

平成 20 年 6 月 16 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19890175  
 研究課題名（和文） 肺線維症における新規サーファクタント SCGB3A2 の抗線維化作用機序の  
 解明  
 研究課題名（英文） Role of SCGB3A2 in pulmonary fibrosis

研究代表者  
 黒谷玲子（KUROTANI REIKO）  
 横浜市立大学・医学部・特任助教  
 研究者番号：00453043

## 研究成果の概要：

ブレオマイシン (BLM) 誘導性肺線維症モデルを用いて、SCGB3A2 が肺線維症を改善することを明らかにし、その作用機序の解明を試みた。マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイリングにより SCGB3A2 がプロコラーゲン遺伝子群の発現を抑制することを明らかにした。このとき、サイトカインシグナル遺伝子発現が亢進することも明らかになった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,340,000	0	1,340,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,690,000	405,000	3,095,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：生理学一般

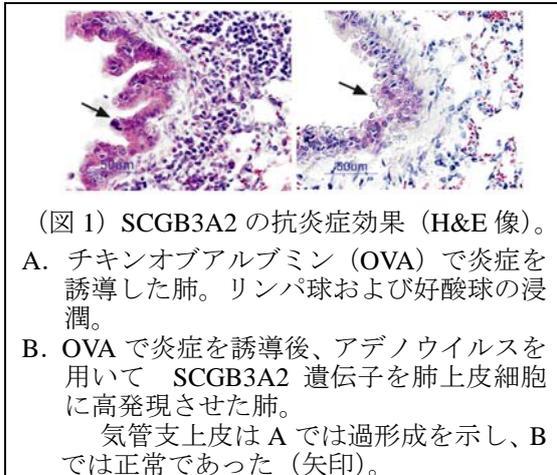
キーワード：

## 1. 研究開始当初の背景

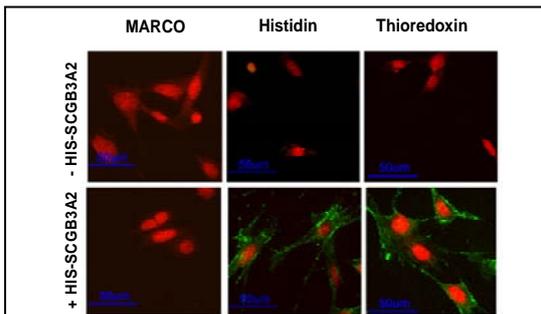
我々は、転写因子 Nkx2\_1 の下流遺伝子としてマウス肺より新規遺伝子 Secretoglobin (SCGB) 3A2 を単離した (*Mol Endocrinol.* 2001 15(11):2021-2036)。SCGB3A2 は、ウテログロビンファミリーに属しており、Uteroglobulin related protein 1 とも呼ばれる。また、SCGB3A2 遺伝子は気管支喘息感受性関連遺伝子クラスター内に位置し、抗炎症作用を持つウテログロビンと相同なアミノ酸配列をもつタンパク質をコードしている。そこで、SCGB3A2 の

抗炎症作用を解明する目的で、I 型肺炎モデルである気管支喘息誘発マウスに SCGB3A2 遺伝子を組み込んだアデノウイルスを吸引させ、肺上皮細胞で SCGB3A2 を高発させた。その結果、炎症が回復したことから、SCGB3A2 が抗炎症効果を持つことを報告した (*Am J Respir Crit Care Med.* 2006 173(9):958-964) (図 1)。さらに、肺上皮細胞特異的に SCGB3A2 を高発現するトランスジェニック (Tg) マウスを作成し、この Tg マウスに I 型肺炎を誘導させた時、炎症はほぼ認め

られなかった (未発表)。そこで、野生型と SCGB3A2Tg マウスに I 型肺炎を誘導させた時の肺組織における遺伝子発現プロファイリングを目的としてマイクロアレイを行った。



一方、ヒトでの SCGB3A2 の特異受容体はマクロファージに発現する Macrophage receptor with collagenous structure (MARCO) であると報告された (*J Immunol.* 2003 171(2):924-930)。しかしながら、胎仔肺での MARCO の検出を行った時、RT-PCR で微量の MARCO の mRNA 発現を検出したが、高感度の *In situ* hybridization (ISH) によっても MARCO の発現は検出されなかった。さらに、初期肺発生時において、SCGB3A2 が分岐促進作用を持ち、増殖因子として機能することを明らかにした。さらに、他の SCGB3A2 特異受容体が肺組織に存在することを示し (*Am J Respir Crit Care Med.* 2008 178(4):389-398) (図 2)、現在同定中である。



(図 2) SCGB3A2 の分岐への影響と SCGB3A2 受容体の局在 (緑)。

- A. マウス胎生 (E)11.5 日肺の 4 日間器官培養。SCGB3A2 の存在下では分岐が促進された。  
 B. 胎仔肺の初代培養細胞での SCGB3A2 の結合。Tag (ヒスチジン、チオレドキシジン) 付きの SCGB3A2 タンパク質を細胞へ添加し、Tag を検出することで受容体と結合した SCGB3A2 の局在を可視化した。

