

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591165

研究課題名(和文)肺サーファクタント輸送異常による間質性肺炎の病態解明

研究課題名(英文)Pathogenesis of interstitial pneumonia caused by abnormal transport of lung surfactant

研究代表者

長内 和弘 (OSANAI, Kazuhiro)

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：70221158

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)：肺サーファクタント輸送による間質性肺炎を発症するヘルマンスキー・パドラック症候群のモデルラットであるLong Evans Cinnamonラット肺を解析したところ、肺胞Ⅱ型上皮細胞内に巨大な層状封入体と肺サーファクタント成分の著増がみられた。同細胞からの肺サーファクタントの基礎分泌は低下していたが、アゴニスト刺激分泌は逆に著明に増加していた。アデノベクターによるRab38遺伝子導入によりこれらの異常は改善された。同ラットの肺組織は予想に反して気腫性病変がみられた。同症候群での間質性肺炎の発症には基礎にある遺伝子異常に加え、感染・粉塵・加齢などが関与していることが推測された。

研究成果の概要(英文)：To investigate pathogenesis of interstitial pneumonia that is caused by perturbation of lung surfactant transport, we analyzed the lungs of Long Evans Cinnamon rats, an animal model of Hermansky-Pudlak syndrome. There were remarkably enlarged giant lamellar bodies and increased lung surfactant in alveolar type II cells. Basal secretion of surfactant from the cells was inhibited but agonist-induced secretion was reversely enhanced. Adenovector-mediated delivery of Rab38 ameliorated these surfactant abnormalities. Unexpectedly, the rat lungs showed emphysematous changes. It is suspected that complication with infection, air pollution, and/or aging would be necessary in addition to a primary genetic abnormality to develop interstitial pneumonia in the disease.

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：間質性肺炎 肺サーファクタント 細胞内輸送 肺胞上皮細胞 ヘルマンスキー・パドラック症候群  
Rab38 低分子量Gタンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

間質性肺炎の原因は多岐にわたるが、遺伝子異常が原因で発症する間質性肺炎がある。遺伝性間質性肺炎の一群は肺サーファクタントの輸送異常によって引き起こされる。現在までに判明している遺伝子には、サーファクタントプロテイン(SP) C、SP A、ヘルマンスキー・パドラック症候群 (HPS)、ATP-binding cassette transporter-A (ABCA)-3 がある。

HPS は眼皮膚型白皮症と易出血性を特徴とする常染色体劣性遺伝疾患であるが、半数以上の患者では 30~40 歳代に間質性肺炎が合併し、予後規定因子となる。同疾患の間質性肺炎ではセロイド脂質の著増、特徴的な巨大層状封入体を有する肺胞型上皮細胞の出現など肺サーファクタントの輸送障害による変化がみられる。

HPS の原因遺伝子である HPS-1 は Biogenesis of lysosome related organelle complex (BLOC) と呼ばれるリソゾームに関連した細胞内輸送小胞を構成するタンパク質であり、細胞内輸送に関与する。肺サーファクタント貯蔵顆粒である層状封入体もリソゾーム関連小器官である。しかしリソゾーム関連 BLOC 小胞の異常が間質性肺炎を起こす機序は不明のままである。

肺サーファクタントは成分毎に多様な機能をもち細胞内輸送経路も異なる。肺サーファクタントは肺胞表面を薄く覆って表面張力を下げ、肺胞の虚脱を防ぐ役割を担っており、正常な呼吸に必須の物質である。肺サーファクタントは複数の脂質と 4 種類のアポタンパク質から構成される複合体であり、おもに肺胞型上皮細胞で産生され、細胞内輸送と翻訳後修飾を受け、特異的貯蔵顆粒である層状封入体に貯蔵されてから、刺激により細胞外へ分泌される。肺サーファクタントは以前から知られている表面張力低下作用すなわちサーファクタント作用のみでなく、近

