

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19590916
 研究課題名（和文） 肺胞Ⅱ型上皮細胞の内因性機能異常を起点とする肺線維化機序の分子生物学的研究
 研究課題名（英文） A molecular biological study of mechanism of developing pulmonary fibrosis based upon dysfunction of alveolar type II cells
 研究代表者
 瀬戸口 靖弘（SETOGUCHI YASUHIRO）
 東京医科大学・医学部・教授
 研究者番号：90206649

研究成果の概要：

1. 本邦に於ける間質性肺炎でこれまで報告のない新たなSP-C（サーファクタント蛋白C）遺伝子変異を6箇所同定した。
 SP-C遺伝子変異は、成人発症間質性肺炎に比し新生児、乳児の間質性肺炎で有意に高率であった。本邦の変異の位置は、欧米と異なりexon2からexon3に多いという特徴を示した。
2. 野生型並びに変異SP-C蛋白の細胞内動態と発現細胞への影響の分子生物学的比較解析のために特徴的な遺伝子変異を2箇所（exon2の部分とexon4欠失）を選んでinsertional mutagenesis法によりプラスミド発現ベクターを作成。遺伝子導入による変異SP-C前駆蛋白の細胞内動態の比較解析では、SP-C前駆蛋白の変異部分により細胞内蓄積部位が異なり、遺伝子発現機能解析に於いても細胞の機能上も影響が異なる事を明らかにした。
3. 結論 SP-C遺伝子変異部位が欧米と異なることを考えると民族的な背景によることも考えられ、遺伝子変異部位により影響された細胞機能も異なることから臨床的に薬剤性間質性肺炎等が欧米に比し本邦に多いということにも関連するのではないかという興味ある結論が導きだされた。更に、SP-C発現細胞である肺胞Ⅱ型上皮細胞の機能異常による間質性肺炎発症という病因論学的に新しいパラダイムの構築につながる事が期待された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：肺線維化、肺胞Ⅱ型上皮細胞、間質性肺炎、surfactant、SP-C、アポトーシス小胞体、遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

肺線維化の起点は、遺伝的因子を背景に環境、吸入抗原、感染などの外的因子により肺胞内の細胞が刺激されたり細胞死に追いやられることと解釈されてきた。最近、肺胞 II 型上皮細胞の内因性の異常が肺胞 II 型上皮細胞死を招く可能性が示唆される知見が得られてきている。肺胞 II 型上皮細胞は、肺胞の虚脱を防ぐサーファクタント (SP) 産生や肺胞 I 型上皮細胞の再生にも関わり種々のサイトカインや増殖因子の産生も行うなど多機能な細胞である。特に SP 産生分泌は、代表的な機能の一つである。SP は、脂質と SP 蛋白から構成され、SP 蛋白は、SP-A, SP-B, SP-C, SP-D からなる。SP-B, SP-C は、SP の脂質の膜を貫通し SP 構造維持に関わる重要な役割を演じている。SP-B 遺伝子変異は、新生児の呼吸促進症候群の原因の一つとなっている (Am J Respir Crit Care Med. 161:973-81, 2000; Hum Mutat. 14:502-9, 1999)。米国で新生児とその母親の間質性肺炎症例において SP-C 遺伝子の exon4 の欠失変異が明らかになった (N Engl J Med. 344:573-9, 2001)。同時期に複数の施設から家族性間質性肺炎において SP-C 遺伝子 exon2, exon3, exon4 の missense 変異が同定された (Am J Respir Crit Care Med. 165:1322-8, 2002)。exon4 の欠失変異に於ける基礎研究において肺胞 II 型上皮細胞内の前駆 SP-C 変異蛋白の凝集やプロテオソームでの破壊を生じ、この細胞の変調が間質性肺炎につながっていることが示唆されてきているが詳細は明らかになっていない。また、膜輸送を担う蛋白質のうち最も大きなスーパーファミリーを形成する ATP-binding cassette transporter (ABC transporter) の subfamily である ABCA3 遺伝子変異が小児や成人の間質性肺炎症例で同定されている (N Engl J Med. 350:1296-303, 2004; Am J Respir Crit Care Med. 172:1026-31, 2005)。ABCA3 は肺胞 II 型上皮細胞の SP の脂質の transmembrane transporter として機能していることも明らかになっている。臨床的に、ABCA3 遺伝子変異を持った症例は、DIP、肺胞蛋白症を発症し、組織病理学的には腫大化した肺胞マクロファージや肺胞 II 型上皮細胞を呈し、その細胞内には高密度に詰まった lamellar bodies が存在する特徴を有し、SP を産生関連した異常を誘導することが推測されている。更に、白皮症の中で出血傾向と肺線維症を合併する Hermansky-Pudluc 症候群は、HPS-1 遺伝子の変異により生じた変

