

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591154

研究課題名(和文)肺コレクチンが有する急性肺障害制御機能の臨床応用化への橋渡し

研究課題名(英文)Therapeutic application of lung collectin in acute lung injury

研究代表者

高橋 弘毅 (TAKAHASHI, HIROKI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：60231396

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は急性肺障害でのToll様受容体(TLRs)の役割を明確にし、肺コレクチン、SP-Aによる抑制効果を臨床薬に応用する基盤的研究である。ブレオマイシン(BLM)投与SP-Aノックアウトマウスは野生型よりも死亡率が高く、肺内炎症性サイトカイン産生が増強された。BLM刺激でラット肺胞マクロファージから炎症性サイトカインが誘導され、SP-A添加で有意に抑制された。sTLR2遺伝子導入HEK293細胞では、BLM刺激でNF- κ Bが誘導された。BLMはsTLR2と直接結合し、それはSP-Aで阻害された。以上より、BLM誘導シグナルはTLR2依存性で、肺コレクチンはその阻害効果をもつことが示された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this project were to clarify the mechanism of regulation by which Toll-like receptors (TLRs) act against drug-induced acute lung injury (ALI), to evaluate the protective effect by lung a collectin, SP-A and to establish the molecular basis for the clinical application of it. Bleomycin (BLM)-administered SP-A(-/-) mice had significantly higher mortality rate and more increase of inflammatory cytokines in the lungs than wild types. SP-A inhibited BLM-induced inflammatory cytokines from rat alveolar macrophages. sTLR2 gene-transfected HEK293 cells showed up-regulation of NF- κ B. BML bound directly with sTLR2 and its binding was blocked by SP-A. These results indicate that BLM-induced signal depends on TLR2 and lung collectin, SP-A has protective function against ALI via TLR2 dependent signal pathway.

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：急性肺障害 ブレオマイシン 肺コレクチン 肺サーファクタントタンパク質A トル様受容体

1. 研究開始当初の背景

急性肺障害は様々な原因によって生じ、病理学的には肺胞上皮細胞の変性・脱落に始まり、病変の急速な進行によって、びまん性肺胞障害(DAD)へと進展する疾患概念である。ステロイド治療が無効な場合が多く、原因を問わず致死的である。とくに最近、DADの病理所見を示す薬剤性肺障害が呼吸不全を招き死に至らしめる重大な医原性疾患として臨床面で注目されている。その主な薬剤として、がん治療薬、リウマチ治療薬、抗不整脈薬等が挙げられる。本来、治療目的に使用される薬剤で健康被害を受ける患者にしてみれば容認し難い事態であり、憂慮すべきは事例報告が年々増加の一途にあることである。安全な薬剤使用を可能にするため、詳細な病態解析と有効な予防・治療法を確立する必要性が叫ばれている。かつて、社会問題として波紋が広がった肺がん分子標的治療薬ゲフィチニブ使用に伴う肺障害は申請者らの検討によって示されたように、重症例の多くが肺胞上皮細胞障害型であり(*Inomata S, Takahashi H, et al Anti-Cancer Drug 2006*)、病理所見はDADであった。また、2009年に発生したH1N1新型インフルエンザウイルス感染で死亡した殆どの患者において、感染後に急性呼吸窮迫症候群へと進展し、その剖検肺の病理所見はDADであった(*Am J Respir Crit Care Med 2010;181:72-79*)。したがって、急性肺障害の病態を詳細に解析し、それに基づいた新たな視点での治療法の開発が求められる。

急性肺障害はTNF- α を起点とするサイトカインストームがその中心的役割を持ち、進展・増悪することが知られている。また、種々のトリガーがリガンドとして、マクロファージ表面に発現する膜貫通型受容体Toll-like receptors (TLRs)と結合することがサイトカインストームの発端となる。例えば、細菌由来成分であるlipopolysaccharideがTLR4に、また、peptidoglycanがTLR2に結合し、NF- κ Bを介してTNF- α 産生を亢進させる。一方、薬剤に惹起される急性肺障害においてもTNF- α が増加するが、その機序について十分には解明されていない。我々は、その推定候補の一つとして、このTLRsシグナル伝達系に着目した。