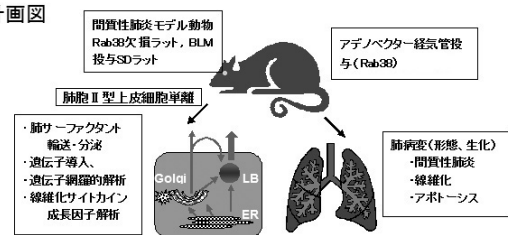
年親水性成分である SP-A や SP-D は自然免疫作用や免疫細胞への調整作用が知られるようになってきた。われわれは肺サーファクタントの親水性成分であるサーファクタントプロテイン A と疎水性成分であるフォスファチジルコリンあるいはサーファクタントプロテイン B の肺胞型上皮細胞内における輸送経路がそれぞれ異なる経路をとることを報告した(Osanai K et al. *Biochim Biophys Acta* 1531: 222-229, 2001)。

## 2. 研究の目的

Rab38 低分子量 G タンパク質を欠損している Long Evans Cinnamon (LEC) ラットは眼皮膚型白皮症と出血傾向を有するラットでヒト HPS のラットモデルであることが知られている(Oiso N et al. *Mamm Genome* 2004 15:307-14)。以上述べたように肺サーファクタントの細胞内輸送経路の研究と Rab38 遺伝子異常をもつヘルマンスキー・パドラック症候群モデル動物における肺サーファクタント異常の研究により、肺サーファクタント輸送異常と間質性肺炎の関係を解明する目的で本研究を遂行した。

## 3. 研究の方法

### 計画図



### (1) 分化機能を維持した肺胞型上皮細胞 (型細胞) 初代培養系の確立

型細胞株や培養ディッシュに培養した単離型細胞は脱分化し、肺サーファクタントの研究には使用できない。そこでコントロールの Sprague-Dawley (SD), ヘルマンスキー・パドラック症候群(HPS)モデルである Rab38 低分子量 G タンパク質欠損 Long Evans

Cinnamon (LEC)ラットからエラスターゼ消化およびメトリザミド密度勾配遠心法にて型細胞を単離し、これをマトリゲル膜上に培養し、途中から上皮側を気相にして、型細胞を培養する。この方法により型細胞は長期間サーファクタント発現などの分化機能を維持すると報告されている(Mason RJ et al. J Clin Invest. 2003 112:244-55)。

**(2) 型細胞内肺サーファクタント輸送の解析** 上記で確立した培養系を用いて型細胞内におけるサーファクタント輸送を小胞体(ER)からゴルジ装置(Golgi)への小胞輸送をインヒビターであるプレフェルジンA(BFA)を用いて解析する。また細胞分画法およびスクロース密度勾配遠心法により層状封入体(LB)を単離する。サーファクタントのLBへの輸送、細胞外への分泌を検討する。サーファクタント成分のうちPCは $^3\text{H}$ コリンでラベルしシリカゲル薄層クロマトグラフィー法で定量する。SP-AとSP-Bは $^{35}\text{S}$ メチオニンでアイソトープラベルし、特異抗体を用い免疫沈降法により新合成サーファクタント成分の輸送を解析する。コントロールSDラットに比しRab38欠損FHラット由来型細胞での輸送の相違点を明らかにする。さらに蛍光物質(GFP)融合Rab38を組み込んだアデノベクターを感染させ、輸送異常の改善が得られるかどうか観察する。

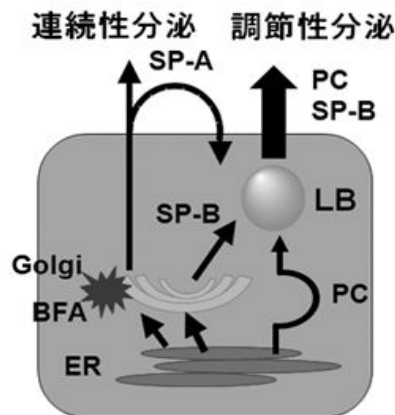
**(3) ヘルマンスキー・パドラック症候群モデルラットでの肺病変および肺サーファクタント輸送・分泌の解析** LECラットは日本チャールズリバー社より購入する。経時的に肺病変の有無を組織学的に観察するほか、気管支肺胞洗浄法にて気管支・肺胞内の炎症細胞を定量的に評価する。また、肺組織ホモジネート内、スクロース密度勾配超遠心法により単離した層状封入体(LB)小器官分画、および気管支肺胞洗浄液による肺胞内の肺サーファクタント量を測定する。フォスファチジルコリン(PC)はシリカゲル薄層クロマトグラフィー法で測定し、SP-A、SP-B、SP-Dは市販の抗体を用いてウェスタンブロットで定量する。

