

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591135

研究課題名(和文)アクチンミオシン結合蛋白トランスジェニックマウスにおける間質性肺炎の検討

研究課題名(英文)A role of p116Rip protein in the actin-myosin binding protein transgenic mouse on interstitial pneumonia

研究代表者

古賀 康彦(KOGA, YASUHIKO)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10533862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

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でのミオシンのリン酸化やcell motilityへの影響を検討し、p116Ripが気道培養細胞においてミオシンのリン酸化に抑制的に作用していることが判明し、その結果としてcell motilityにも抑制的に影響していることが明らかとなった。さらにp116Rip transgenic miceのブレオマイシンによる急性肺障害モデルマウスへの影響を検討を試みたが、p116Rip transgenic mouseでのmRNA発現レベルが軽度しか認められず、さらなるマウスの検討が必要と思われた。

研究成果の概要(英文)：We examined the effect of specific siRNA against p116Rip on its protein expression level in human bronchial culture cells, HFL-1, A549 and HBEC-3 by western blot. The elimination of p116Rip protein expression was successfully performed using siRNA against p116Rip. Knocking down of p116Rip was accompanied with the elevation of myosin light chain phosphorylation in cells. Furthermore, we generated p116Rip-transgenic mice and examined the effect of p116Rip protein on the Bleomycin-induced acute lung injury model mice. However, p116Rip transgenic mice showed the minimal overexpression of exogenous p116Rip compared with wild type mouse, thus it is thought that we need to examine for further experiments to produce p116Rip transgenic mouse.

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：非閉塞性肺疾患 肺線維症 呼吸器感染症

1. 研究開始当初の背景

間質性肺炎は、さまざまな原因；膠原病、薬剤性、放射線、じん肺や感染性などのものから生じるものと、明らかな原因がわかっていないものがあるが、病態の主座は肺胞隔壁などの間質の炎症であるとされている。

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原因不明の特発性であるが、その病態解明は未だに進んでおらず、はっきりとした治療法の確立もなされていない。間質性肺炎に対する治療薬も現時点で承認されているものは抗線維化薬として発売された pirfenidone しか存在しない。しかしながらその臨床効果は限定的であり、未だ有効な治療薬が存在しないのが現状である。

これまでの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。しかし、ブレオマイシンモデルの間質性肺炎は経過とともに改善するという特徴があり、急性肺障害モデルとも言われている。

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.)。

2. 研究の目的

本研究の目的は p116Rip の気道培養細胞におけるミオシンリン酸化に及ぼす影響と cell motility に及ぼす影響を検討し、さらに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) 気道培養細胞への p116Rip siRNA の導入

気道上皮細胞である HBEC3、肺線維芽細胞である HFL-1 を用いて p116Rip の siRNA の検討を行う。Lipofectamine siRNA MAX を用いて Reverse transfection 法により少量の siRNA で効率よく目的のタンパク質をノックダウンする。

RNA の抽出には QIAGEN の RNAeasy mini kit を用いる。タンパク質の抽出には培養細胞の上清を取り除いた後、10% Trichloro acetic acid を 10 分間、インキュベートしてタンパク質を固定し、PBS で洗浄した後に、2X SDS sampling buffer で回収し、western blot 分析に用いる。

2) 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 Genotyping を行い、p116Rip ヘテロマウスの作製が確認された(ユニテック社)。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。

3) プ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 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ のプレオマイシンを 1 週間かけて 100 μl 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。

