

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 13 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461194

研究課題名(和文)肺サーファクタント蛋白質の新たな生体防御機能：抗腫瘍活性と肺病態進展の防御機構

研究課題名(英文) Studies of pulmonary surfactant proteins on new aspects of host defense functions: anti-tumor activity and defensive activity against disease development.

研究代表者

黒木 由夫 (Kuroki, Yoshio)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：70161784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：肺サーファクタント蛋白質はEGFシグナルを抑制することにより、肺がん細胞の増殖と遊走・浸潤を抑制した。SP-DはCa<sup>2+</sup>依存性にEGFRの高マンノース型糖鎖に結合し、SP-AはCa<sup>2+</sup>非依存性にEGFRに結合することから、両者で異なる機序が示唆された。

SP-Aとそのペプチド(SAP01:Tyr161-Lys201領域)はhBD3刺激肥満細胞遊走を抑制し、喘息モデルラット気管において肥満細胞集積を現弱させた。SP-Aは、タバコ抽出液(CSE)曝露により分子内のreactive thiolが減少し、タバコ煙に含まれるアクロレインにより修飾を受け、修飾SP-Aは大腸菌増殖抑制能が現弱していた。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary surfactant proteins, SP-A and SP-D, suppress the growth and progression of lung cancer cells by attenuating the EGF signaling of EGFR phosphorylation and its downstream. SP-D interferes with the EGF binding to EGFR by binding to the high mannose type-sugar moieties of EGFR. SP-A binds to EGFR in a Ca<sup>2+</sup>-independent manner, indicating the different mechanism from that of SP-D. SP-A and its peptide (SAP01:Tyr161-Lys201) attenuate mast cell migration stimulated with hBD3 and weakened the accumulation of mast cells in the tracheas of asthma model rats. SP-A protein was modified by cigarette smoke extract (CSE) and acrolein containing in the cigarette smoke. The reduction of reactive thiol in the SP-A molecule and the addition of acrolein was observed. The modified SP-A exhibited the decreased ability to attenuate the E. coli growth.

研究分野：医化学

キーワード：肺サーファクタント 肺コレクチン EGFシグナル ディフェンシン アクロレイン 肺がん 肥満細胞

## 1. 研究開始当初の背景

肺サーファクタント蛋白質の SP-A と SP-D は、カルシウム依存性に糖質に結合するコレクチンに属し、肺における病原微生物の侵入阻止、過剰な炎症の抑制など、呼吸器の自然免疫生体防御において中心的な役割を担っている。

上皮増殖因子受容体 (epidermal growth factor receptor:EGFR) は、肺がん治療のターゲット分子である。EGFR は、膜貫通型受容体チロシンキナーゼで、リガンドである上皮増殖因子 (epidermal growth factor:EGF) と結合することによって 2 量体形成および自己リン酸化を起こし、下流の Ras/Erk シグナル、PI3K/Akt シグナルなどを活性化し、細胞の増殖、浸潤、アポトーシス抑制など癌の進展に関与している。従って、EGFR は癌治療の分指標的として注目され、EGFR-チロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) や抗 EGFR 抗体などが開発された。

BALF 中 SP-A と SP-D が減少する間質性肺炎患者で肺がんが合併しやすく、肺腺がん細胞株に SP-A を強制発現させるとヌードマウスでのがん転移が抑制されることから、SP-A と SP-D が肺がんの進行抑制に関与している可能性が示唆される。一方、SP-A と SP-D は糖質結合蛋白質で、糖蛋白質である増殖因子受容体 EGFR との相互作用により EGF シグナルを変化させ、その結果、腫瘍細胞増殖が抑制される可能性が考えられる。

SP-D KO マウス肺で異常 (泡沫化) 肺泡マクロファージが出現し、肺気腫様病変を呈し、加齢と喫煙によって SP-A と SP-D の動態が変化することから、肺コレクチンが肺疾患進展防御に関与していることが示唆されている。

