

機関番号：17401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590084

研究課題名 (和文) 肺胞上皮細胞の分化に必須な転写因子 Sp3 による肺胞再生に関する研究

研究課題名 (英文) Sp3 and its regulatory effect of gene expression provide new insights to treat chronic obstructive pulmonary disease.

研究代表者

磯濱 洋一郎 (ISOHAMA YOICHIRO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：10240920

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、転写因子 Sp3 の肺胞上皮細胞の分化に関する遺伝子発現調節の機序およびその意義について調べた。その結果、1) Sp3 は胎児ラット肺の II 型上皮細胞および間葉細胞に選択的に存在し、肺サーファクタントリン脂質の合成酵素の発現に重要であること、2) IL-6 および STAT3 による遺伝子発現調節にも Sp3 が重要であること、3) TNF- α が Sp3 および aquaporin-3 の発現を ERK, CEBP 依存的に抑制することなどを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, we examined the role of Sp3 in alveolar cells, during differentiation. We have found that Sp3 is expressed in alveolar type II cells and mesenchymal cells, but not in type I cells, and that overexpression of Sp3 considerably increased mRNA expression of an enzyme, which is important to synthesis pulmonary surfactant. In addition, Sp3 may be involved in IL-6- and STAT3-dependent gene expression. Further, expression of Sp3 and aquaporin-3 was decreased by TNF-alpha, through the activation of ERK and CEBP.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：肺胞上皮細胞, アクアポリン, 転写因子 Sp3

1. 研究開始当初の背景

我が国には現在、40 歳以上の約 8.5%、実に 530 万人もの慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の潜在的患者が存在すると推定されている。COPD の病態は複雑で、気道に生じた慢

性の炎症に伴い、気道粘液の過剰な産生に加え、肺胞が破壊される「肺気腫」を生じる。この肺気腫を生じた肺胞では、本来の働きであるガス交換を行うために十分な肺胞表面積を失ってしまう。これに加え、換気路である気道への粘液の膠着による閉塞も相俟つ

て、肺の第一義的役割であるガス交換能は著しく阻害される。COPDの最大の原因が喫煙であることは疑う余地はないが、COPDの患者が禁煙しても気腫化した肺が修復・再生されることはない。従って、抜本的な治療法のない肺気腫を伴った重篤なCOPDでは、狭くなった気道を拡張させる抗コリン薬の投与や高濃度酸素の吸入によって低下した換気能を補う治療がなされているが、病態の進行の抑制や回復の見込めないこれらの治療法には限界があることは言うまでもない。COPDの患者数は年々、増加の傾向にあり、呼吸器疾患を我が国の死亡原因の第4位に押し上げるなど社会的な影響も大きい。また、低酸素血症によって全身症状の悪化や著明な体力の低下を伴うCOPD患者の著しいQOLの低下を鑑みると、本疾患の治療法の確立は現代医療における急務であるといっても過言ではない。

COPDの治療には、まず、気道に生じた慢性の炎症を鎮め、肺気腫を予防することが重要である。しかし、気道系の炎症には、ロイコトリエン類の産生を亢進する非ステロイド性抗炎症薬による治療は難しい。また、ステロイド性抗炎症薬も、長期投与が避けられない慢性の炎症ではその副作用が問題となるなど、現在の抗炎症薬では対応できない。また、進行したCOPD患者の気腫化した肺には、肺胞を修復・再生させる治療が求められるものの、上述のように肺気腫は不可逆的と考えられており、現在の医療にはその概念さえ存在しない。すなわち、COPDの基礎となる慢性の気道炎症を抑え、破壊された肺胞を修復・再生する治療概念の確立が望まれている。

一方、胎生期の肺では、間葉系の細胞から肺サーファクタントを産生・分泌するII型上皮細胞へと分化し、さらにこのII型細胞が、肺胞内腔の大部分を覆い血管内皮細胞との間でガス交換を行うI型細胞へと分化することで肺胞壁が形成されることはよく知られている。我々は、肺胞の再生治療へ応用可能な分子機序を求めて、これらの肺胞上皮細胞の分化および機能発現機序について研究してきた。これまでに肺胞上皮細胞の初代培養系を用いた検討により、転写因子Sp1およびSp3の量的変化が、肺胞II型細胞からI型細胞への分化に重要であることを示唆してきた。特に、Sp3は肺胞壁での幹細胞としての役割をもつII型細胞で重要な役割を果たすのではないかと推定している。しかし、これらの転写調節分子がCOPD患者の破壊された肺胞の修復のための治療を考える上での標的分子となり得るか否かは十分に明らかとなっていない。