4) プレオマイシンモデルマウスの解析

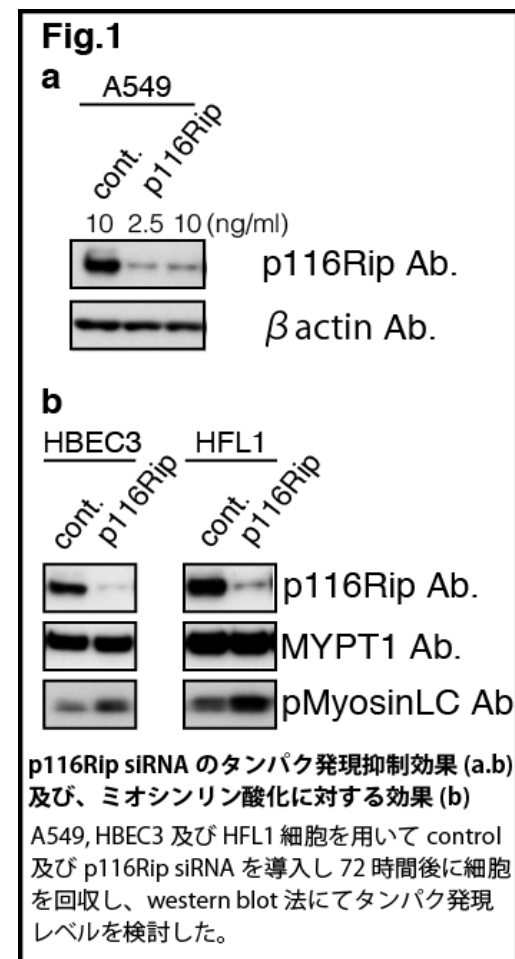
肺組織の解析: ネブタール処理をされたマウスの肺組織をホルマリンに浸して固定する。H.E.染色を行い、間質性肺炎の組織学的な線維化を Ashcroft score を用いて Grade 0 から Grade8 まで評価し、parenchymal cell の間質細胞の増殖を細胞の増殖マーカーである Ki67 staining にて評価する。

4. 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

仮説をたて培養細胞における p116Rip siRNA が及ぼす cell migration への影響や、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。

肺癌の cell line である A549 を用いた p116Rip の siRNA では効率よく p116Rip のタンパク発現を抑制することができた (Fig.1a)。さらに、気道上皮細胞の HBEC3、肺線維芽細胞の HFL-1 を用いて p116Rip のノックダウンを特異的 siRNA を用いて行った。



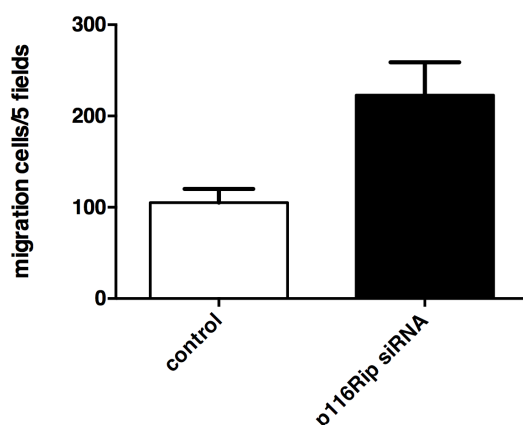
いずれの細胞株においても p116Rip のタンパク発現は p116Rip siRNA により抑制され、さらにミオシンのリン酸化が亢進していた (Fig.1b)。

そこで次に、p116Rip の細胞運動に及ぼす影響を検討した。

Fig.2 に示すように、PDGF で刺激され

た HFL-1 細胞を用いた細胞遊走の実験では、p116Rip siRNA 処理をされた方が control siRNA 処理された細胞よりも有意に cell migration が亢進していた。このことから、p116Rip がミオシンのリン酸化の

Fig.2



制御を介して細胞の遊走能に影響を及ぼしていることが考えられた。

これまでの報告から、Rho-kinase inhibitor の全身投与がプ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 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プレオマイシンによる間質性変化の抑制を認めることが予想された。

そこで、p116Rip トランスジェニックマウスによるプレオマイシンによる急性肺障害モデルマウスへの影響を検討することを試みたが、p116Rip トランスジェニックマウス群の p116Rip のタンパク過剰発現レベルが肺以外の臓器では明らかに認められず (Fig.3a)、また mRNA の発現に関しては wild type マウスと比較して p116Rip トランスジェニックマウス群において軽度の p116Rip mRNA 発現の上昇を認めるのみであった (Fig.3b)。

この結果から、プ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

トランスフェニックマウスの影響を検討するには p116Rip の発現レベルが軽度であることが考えられた。このことより今後、さらに p116Rip のトランスジェニックマウスやさらには p116Rip のノックアウトマウスなどの作成の検討を行っていく必要があると思われた。