肺コレクチン(SP-A, SP-D)の生体防御作用に関する研究は最近急速にその研究領域を広げている。この分野において我々は、SP-AとSP-Dの基礎的・臨床的研究において、先駆的な役割を果たしている。その一連の研究のなかで、肺コレクチンが呼吸器感染症の原因病原体とTLRsとの結合を阻止することを明らかにしてきた。

2. 研究の目的

本研究では、特に薬剤に起因する急性肺障害の増強因子としてのTLRsの役割を明確にした上で、TLRsの制御因子として知られる肺コレクチン投与による障害抑制効果について検討する。本検討により得られた基礎的データを基にして、リコンビナント製剤を治療薬として臨床応用する橋渡し研究を段階的に行う。

具体的には、

- (1) 薬剤性障害肺の進展・増悪の機序解析に適したモデルマウスを作成する。
- (2) モデルマウスを用いて薬剤刺激で強発現するTLRsを特定する。
- (3) TLR機能の変調作用をもつSP-AおよびSP-Dが、薬剤性肺障害時のTLR機能をも制御し病変の進展・増悪を防止する作用があることを明らかにする。
- (4) 合成SP-A/SP-D分子をモデルマウスに投与し、TLRを介した肺障害の進行抑制効果を評価し、治療薬に応用する基盤的成果を得る。

3. 研究の方法

(1) 肺障害モデルの作成

野生型マウス(C57BL/6)またはSP-A(k/o)マウスに腹腔麻酔下にブレオマイシン(BLM)(10mg/kg)をMicrosprayerを用いて経気道投与し、1日後に肺組織やBAL液を回収した。

(2) in vitro 実験でのメカニズムの解明

肺胞マクロファージを用いたBLM誘導シグナルの解明: SDラット(週齢8週)を腹腔麻酔下に安楽死させ、気管より生理食塩水を注入して肺洗浄し、回収液から肺胞マクロファージを分離し、培養した。細胞をBMLにて刺激し、産生されたTNF- α 、IL-1 β を測定し、肺サーファクタントがサイトカイン産生に及ぼす影響を解析した。

TLR遺伝子導入 HEK293細胞を用いたBLM誘導シグナルの解明: HEK293細胞にTLR2, CD14, TLR4, MD-2などの細胞表面受容体の遺伝子を導入し、BLMによるNF- κ Bの誘導を検討した。

表面プラズモン共鳴センサー(ピアコア)を用いた受容体とBLMとの結合検出: 分子間の結合を調べるため、ピアコアを用いてBLMとTLR2, TLR4の細胞外ドメイン(s TLR2, s TLR4)を合成した蛋白との結合を検討した。さらに、肺コレクチン(SP-A, SP-D, POPG)がそれらの結合能を変化させるかどうか、また、BLMと肺コレクチンが直接結合するかどうかを検討した。

BLMとTLR2との直接結合能および肺コレクチンによる阻害効果の検討: BLMをELISAプレートに固相し、 s TLR2との結合を検討した。また、その結合がSP-A, SP-Dにより阻害されるかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) BLM肺障害モデルの生存率の検討

SP-A k/oマウス(SP-A(-/-)Bleo)では野生型マウス(WT Bleo)と比較し、BLM投与による死亡率が高かった(Fig.1A)。

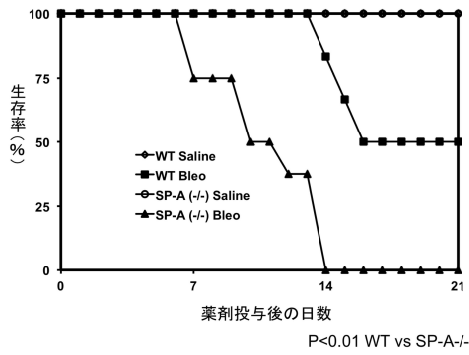


Fig. 1A BLM投与後の生存曲線

BLM 投与1日後の肺組織は炎症細胞浸潤を強く認め、BALF 中の炎症細胞数や炎症性サイトカインの誘導が SP-A(k/o)マウスで増強していた (Fig.1B)。

