

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 6 月 20 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究 B

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21790207

研究課題名（和文） 肺における新規サーファクタント SCGB3A2 の線維化抑制機序の解明

研究課題名（英文） Role of SCGB3A2 in pulmonary fibrosis

研究代表者

黒谷 玲子 (KUROTANI REIKO)

山形大学・大学院理工学研究科・助教

研究者番号：00453043

研究成果の概要（和文）：線維症患者数は細胞の損傷をきっかけとして、炎症、コラーゲン・マトリックス沈着を経過して発症する難治性疾患であり、決定的な治療薬は存在しない。本研究では、新規生理活性物質 SCGB3A2 が線維化抑制能を有すると考え、肺線維症における SCGB3A2 の効果とその作用機序の検討を目的とした。ブレオマイシン（BLM）誘導性肺線維症モデルマウスにリコンビナント SCGB3A2 を投与した結果、SCGB3A2 が肺線維症を改善した。さらに、TGFβ 刺激によって線維芽細胞を筋線維芽細胞に分化させた時、SCGB3A2 添加によって筋線維芽細胞への分化抑制とコラーゲン遺伝子の発現を抑制することを示した。

研究成果の概要（英文）：An explosive number of people are affected by fibrosis worldwide in these days, and the morbidity and mortality rates are increasing every year. The exploration and/or development of a definitive medicine are urgently required. We report that SCGB3A2 drastically reduces the severity of lung fibrosis using bleomycin (BLM)-induced mouse model. Mice were intravenously administered SCGB3A2 for 7 days starting at day 14 after administration of BLM by intratracheal intubation. Fibrosis foci were remarkably reduced by SCGB3A2 in lung lobes and the number of neutrophils and macrophages was also reduced in bronchoalveolar lavage fluid (BALF). Additionally, when lung fibroblast cells isolated from adult mice were differentiated into myofibroblast cells by TGFβ, the differentiation was inhibited by SCGB3A2 as judged by morphology and reduced expression of a smooth muscle actin (αSMA). Collagen 1a2 and 3a1 gene expression was also decreased in the presence of SCGB3A2.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	156,000
2010 年度	1,000,000	300,000	130,000
2011 年度	1,000,000	300,000	130,000
総計	3,200,000	960,000	416,000

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：SCGB3A2、肺線維症

1. 研究開始当初の背景

(1) SCGB3A2 の単離

転写因子 NKX2_1 欠損マウス肺は、気管支

分岐が停止し、袋状になることで呼吸ができず、出生と同時に死に至る。そこで、肺発生における NKX2_1 の作用機序を理解するため

に、NKX2_1 の下流遺伝子の単離を試みた結果、新規サーファクタント Secretoglobin (SCGB)3A2 の単離に成功した(Mol Endocrinol. 2001 15:2021-2036)。SCGB3A2 は、ウテログロビン(UG)ファミリー遺伝子であり、気管支喘息感受性関連遺伝子クラスター内に位置し、抗炎症作用を有する UG と相当なアミノ酸配列を持つタンパク質をコードしていた。

(2) 喘息性肺炎および肺発生における SCGB3A2 の機能解明

SCGB3A2 の抗炎症作用の解明を目的として、気管支喘息モデルマウスに 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 を高発現させた。その結果、炎症は回復し、SCGB3A2 が抗炎症作用を持つことを証明した (Am J Respir Crit Care Med. 2006 173:958-964)。加えて、SCGB3A2 がマウス肺発生初期から後期にかけ、分岐促進作用と成熟促進作用を持つことを明らかにした (Am J Respir Crit Care Med. 2008 178:389-398)。

(3) 肺線維症における SCGB3A2 の機能解明

BLM 誘導性肺線維症モデルマウスに SCGB3A2 を静脈投与した時の遺伝子プロファイリングを行った。これにより、SCGB3A2 は BLM 誘導性肺線維症を改善する可能性が高いことを示し、STAT1 が SCGB3A2 の細胞内シグナル系のキーファクターであることを見出した。

2. 研究の目的

線維症は、細胞の損傷をきっかけとして、炎症、コラーゲン・マトリックス沈着を経過して発症する。本研究で注目する肺で産生する新規生理活性物質 SCGB3A2 は、抗炎症作用および増殖作用を持つため、線維化を抑制する可能性が考えられた。そこで、BLM 誘導性肺線維症モデルマウスを用いて SCGB3A2 が肺線維症を改善することを検証することを目的とした。特に、遺伝子プロファイリングによって得られた情報を基に、SCGB3A2 の抗線維化における作用機序の解明を行った。

