

## 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 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22790772

研究課題名（和文） 肺線維化における DNA メチル化の制御解析

研究課題名（英文） Regulatory analysis of DNA methylation in pulmonary fibrosis

研究代表者

朴 雅美 （ PARK AH-MEE ）

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：70469245

研究成果の概要（和文）：肺線維化における DNA メチル化をはじめとしたエピジェネティックな変化を明らかにする目的で、シリカ投与による肺線維化モデルマウスを作成し、肺組織中の DNA メチル化の変化を検討した。DNA メチル化の量は正常マウスでも比較的高く、線維化肺での変化が認められなかった。しかし、DNA メチル化酵素の 1 つ DNMT3B が線維化肺で増加していた。同様の DNA メチル化酵素が線維化に重要な筋線維芽細胞でも増加していたことから、線維化において DNMT3B を介したメチル化が関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：The object of this study is to clarify the epigenetic changes in pulmonary fibrosis. In vivo study using silica-induced mouse fibrosis model revealed that the DNA methylation level was unchanged, but the protein level of DNMT3B, which catalysis DNA methylation, was increased in fibrosis lung. In vitro study also showed the increase of this protein. The increase of DNMT3B protein may play important role in pulmonary fibrosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医師薬学

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：肺線維化、メチル化

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 肺線維症は塵肺、過敏性肺炎、膠原病、サルコイドーシス等の病気が進行して引き起こされる場合や特発性のものがあり、肺泡に線維組織が増加することでガス交換機能が大きく低下し呼吸困難を引き起こす。本病態の約 50% を占める特発性肺線維症の 5 年生存率は 20% と非常に低く難治性の疾患である。

(2) 肺線維化には筋線維芽細胞が重要な役割を果たしている。線維芽細胞が活性化されると筋線維芽細胞へと形態変化し、フィブロネクチン、コラーゲンなど細胞外マトリックスを多量に分泌すると同時に細胞外マトリックスを分解するメタロプロテアーゼの活性を抑制し線維化を促進する。この活性化因子としてはトランスフォーミング増殖因子

(TGF- $\beta$ ) や結合組織増殖因子、インターロイキン-13 などが知られているが、そのうちでも TGF- $\beta$ 1 が最も強力である。

(3) エピジェネティクスとは、クロマチンへの後天的な修飾により遺伝子発現が制御され、細胞の独自性を維持する仕組みであり、DNA メチル化とヒストン修飾などによって担われる。この正常な機能が破綻すると癌や種々の病が引き起こされる。このため DNA メチル化解析を行うことで病気の原因や進行度などを把握することができ、癌においては臨床への応用が進んでいる。

## 2. 研究の目的

肺線維化病態においてエピジェネティクス解析はほとんどなされていない。線維化は異常に活性化された筋線維芽細胞がその原因の一つであり、このような細胞ではエピジェネティックな変化が起きている可能性が十分に考えられる。本研究では肺の線維化における DNA メチル化の意義について明らかにすることを目的とし、筋線維芽培養細胞を用いた *in vitro* と肺線維化モデルマウスを用いた *in vivo* の両面から研究を進めた。

## 3. 研究の方法

### (1) TGF- $\beta$ 1 プロモーター活性の測定

TGF- $\beta$ 1 のプロモーター領域、-250, -500, -1000bp 領域それぞれを pGL3 luciferase 発現 vector に組み込んだ。培養筋線維芽細胞 MRC-5 に lipofectamine 2000 を用いて導入し、発光測定を実施した。さらに、-250bp プロモーター領域における CpG 領域にメチル化を付与したものを作成し解析に用いた。

### (2) TGF- $\beta$ 刺激によるタンパク質発現の変化解析

MRC-5 細胞を TGF- $\beta$  で刺激した細胞と通常の細胞それぞれからタンパク質を回収し、DNA メチル化酵素の発現量をウェスタンブロットにて確認した。

さらに、TGF- $\beta$  刺激による広範なタンパク質の変化を比較する目的でプロテオーム解析を実施した。本実験では蛍光ラベル後に 2 次元電気泳動を行う 2D-DIGE 法、および MALDI/TOF-MS を用いた。

