

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790551
 研究課題名 (和文) SLPI によるアディポカインの制御機構の解明

研究課題名 (英文) Regulation of adipokine by SLPI

研究代表者

福原 達朗 (Fukuhara Tatsuro)
 東北大学・病院・助教
 研究者番号：80400365

研究成果の概要：蛋白分解酵素阻害物質 SLPI は、アディポカインを抑制していることが明らかとなったが、マウスの実験系において、脂質糖代謝系への影響は明らかではなく、その生理的意義は不明であった。一方、肺の上皮細胞株においては、SLPI は増殖能を高めているが、浸潤・遊走能への影響は明らかではなく、蛋白分解酵素阻害作用以外の肺上皮細胞への作用の存在が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	420,000	3,620,000

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：SLPI、アディポカイン、発癌

1. 研究開始当初の背景

糖尿病の患者において、肺炎等の強い炎症が発生しているとき、血糖コントロールが不良となることは、臨床的によく知られている。また、重症の糖尿病患者では、病原体への抵抗性が低下することもよく知られている。このような炎症と耐糖能異常、あるいは耐糖能異常と広義の免疫能の低下の機序は、これまで、ステロイドホルモンとそのレセプターによる作用や、アディポカインなどの関与が指摘されてきたが、詳細は明らかではない。

SLPI(secretory leukoprotease inhibitor)は、

気管分泌液中のエラスターゼインヒビターの主要成分の一つである。肺は常に外界と接しているため、病原体の侵入とそれを排除する免疫系の戦いの場となっている。そのため、炎症が発生しやすい臓器の一つであり、その一方で過剰な炎症により組織自体の破壊がおこりうる臓器でもある。SLPI は炎症が過剰に広がり、肺自体を破壊しないように、トリプシン、キモトリプシン、カテプシンGなど蛋白分解酵素の活性を阻害し、炎症をコントロールする役割を担っている。また、当研究室では、SLPI ノックアウトマウス (SLPI-KO)

を作製し、SLPI-KO マウスが LPS 刺激により誘導されたエンドトキシンショックに対して感受性が高いことを報告しており、(J.Exp.Med.,197,669-674,2003) 蛋白分解酵素阻害以外の作用によっても、炎症のコントロールに SLPI が重要な役割を果たしていることを示した。

また RT-PCR により SLPI-KO の肺において、アディポカインの一つであるレジスチンの発現が上昇していることが明らかとなった。

2. 研究の目的

炎症の制御因子である SLPI と糖脂質代謝の制御因子であるレジスチンをはじめとした、アディポカインの直接的あるいは間接的な関連を明らかにすることで、SLPI による炎症と糖脂質代謝の制御の解明を行う。

また、SLPI が細胞に与える影響を検討する。

3. 研究の方法

(1). SLPI-KO マウスを用いた SLPI の作用の検討

SLPI-KO マウスにおいて血糖値、コレステロール値、中性脂肪値を測定し、wild type と比較する。SLPI-KO マウスの肝臓の病理所見を検討する。

(2). SLPI-KO マウス肺におけるアディポカインの発現の検討

SLPI-KO マウスと wild type マウスのウレタン投与前とウレタン投与後 20 週におけるマウス肺を取り出し、total RNA を抽出し、RT-PCR を行う。アディポサイトカイン群に関わる因子の発現量の変化を解析する。

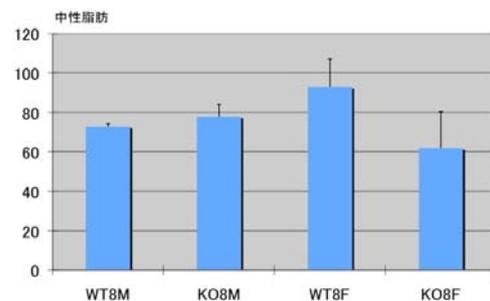
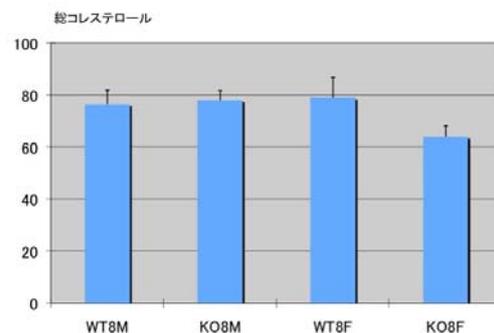
(3). 肺上皮細胞株 A549 を用いた、SLPI の作用の検討

A549 に SLPI を強制発現させた細胞株 A549-SLPI を樹立し、SLPI を強制発現することによる細胞増殖能、浸潤能等の変化を検討する。

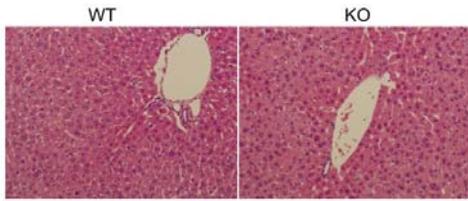
4. 研究成果

生後 8 ヶ月のマウス SLPI-KO と野生型の血清中の 16 時間絶食後の空腹時血糖を測定すると、SLPI-KO の方が高い血糖値を示す傾向が明らかとなった(雄 WT176.3 ± 21.5mg/dl, KO182.5 ± 0.7mg/dl、雌 WT126.4 ± 15.0mg/dl, KO159.0 ± 25.5)。一方コレステロール値や中性脂肪は SLPI-KO の雌で低値を示す傾向があることが明らかとなった(総コレステロール WT79.0 ± 7.8mg/dl, KO64.0 ± 4.2mg/dl、中性脂肪 WT93.0 ± 14.1mg/dl, KO62.0 ± 18.4mg.dl)。雄に関しては、そのような傾向は認められなかった(総コレステロール WT76.5 ±