**(4) LECラットでのRab38遺伝子強制発現による肺での肺サーファクタント輸送および肺病変の解析** 正常Rab38-cDNAを組み込んだアデノベクターをLECラットに経気管的に単回投与し、経時的に肺病変を観察するとともに全肺組織ホモジネート、スクロース密度勾配超遠心法により単離した層状封入体小器官分画、および気管支肺胞洗浄液中における肺サーファクタントを上記(2)と同様に検討する。またLECラットより型細胞を単離し(1)で確立した培養方法で培養し、コントロールとしてLacZ遺伝子あるいはRab38遺伝子を組み込んだアデノベクターを感染させ、型細胞より総RNAを抽出し、DNAマイクロアレイ法にて発現遺伝子の差を網羅的に解析し、間質性肺炎発症に関わる遺伝子群を絞り込む。

#### 4. 研究成果

**(1) 型細胞内での肺サーファクタント輸送** 肺サーファクタントはフォスファチジルコリンを主成分とする複数のリン脂質、4種類のサーファクタントプロテイン(SP)-A、-B、-C、-Dから成る複合体である。SP-AとSP-Dは例外的に親水性である。これらのうちPCとSP-A、SP-B3成分の細胞内輸送経路を肺サーファクタントの貯蔵顆粒である層状封入体(LB)との関連から解析した結果を図1に示す。3成分ともそれぞれ異なった経路を取

図1 肺サーファクタントの細胞内輸送



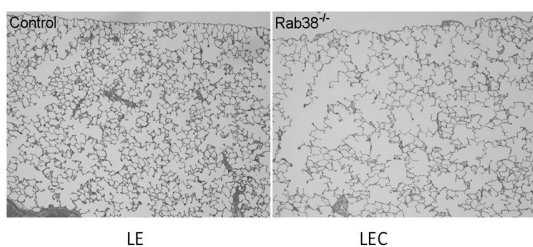
っていた。すなわちPCは小胞体(ER)で合成後、ゴルジ装置とは関連なくLBへ輸送・貯

蔵された。SP-A は合成後、ゴルジ装置へ輸送され糖鎖修飾を受けた後、連続的に細胞外へ分泌され、エンドサイトーシスによってLBへ取り込まれていた。SP-B は合成後、ゴルジ装置に輸送されてからLBへ輸送・貯蔵されていた。

## (2) Rab38 欠損 L E C ラットでの肺病変。

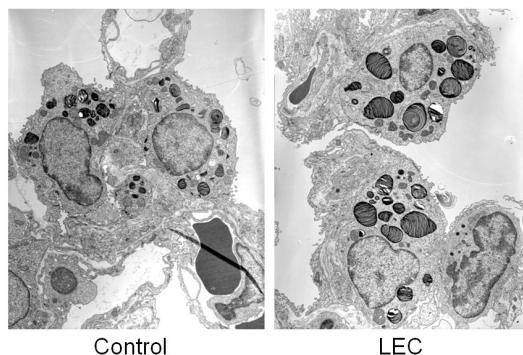
常染色体劣性遺伝疾患である間質性肺炎を発症するヘルマンスキー・パドラック症候群(HPS)のモデルラットでの肺病変および肺サーファクタント輸送・分泌を解析した。Rab38 低分子量 G タンパク質を欠損し眼皮瘡型白皮症と出血傾向を有する HPS のモデルラットとして肺病変の強い Long Evans Cinnamon(LEC)ラットを使用した。LEC ラットの肺を観察したところ、コントロールの Long Evans (LE)ラットに比し、肺胞型上皮細胞内の層状封入体の巨大化が起きており、細胞内の肺サーファクタントの増加、細胞外の肺サーファクタントの低下が起きていた。ヘマトキシリン・エオジン染色で肺組織を観察すると、間質性肺炎ではなく気腫性肺病変が観察された(図2)。

図2 肺組織光顕像、×40倍



電顕で肺胞上皮細胞を観察したところII型上皮細胞は大型化し、胞体内に著明に大型化した層状封入体を含有していた(図3)。LECラットにみられる肺サーファクタントの増加、特徴的な巨大層状封入体を有する肺胞型上皮細胞は、HPSでみられる肺病理組織所見と類似していた。