2. 研究の目的

本研究では、肺胞上皮細胞の分化にSp3転写因子が重要であるという仮説を検証し、COPD患者の気腫化した肺胞を再生するための新規治療概念を提唱することを最大の目的としている。そのために、まず本研究で鍵となる分子として注目するSp3転写因子の肺胞形成における役割と、本分子の関わる遺伝子発現調節の詳細な分子機構を解明することを当面の目的とする。具体的には、下記の目的を設定した。

(1) ラット胎児の肺の発達に伴うSp1およびSp3転写因子の発現を調べ、肺胞上皮に存在する細胞種における各転写因子の局在を解明する。

(2) 肺胞の形成および修復時に著明に増殖する肺胞II型上皮細胞でのSp3転写因子の役割すなわち本転写因子によって調節される遺伝子を同定する。

(3) 肺胞の形成に関わると、従来、報告されているSTAT3による遺伝子発現に対するSp3の関連を調べる

(4) 肺胞II型上皮細胞がI型細胞へと分化するとSp3の発現は抑制され消失するが、その機序を調べる。

3. 研究の方法

(1) 転写因子Sp1およびSp3の局在に関する実験

試料にはWistar系ラットの胎生期16, 18または20日目の胎児肺を用いた。摘出後、凍結切片とし、Sp1, Sp3転写因子に対する抗体ならびに肺胞I型細胞およびII型細胞のマーカーとしてT1 α およびSP-C抗体を用いて免疫染色を行った。

(2) II型細胞におけるSp3の役割についての実験方法

マウス肺胞上皮由来の細胞株MLE-12細胞を試料とし、本細胞にSp3をコードする遺伝子を導入、その後のRNAを抽出し、マイクロアレイ法により発現の亢進する遺伝子を網羅的に解析した。また、変動の可能性が示された遺伝子については、さらにreal-time PCR法により定量的に発現量を測定した。

(3) STAT3依存性遺伝子発現調節に対するSp3の作用に関する実験

標本としてMLE-12細胞を用い、本細胞に代表的なSTAT3活性化薬であるIL-6を処理し、その後の種々の遺伝子のmRNA発現についてreal-time PCR法により測定した。

(4) Sp3 遺伝子の発現抑制に関する実験方法

A549 細胞に種々の刺激を加え、その後の Sp3 およびその mRNA 発現に対する作用を Western blot 法および real-time PCR 法により調べた。また、本細胞の選択的マーカーとして水チャネルの一種 aquaporin-3 についても同様の方法により測定した。

4. 研究成果

ラット胎児肺を用いた免疫組織化学的実験では、胎生期 16 日目では、肺組織中に肺胞 I 型細胞のマーカーである aquaporin-5 (AQP5) および II 型細胞のマーカーである SP-C の抗体によって染色される細胞は全く認められず、18 日目で SP-C 陽性細胞だけが、20 日目で両マーカーに陽性の細胞が検出された。これらの組織を抗 Sp3 抗体で免疫染色すると、全ての組織切片で陽性細胞が検出された。しかし、各細胞のマーカーとの二重染色を行うと、Sp3 は SP-C 陽性の細胞には認められたものの、AQP5 陽性細胞には全く検出されなかった。同様の染色は成熟ラットの肺組織でも観察されたが、Sp3 陽性の細胞は全て II 型細胞であった。

この成績は、先に我々が初代培養細胞を用いた *in vitro* の実験で得た成績をもとに提唱した、間様系細胞にて Sp3 の発現が亢進し、肺胞 II 型上皮細胞に分化、増殖し、その後、Sp3 の消失によって I 型細胞へと分化するという仮説を支持するものであった。

間様系細胞から II 型細胞への分化に伴い Sp3 転写因子の発現が亢進したことは、同時に生じる独立した現象である可能性も否定できない。そこで、次に Sp3 を強制発現させた MLE-12 細胞を用いて、Sp3 により調節される遺伝子について調べた。その結果、肺胞 I 型細胞と II 型細胞の中間の性質をもち、両細胞のマーカー遺伝子を発現する本細胞への Sp3 の高発現は、I 型細胞に選択的な遺伝子である AQP5 の発現を著明に抑制し、一方、II 型細胞に選択的な CDP-diacylglycerol synthase-2 の発現を亢進することが分かった。しかし、II 型細胞に選択的に発現する fatty acid synthase や phosphatidic acid phosphatase-2A などの他の遺伝子については Sp3 の強制発現の影響を受けず、II 型細胞への分化には、必ずしも Sp3 だけでなく他の調節因子の関与が示唆された。

