

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790937

研究課題名（和文）p116Rip proteinの気道ムチン分泌に及ぼす影響について

研究課題名（英文）The role of p116Rip protein on the bronchial mucin secretion.

## 研究代表者

古賀 康彦 (KOGA YASUHIKO)

群馬大学・医学部・医員

研究者番号：10533862

研究成果の概要（和文）：p116Rip protein に対する特異的 siRNA を用いた培養細胞での gene silencing での cell motility への影響を検討し、さらに p116Rip transgenic mice の作成を行いブレオマイシンの持続皮下ポンプ注入での急性肺障害モデルマウスの作成に成功して、p116Rip protein の急性肺障害に及ぼす影響を検討した。

研究成果の概要（英文）：We examined the effect of cell motility on the p116Rip siRNA-treated cells. Furthermore, we generated p116Rip-transgenic mice successfully and examined the effect of p116Rip protein on the Bleomycin-induced acute lung injury model mice.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
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・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：ミオシン、アクチン、p116Rip、ブレオマイシン、間質性肺炎、急性肺障害

## 1. 研究開始当初の背景

間質性肺炎は、原因不明のものと、膠原病、薬剤性、放射線、じん肺や感染性などの原因が明らかになっているものがあるが、病態の主座は肺胞隔壁などの間質の炎症である。

間質性肺炎の患者の多くはステロイドに対する反応性の乏しい特異性であるが、その病態解明は未だに進んでおらず、治療法の確立もなされていない。間質性肺炎の研究においては古くからブレオマイシン誘発性の急性肺障害モデルマウスが使用されて来てお

り、間質性肺炎の病態解明に大きく貢献している。

我々の研究グループからもブレオマイシンを使用した動物モデルにおいて低分子 G protein である RhoA の下流シグナルに存在する Rho-kinase の特異的 inhibitor である Y-27632 の全身投与の検討を行い、RhoA シグナルが間質性肺炎の病態に大きく関与している事を解明して来ているのが近年の現状である (Shimizu et al., Am J Respir Crit

Care Med. 2001)。

モーター機能を持つタンパク質であるミオシンは、細胞の走化性、遊走能、分裂や平滑筋の収縮などの生体内におけるあらゆる運動機能に直接関与していることが知られている。

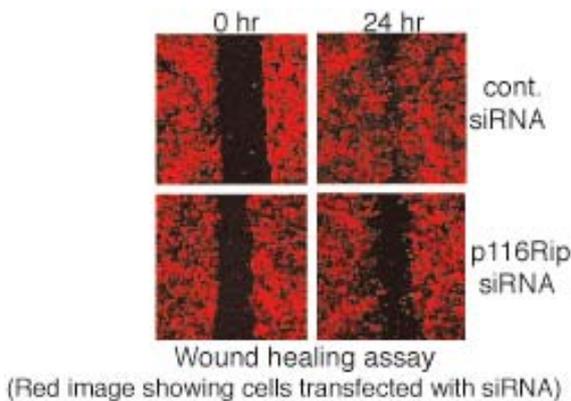
ミオシンのモーター機能はミオシン軽鎖のリン酸化により制御されており、ミオシンがリン酸化されることによりアクチンとミオシンの重合体であるアクトミオシン構造物上をミオシンが動き始めることによって、ミオシンの動力が平滑筋の収縮を含めたあらゆる細胞の運動機能に還元される仕組みとなっている。

近年我々は、RhoA の inhibitor としての役割を持ちかつ、細胞骨格分子であるアクチン、ミオシン、及び RhoA にも結合するタンパク質である p116Rip のクローニングに成功した (Koga and Ikebe., 2005, J. Biol. Chem.)。

我々のこれまでの研究から、p116Rip がミオシン、RhoA、及びミオシン脱リン酸化酵素 (Myosin light chain phosphatase:MLCP) と結合能を有し、MLCP 酵素活性を上昇させると共に RhoA を不活化させてミオシンのリン酸化に直接影響を及ぼしていることを解明した (Koga and Ikebe., 2005, J. Biol. Chem.)。