図3 肺胞型細胞 ×3,500倍

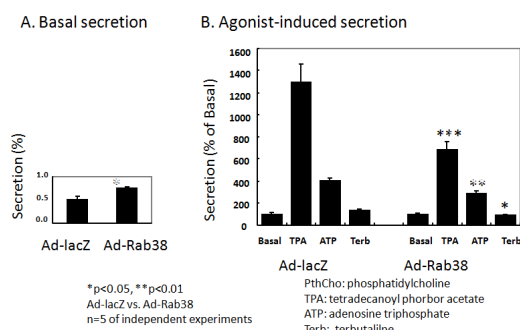


気管支肺胞洗浄法にて気管支・肺胞内の炎症細胞を定量的に評価したところ、軽度の出血と好中球の増加、脂質の貪食により大型化した胞体を有する肺胞マクロファージがみられた。肺組織ホモジネート内、スクロース密度勾配超遠心法により単離した層状封入体(LB)小器官分画、および気管支肺胞洗浄液による肺胞内の肺サーファクタント量を測定したところ、肺サーファクタント脂質成分のフォスファチジルコリン(PC)は組織および層状封入体分画で著明に増加していたが、肺胞腔内での増加はみられなかった。同様に疎水性肺サーファクタントタンパク質SP-Bも同じ傾向を示した。しかし親水性肺サーファクタントであるSP-AとSP-Dには明らかな変化はみられなかった。単離培養した肺胞II型上皮細胞からのPCの分泌活性をみたところ、無刺激状態での分泌は低下していたが、各種アゴニストによる分泌刺激では著明な分泌活性を示した。

アデノベクターを用いRab38-cDNAを組み込み、初代培養II型肺胞上皮細胞およびLECラット肺へ経気道的に肺に感染させた。培養II型上皮細胞からの分泌活性は野生型ラットに近づくように改善された(図4)。またin vivoで経気道感染させた肺でのPCや疎水性肺サーファクタントタンパク質SP-Bの含有量にも野生型へ近づくような改善がみられた。初代培養型細胞にRab38-cDNAおよびコントロールとしてlacZ-cDNAを組み込んだアデノベ

クターを感染させ発現するRNAをDNAマイクロ

図4 肺胞 型細胞からの<sup>3</sup>H]フォスファチジルコリンの分泌



アレイで解析した。コントロールに比し2倍以上の変化を示した分子を探索したところ表のように増加あるいは低下した分子種類が同定された(表)。

Transcripts	FC	Absolut	regulation	genesymbol
10702412	2.190071		down	Rspo3
10703787	2.816789		down	LOC292543
10705411	2.1254		down	
10708531	2.605728		up	Rab38
10712383	3.317824		up	RGD1561983_predicted
10733017	2.005498		down	Havcr1
10741947	2.449548		up	Gabrp
10751948	2.389427		down	Masp1
10754176	2.027087		down	Cd80
10761555	2.769924		down	Dnah10
10770082	2.057381		down	Ifi204
10770109	2.943795		down	RGD1562462_predicted
10771655	2.427418		down	Cxcl10
10779248	2.819129		up	LOC679752 LOC305698 LOC679066
10779305	2.467246		up	LOC305698 LOC679752 LOC679066
10782424	2.752412		up	LOC679752 LOC305698 LOC679066
10782428	2.346547		up	LOC305698 LOC679752 LOC679066
10786123	2.920298		up	LOC679752
10809540	2.306058		down	Mmp2
10821067	2.125139		down	
10823555	3.213633		up	Plunc
10826371	2.476614		down	Lrp2
10841170	2.40374		down	Ryr3
10845977	2.044119		down	Ryr3
10848176	2.094595		down	Ryr3
10848275	2.144097		down	Atg9b
10852920	2.309576		down	Abcb1b
10854558	2.142718		down	Cttnbp2 Wnt2 Asz1 Met Cav1 ST7 Cav2
10861171	2.006892		down	Mmp16
10864848	2.475723		down	Akr7a3
10867761	3.293501		down	Sulf1
10876069	2.399008		down	Srd5a2
10882969	2.214979		up	Lypd2_predicted
10889728	3.364494		down	Ly6c
10904521	2.076663		down	Ly6a_predicted
10904578	2.178906		down	Cpt1b
10909446	3.432724		down	
10931159	2.384912		down	Ppef1
10933479	2.051058		down	Nrk_predicted
10933559	2.111225		down	Gria3