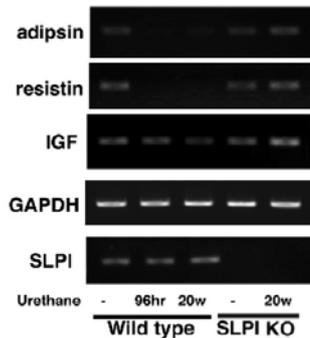
5.4mg/dl, KO78.0 ± 3.7mg/dl、中性脂肪 WT73.0 ± 1.4mg/dl, KO78.0 ± 6.2mg.dl)。



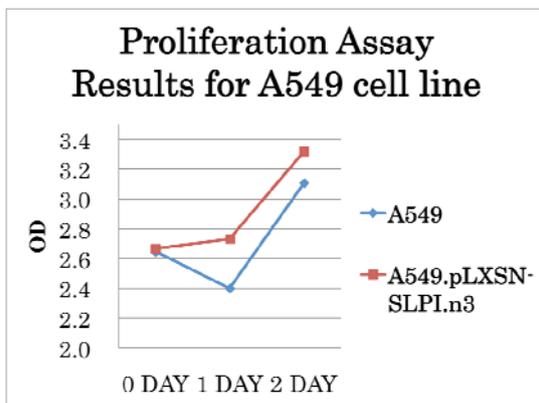
これらのマウスの肝組織をホルマリン固定後、Hematoxilin-Eosin 染色で構造を確認したが、差は認められなかった。



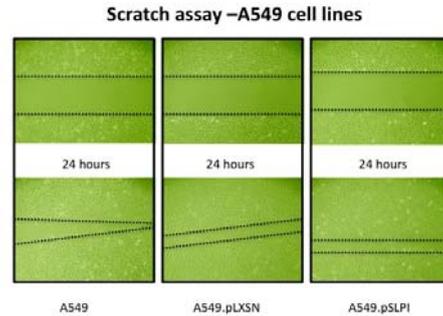
マウスの肺から mRNA を抽出し、RT-PCR による評価を行った。結果 resistin と同様に adipsin で SLPI-KO 肺での発現が上昇していることが明らかとなった。



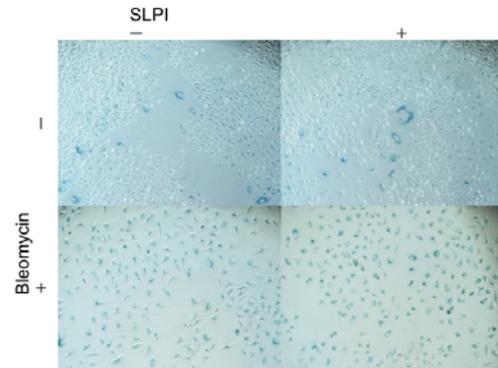
マウス肺での発現に差はあるものの、表現系に乏しいと考えられたため、まず In vitro の実験系の樹立のため、肺胞上皮細胞のモデル細胞株として用いられる A549 にレトロウイルスベクターを用い、SLPI を強制発現させる細胞株 A549-pSLPI を樹立した。本細胞株の細胞増殖能は野生型と比較して増加傾向を認めた。



遊走能について検討するため、scratch assay を施行したが、差は認められなかった。



また、insulin や insulin-like growth factor receptor (IGFR) による signal が細胞老化 (cell senescence) を誘導することが知られており、A549 に Bleomycin 50µg/ml 刺激を加え cell senescence を誘導し、ヒトリコンビナント SLPI 500ng/ml を添加することでの senescence associated beta-galactosidase の活性を観察したが、差を認めなかった。



SLPI の肺胞細胞に対する影響については更に検討する必要があると考えられた。

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 2 件)

1, Inoue A, Xin H, Suzuki T, Kanehira M, Kuroki Y, Fukuhara T, 他 4 名, Suppression of surfactant protein A by an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor exacerbates lung inflammation. Cancer Sci. Aug, 1679-1684, 2008, 査読有

2. Nukiwa T, Suzuki T, Fukuhara T, Kikuchi T. Secretory leukocyte peptidase inhibitor and lung cancer. *Cancer Sci.* May, 849-855, 2008, 査読有

〔学会発表〕（計 2 件）

- 1, 福原達朗、鈴木拓児他、蛋白分解酵素阻害物質 Secretory leukoprotease inhibitor (SLPI) の肺癌形成における役割、日本癌学会、平成 20 年 10 月 28 日、名古屋
- 2, 福原達朗、鈴木拓児他、蛋白分解酵素阻害物質 Secretory leukoprotease inhibitor (SLPI) による肺癌形成促進の機序、日本癌学
平成 19 年 10 月 4 日、千葉

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福原 達朗 (Fukuhara Tatsuro)

東北大学・病院・助教

研究者番号：80400365

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者