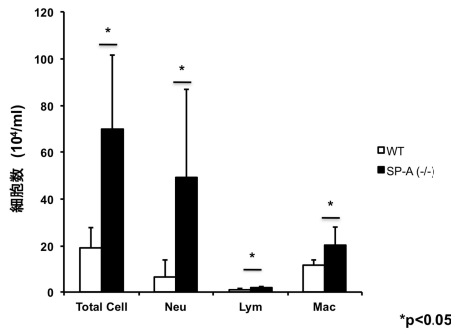


Fig. 1B BLM投与1日後のBALF中細胞数

また、マウスに Alzet-pump を用いて BLM を持続皮下投与し、21 日後に肺組織や BAL 液を回収し検討した。BLM の経皮持続投与モデルにおいても、SP-A(k/o)マウスで肺胞隔壁の肥厚や線維化がより強い傾向があり、BALF 中の TGF- β 産生も増強していた。

(2) in vitro 実験でのメカニズムの解明

肺胞マクロファージを用いた BLM 誘導シグナルの解明

ラット肺胞マクロファージの初代培養細胞を BLM で刺激すると、TNF- α 、IL-1 β 、KC が誘導された。また、それらの産生は SP-A により有意 ($p < 0.05$) に抑制された (Fig. 2)

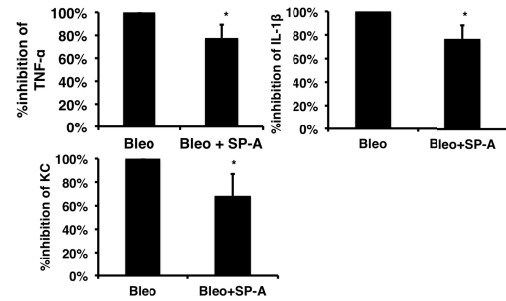


Fig. 2 BLM刺激下でのラット肺胞マクロファージのサイトカイン産生能に及ぼすSP-Aの抑制効果

TLR 遺伝子導入 HEK293 細胞を用いた BLM 誘導シグナルの解明

HEK293細胞にsTLR2を遺伝子導入し、BLM刺激するとNF- κ Bが誘導された (Fig.3)。このことはBLM誘導シグナルがTLR2依存性であることを示している。

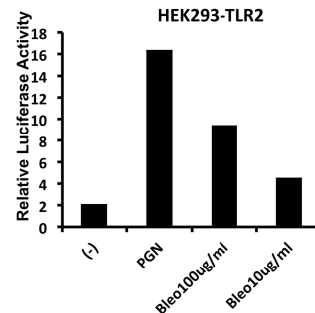


Fig. 3 TLR2遺伝子導入HEK293細胞におけるBLM刺激によるNF- κ B発現への影響
※既知の増強因子; PGN (peptide glycan)