このように、SCGB3A2 は抗炎症作用および増殖作用を持つため、SCGB3A2 は細胞の損傷、炎症を経過して発症される線維症を発症初期の段階から抑制する可能性が極めて高いことが予想される。近年、肺および腎臓で発現するウテログロビン (UG、CC10/CCSP) の KO マウスの解析から、UG 欠損肺および腎臓では線維症発症のリスクが高いことが報告された (*Science* 30 1997 276(5317):1408 - 1412, *FEBS Lett.* 2006 580(18):4515-4520.)。また、肝細胞増殖因子 (HGF) が筋線維芽細胞のアポトーシスを誘導するとの報告があるが (*FASEB J.* 2005 19(6):580-582)、肺上皮細胞に特異的に発現するサーファクタンタンパク質の投与による効果についての報告は無い。また、SCGB3A2 の特異受容体の発現が肺組織にのみ認められれば、SCGB3A2 は他臓器へ影響を与えず、肺線維症特異的に機能することが期待される。

## 2. 研究の目的

線維症患者数は、世界規模で年々増加しており、深刻な問題になっている。また、癌治療の結果、線維化が認められることもあるが、決定的な治療薬は存在しない。そこで、SCGB3A2 が肺線維症を改善することおよびその作用機序を明らかにし、肺線維症治療薬として開発していくことを目的とした。

線維症は細胞の損傷をきっかけに炎症を経過して発症されるため、抗炎症作用および増殖作用を持つ SCGB3A2 は、線維化を抑制する可能性が考えられた。そこで、ブレオマイシン (BLM) 誘導性肺線維症モデルマウスを用いて SCGB3A2 の効果を検討した。

## 3. 研究の方法

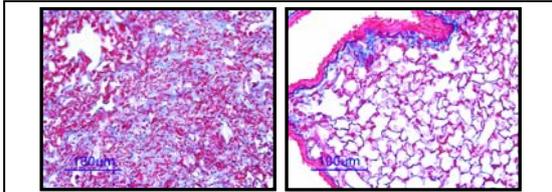
C57BL/6 マウス (雌、7-8 週令) に BLM (8U/Kg) を気管挿管投与方法により直接気管支内へ投与し、BLM 投与後 1 週間毎に気管支洗浄液、肺組織を回収した。遺伝子発現変化をマイクロアレイによりプロファイリングした。

## 4. 研究成果

本助成を受け、主に、肺線維症での発現遺伝子プロファイリングを行った。

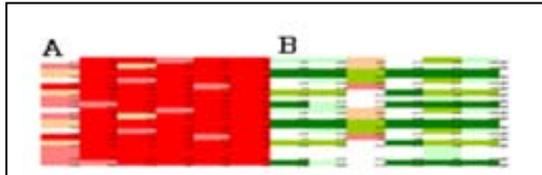
組織化学的解析によって、SCGB3A2 が BLM 誘導性肺線維症を改善することを明らかにしていた (図 3)。BLM 投与後 3 週目に肺組織からの total RNA を採取してマイクロアレイを行った。すなわち、BLM 投与 2 週から 3 週目まで PBS もしくは SCGB3A2 を投与したマウス肺における遺伝子発現をマイクロアレイにて検索した。その結果、BLM 投与肺では、特にプロコラーゲン遺伝子群の発現増加が見られ、SCGB3A2 投与によってそれらは

抑制されていた (図 4)。またサイトカインシグナル、アデニル酸シクラーゼ遺伝子群の発現が亢進していた。



(図 3) マッソン・トリクローム染色像  
BLM 投与後 3 週間経過した肺。  
A. 2-3 週に PBS を投与。  
B. 2-3 週に SCGB3A2 を投与。

特に SCGB3A2 投与によって発現が誘導された遺伝子を多数検出できると期待していたが、マイクロアレイの結果から有意に高発現した遺伝子は 1 遺伝子のみであった。顕著な組織学的変化が認められたのにもかかわらず、SCGB3A2 によって誘導された遺伝子を抽出できなかった。



(図 4) プロコラーゲン遺伝子群の変化  
A. 正常肺と BLM 誘導線維症モデル肺間での遺伝子発現  
B. BL 誘導線維症モデル肺とモデルマウスに SCGB3A2 を投与した肺間での遺伝子発現

そこで、抽出条件を変更し、再度抽出していく。また、BLM 誘導肺線維症モデル肺で SCGB3A2 によって遺伝子発現を認めた遺伝子は、肺上皮細胞マーカーであり、肺の幹細胞マーカーであるとの報告がある。このことは、SCGB3A2 によって肺線維症の回復が裏付けられた。今後、SCGB3A2 の肺上皮マーカー遺伝子発現調節が直接的であるか否かを検討するとともに、両者が肺線維症を相乗的に回復させるか否かについて検討していきたい。

#### 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 8 件)

- ① Shimada C, Kurotani R, Fukumura H, Ono S, Egushi H, Ishikawa Y. Drug Delivery System Using Magnetic Materials  
日本病態生理学会雑誌、第 18 巻第 1 号