抗菌ペプチドは、感染微生物を殺菌するだけでなく、炎症細胞の遊走・活性化、サイトカイン産生の調節など、様々な反応に関与する多機能性ペプチドである。一方で、抗菌ペプチドは高濃度になると宿主細胞に対しても細胞傷害性を示し、この過剰炎症が抗菌ペプチドの臨床応用の妨げとなっている。我々は、SP-A が抗菌ペプチドの一種であるヒトα-デフィエンシン (hBD3) の細胞傷害性を抑制することを報告した。

## 2. 研究の目的

本研究は、肺コレクチンの SP-A と SP-D が、病原微生物に対する感染防御作用、あるいは、

抗菌ペプチドによる細胞傷害抑制作用の他に、新たな生体防御作用 (抗腫瘍活性と肺病態進展防御) を有するかどうかを調べ、その分子機構を明らかにすることによって、肺コレクチン分子を用いる臨床応用のための分子基盤を確立することを目的として遂行された。

- (1) 肺コレクチンが腫瘍細胞の増殖と浸潤に影響を及ぼすかどうかを調べ、抑制効果を認めたら、その分子機構を明らかにする。
- (2) hBD3 は肥満細胞を活性化するが、その過程に SP-A とそのペプチド (SP-A の Tyr<sup>161</sup>-Lys<sup>201</sup> 領域: SAP01) が影響を与えるかどうかを調べ、その機序を明らかにする。
- (3) 肺コレクチン蛋白質に対する喫煙の影響を調べるために、SP-A をタバコ抽出液 (CSE) とアクロレインに暴露し、SP-A 蛋白質が化学修飾を受けるかどうかを分析し、修飾 SP-A の機能を調べた。

## 3. 研究の方法

- (1) 肺コレクチン、可溶性 EGFR 細胞外ドメイン (sEGFR) の調製  
SP-A、SP-D、および、sEGFR の組換え蛋白質は、CHO-K1 細胞を用いて、グルタミン合成酵素遺伝子増幅系を用いて、発現し、培養上清からアフィニティークロマトグラフィーによって精製した。
- (2) EGF の EGFR への結合動態  
<sup>125</sup>I-EGF を A549 細胞と培養することにより、細胞に結合した <sup>125</sup>I-EGF を γ-counter で測定した。
- (3) SP-D および SP-A と EGFR との結合  
A549 細胞から免疫沈降した EGFR あるいは sEGFR を電気泳動後、PVDF メンブレンに転写後、SP-D、SP-A を overlay して、抗体で検出することによる ligand binding を行った。  
表面プラズモン共鳴センサーによっても sEGFR と SP-D あるいは SP-A の結合を解析した。
- (4) がん細胞の細胞増殖、遊走・浸潤  
A549 細胞を SP-A もしくは SP-D 存在下で培養し、48 時間後に WST-1 アッセイを行い、生存細胞数を計測し

た。

トランスウェルダブルチャンバーに A549 細胞を播種し、EGF で刺激するとともに、SP-A あるいは SP-D を添加して培養し、2 2 時間後に下側チャンバー (FCS + ) に移動した細胞を DAPI 染色し、移動細胞を計測した。上側のチャンバー底にマトリゲルのないもので遊走能を、あるもので浸潤能を測定した。

( 5 ) hBD3 による肥満細胞の遊走刺激

ラット耳の皮下に hBD3 を投与し、耳介の血管透過性を調べるとともに、組織切片を抗トリプターゼ抗体で染色し投与部位周辺に集積した肥満細胞数を計測した。

トランスウェルダブルチャンバーの上側にラット腹腔由来肥満細胞を、下側に hBD3 を添加し、3 時間後に遊走した肥満細胞を計測した。

( 6 ) SP-A の化学修飾と分析

精製ヒト SP-A を 10% CSE (3R4F, Kentucky Tobacco Research Institute)、あるいは、acrolein (10  $\mu$ M あるいは 100  $\mu$ M) で曝露した。曝露 1 週間後のサンプルをリシルエンドペプチダーゼで酵素処理し、得られたペプチドの質量分析を行った。