異 HPS-1 蛋白により発症することが明らかになっている。HPS-1 は、メラノサイト内のメラニン顆粒の細胞内移動だけでなく肺胞 II 型細胞内にも存在し、SP 産生にも関わっていることも明らかになってきている。HPS-1 遺伝子変異をもつ II 型肺胞上皮細胞は、SP を含む巨大な lamella body が出現することも見いだされ、間質性肺炎との関連性も示唆されている (Nat Genet. 14:300-6, 1996; Virchows Arch. 437:304-13, 2000)。

申請者は、HPS 症例や家族性間質性肺炎の症例において肺胞 II 型上皮細胞の異常な腫大化という形態学的特徴と先に述べたこれまでの知見から肺胞 II 型上皮細胞における SP の産生分泌過程の異常が肺胞 II 型上皮細胞の機能異常や細胞死に結びつき間質性肺炎の発症起点となり得る可能性もあるという仮説をたて関東周辺に於ける成人発症の家族性間質性肺炎 11 症例と非家族性間質性肺炎 30 症例、健常ボランティア 43 名について SP-C 遺伝子変異を検索し exon3 に N138T, exon4 に N186S を同定し遺伝子多型ではあったが、N186S は家族性、非家族性問わず間質性肺炎に多い傾向を示すことを明らかにし報告した (Respirology. 11 :S41-5, 2006)。

2. 研究の目的

本申請期間中にこれまで新たに発見した SP-C 遺伝子変異がどのようにして肺胞 II 型上皮細胞の機能異常を通じて間質性肺炎へ進展させていくのか変異 SP-C 遺伝子を正常細胞へ遺伝子導入し、経時的に変異 SP-C 蛋白分子動態の変化をとらえ、また正常細胞と変異 SP-C 発現細胞を遺伝子発現レベル、蛋白レベルで網羅的に比較解析することであり、明らかにすることが本研究の目的である。また、背景で述べたように SP-C 遺伝子変異や ABCA3 遺伝子変異に伴う間質性肺炎、Hermansky-Pudluc 症候群の間質性肺炎のいずれもが肺胞 II 型上皮細胞の SP 産生分泌の異常を共通にしている点で肺胞 II 型上皮細胞の機能異常という内的要因が間質性肺炎の成立に強く関与するという、広い意味で肺胞 II 型上皮細胞の変性疾患にもいた間質性肺炎の成立も存在するのではないかという新しい概念を提供する意味で特色があり独創的な研究である。これが証明されれば、新しい間質性肺炎の成因の学問的、臨床的パラダイムが形成されるだけでなく、肺胞 II 型上皮細胞中の SP 産生に関わる分子、或いはその分子を認識する機構の制御を行う新規

治療法、特に間質性肺炎の分子標的治療法の開発につながる可能性がある。

3. 研究の方法

2005年から2008年にかけて家族性間質性肺炎、孤発性間質性肺炎に於ける SP-C 遺伝子変異の探索をおこない SP-C 遺伝子変異を同定する。この中で特徴的な変異を有する SP-C 遺伝子を insertional mutagenesis でクローニングを行い、その変異 SP-C 遺伝子を遺伝子導入技術によりヒト肺上皮細胞株で発現させ、肺上皮細胞株の機能の変化を細胞病理学的、分子生物学的に解析を行う。