将来的に SCGB3A2 の肺線維症の治療薬としての開発を目指したい。

3. 研究の方法

C57BL/6 マウス (雌、7-8 週令) にブレオマイシン (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、肺線維症モデ

ルマウスを作製した。BLM 投与後 2 週間後に SCGB3A2 を 1 週間毎日投与した。気管支洗浄液、肺組織は BLM 投与後、1 週間毎に回収した。

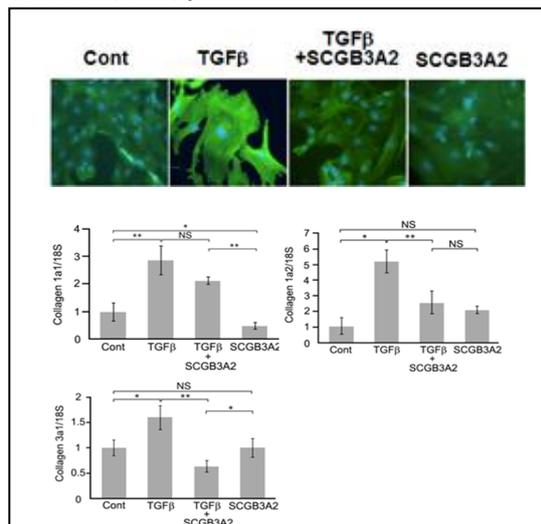
遺伝子発現変化をマイクロアレイによりプロファイリングした。

C57BL/6 マウスより線維芽細胞を単離し、TGFβ で刺激し、筋線維が細胞へ分化させた。この時、SCGB3A2 刺激後の αSMA の発現およびコラーゲン遺伝子発現を検討した。さらに、SCGB3A2 刺激後、1~16 時間までの線維芽細胞を回収し、STAT1、pSTAT1、SMAD2/3、pSMAD2/3、SMAD7 をウエスタンブロットにて検出した。

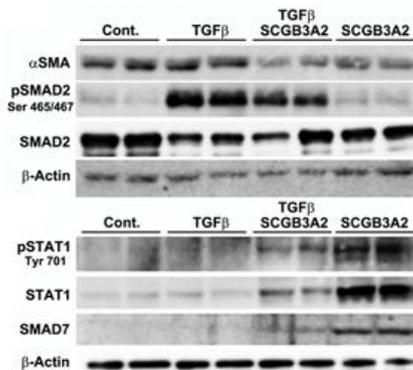
肺組織は SCGB3A2 および STAT1、pSTAT1、SMAD2/3、pSMAD2/3 を免疫組織化学法にて検出した。

4. 研究成果

初代培養系で SCGB3A2 は TGFβ による筋線維芽細胞への分化を抑制した。この時、αSMA 発現およびコラーゲン遺伝子発現が低下した (図 1)。



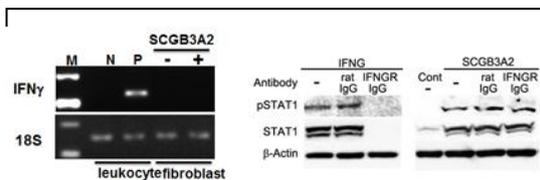
(図1) SCGB3A2 による筋線維芽細胞への分化抑制と αSMA 発現(上段写真)、コラーゲン遺伝子発現低下(下段グラフ)



(図2) SCGB3A2 による STAT1 のリン酸化(pSTAT1)と SMAD7 発現誘導と SMAD2、SMAD3 の活性化抑制

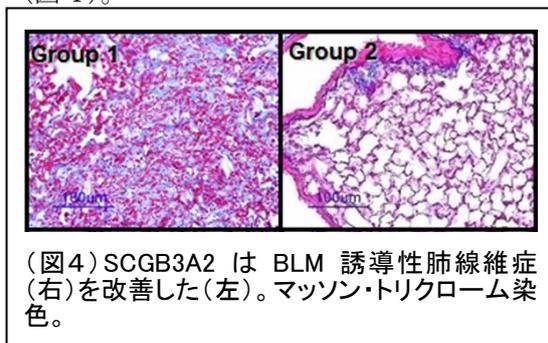
さらに、SCGB3A2はSTAT1を活性化(リン酸化; pSTAT1)し、SMAD7の発現を向上させた(図2)。これにより、SMAD2、SMAD3の活性化は抑制された。

臨床で治療に使用されているIFN γ はSTAT1を活性化させるため、SCGB3A2とIFN γ の関連性を検討した。その結果、SCGB3A2刺激によってIFN γ の遺伝子は発現されず、IFN γ 受容体にも結合しないことが明らかになった(図3)。