今度は、従来より肺胞上皮の形成に関わ

ることが知られている STAT3 による遺伝子発現調節作用についても調べた。STAT3 の活性化薬として IL-6 を用い、MLE-12 細胞を IL-6 で刺激し、AQP5 の mRNA 発現を調べると、その発現量は、Sp3 の高発現時と同様に、著明に減少した。一方、II 型細胞に特異的な遺伝子については、少なくとも今回調べたものに IL-6 の影響を受けるものはなかった。興味深いことに、Sp3 を siRNA 法により欠損させると、IL-6 による AQP5 の発現抑制は消失し、一方、Sp3 の高発現で IL-6 の作用はさらに著明となった。本成績から、従来、肺胞の形成に重要と考えられている STAT3 が肺胞 II 型細胞の形成ではなく、特に、II 型細胞から I 型細胞への分化に重要であることを示唆するとともに、STAT3 依存的な分化調節作用にも Sp3 が共役因子として関わっていることが示唆された。

しかし、*in vivo* の肺では、Sp3 は I 型細胞への分化に伴い消失することが、先の実験により分かっている。そこで、この Sp3 の消失の機序について追求した。種々の刺激による Sp3 の発現への影響を調べると、TNF- α が Sp3 発現を著明に抑制した。本作用は ERK の阻害薬の併用により消失し、ERK の関与が推定された。また、同様の ERK 依存的な発現低下は末梢気管支の上皮細胞に存在し、気道の水代謝に重要な役割を果たす AQP3 でも生じた。これらの結果は、COPD のように慢性的に炎症が生じている気道では、種々の炎症性サイトカインの産生が増加傾向にある一方で、ERK の活性化を介して Sp3 や AQP3 の発現は低下し、その結果、II 型細胞から I 型細胞への分化は亢進するものの、II 型細胞の形成および増殖は逆に抑制する傾向にあると考えられる。また、AQP3 の発現低下は、気道での水の分泌を抑制し、気道粘液の粘稠化を引き起こす要因となるとも考えられる。

そこで、AQP3 のプロモーター遺伝子の活性を指標として、TNF- α および ERK 依存性の発現抑制の機序をさらに追求したが、本プロモーター内の -374~-271 位に TNF- α への感受性に関わる配列が存在すると考えられ、その中でも C/EBP 結合配列が重要であることが分かった。

さらにこの配列の近傍に E2F-1 転写因子結合配列が認められたため、E2F-1 を siRNA 法により欠損させると、AQP3 プロモーターの基本転写活性が著明に抑制されるとともに、TNF- α による発現抑制もほぼ完全に消失した。従って、TNF- α による肺上皮細胞での遺伝子発現の抑制作用には、C/EBP を介した E2F-1 の活性抑制が関わりと推定している。

なお、本研究では *in vivo* 肺の II 型細胞での Sp3 高発現系を構築することも目指した

が、未だ高効率で選択的に本遺伝子を発現させる方法の確立に至っていない。この点については、今後も継続して検討する予定である。

以上の成績は、肺胞の形成および修復の機序を考える上でSp3転写因子の重要性をさらに強く示唆するとともに、その発現低下がCOPDなどの慢性気道炎症における病態形成にも関わる可能性を示すものである。本研究の究極的目的であるCOPD治療薬の開発に向け、Sp3転写因子の発現または活性を薬理的に調節する薬物の有用性が考えられ、従来、不可能と考えられている気腫化した肺胞の再生に、道を拓く画期的な基礎データであると考えられる。

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20件)