また、最近の研究結果からはさらに、p116Rip protein の gene silencing により Cell motility が抑制されることも Hela cells を用いた Wound Healing Assay にて確認され明らかになってきている (Fig. 1)。

Fig. 1



## 2. 研究の目的

本研究の目的はブレオマイシン誘発性の間質性肺炎モデルマウスにおいて、アクチン・ミオシン結合蛋白質である p116Rip protein の果たす役割を、p116Rip protein トランスジェニックマウスを用いて生化学的、組織学的に検討し、p116Rip の間質性肺炎の病態に関わるシグナルメカニズムを解明する事である。

## 3. 研究の方法

### 1) p116Rip トランスジェニックマウスの作製

Full length p116Rip (Koga and Ikebe., 2005, J. Biol. Chem.) を pCAG vector へ導入しマウスの胚細胞へマイクロインジェクション、C57BL/6 マウスへの移植を業者委託して、F0 マウスのテールから Geno typing を行い、p116Rip ヘテロマウスの作製が確認された (ユニータック社)。こうして得られた p116Rip トランスジェニック F0 マウスをもとに交配を重ねて、F1, F2, F3, , マウスを作製。

### 2) ブレオマイシンモデルマウスの作製

8 週令のメス C57BL/6 マウスへネブタールを腹腔内投与して麻酔をかけ、micro osmotic pump をマウスの背中に埋め込み  $30 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  のブレオマイシンを 1 週間かけて  $100 \mu\text{l}$  持続皮下注射する (micro osmotic pump, Alzet 社)。コントロールは生食を使用し、皮下注射開始 4 週後に解析を行う。

3) ブレオマイシンモデルマウスの解析  
肺組織の解析: ネンブタール処理をされたマウスの肺組織をホルマリンに浸して固定する。H.E. 染色を行い、間質性肺炎の組織学的な線維化を Ashcroft score を用いて Grade 0 から Grade 8 まで評価し、parenchymal cell の間質細胞の増殖を細胞の増殖マーカーである Ki67 staining にて評価する。

#### 4) 肺胞洗浄液中の細胞成分、炎症性サイトカイン分泌の測定

60mg/kg のペントバルビタールの腹腔内投与を行い、麻酔下において 5 ml X 6 回の気管支洗浄検査を施行して、肺胞洗浄液中の TGF-beta、及び CTGF 等の各種サイトカインを Eliza assay にて測定する。一回 5ml の生理食塩水を肺胞洗浄に使用し計 6 回の洗浄の回収液を肺胞洗浄液として遠心機にかける。上清を-20 度に保存して測定に使用する。

#### 5) 肺線維芽細胞の RhoA 活性の測定

細かく処理された肺組織をトリプシン液に浸し、分離された細胞を DMEM medium にて培養継代し、初期培養のものだけを肺線維芽細胞として RhoA 活性の評価に用いる。活性化 RhoA は Rhotekin と呼ばれる RhoA 結合蛋白と結合している事が知られており、その Rhotekin の RhoA 結合ドメインを GST 融合蛋白に付着させた GST-Rhotekin を実験に用いる (Koga and Ikebe., 2005, J. Biol. Chem.)。線維芽細胞のホモジェネートを GST-Rhotekin と一時間反応させ結合してくる活性化 RhoA を、特異的 RhoA 抗体を用いたウェスタンブロット法により解析する。肺組織ならびに肺線維芽細胞の cell line である HFL-1 cells のホモジェネートを用いて同様の検討を行って行く。

#### 6) マウス気道上皮への p116Rip siRNA の導入

ネンブタールを腹腔内投与された麻酔下のマウスを、penn-century 社のマウス専用喉頭

鏡を用いて、5-15  $\mu$ g の control, p116Rip siRNA を同社の micro sprayer を用いて 50  $\mu$ l の容量を経気道的に投与する。経気道散布の成功の可否をエバンスブルーを同様の手順で投与して視覚的に確認する。

また、肺の組織を抽出し、p116Rip siRNA の効果をタンパク質、RNA レベルでウェスタンブロット法、及び Real time PCR 法により確認する。