SP-C 遺伝子解析

対象は、インフォームドコンセントの得られた家族性間質性肺炎 27 症例 (小児発症 2 例)、孤発性間質性肺炎 57 症例 (小児発症 25 例)、コントロールとして健常者 40 名について検討した。SP-C 遺伝子解析については、各症例より得られた末梢血 4~6ml より抽出された DNA を用い exon1 から exon5 における Direct sequence により塩基配列を決定した。(一部は、研究開始前に実施)

野生型並びに変異 SP-C 遺伝子のクローニング

これまでに作成した正常ヒト肺 cDNA ライブラリーより既知の SP-C mRNA の塩基配列をもとに PCR 法にて SP-C cDNA を増幅作成する (pSP-CcDNA)。変異 SP-C 遺伝子クローニングについては、野生型 p SP-C-cDNA を基に insertional mutagenesis 法により変異 SP-C cDNA を作成する。(pmSP-C-cDNA)。

野生型並びに変異 SP-C 遺伝子発現ベクターの作成

野生型並びに変異 SP-C クローニングベクターより野生型、変異型 SP-C cDNA をサイトメガロウイルスのプロモーターを有する遺伝子発現ベクター-pcDNA3 へ移し換え野生型 (pcDNA3SP-C) 並びに変異 SP-C 遺伝子発現ベクター (pcDNA3mSP-C) を作成する。

作成した発現ベクターの機能を調べるために上皮細胞へ遺伝子導入し、western-blotting にて評価する。

野生型並びに変異 SP-C とマーカーとしての GFP の融合蛋白発現ベクターの作成

作成した野生型並びに変異 SP-C 遺伝子発現ベクターからプロモータ領域を一緒にして発光蛋白 GFP 発現ベクターへ挿入し SP-C 蛋白と発光蛋白 GFP の融合蛋白を発現するシステムを構築する。

遺伝子導入法による野生型並びに変異 SP-C 蛋白の細胞内動態の分子生理学的

比較解析

野生型、変異型 SP-C 遺伝子発現 GFP ベクターを肺胞上皮細胞株へ遺伝子導入し発現した野生型及び変異型 SP-C の細胞内での動態を GFP 蛋白を目印に分担研究者の所有する共焦点レーザー顕微鏡を使い生きたままの状態分布を解析する。

遺伝子導入法による変異 SP-C 蛋白発現細胞の発現蛋白の網羅的比較解析

変異 SP-C 蛋白発現によりサーファクタントの変化だけでなく肺胞上皮細胞にどのような機能の変化が生じるのか解析する。本解析については細胞内の各種蛋白の発現の変化、またアポトーシスなど細胞死に関わる分子、線維化に関わるサイトカイン、増殖因子発現の変化を中心に解析する。これらの蛋白分子は、数多く存在するため DNA マイクロアレイ、蛋白アレイを使用して野生型、変異型 SP-C 発現細胞において比較解析を行う。

4. 研究成果

SP-C 遺伝子変異：

9カ所の SP-C 遺伝子変異が同定され、いずれも heterozygous missense mutation であった。3カ所 (I73T, Y104H, exon4 欠失) は欧米でも同定されているものであったが、6カ所 (I38F, V39L, L36R, V49A, S61G, V102G) は、これまで報告がなく新しい遺伝子変異であった。Exon2 に5カ所で exon3 に2カ所、exon4 が1箇所の変異であり、欧米では exon2 に比して exon3, exon4, exon5 に変異が多い傾向があり、この違いは人種的なものに由来している可能性が示唆された。

SP-C 遺伝子変異と臨床像

表1に示すように家族性間質性肺炎 27 症例中5症例に SP-C 遺伝子変異を認め、全例 exon3 に変異を認めた。また、2症例が小児発症例で1症例は、乳児期の発症であった。孤発性間質性肺炎 57 症例中10症例に SP-C 遺伝子変異を同定した。孤発性間質性肺炎 57 症例中25症例は小児間質性肺炎で10症例に SP-C 遺伝子変異を認めた。遺伝子変異の部分も5症例が exon2、4症例が exon3、1症例が exon4 (exon4 欠失: exon4) であった。