### (3) 肺線維マウスにおける DNA メチル化の解析

①ブレオマイシン 1.5 mg/kg body weight を気道内に単回投与し、線維化マウスを作成した。投与 2 週間後に肺を回収し実験に用いた。

②シリカ長期投与 (半年) によって肺での継続的な炎症を惹起し、肺線維症モデルを作成した。

以上 2 種のモデルから回収した肺を用い、DNA メチル化レベルを ELISA を用いて測定した。メチル化酵素のタンパク質発現の変動はウェスタンブロット解析した。

また、プロテオーム解析で変化のみられたタンパク質についても解析を実施した。

③ DNA メチル化誘導食による肺線維症の变化解析を行う目的で、粉末餌にコリン、ベタイン、亜鉛、L-メチオニン、葉酸、ビタミン B12 を加え、交配前から授乳期にかけて摂食させた母親マウスの仔マウス 8 週齢にブレオマイシン単回投与後、2 週間後の線維化のレベルを比較した。

(4) MRC-5 細胞における HSP27 の働き  
MRC-5 細胞に TGF- $\beta$  を作用させると HSP27 が増加することから、本タンパク質の細胞内における働きを明らかにするため HSP27 siRNA を細胞内に導入し、細胞の筋線維芽細胞への分化や細胞増殖について調べた。活性化された筋線維芽細胞のマーカーとして  $\alpha$ -smooth muscle actin(SMA) とフィブロネクチンのタンパク質レベルをウェスタンブロットで測定した。細胞増殖能の測定は cell counting kit を用いた。

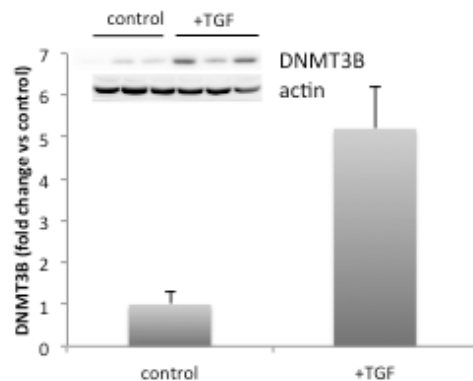
## 4. 研究成果

### (1) TGF- $\beta$ 1 プロモーター解析

TGF- $\beta$ 1 のプロモーター活性を測定した結果、-250, -500bp とともに同レベルの高い活性が認められたことから、-250bp を用いてメチル化プロモーター活性を実施した。-250bp 内には転写因子の結合が高い CpG アイランドが含まれ、メチル化は主にこの部分に付加される。プロモーター活性を測定した結果、通常のものに比較してメチル化を付加したもので高い活性を示した。

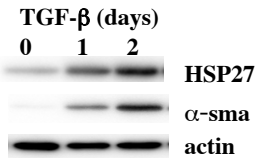
多くの場合 CpG メチル化を受けることでプロモーター活性が低下することが報告されているが、非常に興味深いことに、本結果は増加した。このことから、メチル化が線維化に促進的に機能している可能性が示唆された。

### (2) DNA メチル化酵素の発現変化の解析



DNA メチル化には DNA メチルトランスフェラーゼ (DNMT) が働く。いくつかのサブタイプの中で癌などの疾患との関わりが報告されているのは DNMT3 である。TGF- $\beta$  刺激によって活性化された筋線維芽細胞と無刺激の正常細胞における各種 DNMT のタンパク質レベルを比較したところ DNMT3B が有意に増加していることが分かった。