表面プラズモン共鳴センサー(ピアコア)を用いた受容体とBLMとの結合検出

ピアコアを用いて分子間の結合を検討すると、BLM は sTLR2 と結合した (Fig.4A)。また、BLM は SP-A と結合した (Fig.4B)。

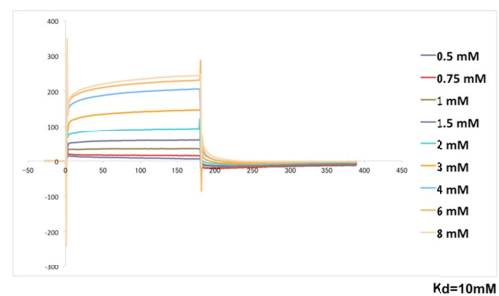


Fig. 4A BLMとsTLR2の結合能

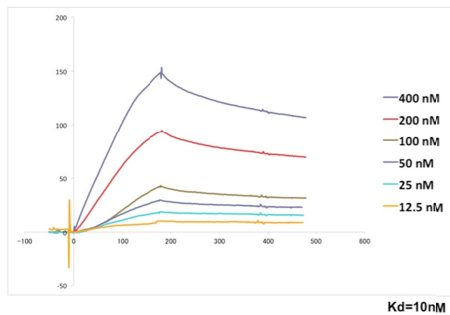


Fig. 4B BLMとSP-Aの結合能

BLMとTLR2との直接結合能および肺コレクチンによる阻害効果の検討

ELISA 法では BLM は sTLR2 と結合したが、SP-A によりその結合は阻害された。

考察

本研究では、肺コレクチンの一つ、SP-A が薬剤起因性の急性肺障害において、防御的機能をもつ生理的物質であることを BLM 投与マウスの in vivo 実験によって明らかにすることができた。SP-A(k/o)マウスに合成 SP-A を経気道投与したところ、肺障害を軽減させ、生存率を向上させる効果があることも示された。また、ラット肺泡マクロファージの初代培養細胞を用いた in vitro 実験によって、SP-A による急性肺障害防御のメカニズムを解明することに成功した。とくに TLR 遺伝子導入 HEK293 細胞を用いた検討によって、BLM 誘導シグナルが TLR2 依存性であることが明らかになった。今後、急性肺障害を生じ易い種々の臨床薬剤についても同様の検討を行い、TLR2 が多くの薬剤に共通したシグナル伝達経路上の key factor なのかどうかを検討してみる価値があると思われる。

結語

本研究では、薬剤性肺障害のメカニズムの一端が解明され、肺コレクチンを新規治療法に応用するための基盤的成果が得られた。

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 14 件)

1. Hasegawa Y, Takahashi M, Ariki S, Asakawa D, Tajiri M, Wada Y, Yamaguchi Y, Nishitani C, Takamiya R, Saito A, Uehara Y, Hashimoto J, Kurimura Y, Takahashi H, Kuroki Y. Surfactant protein D suppresses lung cancer progression by downregulation of epidermal growth factor signaling. *Oncogene*. doi: 10.1038/onc.2014.20. (査読有り)
2. 千葉弘文, 高橋弘毅. 呼吸器疾患の診断・治療 (I) 間質性肺炎. *医学と薬学* 2013;69(1)27-32. (査読無し)
3. 千葉弘文, 高橋弘毅. 呼吸器疾患の診断と

治療 最近の進歩 特発性間質性肺炎. *北海道医報* 2013;1134:44-6. (査読無し)

4. 錦織博貴, 千葉弘文, 大塚満雄, 高橋弘毅. 特発性肺線維症患者における SP-A と SP-D の肺内動態の差異についての検討. *日肺サーファクタント・界面医学会誌*. 2013;44:63-5. (査読無し)
5. 高橋弘毅. 血清蛋白, その他の生化学検査 シアル化糖鎖抗原(KL-6), サーファクタントプロテイン A, サーファクタントプロテイン D. *内科* 2013;111(6):1304. (査読無し)
6. 千葉弘文, 夏井坂元基, 高橋弘毅. 特発性肺線維症の疫学調査(北海道 study)による新知見. *呼吸器内科* 2013;23(4):337-41. (査読無し)
7. 千葉弘文, 夏井坂元基, 高橋弘毅. [特発性間質性肺炎-この10年の進歩と今後の展望-] 特発性間質性肺炎の診断と治療の進歩 診断・疫学関連 わが国における疫学調査: 北海道 STUDY. *日胸* 2013;72:S8-S9.
8. D'Ovidio F, Kaneda H, Chaparro C, Mura M, Lederer D, Di Angelo S, Takahashi H, Gutierrez C, Hutcheon M, Singer LG, Waddell TK, Floros J, Liu M, Keshavjee S. Pilot study exploring lung allograft surfactant protein A (SP-A) expression in association with lung transplant outcome. *Am J Transplant*. 2013;13(10):2722-9. doi: 10.1111/ajt.12407. (査読有り)
9. 千葉弘文, 夏井坂元基, 高橋弘毅. 間質性肺疾患 Up-To-Date 北海道 study はじめて明らかになった特発性肺線維症の疫学. *THE LUNG-perspective* 2012;20(3):243-5. (査読無し)
10. Saito A, Ariki S, Sohma H, Nishitani C, Inoue K, Ebata N, Takahashi M, Hasegawa Y, Kuronuma K, Takahashi H, Kuroki Y. Pulmonary surfactant protein A protects lung epithelium from cytotoxicity of human -defensin 3. *J Biol Chem*. 2012;287(18):15034-43. doi: 10.1074/jbc.M111.308056. (査読有り)
11. 齋藤充史, 有木 茂, 西谷千明, 高橋素子, 高橋弘毅, 黒木由夫. レジオネラ菌に対する肺コレクチンの生体防御機構. *エンドキシン・自然免疫研究* 2011;14:79-82. (査読無し)
12. 高橋弘毅, 千葉弘文, 大塚満雄. びまん性肺疾患のマイル・ストーン 特発性肺線維症の病態と特徴. *総合臨床* 2011;60(12):2385-90. (査読無し)
13. 高橋弘毅, 白鳥正典, 千葉弘文. 特集 特発性肺線維症 (IPF). IPF のバイオマーカー 2. SP-D, SP-A. *呼吸器内科* 2011; 19(6):597-604. (査読無し)
14. 高橋弘毅, 千葉弘文. 特集 特発性間質性肺炎-最近の進歩と展望. 病態と治療: 特発性間質性肺炎の疫学. *最新医学* 2011;66(6):1103-1107. (査読無し)