変異 SP-C 前駆蛋白の細胞内分布と細胞機能への影響

変異 S69GSP-C 発現ベクター、exon4SP-C 発現ベクター、野生型 SP-C 発現ベクターの A549 細胞への遺伝子導入による細胞内分布の検討を共焦点レーザー顕微鏡を使っておこな

った。S69GSP-C は、early endosome への集積を認めたが、 exon4SP-C は、小胞体への集積を認めた。 exon2 の変異を認めた症例 (V49A) では、蛋白の構造解析をしてみると -helix 構造の消失をまねていることが明らかになった。 DNA マイクロアレイでは、 exon4SP-C 発現細胞を使った DNA マイクロアレイでは、アポトーシス、小胞体ストレス、炎症性サイトカイン関連遺伝子の発現増強をみたが、一方、S69GSP-C 発現細胞は、アポトーシス、小胞体ストレス関連遺伝子の発現増強は認められなかった。以上のことから SP-C 遺伝子の変異部位により発現細胞、生体では肺胞 II 型上皮細胞の機能異常は異なってくるのが推測された。 exon4SP-C 発現細胞に於ける結果は、欧米の結果と一致していた。しかし、S69GSP-C 発現細胞における結果は、どこの施設からも報告はないため慎重な見直し作業中である。

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26件)

1. Setoguchi Y., Tamaoki F, Nakai, M, Kono, Y The Frequency of Mutations in the Surfactant Protein C Gene (SFTPC) Is Much Higher in Pediatric Interstitial Lung Disease (PILD) Than Either Adult-Onset Familial or Sporadic Interstitial Pneumonia Am J Crit Care Med A2170 2009. (査読有)
2. 高橋寛吉, 木苗優子, 白井眞美, 本郷輝明, 瀬戸口靖弘 ハイドロキシクロロキンにて治療を行った肺胞サーファクタント遺伝子異常を伴う間質性肺炎の1例 日本小児科学会雑誌 113:118, 2009. (査読有)
3. Ohkubo M, Setoguchi Y, Kobayashi Y, Kanagasaki S, Ohyashiki K, Tamaya T. Increased galectin-9 expression in alveolar macrophages in interstitial lung disease J Tokyo Medical University 66:513-521, 2008 (査読有)
4. Watanabe M, Takata Y, Fukasawa S, Sakota K, Abe T, Goseki Y, Setoguchi Y, Chikamori T, Yamashina A. Two Patients With Bepridil-Induced Interstitial Pneumonia. Circ J. 2008 Dec 27. (査読有)
5. 瀬戸口靖弘 臨床遺伝子学'08 呼吸器系疾患の遺伝子学 最新医学 63: 1827-1836, 2008 (査読無)
6. 瀬戸口靖弘 間質性肺炎と SP-C 遺伝子異常 呼吸 27:873-879, 2008 (査読無)
7. 貫和敏博, 瀬戸口靖弘, 瀬山邦明, 萩原弘一 遺伝子異常と肺疾患 21世紀ゲノム医学に向けて 呼吸 27:859-868, 2008 (査読無)
8. 渡辺雅貴, 深澤伸也, 迫田邦裕, 五関善成, 近森大志郎, 山科章, 阿部哲也, 瀬戸口靖弘 bepridil 投与中に認められた間質性肺炎の2症例 Circulation Journal 72:941, 2008. (査読有)
9. 瀬戸口靖弘, 河野雄太, 岸本佳子, 小松広彦, 大久保仁嗣, 臼田実男, 稲垣佳典, 松林純, 木村之彦 胸腺原発の MALT リンパ腫 東京医科大学雑誌 66:584-594, 2008 (査読有)
10. Jankipersadsing V, Tauchi T, Ohyashiki K, Tanaka Y, Setoguchi Y, Mukai K. Spontaneous regression of pulmonary infiltration of adult T-cell leukemia/lymphoma. Int J Hematol. 86:207, 2007 (査読有)
11. 瀬戸口靖弘 間質性肺炎とサーファクタント 内科 99:292-298, 2007 (査読無)
12. 瀬戸口靖弘 Smad ノックアウトマウス 分子呼吸器病 10: 176-182, 2007 (査読無)
13. 瀬戸口靖弘 後藤幹生 SP-C 遺伝子変異を伴った小児間質性肺炎 分子呼吸器病 11: 61-66, 2007 (査読有)
14. 大久保仁嗣, 大屋敷一馬, 瀬戸口靖弘 間質性肺疾患におけるガレクチン-9 の発現解析 東京医科大学雑誌 65:472, 2007. (査読有)
15. Sriwiriyanont P, Hachiya A, Pickens WL, Moriwaki S, Ohuchi A, Kitahara T, Takema Y, Kitzmiller WJ, Visscher MO, Bello A, Tsuboi R, Kobinger GP. Lentiviral Vector-Mediated Gene Transfer to Human Hair Follicles. J Invest Dermatol. 2009 (査読有)
16. Hachiya A, Sriwiriyanont P, Kobayashi T, Nagasawa A, Yoshida H, Ohuchi A, Kitahara T, Visscher MO, Takema Y, Tsuboi R, Boissy RE. Stem cell factor-KIT signalling plays a pivotal role in regulating pigmentation in mammalian hair. J athol. 218:30-9, 2009 (査読有)