(図3) SCGB3A2はIFN γ とは独立して機能する。

また、SCGB3A2はBLM誘導性肺線維症を改善することを組織学的にも明らかにした(図4)。



(図4) SCGB3A2はBLM誘導性肺線維症(右)を改善した(左)。マッソン・トリクローム染色。

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 11 件)

- ① Kurotani R, Okumura S, Matsubara T, Yokoyama U, Buckley JR, Tomita T, Kezuka K, Nagano T, Esposito D, Taylor TE, Gillette WK, Ishikawa Y, Abe H, Ward JM, Kimura S. Secretoglobin 3A2 suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis by TGFbeta signaling down-regulation. *J Biol Chem*. 2011, 286(22):19682-19692.(査読有)
- ② Sato M, Hiraoka M, Suzuki H, Bai Y, Kurotani R, Yokoyama U, Okumura S, Cismowski MJ, Lanier SM, Ishikawa Y. Identification of transcription factor E3 (TFE3) as a receptor-independent activator of G α 16: Gene regulation by nuclear G α subunit and its activator. *J Biol Chem*. 2011, 286(20):17766-17776.(査読有)
- ③ Suzuki S, Yokoyama U, Abe T, Kiyonari H, Yamashita N, Kato Y, Kurotani R, Sato M, Okumura S, Ishikawa Y. Differential roles of EPAC in regulating cell death in neuronal and myocardial cells. *J Biol Chem*. 2010, 285(31):24248-24259.(査読有)
- ④ Kurotani R, Kumaki N, Linnoila RI, Ward JM, Kimura S. Secretoglobin 3A2/uteroglobin-related protein 1 is a novel marker for pulmonary carcinoma in mice and humans. *Lung Cancer* 2011, 71(1):42-48.(査読有)
- ⑤ Yokoyama U, Minamisawa S, Katayama A, Tang T, Suzuki S, Iwatsubo K, Iwasaki S, Kurotani R, Okumura S, Sato M, Yokota S, Hammond HK, Ishikawa Y. Differential Regulation of Vascular Tone and Remodeling via Stimulation of Type 2 and Type 6 Adenylyl Cyclases in the Ductus Arteriosus. *Circ Res*. 2010, 106(12):1882-1892.(査読有)
- ⑥ 黒谷玲子、福村英信、佐藤 格、江口晴樹、石川義弘 磁性体を利用した薬剤送達法 **磁気と健康** 23号 2010年7月10-13(査読無)
- ⑦ Otsu K, Toya Y, Oshikawa J, Kurotani R, Yazawa T, Sato M, Yokoyama U, Umemura S, Minamisawa S, Okumura S, Ishikawa Y. Caveolin gene transfer improves glucose metabolism in diabetic mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010 298(3):C450-456.(査読有)
- ⑧ Sato M, Jiao Q, Honda T, Kurotani R, Toyota E, Okumura S, Takeya T, Minamisawa S, Lanier SM, Ishikawa Y. Activator of G protein signaling 8 (AGS8) is required for hypoxia-induced apoptosis of cardiomyocytes: Role of gbetagamma and connexin43 (CX43). *J Biol Chem*. 2009 284(45):31431-31440.(査読有)
- ⑨ Shimada C, Kurotani R, U 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 24-27(査読無)
- ⑩ Baljinnyam E, Iwatsubo K, Kurotani R, Wang X, Ulucan C, Iwatsubo M, Lagunoff D, Ishikawa Y. Epac Increases Melanoma Migration by a Heparan Sulfate-Related Mechanism. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009, 297(4):C802-813(査読有)
- ⑪ Kumamoto K, Fujita K, Kurotani R, Saito M, Unoki M, Hagiwara N, Shiga H, Bowman ED, Yanaihara N, Okamura S, Nagashima M, Miyamoto K, Takenoshita S, Yokota J, Harris CC. HING2 is upregulated in colon cancer and increases invasion by enhanced MMP13 expression. *Int J Cancer*. 2009, 125(6):1306-1315.(査読有)

[学会発表] (計 17 件)

