検出できるプライマー

(5' -gtcttgctttccactgaatcct-3' , 5' -aaactgaaggccagacaggat-3') を作製した。

作製したプライマーを用いてシーケンスを行ったところ、既知の Q223K の SNP は検出することができたが、測定した範囲では新規遺伝子変異は検出することができなかった。この Q223K は病的意義をもたないことが報告されている。(Am J Hum Genet. 2009; 84(1) : 52-9.)

(3) 日本人における MUC5B rs35705950, TERT rs2736100, TERC rs1881984, OBFC1 rs1191865 と間質性肺炎発症リスクの相関

我々は mucin 5B (*MUC5B*) rs35705950, telomerase reverse transcriptase (*TERT*) rs2736100, telomere RNA component (*TERC*) rs1881984, Oligonucleotide / oligosaccharide - binding fold containing 1 (*OBFC1*) rs1191865 について Taqman primer を用いて肺の生活習慣病コホート研究から得られた 830 例のゲノムと、対象としての 379 例について検索し、間質性肺炎へのリスクとなり得るかを検討した。現在データを解析し、論文執筆中である。

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)

Bax-inhibiting peptide attenuates bleomycin-induced lung injury in mice. Suzuki K, Yanagihara T*, Yokoyama T, Maeyama T, Ogata-Suetsugu S, Arimura-Omori M, Mikumo H, Hamada N, Harada E, Kuwano K, Harada T, Nakanishi Y. *Biology Open* 2017; **6**: 1869-1875. 査読あり

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳原豊史 (YANAGIHARA Toyoshi)
九州大学病院呼吸器科・助教
研究者番号：40778841

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4)研究協力者

清原千香子 (KIYOHARA Chikako)

九州大学大学院医学研究院予防医学分野
講師