17. Hachiya A, Sriwiriyanont P, Fujimura T, Ohuchi A, Kitahara T, Takema Y, Kitzmiller WJ, Visscher MO, Tsuboi R, Boissy RE. Mechanistic effects of long-term ultraviolet B irradiation induce epidermal and dermal changes in human skin xenografts. *Am J Pathol.*174:401-13,2009 (査読有)
 18. Hayashi K, Yamamoto T, Oyama K, Nagai T, Tsuboi R. Epidermotropic skin metastasis from gastric cancer: immunohistochemical analysis using cytokeratins. *Clin Exp Dermatol.* 34:406-8,2009 (査読有)
 19. Kamogawa S, Kagami K, Maeda M, Arai K, Okubo Y, Tsuboi R, Hirano T. Suppressive efficacy of roxithromycin against human peripheral-blood mononuclear cells stimulated with hemolytic streptococci superantigen. *Eur J Pharmacol.*602:439-47,2009 (査読有)
 20. Morokuma Y, Yamazaki M, Maeda T, Yoshino I, Ishizuka M, Tanaka T, Ito Y, Tsuboi R. Hair growth stimulatory effect by a combination of 5-aminolevulinic acid and iron ion. *Int J Dermatol.* 47:1298-303,2008 (査読有)
 21. Koga H, Nanjoh Y, Makimura K, Tsuboi R. In vitro antifungal activities of luliconazole, a new topical imidazole. *Med Mycol.* 29:1-8.2008 (査読有)
 22. Miyakura T, Yamamoto T, Tashiro A, Okubo Y, Oyama B, Ishii N, Hashimoto T, Tsuboi R. Anti-p200 pemphigoid associated with annular pustular psoriasis. *Eur J Dermatol.*18:481-2,2008 (査読有)
 23. Hayashi N, Suh DH, Akamatsu H, Kawashima M; Acne Study Group. Evaluation of the newly established acne severity classification among Japanese and Korean dermatologists. *J Dermatol.* 35:261-3,2008 (査読有)
 24. Tajima M, Sugita T, Nishikawa A, Tsuboi R. Molecular analysis of *Malassezia* microflora in seborrheic dermatitis patients: comparison with other diseases and healthy subjects. *J Invest Dermatol.* 128:345-51,2008 (査読有)
 25. Tsuboi R, Yamazaki M, Matsuda Y, Uchida K, Ueki R, Ogawa H. Antisense oligonucleotide targeting fibroblast growth factor receptor (FGFR)-1 stimulates cellular activity of hair follicles in an in vitro organ culture system. *Int J Dermatol.*46:259-63,2007 (査読有)
 26. Hachiya A, Sriwiriyanont P, Patel A, Saito N, Ohuchi A, Kitahara T, Takema Y, Tsuboi R, Boissy RE, Visscher MO, Wilson JM, Kobinger GP. Gene transfer in human skin with different pseudotyped HIV-based vectors. *Gene Ther.* 14:648-56. 2007 (査読有)
- [学会発表](計10件)
1. Setoguchi Y., Tamaoki F, Nakai, M, Kono, Y The Frequency of Mutations in the Surfactant Protein C Gene (SFTPC) Is Much Higher in Pediatric Interstitial Lung Disease (PILD) Than Either Adult-Onset Familial or Sporadic Interstitial Pneumonia American Thoracic Society International Conference (In San Diego)2009.5.17
 2. Setoguchi Y. Surfactant protein C gene mutation associated interstitial pneumonia Sakura Lung Conference (In Tokyo) 2009
 3. Setoguchi Y. Kono Y, Sugiyama S. Clinico-Pathological Consequences of Novel Mutations in The Surfactant Protein C Gene (SFTPC) in Japanese Patients with Interstitial Pneumonia (IP). American Thoracic Society International Conference (In Toronto)2008.5.21
 4. Michiko Nakai , Yuta Kono , Tetsuya Abe , Norihiro Sugiyama , Yasuhiro Setoguchi Clinico-Pathological Consequences of Novel Mutations in The Surfactant Protein C Gene (SFTPC) in Japanese Patients with Interstitial Pneumonia (IP) English Mini symposium 48th JRS Meeting 2008.7.5 (in Kobe)
 5. Fukami Tamaoki , Yuta Kono , Yasuhiro Setoguchi Nonspecific Interstitial Pneumonia and Alveolar Proteinosis Trafficking Resulting From A Novel Mutation in The Surfactant Protein C Gene (SFTPC) English Mini symposium 48th