- ① **黒谷玲子**、佐々木昭美、小川拓、阿部宏之
マウス肺発生におけるシトクロム c 酸化酵素 (Cox) の発現、第 52 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 2011 年 9 月 24-25 日 金沢市、金沢大学
- ② 小寰清香、熊木伸枝、佐々木昭美、小川拓、阿部宏之、柴田陽光、**黒谷玲子** 喫煙マウス肺におけるサーファクタントとシトクロム c 酸化酵素 (Cox) の発現、第 52 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 2011 年 9 月 24-25 日 金沢市、金沢大学
- ③ 高倉啓、**黒谷玲子**、阿部宏之 電気化学計測技術を応用した単一培養細胞の呼吸能解析、日本機械学会東北支部第 47 期秋期講演会 2011 年 9 月 22 日 米沢市、山形大学
- ④ 栢本亮太、長畑仁美、大江将司、阿部靖之、**黒谷玲子**、阿部宏之リアルタイム培養細胞観察システムを用いたマウス胚発生のタイムラプス解析、日本機械学会東北支部第 47 期秋期講演会 2011 年 9 月 22 日 米沢市、山形大学
- ⑤ 阿部宏之、小川拓、渡邊剛広、**黒谷玲子** マウス初期胚におけるミトコンドリア呼吸機能の多項目解析、第 104 回日本繁殖生物学学会大会 2011 年 9 月 16-17 日 盛岡市、岩手県民情報交流センター
- ⑥ 渡邊剛広、**黒谷玲子**、阿部宏之 マウス胚におけるミトコンドリア呼吸機能の多項目解析の試み、日本動物学会平成 23 年度東北支部大会 2011 年 7 月 30 日 弘前市、弘前大学
- ⑦ **黒谷玲子**、木村芝生子、阿部宏之 SCGB3A2 は TGF β シグナルの制御によってプレオマイシン誘導性肺線維症を抑制する、日本動物学会平成 23 年度東北支部大会 2011 年 7 月 30 日 弘前市、弘前大学
- ⑧ 阿部宏之、高倉啓、**黒谷玲子** 電気化学計測法を応用した単一培養細胞の呼吸能解析の試み、日本動物学会平成 23 年度東北支部大会 2011 年 7 月 30 日 弘前市、弘前大学
- ⑨ 角田夢人、小川拓、阿部靖之、**黒谷玲子**、阿部宏之 長期保存されたウシ卵巣におけるアポトーシス細胞の組織学的検出、第 26 回東日本家畜受精卵移植技術研究会大会 2011 年 1 月 25-26 日 盛岡市、盛岡市民文化ホール
- ⑩ Fukumura H, **Kurotani R**, Sato I, Eguchi H, Saito T, Ishikawa Y. Development of simultaneous hyperthermo-chemotherapy using a drug with novel magnetic properties. 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会 合同大会 2010 年 12 月 7 日-10 日 神戸、神戸国際展示場
- ⑪ **Kurotani R**, Fukumura H, Sato I, Kamide T, Kawamata F, Kezuka K, Eguchi H, Ishikawa Y Controlled Drug Delivery System Using a Novel Magnetic Material 第 33 回日本分子生物学会 第 83 回日本生化学会 合同大会 BMB 2010 BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY 2010 年 12 月 9 日 神戸、神戸国際展示場
- ⑫ **黒谷玲子**、木村芝生子 転写因子 NKX2-1 の下流因子として同定された SCGB3A2 の下垂体における役割 日本下垂体研究会 第 25 回学術集会 2010 年 8 月 20 日愛知、田原市、伊良湖ガーデンホテルリゾート&スパ
- ⑬ 福村英信、高橋 晃、**黒谷玲子**、石川義弘、齋藤知行 磁性体粒子を用いた新しい温熱化学療法の開発 第 43 回日本骨軟部腫瘍学会 2010/07/15-16 東京、新宿区、京王プラザホテル
- ⑭ **黒谷玲子**、福村英信、石川 義弘、江口晴樹 新規磁性化合物(EI236)による抗癌剤のドラッグデリバリーシステムの開発 第 121 回日本薬理学会関東部会 2009 年 10 月 10 日 東京、新宿区、東京女子医大
- ⑮ Motohiko Sato, Takashi Honda, Qibin Jiao, **Reiko Kurotani**, Eiji Toyota, Stephen M Lanier, Yoshihiro Ishikawa. Requirement of receptor-independent G-protein activator, activator of G protein signaling 8 for hypoxia-induced apoptosis of cardiomyocytes. Proceedigs of the XXXVI International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009) The Journal of Physiological Sciences P159 2009 年 7 月 京都市、国立京都国際会館
- ⑯ **黒谷玲子**、石川義弘 新規磁性薬剤化合物の画像診断への応用 内閣府共催 総合科学技術会議 科学技術連携施策群 ナノバイオテクノロジー連携群成果報告会 2009 年 1 月 28 日 東京、江東区、日本科学未来館
- ⑰ 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、所沢市、所沢市民文化センター

[その他]

ホームページ等

<http://kurotani-lab.yz.yamagata-u.ac.jp/>

http://yudb.kj.yamagata-u.ac.jp/0UTSIDE?ISTActId=SCHKOB0010RIni001&userId=100000406&lang_kbn=0

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒谷 玲子 (KUROTANI REIKO)
山形大学・大学院理工学研究科・助教
研究者番号：00453043

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：