

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591151

研究課題名(和文)新規生理活性物質SCGB3A2の肺線維症治療薬としての応用を目指した基盤研究

研究課題名(英文)Basic research aimed at application as pulmonary fibrosis treatment of new biologically active substances, SCGB3A2

研究代表者

黒谷 玲子(Kurotani, Reiko)

山形大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：00453043

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：肺線維症は、がん治療の際の放射線照射や抗がん剤として使用されるブレオマイシン(BLM)の副作用によって肺組織の線維化が誘起され発症する。肺線維症の病態解明は十分ではなく、決定的な治療薬は存在しないため、肺線維症の発症メカニズムの解明と新規治療薬の開発が急務となっている。新規生理活性物質Secretoglobin (SCGB)3A2は、抗炎症作用、肺線維症改善効果、肺発生過程での気管支分岐と成長促進および増殖因子として機能する。多機能を有するSCGB3A2は肺線維症の有効な治療薬として可能性を秘めた生理活性物質であると期待し、本研究では、SCGB3A2が肺線維症の治療薬としての有効性を示した。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary fibrosis is induced to develop by the side effects of bleomycin (BLM), which is used as a radiation and anti-cancer agent in the treatment of cancer. Since the pathogenesis of pulmonary fibrosis is not sufficient, and definitive therapeutic agent is not present, elucidation of the onset mechanism of pulmonary fibrosis and the development of the new therapeutic drug become the urgent business. New bioactive substance Secretoglobin (SCGB)3A2 has roles of the anti-inflammatory effect, pulmonary fibrosis improvement effect, as well as promotes growth, branching, and maturation in the lung development. SCGB3A2 having such a multi-function was expected to be physiologically active substances with the potential as an effective treatment of pulmonary fibrosis. This study demonstrated the possible therapeutic use of SCGB3A2 in treatment of lung fibrosis.

研究分野：細胞生物学 分子生物学

キーワード：SCGB3A2 肺線維症

1. 研究開始当初の背景

肺線維症は、がん治療の際の放射線照射や抗がん剤として使用されるブレオマイシン(BLM)の副作用によって肺組織の線維化が誘起されて発症する。肺線維症は、細胞へのダメージ、炎症、コラーゲン沈着を経て、肺胞壁が厚く硬くなり(線維化)最終的にはガス交換が困難になる。肺線維症の病態解明は十分ではなく、決定的な治療薬は存在しないため、深刻な問題になっている。肺線維症は自覚症状から3~5年で呼吸不全になることもあり、肺線維症の発症メカニズムの解明と新規治療薬の開発が急務となっている。

現在、肺線維症で重要な役割を果たしている物質として肺上皮細胞が分泌する生理活性物質サーファクタントがある。申請者らは、肺発生に必須の転写因子 Nkx2_1 の下流遺伝子としてサーファクタントと類似の新規生理活性物質 Secretoglobin (SCGB)3A2 の単離に成功した。SCGB3A2 は、ウテログロビン(UG)ファミリー遺伝子に分類され、気管支喘息感受性関連遺伝子クラスター内に位置する。また、抗炎症作用を有する UG と相同性の高いアミノ酸配列を有している。これまでに申請者らは、SCGB3A2 が肺炎の改善(抗炎症作用)(*Am J Respir Crit Care Med.* 2006, 173:958)、肺線維症の発症過程でみられる筋線維芽細胞への分化抑制とこれに伴うコラーゲン産生の抑制効果を有することを明らかにしてきた(*J Biol Chem.* 2011, 286:19682)。また、SCGB3A2 は、肺発生過程での気管支分岐と成長を促進させる増殖因子であることを明らかにしている(*Am J Respir Crit Care Med.* 2008, 178:389)。これらの一連の研究から、SCGB3A2 は肺線維症の有効な治療薬としての可能性を秘めた生理活性物質であると考えられる。しかしながら、SCGB3A2 の抗炎症作用に関する分子メカニズムや、器官レベルでの SCGB3A2 の