Fig.3

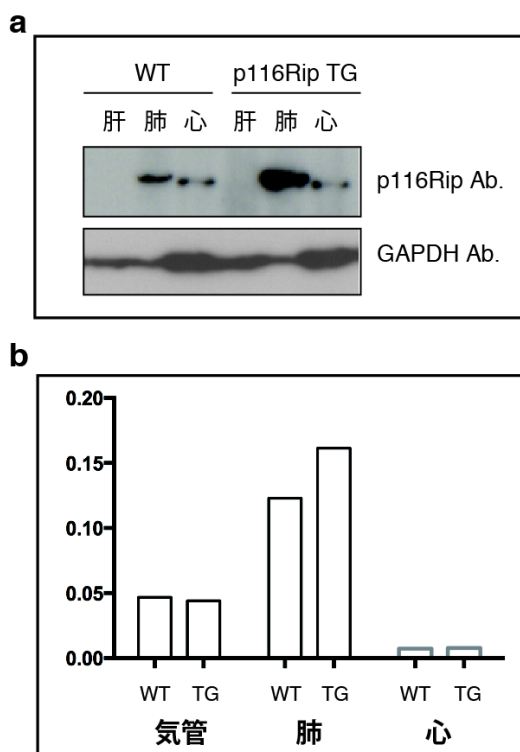


Fig.3 p116Rip expression of wild type and p116Rip transgenic mouse by western blot (a) and real time PCR (b). (a) p116Rip protein was expressed in both lung and heart but not in liver. The protein expression level in lung of p116Rip in p116Rip transgenic mouse was relatively higher than that of wild type mouse. (b) p116Rip mRNA expression in trachea and lung and heart were compared by real time PCR. mRNA expression level was low in trachea and heart compared with lung. p116Rip transgenic mouse showed high mRNA expression of p116Rip in lung moderately. The difference of p116Rip mRNA expression in both trachea and heart was not seen.

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5件)

1. Phase II study of oral S-1 plus cisplatin with bevacizumab for advanced non-squamous non-small cell lung cancer. Kaira K, Tomizawa

Y, Yoshino R, Miura Y, Yoshii A, Iwasaki Y, Koga Y, Ono A, Hisada T, Minato K, Sato K, Kazama T, Ishihara S, Kohyama K, Fueki N, Saito R, Sunaga N. Lung Cancer. 2013 Aug 5. S0169-5002(13), 査読:有り.

2. Phase II study of oral S-1 and cisplatin with concurrent radiotherapy for locally advanced non-small-cell lung cancer. Kaira K, Tomizawa Y, Yoshino R, Yoshii A, Matsuura M, Iwasaki Y, Koga Y, Ono A, Nishioka M, Kamide Y, Hisada T, Ishizuka T, Shirai K, Ebara T, Saito J, Nakano T, Sunaga N. Lung Cancer. 2013 Dec;82(3):449-54, 2013.09.04. Epub 2013 Sep 19. 査読:有り.

3. Extracellular acidification induces connective tissue growth factor production through proton-sensing receptor OGR1 in human airway smooth muscle cells. Matsuzaki S, Ishizuka T, Yamada H, Kamide Y, Hisada T, Ichimonji I, Aoki H, Yatomi M, Komachi M, Tsurumaki H, Ono A, Koga Y, Dobashi K, Mogi C, Sato K, Tomura H, Mori M, Okajima F. Biochem Biophys Res Commun. 2011 Oct 7;413(4):499-503. Epub 2011 Sep 1. 査読:有り.

4. Intracellular glutathione redox status in human dendritic cells regulates IL-27 production and T-cell polarization. Kamide Y, Utsugi M, Dobashi K, Ono A, Ishizuka T, Hisada T, Koga Y, Uno K, Hamuro J, Mori M. Allergy. 2011 Sep;66(9):1183-92. 査読:有り.

5. A young adult case of poorly differentiated lung adenocarcinoma showing the resistance mutation T790M of EGFR before treatment with tyrosine kinase inhibitors. Okamura T, Shibusawa N, Koga Y, Horiguchi N, Ogashiwa T, Satoh K, Hisada T, Satoh T, Ishizuka M, Mori M, Nihon Naika Gakkai Zasshi. 2011 Jul 10;100(7):1959-62. 査読:有り.

〔学会発表〕(計4件)

古賀 康彦、第63回日本アレルギー学会 p116Rip protein の培養細胞での gene silencing の影響について、2013.11.30、ホテルオークラ(東京都)

古賀 康彦、第11回臨床腫瘍学会、維持透析下に 5th line までの化学療法を行った進展型小細胞肺癌の長期生存が得られた一例、2013.8.30、仙台国際センター(仙台市)

古賀 康彦、第53回日本呼吸器学会、気道培養細胞における p116Rip gene

silencing についての検討 2013.4.21、東京国際フォーラム(東京都)

古賀 康彦、第51回日本呼吸器学会、気道線維芽細胞における MLCP 結合蛋白 p116Rip の発現の検討、2011.4.23、東京国際フォーラム(東京都)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：