

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21790776

研究課題名(和文) 肺コレクチンによるトル様受容体およびインフラマソーム介在炎症制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulations of inflammatory responses through Toll-like receptors and inflammasomes by pulmonary collectins.

研究代表者

大野 千明 (西谷 千明) (ONO CHIAKI (NISHITANI CHIAKI))

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：30381255

研究成果の概要(和文)：本研究により、酸化肺サーファクタント脂質(oxSLs)と酸化PAPC(1-パルミトイル-2-アラキドノイル-sn-グリセロ-3-ホスファチジルコリン)は、異なる機序で、LPSが惹起する炎症応答を抑制することが示された。炎症により生じた活性酸素種は、宿主側の脂質を酸化することから、酸化サーファクタント脂質がLPSに対する過剰な炎症応答を制御する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： In this study, we demonstrated that oxidized surfactant lipids (oxSLs) and oxidized PAPC (1-palmitoyl-2-arachidonyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine) inhibit LPS-induced inflammatory responses by different mechanisms. Because the generation of reactive oxygen species is one of the characteristics of inflammation that results in the oxidation of host lipids, oxSLs may contribute to reduce the excessive inflammatory response to LPS.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：肺サーファクタント、トル様受容体(TLR)、酸化肺サーファクタント脂質、リポ多糖(LPS)、炎症応答

## 1. 研究開始当初の背景

肺サーファクタントは肺胞II型細胞で産生され、肺胞腔に分泌されるリポ蛋白質で、そ

の構成成分であるリン脂質と疎水性肺サーファクタント蛋白質(SP)は、円滑な呼吸の維持に、親水性蛋白質の肺コレクチン(SP-A お

よび SP-D)は、呼吸器の生体防御を担っている。肺サーファクタントが存在する呼吸器は、常に活性酸素種 (ROS) に曝されているが、近年、ROS により産生された酸化リン脂質 (OxPL)が Toll 様受容体(TLR)4 を介した炎症性肺疾患の発症に関与することが示された (Imai Y et al. Cell 2008)。さらに、ROS は、マクロファージの細胞内自然免疫系である Nalp3 インフラマソームの活性化に関与し肺の炎症・繊維化を惹起する可能性が示唆されている (Hornung V et al. Nat Immunol 2008)。また、SP-D ノックアウトマウス肺では ROS と酸化リン脂質の増加が認められ、肺気腫進展への要因である可能性が指摘されている (Korfagen T et al. PNAS 2000)ことから、酸化リン脂質が病態肺形成進展に寄与することが予想される。一方、リン脂質である 1 - palmitoyl - 2 - arachidonyl - sn - glycerol - 3 - phosphorylcholine (PAPC) の過酸化物 (OxPAPC)が、リポ多糖(LPS)の惹起する TLR4 介在シグナル伝達を阻害することが報告された。しかし、肺サーファクタント脂質 (SL) は PAPC を含んでおらず、LPS が惹起する炎症応答に対する酸化肺サーファクタント脂質 (OxSL)の影響は不明である。

## 2. 研究の目的

本研究は、肺サーファクタント脂質の酸化による TLR4 介在炎症制御機構を明らかにすることにより、病態肺進展へのメカニズムを解明し、治療応用へ向けた分子基盤を確立することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)肺サーファクタント脂質の単離と酸化脂質の作成

密度勾配遠心法と Bligh and Dyer 法を用いて、ラット気管支肺胞洗浄液より肺サーファ

クタント脂質 (SL) を単離した。SL はフィルムにした後、空気暴露により酸化し、酸化肺サーファクタント脂質 (OxSL) を作成した。酸化度合は、TBARS アッセイ法を用いて測定を行った。

### (2)NF- $\kappa$ B 活性化測定

HEK293 細胞に NF- $\kappa$ B リポーター遺伝子 (pNF- $\kappa$ B), 内部コントロール遺伝子 (pRL-TK), wtTLR4, および MD-2 遺伝子をトランスフェクションし、OxSL, あるいは SLs 存在下で LPS 刺激による NF $\kappa$ B 活性化をルシフェラーゼアッセイ法にて測定した。

### (3) TNF- $\alpha$ 測定

SD ラットの気管支肺胞洗浄液から分離した肺胞マクロファージを OxSL, SL, PAPC あるいは OxPAPC と反応させ、LPS 刺激後、培養液中に分泌された TNF- $\alpha$  を ELISA 法により解析した。

### (4) 組換え可溶性 CD14 (sCD14) と組換え可溶性 MD-2 (sMD-2) の作成

組換え可溶性 CD14 (sCD14) と組換え可溶性 MD-2 (sMD-2) の作成を行った。いずれも C 末端に His タグを付加し、sCD14 は glutamine synthetase amplification による CHO-K1 細胞で発現させ、sMD-2 はバキュロウイルス昆虫細胞系で発現させた。可溶性の各蛋白質は、ニッケルビーズカラムを用いて精製した。

### (5) LPS と MD-2 との結合に及ぼす酸化脂質の影響

MD-2-His とプレインキュベーションした脂質 (OxSL, あるいは SLs) を、マイクロタイターウェルに固相化した LPS と反応させた後、LPS に結合した sMD-2 を、抗 His tag 抗体で検出した。

(6)LPS と MD-2 及び CD14 との結合に及ぼす酸化脂質の影響

免疫沈降法並びにビオチン化 LPS とストレプトアビジンアガロースを用いたプルダウンアッセイ法を用いて結合解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 酸化脂質の作成

肺サーファクタント脂質(SLs)の空気暴露により調整した、酸化脂質(OxSLs)では、酸化度合いの指標である malondialdehyde が SLs と比べ優位に高かった。

##### (2) LPS が惹起する NF- $\kappa$ B 活性化に及ぼす酸化脂質の影響の解析

OxSL は TLR4/MD-2 を介した LPS の惹起する NF- $\kappa$ B の活性化を抑制した。

##### (3) ラット肺胞マクロファージにおける LPS が惹起する TNF- $\alpha$ 分泌に及ぼす OxSL の効果

OxSL は脂質濃度依存性に LPS 惹起 TNF- $\alpha$  の分泌を抑制した。さらに、SLs の酸化程度が強いほど LPS 刺激 TNF- $\alpha$ 分泌抑制作用が強かった。

##### (4)固定化 LPS と MD-2 結合に対する脂質の影響

OxPAPC(palmitoyl-arachidonoyl-phosphatidylcholine) は濃度依存性に MD-2 の LPS への結合を抑制したが、OxSL は MD-2 の LPS への結合をしなかった。

##### (5) LPS と MD-2 及び CD14 との結合に及ぼす酸化脂質の影響

ビオチン化 LPS と sCD14 との結合をストレプトアビジンアガロースを用いたプルダウンアッセイ法を用いて解析したところ、

OxPAPC は MD-2 と LPS との結合を阻害した。一方、OxSLs は、LPS と sMD-2 の結合に影響しなかった。同様の結果が、CD14 と LPS との結合についても認められ、OxPAPC は、CD14 と LPS の結合を阻害したが、OxSL は阻害できなかった。

本研究の遂行により、OxSL は酸化の程度に依存して、TLR4 を介する LPS 惹起炎症応答を抑制することが明らかとなった。しかし、OxPAPC は sMD-2 および sCD14 と LPS との相互作用を阻止することで、LPS 惹起炎症反応を抑制したが、OxSLs はそれらの結合を抑制しなかったことから、OxSL は OxPAPC とは異なる機序で LPS 惹起炎症応答を抑制することが示唆された。LPS は、グラム陰性菌細胞壁構成成分でエンドトキシンの本体であることから、酸化サーファクタント脂質がグラム陰性細菌感染に対する過剰な炎症応答を抑制しうることが示唆された。

#### 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 9 件)

- (1) Sawada K., Arika S., Kojima T., Saito A., Yamazoe M., Nishitani C., Shimizu T., Takahashi M., Mitsuzawa H., Yokota S., Sawada N., Fujii N., Takahashi H. & Kuroki Y. Pulmonary collectins protect macrophages against pore-forming activity of Legionella pneumophila and suppress its intracellular growth. J Biol Chem. 285: 8434-8443. (2010) (査読有)
- (2) Hoshino S., Konishi M., Mori M., Shimura M., Nishitani C., Kuroki Y., Koyanagi Y., Kano S.,

- Itabe H. & Ishizaka Y. HIV-1 Vpr induces TLR4/MyD88-mediated IL-6 production and reactivates viral production from latency. *J. Leukoc. Biol.* 87: 1133-1143 (2010) (査読有)
- (3) Shimizu T., Nishitani C., Mitsuzawa H., Arika S., Takahashi M., Ohtani K., Wakamiya N. & Kuroki Y. Mannose binding lectin and lung collectins interact with Toll-like receptor 4 and MD-2 by different mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.* 1790: 1705-1710 (2009) (査読有)
- (4) Kuronuma K., Mitsuzawa H., Takeda K., Nishitani C., Chan E. D., Kuroki Y., Nakamura M. & Voelker D. R. Anionic pulmonary surfactant phospholipids inhibit inflammatory responses from alveolar macrophages and U937 cells by binding the lipopolysaccharide interacting proteins CD14 and MD2. *J. Biol. Chem.* 284: 25488-25500 (2009) (査読有)
- (5) Nishitani C., Takahashi M., Mitsuzawa H., Shimizu T., Arika S., Matsushima N. & Kuroki Y. Mutational analysis of Cys<sup>88</sup> of Toll-like receptor 4 highlights the critical role of MD-2 in cell surface receptor expression. *Int. Immunol.* 21: 925-934 (2009) (査読有)
- (6) 山添雅己 西谷千明 高橋素子 加藤剛志 有木茂 清水健之 光澤博昭 澤田格 高橋弘毅 黒木由夫 SP-DはLPSとその受容体に対する結合を変化させることによりLPS惹起炎症反応を抑制する 分子呼吸器病 14: 101-105 (2010) (査読無)
- (7) 西谷千明 有木茂. 肺サーファクタント蛋白質と呼吸器疾患 炎症と免疫 18: 43-47 (2010) (査読無)
- (8) 黒木由夫、西谷千明 肺コレクチンによる自然免疫制御機構 生化学 81:182-188 (2009) (査読無)
- (9) 澤田格、有木茂、山添雅己、西谷千明 清水健之、高橋素子、横田伸一、藤井暢弘、高橋弘毅、黒木由夫 肺コレクチンによるレジオネラ菌の増殖抑制 分子呼吸器病 13:117-119 (2009) (査読無)
- [学会発表] (計 6 件)
- (1) 西谷千明 Oxidized surfactant lipids and oxidized PAPC inhibit LPS-induced inflammatory responses by different mechanisms 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会合同大会 2010年12月 9日神戸ポートアイランド
- (2) 西谷千明 酸化肺サーファクタントリン脂質によるLPS惹起炎症応答抑制機構 第16回日本エンドトキシン・自然免疫研究会 2010年11月13日 奈良県 橿原万葉ホール
- (3) 西谷千明 肺サーファクタント脂質の酸化によるLPS惹起炎症性細胞応答の抑制 第82回日本生化学会大会 2009年10月24日 神戸ポートアイランド
- (4) 有木茂 非定形抗酸菌に対する肺コレクチンの生体防御機構 第82回日本生化学会大会 2009年10月24日 神戸ポートアイランド

(5) 西谷 千明 Pulmonary Surfactant Protein D Inhibits Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Inflammatory Cell Responses by Altering LPS Binding to Its Receptors. Experimental Biology 2009, 2009 年 4 月 19 日 Ernest N. Morial convention center, New Orleans, Louisiana

(6) 有木 茂 Roles of pulmonary collectins in host defense against Legionella pneumophila infection. Experimental Biology 2009, 2009 年 4 月 19 日 Ernest N. Morial convention center, New Orleans, Louisiana

〔図書〕(計 1 件)

藤田 博美、漆原 範子、西谷 千明、本の泉社、改訂版 分子予防環境医学 生命科学研究所の予防・環境医学への統合、2010 年、93-107.

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

大野 千明 (西谷 千明) ((ONO CHIAKI )

NISHITANI CHIAKI)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号 : 30381255

### (2) 研究分担者

なし

### (3)連携研究者

なし