- 1) Hisatsune A, Nakayama H, Kawasaki M, Horie I, Miyata T, Isohama Y, Kim KC, Katsuki H, Anti-MUC1 antibody inhibits EGF receptor signaling in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 査読有, 405, 2011, 377-381.
- 2) Matsushita H, Hijioka M, Hisatsune A, Isohama Y, Shudo K, Katsuki H. A retinoic acid receptor agonist Am80 rescues neurons, attenuates inflammatory reactions, and improves behavioral recovery after intracerebral hemorrhage in mice. *J Cereb Blood Flow Metab*, 査読有, 31, 2011, 222-234.
- 3) Mizutani A, Maeda N, Toku S, Higa-Nakamine S, Isohama Y, Sunakawa H, Sugahara K, Yamamoto H, Interaction of ethyl pyruvate in vitro with NF- κ B subunits, RelA and p50. *Eur J Pharmacol*, 査読有, 650, 2010, 151-156.
- 4) Namba T, Tanaka KI, Ito Y, Hoshino T, Matoyama M, Yamakawa N, Isohama Y, Azuma A, Mizushima T. Induction of EMT-like phenotypes by an active metabolite of leflunomide and its contribution to pulmonary fibrosis. *Cell Death Differ*. 査読有, 17, 2010, 1882-1895.
- 5) Nishimoto Y, Hisatsune A, Katsuki H, Miyata T, Yokomizo K, Isohama Y. Glycyrrhizin attenuates mucus production by inhibition of MUC5AC mRNA expression in vivo and in vitro. *J Pharmacol Sci*. 査読有, 113, 2010, 76-83.
- 6) Mizutani A, Maeda N, Toku S, Isohama Y, Sugahara K, Yamamoto H. Inhibition by ethyl pyruvate of the nuclear translocation of nuclear factor-kappaB in cultured lung epithelial cells. *Pulm Pharmacol Ther*, 査読有, 23, 2010, 308-315.
- 7) Ishitsuka Y, Moriuchi H, Isohama Y, Tokunaga H, Hatamoto K, Kurita S, Irikura M, Iyama K, Irie T. A selective thromboxane A2 (TXA2) synthase inhibitor, ozagrel, attenuates lung injury and decreases monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 mRNA expression in oleic acid-induced lung injury in guinea pigs. *J Pharmacol Sci*. 査読有, 111, 2009, 211-215.
- 8) Hisatsune A, Kawasaki M, Nakayama H, Mikami Y, Miyata T, Isohama Y, Katsuki H, Kim KC. Internalization of MUC1 by anti-MUC1 antibody from cell membrane through the macropinocytotic pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, 388, 2009, 677-682.
- 9) Horie I, Maeda M, Yokoyama S, Hisatsune A, Katsuki H, Miyata T, Isohama Y. Tumor necrosis factor-alpha decreases aquaporin-3 expression in DJM-1 keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, 387, 2009, 564-568.
- 10) Jin S, Zhao G, Li Z, Nishimoto Y, Isohama Y, Shen J, Ito T, Takeya M, Araki K, He P, Yamamura K. Age-related pulmonary emphysema in mice lacking alpha/beta hydrolase domain containing 2 gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, 380, 2009, 419-424.
- 11) Mikami Y, Hisatsune A, Tashiro T, Isohama Y, Katsuki H. Hypoxia enhances MUC1 expression in a lung adenocarcinoma cell line. 査読有, *Biochem Biophys Res Commun*. 379, 2009, 1060-1065.
- 12) Kuroiwa A, Hisatsune A, Isohama Y, Katsuki H. Bacterial neuraminidase increases IL-8 production in lung epithelial cells via NF-kappaB-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 査読有, 379, 2009, 754-759.
- 13) 磯濱洋一郎, 肺サーファクタントの産生経路と分泌機構, 日本肺サーファクタント・界面医学会雑誌, 査読無, 40, 2009, 59-64. ほか

[学会発表] (計 43 件)