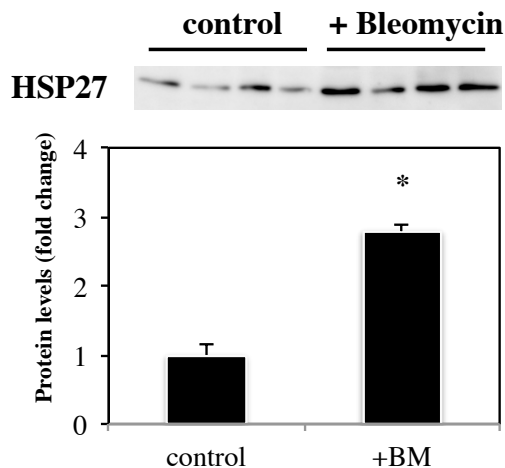
さらに、プロテオーム解析の結果、DNA メチル化に関与するタンパク質の変化は認められなかったが、チオレドキシン、HSP27 など細胞機能に重要な役割を果たすタンパク質が多数増加していることが明らかになった。HSP27 の増加はウェスタンブロットでも確認できた。



### (3) マウス肺線維化モデルにおける DNA メチル化の変化

本実験系では 2 種のマウスモデルを用いた。まずプレオマイシン単回投与後 2 週間後に肺線維化が起こるモデルを用いた。DNA メチル化レベルは正常のマウスでも高いレベルであったことから比較が困難であった DNMT のタンパク質レベルにも変化が全くなかった。DNA メチル化は長期的に起こる変化であることからモデルとしては不適切である可能性が考えられた。そこで、シリカ長期投与マウスを用いた。6 ヶ月の継続投与の後肺からタンパク質を回収した。DNMT3B が投与群で増加していることが分かった。細胞を用いた結果と類似の結果が得られた。

また、プレオマイシン投与後 2 週間の肺での HSP27 の発現を調べた結果、正常群と比較して有意に増加していることが分かった。このことから、HSP27 が肺線維化において重要な役割を果たしている可能性が考えられた。



そこで、マウスにプレオマイシンを投与した後 HSP27 siRNA をキャリアーと混和した物を 3 日に一度点鼻投与し、2 週間後の肺の線維化レベルを比較検討した。その結果、肺線維化のレベルが HSP27 siRNA 投与群で有意に低下していた。このことから、HSP27 が肺の線維化促進に機能していることが明らかとなった。

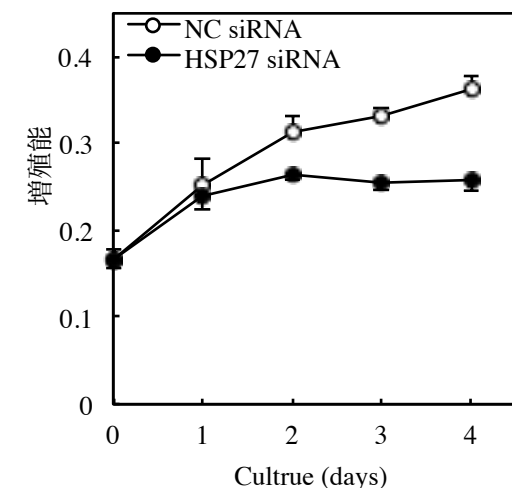
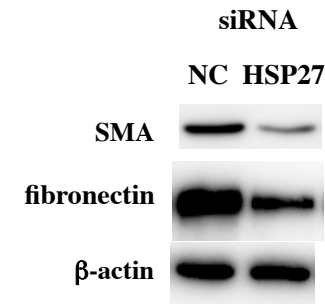
### (4) DNA メチル化誘導マウスを用いた肺線維化の解析

DNA のメチル化を誘導したマウスを用い、プレオマイシン投与による肺線維化レベル違いを検討した。しかし、通常のマウスと比較し線維化レベルに違いが認められなかった。DNA メチル化誘導では、ランダムなメチル化の誘導が起こることから、本実験には不適切である可能性が考えられた。

### (5) HSP27 の筋線維芽細胞における働き

MRC-5 細胞の HSP27 を siRNA によってノックダウンした結果、SMA やフィブロネクチンが低下した。このことから HSP27 が筋線維芽への活性化に重要である事が分かった。

さらにノックダウンによって細胞の増殖能が停止した。



この際の細胞周期をフローサイトメーターにて測定した結果、S 期が減少していた。このように筋線維芽細胞細胞の分化、増殖に HSP27 が非常に重要であることが分かった。このような変化は筋線維芽細胞に特異的であり、肺上皮細胞を用いて同様にノックダウ