ブレオマイシン処理されたマウスに対して、上記の手順で siRNA を投与しその 2 4-7 2 時間後にマウスを解析に使用する。

#### 4. 研究成果

間質性肺炎モデルマウスにおける p116Rip の役割を解明するために、p116Rip が RhoA シグナルに影響を及ぼして間質性肺炎の病態に関わっている、との仮説をたて p116Rip トランスジェニックマウスを作製し細胞生物学、組織学的検討を行った。

Rho-kinase inhibitor の全身投与がブレオマイシン誘発性の間質性肺炎を抑制したことから、p116Rip のトランスジェニックマウスにおいても、RhoA の活性が抑制され、それにより間質性肺炎の病態に抑制的に働く事が予想され、これまでの我々の検討では、wild type のマウスより p116Rip のトランスジェニックマウスの方がブレオマイシンによる胸膜直下の間質の肥厚が明らかに抑えられていた (Fig. 2)。

この結果から、ブレオマイシン誘発性の急性肺障害モデルマウスにおいて、p116Rip は何らかの病態形成に関与していることが示唆された。

p116Rip siRNA のマウスへの気道導入や RhoA 活性の測定実験などは現在進行中である。

Fig. 2

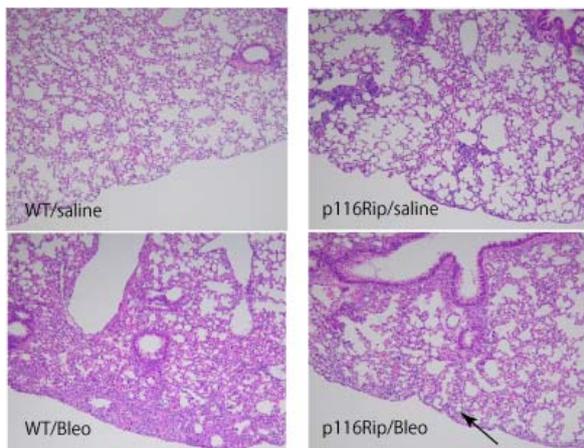


Fig. 2. p116Rip transgenic mouse inhibits Bleomycin-induced pulmonary fibrosis.

(左) Wild type マウスの肺切片の H.E. 染色像。  
(右) p116Rip transgenic マウスの肺切片の H.E. 染色像。

生後 8 週のマウスを生食、もしくはブレオマイシンを持続皮下投与し、その 4 週後に解析。

p116Rip トランスジェニックマウスにおいて、ブレオマイシンによる胸膜直下の間質の肥厚が著明に抑制された (矢印)

## 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 3 件)

① 松崎 晋一、Lysophosphatidic acid inhibits CC chemokine ligand 5/RANTES production by blocking IRF-1-mediated gene transcription in human bronchial epithelial cells. *Journal of Immunology*. 査読有り、vol. 185、2010、4863-4872.

② 青木 悠、Protective effect of resolvin E1 on the development of asthmatic airway inflammation. *Biochem Biophys Res Commun.* 査読有り、vol. 400、2010、128-133.

③ 宇津木 光克、JNK1 and JNK2 differently regulate IL-12 production in THP-1 macrophage cells. *Cytokine*. 査読有り、vol. 51、2010、127-131.

[学会発表] (計 4 件)

① 矢富 正清、気道線維芽細胞における p116Rip の蛋白発現の検討、第 60 回日本アレルギー学会、2010. 11. 25、東京国際フォーラム (東京都)

② 古賀 康彦、気道培養細胞における p116Rip の特異的 gene silencing の検討、第 59 回日本アレルギー学会、2009. 10. 29、秋田キャッスルホテル (秋田県)

③ 古賀 康彦、ミオシン脱リン酸化酵素を介した p116Rip protein のミオシンリン酸化に及ぼす影響について、第 19 回 InterAsthma、2009. 7. 10、都市センターホテル (東京都)

④ 古賀 康彦、気道培養細胞における p116Rip のタンパク質発現の検討、第 49 回日本呼吸器学会、2009. 6. 10、東京国際フォーラム (東京都)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

古賀 康彦 (KOGA YASUHIKO)

群馬大学・医学部・医員

研究者番号：10533862