- JRS Meeting 2008.7.5 (in Kobe)
6. Setoguchi Y., Kohno Y, Abe T, Hattori N. Identification of novel mutation in the surfactant protein C gene and ABC-A3 gene in patients with familial interstitial pneumonia or sporadic interstitial pneumonia. Am J Respir Crit Care Med 175:A148, 2007
 7. Setoguchi Y. Identification and the clinical consequences of novel mutations of surfactant protein C and ABCA3 gene in patients with interstitial pneumonia RLDC (Rare Lung Disease Consortium) 2007
 8. Kano Y, Setoguchi Y. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) MAY Play a Role in Developing Airflow Limitation in Sarcoidosis 12th congress of the APSR 30 November 2007
 9. Abe T, Setoguchi Y. Impulse Oscillometry System (IOS) May Be a Promising Tool to Evaluate the Clinical Course of Respiratory Function in Bronchiolitis Obliterans (BO) APSR 2007 CONGRESS (2007.10.21) Gold Coast
 10. Setoguchi Y. Identification and the clinical consequences of novel mutations of surfactant protein C and ABCA3 gene in patients with interstitial pneumonia APSR 2007 CONGRESS (2007.10.21) Gold Coast

〔図書〕(計4件)

1. 瀬戸口靖弘 呼吸器系(成人から老年)からだの年齢辞典 pp501 朝倉書店 2008
2. 瀬戸口靖弘 心不全 COPD のすべて pp325 文光堂 2008
3. 中井美智子, 瀬戸口靖弘 呼吸器症候群(第2版) その他の呼吸器疾患を含めて】腫瘍性疾患 間葉系(原発性)腫瘍 平滑筋腫、平滑筋肉腫 日本臨床(0047-1852)別冊呼吸器症候群 III pp144-146(2009.03)
4. 河野雄太, 瀬戸口靖弘 呼吸器症候群(第2版) その他の呼吸器疾患を含めて】びまん性肺疾患 間質性肺炎 Hermansky-Pudlak 症候群日本臨床 別冊呼吸器症候群 I pp355-359,2008.

6. 研究組織

(1)研究代表者

瀬戸口 靖弘 (SETOGUCHI YASUHIRO)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号：90206649

(2)研究分担者

坪井 良治 (TSUBOI RYOJI)
東京医科大学・医学部・教授
研究者番号：70221421

(3)連携研究者

なし