2009 年 印刷中

- ② Ishikawa Y, Kurotani R. Cardiac myosin light chain kinase: a new player in the regulation of myosin light chain in the heart. 2008 Circ Res. 102(5):516-518.
- ③ Tomita T, Kido T, Kurotani R, Iemura SI, Sterneck E, Natsume T, Vinson C, Kimura S. CAATT/enhancer binding proteins alpha and delta interact with NKX2-1 to synergistically activate mouse secretoglobin 3A2 gene expression. J Biol Chem. 2008 283(37):25617-25627.
- ④ Kurotani R, Tomita T, Yang Q, Carlson BA, Chen C, Kimura S. Role of Secretoglobin (SCGB) 3A2 in Lung Development. 2008 Am J Respir Crit Care Med. 178(4):389-398.
- ⑤ Okumura S, Tsunematsu T, Bai Y, Jiao Q, Ono S, Suzuki S, Kurotani R, Sato M, Minamisawa S, Umemura S, Ishikawa Y. Type 5 adenylyl cyclase plays a major role in stabilizing heart rate in response to microgravity induced by parabolic flight. 2008 J Appl Physiol. 105(1):173-9.
- ⑥ Ahn SH, Shah YM, Inoue J, Morimura K, Kim I, Yim S, Lambert G, Kurotani R, Nagashima K, Gonzalez FJ, Inoue Y. Hepatocyte nuclear factor 4alpha in the intestinal epithelial cells protects against inflammatory bowel disease. 2008 Inflamm Bowel Dis. 14(7):908-920.
- ⑦ Okumura S, Vatner DE, Kurotani R, Bai Y, Gao S, Yuan Z, Iwatsubo K, Ulucan C, Kawabe J, Ghosh K, Vatner SF, Ishikawa Y. Disruption of type 5 adenylyl cyclase enhances desensitization of cyclic adenosine monophosphate signal and increases Akt signal with chronic catecholamine stress. Circulation. 2007 116(16):1776-1783.
- ⑧ Que J, Okubo T, Goldenring JR, Nam KT, Kurotani R, Morrisey EE, Taranova O, Pevny LH, Hogan BL. Multiple dose-dependent roles for Sox2 in the patterning and differentiation of anterior foregut endoderm. Development. 2007 134(13):2521-2531.

[学会発表] (計 8 件)

- ① 島田千恵美、黒谷玲子、福村英信、小野伸二、江口晴樹、石川義弘  
新規磁性化合物を利用した抗癌剤のドラッグデリバリーシステムの開発 第 19 回日本病態生理学会 2009 年 1 月 24 日 埼玉
- ② 黒谷玲子、富田 毅、木村芝生子  
SCGB3A2 は胎仔肺における新規増殖因子である第 31 回日本分子生物学会 第 81 回日本生化学会 合同大会 2008 年 12 月 10 日 神戸

- ③ Sato M, Honda T, Jiao Q, Kurotani R, Toyota E, Lanier SM and Ishikawa Y An involvement of a novel G-protein activator on hypoxia-induced apoptosis of cardiomyocytes and its interaction with connexin 43  
American Heart Association Scientific Sessions. 2008年11月 New Orleans
- ④ 白水御代 稲垣萌美 奥村敏 黒谷玲子  
白云哲 金美花 鈴木さやか 岩坪耕策  
石川義弘 新しいベータアドレナリン受容体シグナル Epac1 とサイトカインシグナルのCross-talk 第29回 日本循環制御医学会総会 2008年5月10日 横浜
- ⑤ Bai Y, Okumura S, Tsunematsu T, Ono S, Suzuki S, Kurotani R, Sato M, Minamisawa S, Ishikawa Y. Type 5 Adenylyl Cyclase Plays a Major Role in Regulating Autonomic Response to Microgravity in the Heart 第72回 日本循環器学会 2008年3月28日 福岡
- ⑥ 白 云哲、奥村 敏、常松尚志、焦 其彬、小野伸二、鈴木さやか、黒谷 玲子、佐藤元彦、南沢 享、石川義弘  
5型アデニル酸シクラーゼが微小重力下における心臓の自律神経に果たす役割 第85回日本生理学会大会 2008年3月27日 東京
- ⑦ 江口 晴樹、黒谷 玲子、大津 恒治、鈴木さやか、石川 義弘  
第一原理解析を利用した創薬—溶液中の心臓型アデニル酸シクラーゼ特異的刺激剤の分析 第81回日本薬理学会年会 2008年3月 横浜
- ⑧ 白 云哲、奥村 敏、常松尚志、焦 其彬、小野伸二、鈴木さやか、黒谷 玲子、佐藤元彦、南沢 享、石川義弘  
5型アデニル酸シクラーゼの微小重力下での自律神経による心機能制御機構の解析 第24回宇宙利用シンポジウム 2008年1月17日 東京

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒谷玲子 (KUROTANI REIKO)  
横浜市立大学・医学部・特任助教  
研究者番号：00453043

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし