

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21590992

研究課題名（和文）肺線維症におけるテトラスパニン(CD9, CD151)の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of tetraspanins (CD9, CD151) in lung fibrosis

研究代表者

武田 吉人 (TAKEDA YOSHITO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：40452388

## 研究成果の概要（和文）：

近年、インテグリンと線維化、TGF- $\beta$  シグナルとの関連を示唆する報告が種々なされているが、インテグリンのパートナーであるテトラスパニンと線維化に関しては論じられていない。そこで我々は、インテグリンと会合の強いテトラスパニン CD151 の肺の線維化への関わりにつき検討した。マイクロアレイによる網羅的な解析にて CD151 欠損マウスの肺にて線維化関連遺伝子の過剰発現を見出した。また、蛋白レベルでのコラーゲンの過剰蓄積ならびに呼吸機能検査でのコンプライアンスの低下も認め、CD151 欠損肺は無刺激にて線維化の表現型を有することを見出した。CD151 欠損上皮では基底膜類似成分であるマトリゲルとの接着が低下したことが、上皮間葉転換や TGF- $\beta$  活性化に関与すると考えられた。さらに特発性肺線維症患者の肺胞 2 型上皮では CD151 の発現が低下していた。以上より、CD151 は人およびマウスにおいて肺胞上皮の安定化ならびに肺線維症抑制に必須のものであると考えられた。

## 研究成果の概要（英文）：

Pulmonary fibrosis (PF) is the process whereby excess fibrous connective tissue forms and characterized by the accumulation of fibrillar collagen. Tetraspanins, key partners of integrins, facilitate the formation of multiple molecular complexes and regulate cell function. We previously reported double deletion of tetraspanin CD9 and CD81 in mice spontaneously developed COPD-like phenotype. The gene functions analyses from DNA Microarray unexpectedly revealed that 'connective tissue development and function' were ranked high in CD151 KO lungs. Notably, CD151 KO mice spontaneously developed lung fibrosis with age. Consistently, the level of p-Smad2 in the CD151 KO mice was augmented in the whole lung and in the epithelium. Indeed, deletion of CD151 in alveolar epithelial cells leads to increased p-Smad2 activity on Matrigel, and mesenchymal-like changes. Of interest, expression of CD151 in epithelial cells from IPF patients was downregulated compared with that of healthy controls. Given that CD151 plays a pivotal role to prevent fibrosis through maintaining epithelial integrity, CD151 could be a novel target for PF.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：特発性肺線維症，テトラスパニン，インテグリン，CD9，CD151

## 1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (IPF) は胞隔炎として始まり、慢性炎症による肺胞領域の破壊を伴って間質の線維化へと進行する原因不明の予後不良疾患である。しかし IPF の詳細なメカニズムについては解明不十分で、根本的治療法はない。接着分子は癌の転移、血管新生、感染、神経疾患、自己免疫疾患にいたるまで多彩な機能の解明が進められ、近年接着分子をターゲットにした抗体治療 (抗接着分子療法) の研究も盛んに行われ、臨床応用されるものも出現した。線維化における接着分子の役割についても精力的に研究がされている。なかでも integrin の役割については炎症や TGF- $\beta$  の制御など詳細な検討がされている。 $\alpha$ v $\beta$ 6 などの integrin が TGF- $\beta$  の活性化制御のメカニズムは十分な研究がされてきた。最近 integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 が TGF- $\beta$  の抑制シグナルである Smad7 を介して創傷治癒に関わること明らかにされ (J Clin Invest. 2008;118(3))、 $\alpha$ 1 integrin が新たな線維化制御分子として注目されている。

Tetraspanins (以下 TM4) は CD9, CD81, CD151 などを含む細胞膜 4 貫通蛋白でヒトでは 34 種類が報告されている。このファミリーの特徴として integrin やその他の膜蛋白と細胞膜の microdomain にて複合体を形成することにより接着、遊走、増殖、癌転移やシグナル伝達など様々な機能に影響を与える。TM4 は integrin、CD44、EGF receptor や TGF- $\beta$  など炎症、線維化、創傷治癒との関連が深い分子との会合が報告され、TM4 を標的にした治療法の開発も報告され今後創薬の対象となりうる (Nat Rev Drug Discov 2008. Martin Hemler)。CD9 や CD81 は生体においてほぼすべての細胞に発現し、細胞と細胞の接着部位に存在するのに対して、CD151 は血管内皮細胞、血小板、白血球や線維芽細胞など限られた細胞に発現し、細胞間接着部位のみではなく上皮細胞においてはヘミデスモゾームに局在する。CD9 は創傷治癒や心筋肥大に重要な Heparin binding EGF や TGF- $\beta$  と会合し、炎症や免疫応答に関与する。一方 CD151 は血管新生や基底膜の保持や腎臓の形態形成に関与する。このように TM4 は各々が細胞膜上で複合体を形成しつつも、複合体蛋白の種類や TM4 の分布の差異により異なる機能を発揮する蛋白ファミリーである。我々は今までに主要な TM4 である CD9 と CD151 について KO mouse や臨床検体を用いた解析により肺癌、血管新生、肉芽腫形成、急性肺障害、COPD、

骨粗鬆症における TM4 の役割を解明してきた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は肺線維症における TM4 (CD9, CD151) の役割を臨床検体 (肺線維症患者と健康人) と 2 種類の KO mice を用いて詳細に検討し、肺線維症の病態解明や新たな治療法の開発を目的とする。

## 3. 研究の方法

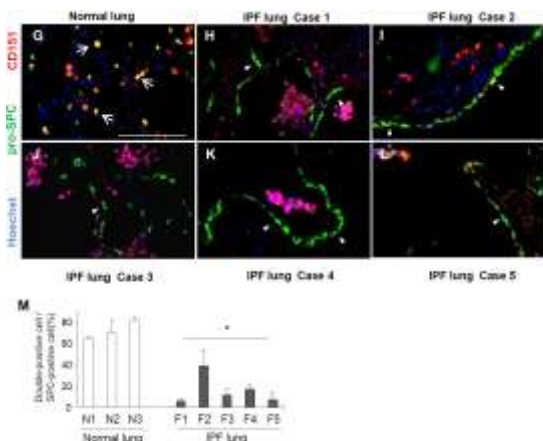
本研究では

- (1) まず肺線維化に CD9 や CD151 が関与しているかどうかを臨床検体 (IPF 肺、正常肺) における integrin と TM4 (CD9, CD151) を免疫染色にて確認し、WT mouse に Bleomycin を経気道投与して肺線維症を誘導し、TM4 の発現 (蛋白、mRNA) を検討。
- (2) WT mouse と CD9、CD151 KO mouse に Bleomycin を経気道投与して肺線維化を生理学的、生化学的、組織学的に比較検討する。
- (3) 線維化に関与するならばどの細胞 (マクロファージ、肺胞上皮細胞、線維芽細胞) がどのようなメカニズムで関わるのかを解明する。

## 4. 研究成果

### (1) 肺線維症患者における TM4 (CD9, CD151) の発現解析

国立病院機構近畿中央胸部疾患センターとの共同研究により正常肺と線維化肺での TM4 の発現を比較した。線維化肺では上皮における CD151 の発現低下を認め、肺胞上皮 CD151 の発現低下が線維化誘導刺激につながる可能性が示唆された (下図)。マウス BLM 刺激による線維化においても同様に CD151 の

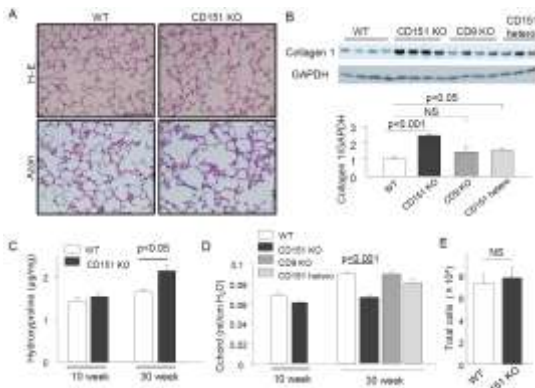


発現低下を定量的に real-time PCR にて確認

した（データ未掲載）。

(2) CD151 KO mice は無刺激で加齢に伴い増強する肺線維症を呈する。

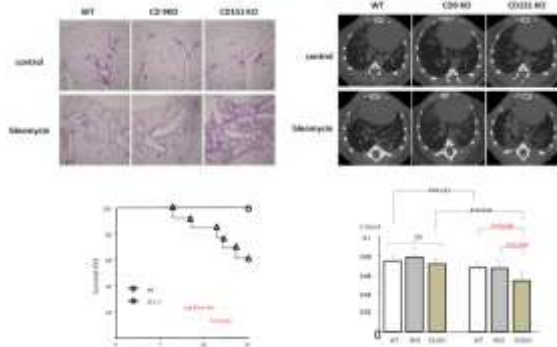
BLM 刺激の実験において、我々は CD151 KO mice が無刺激で加齢とともに肺線維症を呈することを病理学的 (Azan 染色)、生理学的 (chord length)、生化学的 (collagen) に見出した (左図)。一方 CD9 KO mice は有意



な線維化の変化を認めなかった。

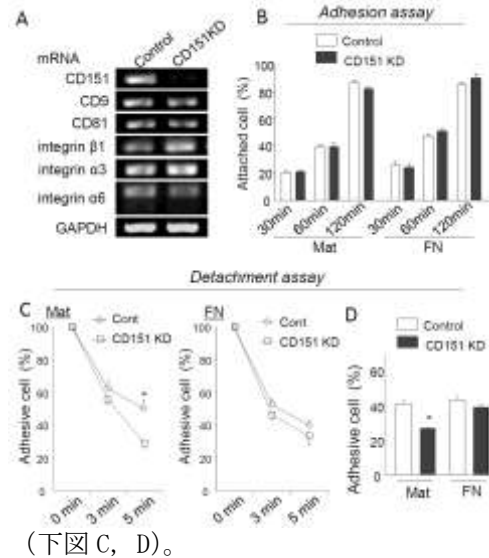
(3) Bleomycin (BLM) 誘導線維化モデルによる WT, CD9 KO, CD151 KO mice 肺線維化の比較

WT mice と CD9, CD151 KO mice に BLM を経気道投与して、生化学的 (Collagen)、病理学的 (Azan 染色)、生理学的 (呼吸機能) に線維化を比較したところ LPS などの刺激により炎症が増強する CD9 KO mouse は予想に反して線維化増強を示さず、CD151 KO mouse は有意な線維化増強 (呼吸機能低下) と生存率低下を認めた。



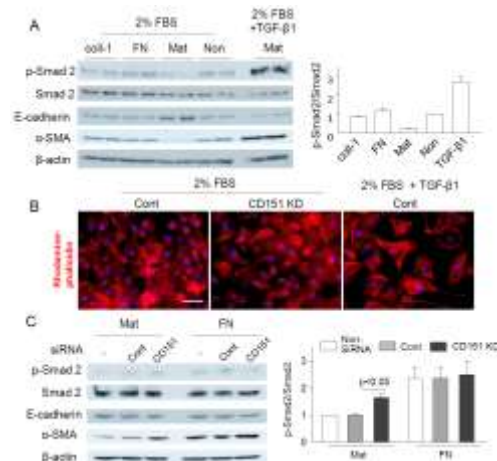
(4) CD151 KO mice が肺線維症に至るメカニズムの解析

肺線維症において II 型肺胞上皮細胞の基底膜への接着は上皮安定化のために最も重要なステップとされる。そこで不死化 II 型肺胞上皮細胞を用いて、siRNA により CD151 knockdown (KD) することで上皮の機能を評価した (下図 A)。マトリゲル (Mat) やフィブロネクチン (FN) への接着 (static cell adhesion) には、CD151 発現低下は影響を与えなかったが、adhesion strengthening (detachment assay) において、CD151 発現低下は Mat への接着を選択的に低下させた



(5) CD151 KO mice が肺線維症に至るメカニズムの解析

肺線維症において上皮-間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition: EMT) が重要なメカニズムで、EMT が線維化の主体である筋線維芽細胞を供給することが注目されている。vitro において、II 型肺胞上皮はその形態を保持しての継代が困難な細胞のため、不死化肺胞 II 型上皮細胞に EMT 誘導作用のある TGF- $\beta$  を加え筋線維芽細胞を誘導したところ、CD151 knockdown (KD) 細胞において Mat 上における間葉系マーカー  $\alpha$ -SMA 増加と上皮系マーカー E-cadherin の減少と EMT 様形態変化を認めた。また KD 細胞において TGF- $\beta$  刺激後の p-Smad2 の増加を認め CD151 が TGF- $\beta$  刺激を抑制することにより  $\beta$ -catenin を制御している可能性が示唆された。



## 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 12 件)

- ① Kazuyuki Tsujino, Yoshito Takeda, Toru Arai, Yasushi Shintani, Ryosaku Inagaki, Hiroyuki Saiga, Takeo Iwasaki, Satoshi Tetsumoto, Yingji Jin, Shoichi Ihara, Toshiyuki Minami, Mayumi Suzuki, Izumi Nagatomo, Koji Inoue, Hiroshi Kida, Takashi Kijima, Mari Ito, Masanori Kitaichi, Yoshikazu Inoue, Isao Tachibana, Kiyoshi Takeda, Meinoshin Okumura, Martin E. Hemler, Atsushi Kumanogoh. Tetraspanin CD151 protects against pulmonary fibrosis by maintaining epithelial integrity. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012 in press 査読有
- ② Takimoto T, Yoshida M, Hirata H, Kashiwa Y, Takeda Y, Goya S, Kijima T, Kumagai T, Tachibana I, Kawase I. 4-Hydroxy-2-nonenal induces chronic obstructive pulmonary disease-like histopathologic changes in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Mar 30;420(1):84-90. 査読有
- ③ Minami T, Kijima T, Otani Y, Kohmo S, Takahashi R, Nagatomo I, Hirata H, Suzuki M, Inoue K, Takeda Y, Kida H, Tachibana I, Kumanogoh A. HER2 As Therapeutic Target for Overcoming ATP-Binding Cassette Transporter-Mediated Chemoresistance in Small Cell Lung Cancer. *Mol Cancer Ther.* 2012 in press 査読有
- ④ Kohmo S, Kijima T, Mori M, Minami T, Namba Y, Yano Y, Yoneda T, Takeda Y, Kitada S, Yamaguchi T, Tachibana I, Yokota S. CXCL12 as a biological marker for the diagnosis of tuberculous pleurisy. *Tuberculosis (Edinb).* 2012 in press 査読有
- ⑤ Takahashi R, Hirata H, Tachibana I, Shimosegawa E, Inoue A, Nagatomo I, Takeda Y, Kida H, Goya S, Kijima T, Yoshida M, Kumagai T, Kumanogoh A, Okumura M, Hatazawa J, Kawase I. Early [18F]fluorodeoxyglucose positron emission tomography at two days of gefitinib treatment predicts clinical outcome in patients with adenocarcinoma of the lung. *Clin Cancer Res.* 2012 Jan 1;18(1):220-8. 査読有
- ⑥ Tetsumoto S, Osa A, Kijima T, Minami T, Hirata H, Takahashi R, Kuhara H, Nagatomo I, Takeda Y, Kida H, Goya S, Tachibana I, Kawase I. Two cases of leptomeningeal metastases from lung adenocarcinoma which progressed during gefitinib therapy but responded to erlotinib. *Int J Clin Oncol.* 2012 Apr;17(2):155-9. 査読有
- ⑦ Kijima T, Takeuchi K, Tetsumoto S, Shimada K, Takahashi R, Hirata H, Nagatomo I, Hoshino S, Takeda Y, Kida H, Goya S, Tachibana I, Kawase I. Favorable response to crizotinib in three patients with echinoderm microtubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase fusion-type oncogene-positive non-small cell lung cancer. *Cancer Sci.* 2011 Aug;102(8):1602-4. 査読有
- ⑧ Yoshito Takeda, Qinglin Li, Alexander R. Kazarov, Mathieu Epardaud, Kutlu Elpek, Shannon J. Turley, Martin E. Hemler Diminished metastasis in Tetraspanin CD151 Knockout mice. *Blood.* 2011 Jul 14;118(2):464-72. 査読有
- ⑨ Takashi Kijima, Tomohito Shimizu, Shinpei Nonen, Mitsugi Furukawa, Yasushi Otani, Toshiyuki Minami, Ryo Takahashi, Haruhiko Hirata, Izumi Nagatomo, Yoshito Takeda, Hiroshi Kida, Sho Goya, Yasushi Fujio, Junichi Azuma, Isao Tachibana, Ichiro Kawase Safe and successful treatment with erlotinib after gefitinib-induced hepatotoxicity: difference in metabolism as a possible mechanism *J Clin Oncol.* 2011 Jul 1;29(19):e588-90. 査読有
- ⑩ Nakanishi K, Takeda Y (equally first author), Tetsumoto S, Iwasaki T, Tsujino K, Kuhara H, Jin Y, Nagatomo I, Kida H, Goya S, Kijima T, Maeda N, Funahashi T, Shimomura I, Tachibana I, Kawase I. Involvement of Endothelial Apoptosis Underlying COPD-Like Phenotype in Adiponectin-Null Mice: Implications for Therapy. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011 May 1;183(9):1164-75. 査読有
- ⑪ Kohmo S, Kijima T, Otani Y, Mori M, Minami T, Takahashi R, Nagatomo I, Takeda Y, Kida H, Goya S, Yoshida M, Kumagai T, Tachibana I, Yokota S, Kawase I. Cell surface tetraspanin CD9 mediates chemoresistance in small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2010 Oct 15;70(20):8025-35. 査読有