線維化抑制効果を調べた研究はほとんどない。SCGB3A2 の肺線維症治療薬の可能性を検証するためには、SCGB3A2 の生物学的作用機構と器官レベルでの治療効果の解析が不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、SCGB3A2 の肺線維症治療薬としての有効性を検証するために、進行した肺線維症に対する SCGB3A2 の治療効果を解析することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 培養肺細胞を用いた SCGB3A2 のアポトーシス抑制効果の解析: SCGB3A2 のアポトーシス抑制効果とその作用機序を解明した。マウス線維芽細胞株(MLg)に対し、SCGB3A2 存在下・非存在下でアクロレイン(ACR)刺激した細胞におけるアポトーシス陽性細胞数を比較する。申請時の計画では BLM 刺激を予定していたが、以前よりアポトーシスの誘導性が悪く、実験モデルとして使用しにくいと判断し、ACR に変更した。

アポトーシス細胞の生物学的解析:

TUNEL 染色法(DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System; Promega, Fitchburg, WI, USA)、および Annexin V 結合試験により、SCGB3A2 存在下・非存在下で BLM 刺激したマウス肺線維芽細胞のアポトーシス抑制効果を解析した。また、SCGB3A2 によって抑制されたアポトーシス経路の生化学的解析をウエスタンブロットによって行った。

活性酸素種(ROS)抑制遺伝子類の解析:

BLM 刺激によって放出される ROS を CellROX Green Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)を用いて検出し、評価した。

(2) 肺線維症モデルマウスを用いた

SCGB3A2 の進行性肺線維症抑制効果の検討:野生型(C57/BL6n)マウス、Scgb3a2 遺伝子改変(欠損:KO, 肺特異的過剰発現:TG)マウスに対し、麻酔下で BLM (8U/Kg)を気管投与後、9週間まで観察した。

(3) 生理機能解析としてトレッドミルを用いた走行実験:上記(2)のマウスに BLM 投与後、3週間目に走行実験をトレッドミル MK-685(室町機械株式会社)内で以下の条件で行った。

- ・適応時間:40分
10分毎に7.2m/min ずつ増加
- ・電気刺激:1mA
- ・傾斜:10°
- ・終了条件:10秒以上電化ステンレススチールグリッドに留まった場合

4. 研究成果

(1) SCGB3A2 のアポトーシス抑制効果

ACR (15, 30, 60 μ M) 刺激を30分間行った後に、新鮮な培地に交換後 SCGB3A2 を添加して一晩培養した。培養後 TUNEL を行った結果、どの濃度の ACR 刺激によ

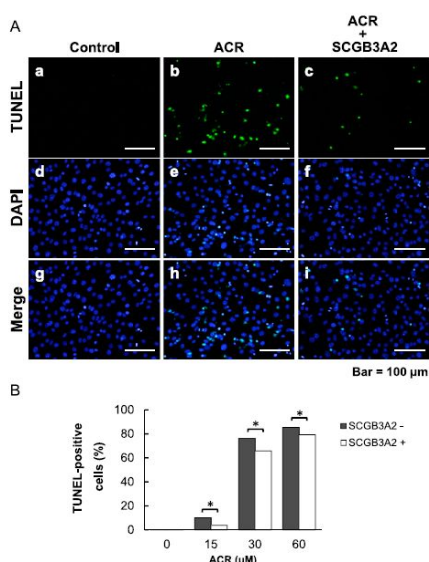


図1. SCGB3A2によるACR誘導性アポトーシスの抑制

A. TUNELアッセイ B. TUNEL陽性率

るアポトーシスも SCGB3A2 によって有意に減少した。特に 15 μ M の ACR 刺激条件下で

は SCGB3A2 によって 50%以上の抑制率が得られた(図1A,B)。

続いて、Annexin V 結合試験を行った結果、ACR 刺激後、SCGB3A2 を添加して一晩培養すると、SCGB3A2 によって Annexin V の結合が明らかに減少し(図1C)、Annexin V 結合率はどの ACR 濃度刺激条件であっても有意に減少した(図1D)。

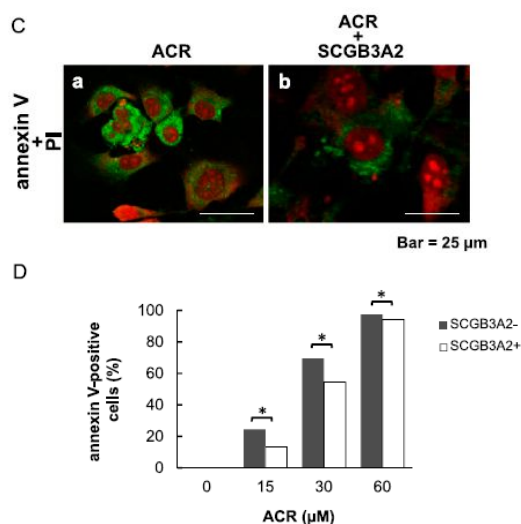


図1. つづき

C. Annexin V 結合試験 D. Annexin V 結合率

SCGB3A2 のアポトーシス抑制効果は確認できたため、そのメカニズムを理解するために ROS の検出を行った。この結果、SCGB3A2 は ACR による ROS 産生には影響を与えなかった(図は掲載しない)。そこで、アポトーシス誘導に働く p53 の発現とリン酸化を検出した。この結果 ACR によってリン酸化された p53(p-p53 Ser18)は SCGB3A2 によって有意に減少した。

以上の結果から、SCGB3A2 は ACR 誘導性アポトーシスを p53 のリン酸化抑制を介して阻止することを示した(*Acta Histochem Cytochem.* 2015 48(2):61-8.)。

(2) 肺線維症モデルマウスを用いた SCGB3A2 の進行性肺線維症抑制効果の検討

WT Scgb3a2KO, TG に BLM を気管投与し、3週間、6週間、9週間後の肺組織を観察した(HE 染色・マッソントリクローム染色) 3

週間目では予想に反して WT より TG 肺での線維化の程度が悪化した。しかし、6 週以降では WT 肺に比べて自然に TG 肺の状態が回復した(*BMC Pulm Med.* 2015 15:72)。この結果は、SCGB3A2 が肺線維症の治療薬として有効性が高いことを示した。

(3) 生理機能解析としてトレッドミルを用いた走行実験

(2)のマウスモデルに対し、BLM 投与後 3 週目のマウスの走行実験を行った。その結果、BLM 投与後 WT, KO では有意に走行距離が減少した(図 2)。また、BLM 非投与条件下で WT に比べ KO で有意に走行距離が減少した。これにより、SCGB3A2 の欠如は肺の恒常的な機能低下に關与することを示唆した(未発表)。また、TG では予想に反し、非投与条件下でも走行距離が低かったが実験数が少なく判定はできていない。

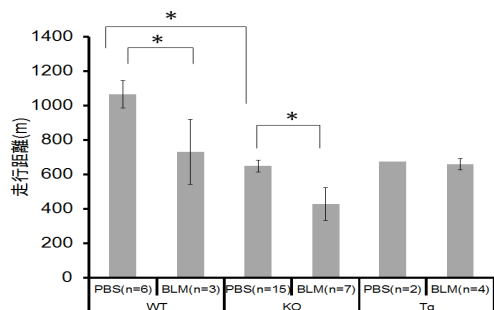


図 2. トレッドミルによる走行試験

以上の結果から、SCGB3A2 は肺線維症の治療に有効性が高いことを示した。

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 11 件)

1. 阿部宏之、黒谷玲子 多項目解析技術を駆使したウシ初期胚ミトコンドリア呼吸機能解析 産婦人科の実際 2015, 第 64 巻 第 6 号 815-822 査読無
<http://www.kanehara-shuppan.co.jp/magazines/detail.html?code=040252015060>

2. Watanabe Y, Takakura K, Kurotani R, Abe H. Optical coherence tomography imaging for analysis of follicular development in ovarian tissue *Applied Optics*, 2015, 査読有 (19):6111-6115. doi: 10.1364/AO.54.006111.
3. Cai Y, Yoneda M, Tomita T, Kurotani R, Okamoto M, Kido T, Abe H, Mitzner W, Guha A, Kimura S. Transgenically-expressed secretoglobin 3A2 accelerates resolution of bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *BMC Pulm Med.* 2015 15:72. 査読有 doi: 10.1186/s12890-015-0065-4.
4. Kurotani R, Shima R, Miyano Y, Sakahara S, Matsumoto Y, Shibata Y, Abe H, Kimura S. SCGB3A2 Inhibits Acrolein-Induced Apoptosis through Decreased p53 Phosphorylation. *Acta Histochem Cytochem.* 2015 48(2):61-68. 査読有 doi: 10.1267/ahc.14065. Epub 2015 Apr 24.
5. Eguchi H, Umemura M, Kurotani R, Fukumura H, Sato I, Hoshino Y, Lee J, Amemiya N, Sato M, Hirata K, Singh DJ, Masuda T, Yamamoto M, Urano T, Tanigaki K, Yamamoto M, Sato M, Inoue S, Aoki I, and Ishikawa Y A magnetic anti-cancer compound for magnet-guided delivery and magnetic resonance imaging 査読有 *Sci Rep.* 2015, 5:9194. doi: 10.1038/srep09194.
6. Okumura S, Fujita T, Cai W, Jin M, Namekata I, Mototani Y, Jin H, Ohnuki Y, Tsuneoka Y, Kurotani R, Suita K, Kawakami Y, Hamaguchi S, Abe T, Kiyonari H, Tsunematsu T, Bai Y, Suzuki S, Hidaka Y, Umemura M, Ichikawa Y, Yokoyama U, Sato M, Ishikawa F, Izumi-Nakaseko H, Adachi-Akahane S, Tanaka H, Ishikawa Y Epac1-dependent phospholamban phosphorylation mediates the cardiac response to stresses. *J. Clin Invest.* 査読有 2014 124(6):2785-2801. doi: 10.1172/JCI64784. Epub 2014 Apr 24
7. Hoshino S, Kurotani R, Miyano Y, Sakahara S, Koike K, Maruyama M, Ishikawa F,

- Sakata I, Abe H, Sakai T Macrophage colony-stimulating factor induces prolactin expression in rat pituitary glands *Zoolog Sci* 2014 31(6):390-397. 査読有 doi: 10.2108/zs130226.
8. Miyano Y, Tahara S, Sakata I, Sakai T, Abe H, Kimura S, Kurotani R. Regulation of LH/FSH expression by secretoglobin 3A2 in the mouse pituitary gland *Cell and Tissue Res.* 2014 356(1):253-260. 査読有 doi: 10.1007/s00441-014-1794-z.
 9. Gong Z, Yoshimura M, Aizawa S, Kurotani R, Zigman J, Sakai T, Sakata I. G-protein coupled receptor 120 (GPR120) signaling regulates ghrelin secretion in vivo and in vitro. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2013 306(1):E28-35. 査読有 doi:10.1152/ajpendo.00306.2013.
 10. Miyano Y, Sakata I, Kuroda K, Aizawa S, Tanaka T, Jogahara T, Kurotani R, Sakai T. The role of the vagus nerve in the migrating motor complex and ghrelin- and motilin-induced gastric contraction in suncus. *PLoS One.* 2013, 8(5): e64777 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0064777.
 11. Bai Y, Tsunematsu T, Jiao Q, Jin M, Cai W, Jin H, Fujita T, Ichikawa Y, Suita K, Kurotani R, Yokoyama U, Sato M, Iwatsubo K, Ishikawa Y, Okumura S. Pharmacological Stimulation of Type 5 Adenylyl Cyclase Stabilizes Heart Rate under both Microgravity and Hypergravity induced by Parabolic Flight *Journal of Pharmacological Sciences*, 2012, 119(4):381-389. 査読有 https://www.jstage.jst.go.jp/article/jphs/119/4/119_12102FP/pdf

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Reiko Kurotani The Roles of Secretoglobin 3A2 in Respiratory Disease (2016) 第93回日本生理学会 3月22 - 24日 札幌コンベンションセンター、札幌
2. 黒谷玲子、近野憲希、小野荘太郎、坂原聖士、宮野佑樹、阿部宏之 (2015) セ

クレトグロビン 3A2 は慢性閉塞性肺疾患を改善する Ssecretoglobin3A2 improved chronic obstructive pulmonary disease. 日本動物学会 第86回大会9月17 - 19日 朱鷺メッセ、新潟

3. 黒谷玲子、松本良江、宮野佑樹、阿部宏之 (2014) 慢性閉塞性肺疾患(COPD)におけるセクレトグロビン (SCGB) 3A2 の役割の解明 日本動物学会 第85回大会 9月11-13日 東北大学川内キャンパス、仙台
4. 黒谷玲子、坂原聖士、渡部裕輝、阿部宏之 (2014) 光干渉断層画像化技術を応用したマウス呼吸器診断システムの開発 第15回山形ニューロサイエンス・医工学研究会 6月14日 ホテル樹林 山形・蔵王
5. 黒谷玲子、坂原聖士、長坂みず穂、渡部裕輝、阿部宏之 (2013) 光干渉断層画像化法を応用したマウス肺病変組織の非侵襲イメージング、日本動物学会第84回大会 9月26-28日 岡山大学津島キャンパス、岡山
6. 黒谷玲子、宮野佑樹、島 麗香、坂田一郎、坂井貴文、阿部宏之 (2013) マウス下垂体における SCGB3A2 の役割 3月27 - 29日 第90回日本生理学会大会 タワーホール船堀、東京
7. 黒谷玲子、宮野佑樹、島 麗香、坂原聖士、阿部宏之 (2012) マウス下垂体における SCGB3A2 の局在 日本動物学会第83回大会 9月13 - 15日、大阪大学豊中キャンパス、大阪

〔図書〕(計 1 件)

1. 黒谷玲子、浦 裕之、太組一朗 DDS 製剤の開発・評価と実用化手法 てんかん治療における DDS 開発のメディカルニーズ 技術情報協会：2013 325-329

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 3 件)

1. 名称：Therapeutic use of SCGB3A2
発明者：Shioko Kimura, Reiko Kurotani
権利者：The United States of America as represented by the Department of Health and Human Services (Washington, DC)
種類：39230989
番号：8,828,936
取得年月日：2014年9月9日
国内外の別：外（米国）
2. 名称：Use of SCGB3A2 for inhibiting or reducing pulmonary fibrosis caused by an anti-cancer agent
発明者：Shioko Kimura, Reiko Kurotani
権利者：The United States of America as represented by the Department of Health and Human Services (Washington, DC)
種類：39230989
番号：8,501,688
取得年月日：2013年8月6日
国内外の別：外（米国）
3. 名称：UGRP1/SCGB3A2 AS A GROWTH FACTOR AND ANTI-APOPTOTIC AGENT:Method of promoting lung development in a fetus and ex vivo
発明者：Shioko Kimura, Reiko Kurotani
権利者：The United States of America as represented by the Department of Health and Human Services (Washington, DC)
種類：39230989
番号：8,133,859
取得年月日：2013年3月13日
国内外の別：外（米国）

〔その他〕

ホームページ

山形大学工学部・大学院理工学研究科：

<http://www.yz.yamagata-u.ac.jp/>

黒谷研究：

<http://kurotani-lab.yz.yamagata-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒谷 玲子 (KUROTANI, Reiko)
山形大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号：00453043

(2) 研究分担者

阿部 宏之 (ABE, Hiroyuki)
山形大学・大学院理工学研究科・教授
研究者番号：10375199

柴田 陽光 (SHIBATA, Yoko)
山形大学・医学部・講師
研究者番号：60333978

(3) 連携研究者

熊木 伸枝 (KUMAKI, Nobue)
東海大学・医学部・講師
研究者番号：90366021