(学会発表) (計 15 件)

1. Hasegawa Y, Takahashi M, Arika S, Asakawa D, Tajiri M, Wada Y, Takamiya R, Uehara Y, Hashimoto J, Takahashi H, and Kuroki Y. Surfactant Proteins A And D Suppress Epidermal Growth Factor Signaling Through Interactions With N-Glycans Of Receptor. In:18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology: 2013 November 11-14: Yokohama, Japan.
 2. Yokoo K, Shiratori M, Natsuizaka M, Ikeda K, Otsuka M, Chiba H, Yamada G, Koba H, Takahashi H. Significance of serum surfactant protein D for combined pulmonary fibrosis with emphysema in idiopathic pulmonary fibrosis. In:18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology: 2013 November 11-14: Yokohama, Japan
 3. Shiratori M, Yokoo K, Ikeda K, Natsuizaka M, Umeda Y, Kitamura Y, Otsuka M, Chiba H, Koba H, Takahashi H. Subtypes of pulmonary emphysema on HRCT affect prognosis on combined pulmonary fibrosis and emphysema in idiopathic pulmonary fibrosis. In:23th European Respiratory Society Annual Congress: 2013 September 7-11: Barcelona, Spain.
 4. Otsuka M, Kitamura Y, Yokoo K, Ikeda K, Shioya M, Nishikiori H, Shiratori M, Takahashi H. Diffusing capacity for carbon monoxide (DLco) may predict appearance of pulmonary hypertension in idiopathic pulmonary fibrosis. In:23th European Respiratory Society Annual Congress: 2013 September 7-11: Barcelona, Spain.
 5. Nishikiori H, Chiba H, Otsuka M, Ikeda K, Takahashi H. Difference in the dynamic state between SP-A and SP-D in the lung. In:23th European Respiratory Society Annual Congress 2013, September 7-11, Barcelona, Spain.
 6. Ikeda K, Shiratori S, Yokoo K, Otsuka M, Chiba H, Takahashi H. Serum surfactant protein D may predict the effect of pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis. In:23th European Respiratory Society Annual Congress: 2013 September 7-11: Barcelona, Spain.
 7. Shioya M, Otsuka M, Kitamura Y, Yokoo K, Ikeda K, Nishikiori H, Shiratori M, Takahashi H. Idiopathic pulmonary upper lobe fibrosis shows distinct features and poor prognosis compared to idiopathic pulmonary fibrosis. In:23th European Respiratory Society Annual Congress: 2013 September 7-11: Barcelona, Spain.
 8. Yokoo K, Shiratori M, Ikeda K, Natsuizaka M, Otsuka M, Koba H, Takahashi H. Serum surfactant protein D (SP-D) and annual decline of diffusion capacity are prognostic factors for combined pulmonary fibrosis with emphysema (CPFE) in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). In:23th European Respiratory Society Annual Congress: 2013 September 7-11: Barcelona, Spain.
 9. Otsuka M, Shiratori M, Kuronuma K, Takahashi H. HSP47siRNA targeting to myofibroblasts attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. In:22th European Respiratory Society Annual Congress: 2012, September 1-5: Wien, Austria.
 10. Nishikiori H, Chiba H, Otsuka M, Kuronuma K, Takahashi H. The decrease of surfactant protein D in bronchoalveolar lavage fluid in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and nonspecific interstitial pneumonia. In:22th European Respiratory Society Annual Congress: 2012, September 1-5: Wien, Austria.
 11. Otsuka M, Shiratori M, Takahashi H. Effect of HSP47siRNA Targeting to The Lung Myofibroblast on Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. In:107th International Conference of American Thoracic Society: 2012 May 18-23: San Francisco, U.S.A.
 12. Kitamura Y, Otsuka M, Umeda Y, Shiratori M, Takahashi H. Relationship between serum SP-A and pulmonary hypertension in interstitial lung diseases. In:107th International Conference of American Thoracic Society: 2012 May 18-23: San Francisco, U.S.A.
 13. Umeda Y, Otsuka M, Kitamura Y, Shiratori M, Takahashi H. Clinical characteristics of combined pulmonary fibrosis and emphysema. In:107th International Conference of American Thoracic Society: 2012 May 18-23: San Francisco, U.S.A.
 14. Natsuizaka M, Chiba H, Shiratori M, Mori M, Sugiyama Y, Takahashi H. Epidemiological survey of patients with idiopathic interstitial pneumonias using clinical personal records in Hokkaido, Japan. In:107th International Conference of American Thoracic Society: 2012 May 18-23: San Francisco, U.S.A.
 15. Saito A, Arika S, Nishitani C, Takahashi M, Takahashi H, Kuroki Y. Pulmonary Collectins Attenuate Autophagy Induce By L. Pneumophila Infection. In:106th International Conference of American Thoracic Society: 2011 May 13-18: Denver, U.S.A.
- [図書] (計 6 件)
1. 高橋弘毅 . 間質性肺疾患の診断・検査・画像と病理がわかる : E. 疾患マーカー・特殊検査の手順と解釈 : 1b. 疾患マーカー : サーファクタント蛋白質 (SP-A, SP-D) . 久保恵嗣, 藤田次郎編 . 間質性肺疾患診療マニュアル (改訂第2版) . 東京 : 南江堂 ; 2014 ; pp146-148.
 2. 高橋弘毅, 千葉弘文, 大塚満雄 . 総論 治療