ン実験を行っても変化がみられなかった。

(6)以上の結果より、in vitro, in vivo 両実験系ともに DNMT3B が肺線維化の際に誘導を受けることが分かった。このことから本タンパク質が肺線維化の促進に寄与している可能性が示唆された。DNMT3B が標的としている遺伝子上の部位などを同定することは非常に重要である。しかし本研究では技術的な問題から同定できなかった。今後そういったことを明らかにしていく事でDNAメチル化と線維化形成のより詳細な関係が明らかになることが期待される。

また、線維化の際にHSP27が非常に重要な役割を果たしていることが分かった。このタンパク質レベルを抑えることで肺線維化を抑制しうる可能性が考えられる。

## 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7件)

①: Park AM, Kudo M, Hagiwara S, Tabuchi M, Watanabe T, Munakata H, Sakurai T. p38MAPK suppresses chronic pancreatitis by regulating HSP27 and BAD expression. *Free Radic Biol Med.* 2012 Jun 1-15;52(11-12):2284-91. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.010 査読有

②: Hagiwara S, Kudo M, Chung H, Ueshima K, Inoue T, Haji S, Watanabe T, Park AM, Munakata H, Sakurai T. Activation of c-Jun N-terminal kinase in non-cancerous liver tissue predicts a high risk of recurrence after hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 2012 ;42(4):394-400. doi: 10.1111/ j.1872-034X.2011.00932.x. 査読有

③: Park AM, Hayakawa S, Honda E, Mine Y, Yoshida K, Munakata H. Conditioned media from lung cancer cell line A549 and PC9 inactivate pulmonary fibroblasts by regulating protein phosphorylation. *Arch Biochem Biophys.* 2012, 15;518(2):133-41. doi: 10.1016/j.abb.2011.12.012. 査読有

④: Sakurai T, Kudo M, Fukuta N, Nakatani T, Kimura M, Park AM, Munakata H. Involvement of angiotensin II and reactive oxygen species in pancreatic fibrosis. *Pancreatol.* 2011;11 Suppl 2:7-13. doi: 10.1159/000323478 査読有

⑤: Park AM, Nagase H, Liu L, Vinod Kumar S, Szwergold N, Wong CM, Suzuki YJ. Mechanism of anthracycline-mediated down-regulation of GATA4 in the heart. *Cardiovasc Res.* 2011,1;90(1):97-104. doi: 10.1093/cvr/cvq361. 査読有

⑥: Hagiwara S, Kudo M, Ueshima K, Chung H, Yamaguchi M, Takita M, Haji S, Kimura M, Arao T, Nishio K, Park AM, Munakata H. The cancer stem cell marker CD133 is a predictor of the effectiveness of S1+ pegylated interferon-2b therapy against advanced hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 2011,46(2):212-21. doi: 10.1007/s00535-010-0294-5. 査読有

⑦: Park AM, Wong CM, Jelinkova L, Liu L, Nagase H, Suzuki YJ. Pulmonary hypertension-induced GATA4 activation in the right ventricle. *Hypertension.* 2010, 56(6):1145-51. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.160515. 査読有

[学会発表] (計4件)

①. 朴雅美 本田映子 宗像浩、Role of heat shock protein 27 in myofibroblast 第85回日本生化学会大会、福岡、2012.12/14-16

②. 朴雅美 櫻井俊治 原田八千代 宗像浩

The role of p38 MAPK in pancreatitis of male Wistar Bonn/Kobori rat 第84回日本生化学会大会、京都、2011 9/21-24

③. Ah-Mee Park, Hiroshi Munakata Role of heat shock protein 27 in pulmonary fibrosis and epithelial-mesenchymal transition of alveolar epithelial cells. 第76回日本インターフェロン・サイトカイン学会、第19回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム 合同開催学術集会、大阪、2011、5/25-27

④. Ah-Mee Park, Hiroshi Munakata 肺線維化におけるHSP27の役割 第83回日本生化学会大会、神戸、2010.12/7-10

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

朴 雅美 (PARK AH-MEE)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号: 70469245

(2)研究分担者

なし

(3)研究連携者

なし