- ⑫ Mayumi Suzuki, Isao Tachibana, Yoshito Takeda, Ping He, Seigo Minami, Takeo Iwasaki, Sho Goya, Takashi Kijima, Toru Kumagai, Mitsuhiro Yoshida, Tadashi Osaki, and Ichiro Kawase Tetraspanin CD9 negatively regulates lipopolysaccharide-induced macrophage activation and lung inflammation J Immunol 2009 May15;182(10):6485-93. 査読有

(3) 連携研究者 なし

〔学会発表〕 (計 3 件)

- ① 2012年5月22日 アメリカ胸部疾患学会 サンフランシスコ 米国 Deletion of tetraspanin CD151 in mice spontaneously leads to pulmonary fibrosis with age through epithelial disintegrity. Yoshito Takeda, Kazuyuki Tsujino, Isao Tachibana, Atsushi Kumanogoh
- ② 2012年4月21日 日本呼吸器学会総会 神戸 CD151は肺胞上皮の安定化を介して肺の線維化を制御する 辻野 和之、武田 吉人、金 英姫、鉄本 訓史、鈴木 真優美、木田 博、木島 貴志、立花 功、熊ノ郷 淳
- ③ 2011年7月22日 Vermont (USA) FASEB Meeting (招待講演) CD151 KO mice spontaneously develop lung fibrosis, hepatic fibrosis and skin fibrosis via augmented TGF- $\beta$  signaling. Yoshito Takeda, Kazuyuki Tsujino, Isao Tachibana, Atsushi Kumanogoh

〔その他〕

本研究成果は2012年5月17日に全国各誌(毎日、読売、産経、日刊工業新聞)に難病・特発性線維症の鍵物質発見として報道された。

ホームページ等

[http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/imed3/lab\\_8/index.html](http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/imed3/lab_8/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 吉人 (TAKEDA YOSHITO)  
大阪大学・医学系研究科・助教  
研究者番号：40452388

(2) 研究分担者

立花 功 (TACHIBANA ISAO)  
大阪大学・医学系研究科・講師  
研究者番号：60324761