1. 生活習慣と薬物療法. 監修. インフォームドコンセントのための図解シリーズ びまん性肺疾患と特発性肺炎. 東京: 医薬ジャーナル; 2014. pp.42-47.
3. 黒沼幸治, 高橋弘毅. 初診時の対応. 杉山幸比古編. 特発性間質性肺炎の治療と管理. 東京: 克誠堂出版; 2013. pp172-176.
4. 高橋弘毅. 7. 呼吸器系の疾患: 間質性肺疾患: 3) 非特異性間質性肺炎. 矢崎義雄総編. 内科学(第10版). 東京: 朝倉書店; 2013. pp804-806.
5. 高橋弘毅, 白鳥正典. VIII. IPF の臨床と診断: 5. 新しい線維化マーカー(2) SP-A, SP-D. 杉山幸比古編. 特発性肺線維症(IPF) (改訂版). 大阪: 医薬ジャーナル社; 2013. pp166-174.
6. 高橋弘毅. 14 章 呼吸器疾患: 11-1 特発性間質性肺炎. 門脇 孝, 永井良三総編. 内科学. 東京: 西村書店; 2012; pp802-805.

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

高橋 弘毅(TAKAHASHI HIROKI)

札幌医科大学医学部・教授

研究者番号: 60231396

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

黒木 由夫(KUROKI YOSHIO)

札幌医科大学医学部・教授

研究者番号: 70161784

白鳥 正典(SHIRATORI MASANORI)

札幌医科大学医学部・准教授

研究者番号: 40295366

千葉 弘文(CHIBA HIROFUMI)

札幌医科大学医学部・講師

研究者番号: 40347175

工藤 和実(KUDO KAZUMI)

札幌医科大学医学部・助教

研究者番号: 90438002

黒沼 幸治(KURONUMA KOJI)

札幌医科大学医学部・助教

研究者番号: 40563250