以上よりRab38の欠失により肺サーファクタントのII型細胞内での輸送・分泌に異常が起き、予想に反し間質性肺炎ではなく肺気腫様病変が引き起こされることが明らかにされた。

他文献(Young LR et al. Am J Respir Crit Care Med. 2012, 186: 1014-24)からの知見と合わせ考察すると、ヒトHPSでの間質性肺炎には1stヒットである遺伝子異常に加え、2ndヒットである呼吸器感染、加齢、粉じん吸入などの要因が関わっていると推測された。

## 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7件)

Fujimoto Y, Huang J, Fukunaga T, Kato R, Higashino M, Shinomiya S, Kitadate S, Takahara Y, Yamaya A, Saito M, Kobayashi M, Kojima K, Oikawa T, Nakagawa K, Tsuchihara K, Iguchi M, Takahashi M, Mizuno S, Osanai K, Toga H. A three-microphone acoustic reflection technique using transmitted acoustic waves in the airway. J Appl Physiol, 査読有, 115, 2013, 1119-1125

DOI 10.1152/jappphysiol.00326.2013

周敏、長内和弘、北楯祥子、四宮祥平、東野茉莉、山谷敦代、高原豊、齋藤雅俊、小林誠、及川卓、土原一真、水野史朗、黄正寿、梅博久、アデノベクターによるラット肺へのリソフォスファチジルコリンアシル転移酵素1(LPCAT1)遺伝子デリバリーはオレイン酸肺水腫を抑制する、分子呼吸器病学、査読無、17巻、2013、143-145

DOI なし

齋藤雅俊、及川卓、中川研、水野史朗、長内和弘、梅博久、市中感染型メチシリン耐性黄色ブドウ球菌による肺化膿症の1例、日本呼吸器学会誌、査読有、2巻、2013、205-209

DOI なし

及川卓、加藤諒、中川研、水野史朗、長内和弘、梅博久、シタフロキサシン長期投与が有効であった多剤耐性ノカルジア膿胸の1例、日本呼吸器学会誌、査読有、2巻、2013、424-428

DOI なし

長内和弘、肺サーファクタントの自然免疫、生体防御機構における役割と薬剤(アンプロキソール)による呼吸器感染予防の可能性、Progress in Medicine, 査読無、2012、149-153

DOI なし

東野茉莉、長内和弘、急性好酸球性肺炎(AEP)と喫煙、呼吸器内科、査読無、22巻、2012、199-202

DOI なし

山谷敦代、長内和弘、COPD発症にかかわるサイトカイン、プロテアーゼの関与、日本臨床、査読無、69巻、2011、1748-1753

〔学会発表〕(計4件)

Osanai K et al, Exogenous expression of lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 (LPCAT1) ameliorates oleic acid-induced lung injury in rats, 第53回日本呼吸器学会学術講演会、2013.4.19、東京国際フォーラム(東京都千代田区)

Zhou M, Osanai K et al, Exogenous expression of lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 protect alveolar type II cells from hydrogen peroxide-induced cell death, ATS 2012 International Conference, 2012.5.20, Moscone Center, San Francisco, USA

Zhou M, Osanai K, et al, Exogenous expression of lysophosphatidylcholine acyltransferase 1 protect alveolar type II cells from hydrogen peroxide-induced cell death, 第52回日本呼吸器学会学術講演会、2012.4.21、神戸コンベンションセンター(兵庫県、神戸市)

Osanai K et al, Abberant lung surfactant homeostasis in Rab38 small GTPase mutated rat lungs, ATS 2011 International Conference, 2011.5.17, Convention Center (Denver, USA)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

長内 和弘 (OSANAI, Kazuhiro)  
金沢医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70221158

### (2)研究分担者

井口 晶晴 (IGUCHI, Masaharu)  
金沢医科大学・医学部・助教  
研究者番号：60350758

小林 誠 (KOBAYASHI, Makoto)  
金沢医科大学・医学部・助教  
研究者番号：20460355