- 1) 堀江一郎 (代表), MEK/ERK and C/EBP α are involved in IL-1 β -induced decrease in aquaporin-3 in lung epithelial cell. 第 84 回日本薬理学会年会, 2011 年 3 月 22 日 (横浜, パシフィコ横浜).
- 2) 坂本唯真 (代表), Silencing of AQP5 gene expression decreases keratinocyte chemoattractant expression in lung epithelial cells. 第 84 回日本薬理学会年会, 2011 年 3 月 22 日 (横浜, パシフィコ横浜).
- 3) Yoichiro Isohama (代表), Inhibition of airway mucin production, a new pharmacological activity of ibudilast. 第 63 回日本薬理学会西南部会, 2010 年 11 月 26 日 (鹿児島, かごしま県民交流センター).
- 4) 磯濱洋一郎, 五苓散はアクアポリン 4 を阻害するか-アクアポリンは利水作用を説明する分子? 国際東洋医学会主催五苓散シンポジウム, 2010 年 10 月 31 日 (東京, 品川イーストワンタワー).
- 5) 磯濱洋一郎 (代表), 気道炎症および気道粘液過剰産生に対する新たな治療薬としてのグリチルリチン. 生体機能と創薬シンポジウム, 2010 年 9 月 9 日 (ホテルグランビア京都, 京都).
- 6) 堀江一郎 (代表) 郎, 炎症性刺激による肺上皮細胞のアクアポリン-3 発現の抑制. 第 9 回肺サーファクタント分子病態研究会, 2010 年 7 月 3 日 (札幌医科大学記念ホール, 札幌).
- 7) Yoichiro Isohama, Nitric Oxide inhibits aquaporin-4 and -5 water channels through different signalings Kumamoto BioMedical Symposium, 2010 年 6 月 19 日 (熊本大学医学部山崎記念館, 熊本).
- 8) Yoichiro Isohama (代表), Nitric Oxide inhibits aquaporin-4 and -5 water channels through different signalings. The 6th International Conference on the Biology, Chemistry, and Therapeutic Application of Nitric oxide, 2010 年 6 月 14-18 日 (国立京都国際会館, 京都).
- 9) 磯濱洋一郎 (代表), 気道上皮細胞の粘液遺伝子 MUC5AC 発現に対する ibudilast の抑制作用. 第 30 回気道分泌研究会, 2010 年 4 月 3 日 (八重洲富士屋ホテル, 東京).
- 10) 磯濱洋一郎, アクアポリン水チャネルの発現と機能調節に関する薬理学的研究. 第 26 回日本薬学会九州支部大会,

- 2009 年 12 月 13 日 (九州大学薬学部, 福岡). 日本薬学会九州支部奨励賞受賞講演
- 11) 横山智士 (代表), IL-6/STAT3 依存性機序に基づくアクアポリン-5 の発現制御. 第 26 回日本薬学会九州支部大会, 2009 年 12 月 14 日 (九州大学薬学部, 福岡).
- 12) 磯濱洋一郎 (代表), 一酸化窒素は cGMP/PKG 経路を介して aquaporin-4 の機能を抑制する, トランスポーター研究会第 3 回九州部会, 2009 年 11 月 21 日 (鹿児島大学医学部鶴陵会館, 鹿児島).
- 13) 磯濱洋一郎, 肺胞上皮細胞のアクアポリン, その発現と意義, 日本肺サーファクタント界面医学会第 45 回学術研究会, 2009 年 10 月 3 日 (金沢市文化ホール, 金沢).
- 14) 前田麻美子 (代表), 肺上皮細胞での aquaporin-5 の品質管理における N-末端細胞内領域の役割, 日本薬学会第 129 年会, 2009 年 3 月 26 日 (国立京都国際会館, 京都).
- 15) 近藤真己子 (代表), 一酸化窒素による cGMP 依存的経路を介した Aquaporin-4 の機能制御, 第 82 回日本薬理学会年会, 2009 年 3 月 17 日 (横浜パシフィコ, 横浜).
- 16) 磯濱洋一郎, 漢方薬の呼吸器疾患治療効果から見てきたグリチルリチンの気道粘液産生制御作用, 第 17 回天然薬物の開発と応用シンポジウム, 2008 年 11 月 13 日 (九州大学医学部百年講堂, 福岡).
- 17) 磯濱洋一郎 (代表), アクアポリンは細胞膜の CO₂ ガス透過性を亢進し, ガス交換に関わる?, 第 7 回肺サーファクタント分子病態研究会, 2008 年 7 月 5 日 (札幌医科大学記念ホール, 札幌).

ほか

[図書] (計 1 件)

- 1) 磯濱洋一郎, 南江堂, パートナー機能形態学 第 9 章呼吸器系, 2008 年 8 月 20 日, p179-196.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: アクアポリン 3 の発現調節剤
発明者: 磯濱洋一郎, 久恒昭哲, 堀江一郎, 香月博志
権利者: 熊本大学
種類: 特許権
番号: 特願 2009-178704
出願年月日: 2009 年 7 月 31 日
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

磯濱 洋一郎 (ISOHAMA YOICHIRO)
熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授
研究者番号：10240920

(3)連携研究者

久恒 昭哲 (HISATSUNE AKINORI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：50347001

香月 博志 (KATSUKI HIROSHI)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：40240733