

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007 ～ 2008  
 課題番号：19390223  
 研究課題名（和文） 肺線維化におけるⅡ型肺胞上皮細胞機能の加齢による低下：STAM1 遺伝子総合的解析  
 研究課題名（英文） Decrease of type II pneumocyte function by aging in the process of lung fibrosis: multi-aspect evaluation of STAM1 gene  
 研究代表者  
 貫和 敏博（NUKIWA TOSHIHIRO）  
 東北大学・大学院医学系研究科・教授  
 研究者番号：40129036

## 研究成果の概要：

肺線維症は高齢者を中心とする、進行性の予後不良な肺疾患である。本研究は本病態形成に関与する遺伝子として、アダプター蛋白として細胞内輸送に関与する STAM1 遺伝子に着目し、総合的に検討した。その結果、末梢血細胞の STAM1 遺伝子 mRNA は肺線維症患者で発現低下をみた。しかし、STAM1 の上流 CpG 領域の DNA メチル化を詳細に検討したが、健常者との差はなかった。最近、本病態関連遺伝子としてテロメラーゼ遺伝子が報告された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2008 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

## 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：肺線維症、加齢変化、DNA メチル化、STAM1 遺伝子、Ⅱ型肺胞上皮細胞

## 1. 研究開始当初の背景

●肺線維症は、膠原病、環境・職業曝露、薬剤等背景要因の明らかなものと、原因の不明なものがある。しかしいずれの場合も大多数の肺線維化例は 50 歳以上に見られる。例えば一部に肺線維症を帰結する遺伝性疾患 Hermansky-Pudlack 症候群（HPS）では、その原因遺伝子 HPS1、HPS4 が細胞内蛋白輸送に関与し、肺線維化にも関連すると考えられている。しかしながらその欠損による albinism は出生初期から認められるが、同一遺伝子欠損でありながら肺での表現型である線維化は 50 歳前後より CT 画像で明らかになる。一

般の肺線維症はその病理組織像において、肺小葉領域における加齢による機能低下が関与すると考えられる。この領域にはⅡ型肺胞上皮細胞、肺胞マクロファージ、血管内皮細胞等が、肺のガス交換機能維持のためのサーファクタント産生、感染防御、抗凝固・血流維持等重要な役割を担っている。ことにⅡ型肺胞上皮細胞は、一般の線維化肺においてはその過形成が知られ、また HPS1、HPS4 欠損では細胞内顆粒や膨化が報告されている。Ⅱ型肺胞上皮細胞はサーファクタント産生機能が重要で、これが低下すれば肺胞は collaps を来す。サーファクタント産生には

EGF等のサイトカインの局所での関与が考えられる。

●最近、米国における大規模家族性肺線維症例 (familial interstitial pneumonia : FIP) (Am J Respir Crit Care Med, 2005) の全ゲノム検索では、第10染色体短腕10p13-14と第11染色体短腕にLOD score高値の領域を認め、後者は関連遺伝子同定中であるが前者は解析が進んでいない (図1. ATS2006, Schwartz DA, 口頭発表)。NCBIデータベースでは10p13-14には約30以上の遺伝子が存在する。そのうち機能や臨床表現型が記載されているのは、STAM1、ARVP6、AD7、BMI-1、LPRS、MCM10、MRC1、USP6NL、VIMの9種の遺伝子である。この内STAM1、MRC1 (mannose receptor C type1)、VIM (vimentin) は肺の線維化との関連が推察される。中でもSTAM1 (signal transducing adaptor molecule 1) はEGFシグナル下にリン酸化を受け (J Biol Chem, 277, 1031, 2002)、恐らく受容体の再利用・分解や細胞内蛋白移送に関与するものと推測される。

●STAM1はサイトカインIL2シグナルの下流の重要なシグナル伝達蛋白遺伝子としてクローニングされ、同様にクローニングされたHrs (hepatocyte growth factor receptor tyrosine kinase substrate) と二量体を形成し (図1)、受容体型蛋白質リン酸化酵素のinternalization、再利用、分解に関与すると考えられている。STAM1やHrsはEGFシグナル下流においても、自身がリン酸化を受け、未同定の会合蛋白とともに細胞内の蛋白移送に重要な役割をもつ。すなわち家族性間質性肺炎個体のゲノム解析より同定された領域において、その領域に存在するSTAM1は、II型肺胞上皮細胞のサーファクタント産生で受容体よりのシグナル、また細胞内顆粒の移送等では重要な細胞機能に関与している可能性がある (図2)。STAM1に関連する蛋白Hrsは細胞内蛋白移送に関連し (BBRC, 309, 848, 2003)、albinismの遺伝子HPS1との関連も疑われている。前述したようにHPS1遺伝子欠損における肺線維症の表現型が50歳前後より顕在化する事実は、肺の線維化プロセスが加齢過程や慢性喫煙刺激によるII型肺胞上皮細胞の変性が最初に存在するという仮説も可能である。実際、肺線維症の初期においては局所の炎症性反応はほとんどみられず、変性による肺小葉機能低下や防御能低下、肺胞虚脱を惹起し、さらに亢進して、炎症性変化が前面に出るとも考えられる。

## 2. 研究の目的

●本研究の目的は、肺線維症におけるII型肺胞上皮細胞の重要機能に関与する、候補遺伝子STAM1に関して、家族性肺線維症患者を中心にcoding領域の変異の有無、non-coding

領域における発現制御新規SNPの可能性の検討、加齢による発現低下におけるmethylation修飾変化等を総合的に解析し、肺の線維化における本遺伝子の関与を明らかにする事である。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト検体

#### ●対象:

1. 「特発性間質性肺炎診断と治療の手引き」 (日本呼吸器学会びまん性肺疾患診断・治療ガイドライン作成委員会編集 2004年)において、定義された特発性肺線維症患者。
2. 喫煙者特発性肺線維症患者で家族内に複数の肺線維症がみられる患者。
3. 上記患者の2親等以内の親族。
4. 対照としての健常ボランティア。

#### ①患者検体収集:

●すでに東北大学医学倫理委員会の承諾を受けた「家族性間質性肺炎における関連遺伝子同定における研究 (受付番号: 2005-63)」、及び「びまん性肺疾患におけるSTAM関連遺伝子の検索 (受付番号: 2005-222)」のもとに、informed consentの得られた喫煙者特発性間質性肺炎患者や家族内に複数の肺線維症患者が見られる患者家系。

例数: 患者群17例、健常ボランティア43例。核酸検体の抽出: 本研究では、対象患者よりの末梢血または保存病理組織より抽出したDNA、RNAを使用した。

#### ●STAM1遺伝子発現情報:

STAM1遺伝子発現をmRNA発現量により解析する。STAM1は全長70Kbpであり、Exonは13箇所である。リアルタイムPCRのためにSTAM1、STAM2、Hrs、hHPRT1のプライマーを作成し、リアルタイムPCRによりmRNAを定量した。STAM遺伝子変異検索: 4検体のcDNA (1622bp) のシーケンスを行いcoding領域における変異の検索を行った。

#### ②ヒトSTAM1 promoter領域の探索:

●STAM1のpromoter領域に関しては、十分な情報はまだない。Kimらのactive promoter map (Nature, 436, 876, 2005)を参考にすると、線維芽細胞ではSTAM1は第10染色体の17690569-17690619がTAF I binding siteである。しかしそれはSTAM1のcoding領域の上流70kに相当し、実際は不明である。そこで、MSP (Methylation-specific PCR)法を用い、STAM1転写開始点から200-300bp上流を標的領域とし、メチル化、非メチル化それぞれに特異的なプライマーを作成し、条件設定の後にPCR (95° 10m, 95° 30s, 62° 30s, 72° 30s 35cycles)を行った。

M-For:

5' -GAAAAAAGGCGTATAGTTCGATTC-3'

M-Rev:

5' -CGTAAACGAAATCCTTCAAACG-3'

U-For:

5' -GAGGAAAAAGGTGTATAGTTTGATT-3'

U-Rev:

5' -ATCTCCATAAAACAAAATCCTTCAAACA-3'

Product: M=115bp, U=123bp

● II型肺上皮細胞由来肺癌細胞株 A549、PC9 では Affymetrix microarray による発現 array データから STAM1 遺伝子を含む諸遺伝子の発現解析、メチル化解析、miRNA 発現解析を行った。

(2) マウスモデルによる検討の諸準備

①加齢、炎症変化を評価しうるマウスモデルの作成:

●マウスモデルの検討として、STAM1 (+/-) マウスを用いる。ヘテロ欠損マウスは、表現型はないが、線維症患者末梢血 STAM1 の mRNA 量が高齢者肺線維症で減少する事実を踏まえ、肺組織の加齢により修飾変化モデルとし、SMP30 早老マウスと交配する。SMP30 マウスはビタミン C 合成に関与する gluconolactonase 欠損であり (PNAS, 103, 5723, 2006)、喫煙で肺障害を来す (Am J Respir Crit Care Med, 174, 530, 2006)。これと STAM1 (+/-) を掛け合わせれば肺局所の過酸化状況を作成する可能性がある。

(本研究は大学内部局異動で、実験室、動物実験室等使用許可等困難となり断念した。)

(3) ヒト線維芽細胞における TGF  $\beta$ -1、ciclosporin A (CsA) の効果と STAM1。追加として、線維芽細胞培養系での TGF  $\beta$ -1 作用時、また臨床で頻用する CsA の効果を遺伝子発現変化で解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 臨床検体の末梢血リンパ球 STAM1 遺伝子発現の検討:

喫煙者特発性間質性肺炎患者で家族性肺線維症患者が見られる IPF 患者 (n=17)、健常対照 (n=43) より genomic DNA、mRNA を抽出し、STAM1 などの遺伝子発現を検討:

・Real time PCR において STAM1/HPRT1 (内部標準): 患者 (n=14) 1.43 $\pm$ 2.3 に対し、正常検体 (n=34) 7.23 $\pm$ 11.0 と低値であった。

STAM1 は前述の通り、末梢の単核球でも発現している。興味あることに、肺線維症患者で末梢血単核球の STAM1 発現が正常に比べて低下している (図 4)。この時、同様なシグナル伝達に関与が考えられる Hrs や STAM2 (類似遺伝子) を比べても、患者では必ずしも低下を認めない。

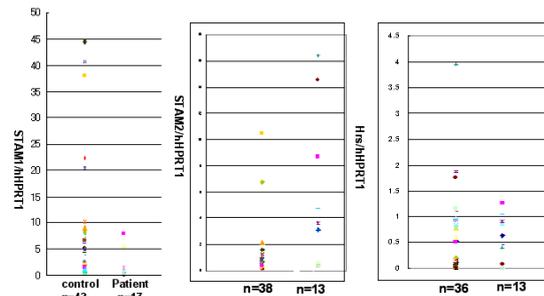
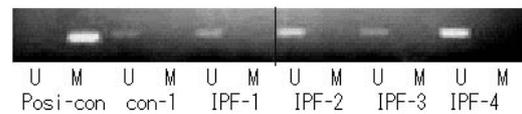


図 4. 末梢白血球における STAM1 関連遺伝子の発現 mRNA 量比較。

- ・ STAM1 の cDNA 蛋白コード領域 (1622bp) には IPF 4 例で塩基変異を認めず。
- ・ STAM1 遺伝子転写開始直下の CpG 領域でも 4 例の IPF 患者にはメチル化を認めず。

#### MSP法



(2) 気道上皮由来細胞における全ゲノムメチル化異常、miRNA 発現解析:  
平成 20、21 年は手術検体や剖検検体の気道上皮細胞より、上質の DNA 採取を検討した。しかし、臨床検体から解析可能な十分量の採取はできなかった。細気管支上皮細胞由来、肺腺癌細胞株 A549、PC9 を用いて、全ゲノムメチル化解析と、microRNA 発現解析等を試行した。

(3) ヒト線維芽細胞の TGF- $\beta$ 1、治療薬 CyclosporinA (CsA) の効果:

線維化肺における増殖因子 TGF- $\beta$ 1 の線維芽細胞に対する作用を in vitro で検討するため、MRC3 (human fetal fibroblast) に TGF- $\beta$ 1 を添加したところ、 $\alpha$ SMA や  $\alpha$ 1-collagen III の発現が亢進し、筋線維芽細胞への形質転換を認め、CsA はこれを抑制する結果を得た。線維芽細胞系では STAM1 の変化はなかった。

(結語)

STAM1 に関しては、末梢血細胞では肺線維症患者群で発現低下をみたが、検索した CpG 領域におけるメチル化は変化なかった。一方、線維芽細胞においては STAM1 の変化はなかったが、線維化最大の要因である TGF- $\beta$ 1 による遺伝子発現変化を免疫抑制剤 CsA が改善することが明らかになった。

これらの結果は、最初想定した STAM1 発現変化が、肺線維症では大きな意義がないと考えられる。最近、研究代表者が関与した臨床試験における特発性肺線維症患者検体での GWAS 解析では、hTERT 遺伝子の関与が示唆さ

た (5)。一方、telomerase shortening syndrome の一部に家族性肺線維症が見られるとする報告がなされ、加齢を加味した新たな展開がなされている。

#### 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 10 件)

1. Tazawa R, Trapnell BC, Inoue Y, Arai T, Takada T, Nasuhara Y, Hizawa N, Kasahara Y, Tatsumi K, Hojo M, Ishii H, Yokoba M, Tanaka N, Yamaguchi E, Eda R, Tsuchihashi Y, Morimoto K, Akira M, Terada M, Otsuka J, Ebina M, Kaneko C, Nukiwa T, Krischer JP, Akazawa K, Nakata K. **Inhaled Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor as Therapy of Pulmonary Alveolar Proteinosis**. Am J Respir Crit Care Med. 2010 in press. (査読あり)
2. Damayanti T, Kikuchi T, Zaini J, Daito H, Kanehira M, Kohu K, Ishii N, Satake M, Sugamura K, Nukiwa T. **Serial OX40 engagement on CD4+ T cells and natural killer T cells causes allergic airway inflammation**. Am J Respir Crit Care Med. 2010 in press. (査読あり)
3. Taniguchi H, Ebina M, Kondoh Y, Ogura T, Azuma A, Suga M, Taguchi Y, Takahashi H, Nakata K, Sato A, Takeuchi M, Raghu G, Kudoh S, Nukiwa T; Pirfenidone Clinical Study Group in Japan. **Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis**. Eur Respir J. 2010 in press. (査読あり)
4. Tanaka K, Ishihara T, Azuma A, Kudoh S, Ebina M, Nukiwa T, Sugiyama Y, Tasaka Y, Namba T, Ishihara T, Sato K, Mizushima Y, Mizushima T. **Therapeutic effect of lecithinized superoxide dismutase on bleomycin-induced pulmonary fibrosis**. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2010 Mar;298(3):L348-360. (査読あり)
5. Mushiroda T, Wattanapokayakit S, Takahashi A, Nukiwa T, Kudoh S, Ogura T, Taniguchi H, Kubo M, Kamatani N, Nakamura Y; Pirfenidone Clinical Study Group. **A genome-wide association study identifies an association of a common variant in TERT with susceptibility to idiopathic pulmonary fibrosis**. J Med Genet. 2008 Oct;45(10):654-656. (査読あり)

6. Inoue A, Xin H, Suzuki T, Kanehira M, Kuroki Y, Fukuhara T, Kikuchi T, Maemondo M, Nukiwa T, Saijo Y. **Suppression of surfactant protein A by an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor exacerbates lung inflammation**. Cancer Sci. 2008 Aug;99(8):1679-1684. (査読あり)
7. Nukiwa T, Suzuki T, Fukuhara T, Kikuchi T. **Secretory leukocyte peptidase inhibitor and lung cancer**. Cancer Sci. 2008 May;99(5):849-855. (査読あり)
8. Inoue Y, Trapnell BC, Tazawa R, Arai T, Takada T, Hizawa N, Kasahara Y, Tatsumi K, Hojo M, Ichiwata T, Tanaka N, Yamaguchi E, Eda R, Oishi K, Tsuchihashi Y, Kaneko C, Nukiwa T, Sakatani M, Krischer JP, Nakata K; Japanese Center of the Rare Lung Diseases Consortium. **Characteristics of a large cohort of patients with autoimmune pulmonary alveolar proteinosis in Japan**. Am J Respir Crit Care Med. 2008 Apr 1;177(7):752-762. (査読あり)
9. Morimoto T, Azuma A, Abe S, Usuki J, Kudoh S, Sugisaki K, Oritsu M, Nukiwa T. **Epidemiology of sarcoidosis in Japan**. Eur Respir J. 2008 Feb;31(2):372-379. (査読あり)
10. Huqun, Izumi S, Miyazawa H, Ishii K, Uchiyama B, Ishida T, Tanaka S, Tazawa R, Fukuyama S, Tanaka T, Nagai Y, Yokote A, Takahashi H, Fukushima T, Kobayashi K, Chiba H, Nagata M, Sakamoto S, Nakata K, Takebayashi Y, Shimizu Y, Kaneko K, Shimizu M, Kanazawa M, Abe S, Inoue Y, Takenoshita S, Yoshimura K, Kudo K, Tachibana T, Nukiwa T, Hagiwara K. **Mutations in the SLC34A2 gene are associated with pulmonary alveolar microlithiasis**. Am J Respir Crit Care Med. 2007;175(3):263-268. (査読あり)

[学会発表] (計 10 件)

1. Nukiwa T: **Translational medicine in lung fibrosis**. PIPKRA VIII, Jakarta, 2010. 2. 14.
2. Hirota N, Ohta H, Tamai T, Nukiwa T, Ebina M: **Simultaneous Alterations of Gene Expressions in Different Cell Types of Alveolar Septa Induced by Transforming Growth Factor-beta 1 and Recovered by Cyclosporin A**. American Thoracic Society International conference, San Diego, 2009. 5. 17.

3. Zaini J, Andarini S, Kikuchi T, Nukiwa T: **OX40L-OX40 Interactions contribute to NKT Activation in a Mouse Model of Allergic Airway disease**. American Thoracic Society International conference, Toronto, 2008. 5. 16.
4. Ogura T, Ebina M, Taniguchi H, Azuma A, Suga M, Taguchi Y, Nakata K, Sato A, Nukiwa T, Kudoh S: **A Phase III, Double-Blind, Placebo-Controlled clinical Trial of Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis in Japan**. American Thoracic Society International Conference, Toronto, 2008. 5. 16.
5. Nukiwa T: **Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Acute Exacerbations Current Concept and Possible Interventions**. Bangladesh Lung Foundation Pulmocon 2008, Bangladesh, 2008. 2. 17.
6. Nukiwa T: **Exacerbation in interstitial lung disease: A clear picture?** European Respiratory Society Annual Meeting 2007, Stockholm, 2007. 9. 18.
7. 貫和敏博: 特発性間質性肺炎. 第49回日本呼吸器学会学術講演会、東京、2009. 6. 13.
8. 貫和敏博: 特発性肺線維症. 第48回日本呼吸器学会学術講演会 Respiratory Year in Review5, 東京, 2008. 6. 16.

[図書] (計3件)

1. 貫和敏博他: 呼吸器疾患最新の治療 2010-2012. (貫和敏博、杉山幸比古、門田淳一編集) 南江堂、2010. Pp. 70-75.
2. Nukiwa T: The role of biomarkers in management of interstitial lung disease: implication of biomarkers derived from type II pneumocytes. Du Bois RM and Richeldi L Edt. The European Respiratory Monograph, 46. 2009, Pp. 47-66. European Respiratory Society.
3. 貫和敏博他: 気管支肺胞洗浄法「BAL」の手引き. (日本呼吸器学会びまん性肺疾患学術部会、厚生労働省難治性疾患克服研究事業びまん性肺疾患調査研究班、編集: 貫和敏博) 克誠堂出版、2008. Pp. 3-4.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

貫和 敏博 (NUKIWA TOSHIHIRO)  
 東北大学・大学院医学系研究科・教授  
 研究者番号: 40129036

### (2) 研究分担者

海老名 雅仁 (EBINA MASAHIRO)  
 東北大学・大学院医学系研究科・准教授  
 研究者番号: 10280885

### (3) 連携研究者

田澤 立之 (TAZAWA RYUSHI)  
 新潟大学・医歯学総合病院・講師  
 研究者番号: 70301041

兼平 雅彦 (KANEHIRA MASAHIKO)  
 東北大学・加齢医学研究所・技術補佐  
 研究者番号: 90374941

田中 伸幸 (TANAKA NOBUYUKI)  
 宮城県県立がんセンター・部長  
 研究者番号: 60280872

久田 修 (HISATA SHU)  
 東北大学・高等教育開発推進センター・助教  
 研究者番号: 60466571