SH の状態を N-(biotinoyl)-N7-(iodoacetyl)-ethylenediamine (Biotin-IAM) で標識した。アクロレインの付加については、抗アクロレイン抗体を用いた western blot で確認した。

4 . 研究成果

( 1 ) 肺コレクチンによる抗腫瘍活性とその分子機構

SP-D は濃度依存性に A549 細胞の増殖を抑制し、EGF による A549 細胞の遊走・浸潤を抑制した。SP-D は濃度依存性に A549 細胞、H441 細胞、EGFR 安定発現 CHO-K1 細胞の EGFR リン酸化、Erk リン酸化、Akt リン酸化を抑制した。SP-D が EGF と EGFR の結合に与える影響を調べたところ、SP-D は濃度依存性に  $^{125}$ I-EGF と A549 細胞の EGFR との結合飽和度を低下させた。A549 細胞由来 EGFR の糖鎖解析と SP-D との結合解析では、メンブレン上の A549

細胞由来 EGFR に SP-D が直接結合した。さらに、メンブレン上の EGFR 細胞外ドメインから成る可溶性組換え蛋白質 (sEGFR) に SP-D は結合したが、N 型糖鎖を切断した sEGFR には結合しなかった。ELISA においても SP-D と sEGFR との結合が確認され、EDTA とマンノースによって両者の結合が阻害された。また N 型糖鎖を切断した sEGFR には SP-D は結合しなかった。表面プラズモン共鳴センサーにおいても sEGFR と SP-D の結合が確認され、 $K_D = 3.2 \times 10^{-8}$  M であった。EDTA とマンノースにより両者の結合が阻害され、N 型糖鎖を切断した sEGFR には SP-D は結合しなかった。CHO-K1 細胞由来 EGFR の糖鎖を解析したところ、sEGFR のドメイン (EGF の結合部位) に存在する 328 番目と 337 番目のアスパラギン残基に高マンノース型の N 型糖鎖が存在することがわかった。

SP-D は EGFR の細胞外ドメインに存在する高マンノース型の N 型糖鎖に糖鎖認識領域を介して結合し、EGFR のリガンド結合を阻害することにより、EGF シグナルを抑制し、抗腫瘍作用をもたらすと考えられる。

次に、SP-A について、その抗腫瘍活性と機序を調べた。SP-A は、A549 細胞の増殖を濃度依存性に抑制し、EGF 刺激による癌細胞の遊走と浸潤を有意に抑制した。さらに、A549 細胞および EGF 発現 CHO-K1 細胞に対する EGF 刺激 EGFR、Erk と Akt のリン酸化を抑制した。また、H441 細胞、Sq1 細胞、Lu99 細胞と Lc817 細胞においても同様の結果であった。SP-A は、 $^{125}$ I-EGF の EGFR への結合を阻害した。ligand blot により、抗 EGFR 抗体で免疫沈降した EGFR に SP-A が直接結合することが示された。このことは、sEGFR への ligand blot と ELISA により確認されたが、SP-A は N 型糖鎖切断 sEGFR にも結合した。SP-A は  $Ca^{2+}$  非依存性に sEGFR に結合し、SP-D の EGFR への結合機序とは異なっていた。A549 細胞は gefitinib による増殖が抑制されるが、SP-A との併用により相乗効果を認めた。

( 2 ) SP-A による hBD3 刺激肥満細胞遊走の抑制

hBD3 による肥満細胞の活性化過程に SP-A と SP-A 由来ペプチド Tyr<sup>161</sup>-Lys<sup>201</sup> (SAP01) が影響を与えるかどうかを、ラット耳の皮下への hBD3 投与後に肥満細胞による血管透過性を指標に調べた。hBD3 と SP-A あるいは SAP01 を混合投与すると、hBD3 惹起血管透過性がコントロールと同程度にまで低下した。SP-A と SAP01 はラット腹腔由来肥満細胞の遊走を抑制したので、血管透過性抑制効果は、SP-A が肥満細胞の脱顆粒を抑制するのではなくて、遊走を抑制することによって惹起されると考えられた。これと一致して、hBD3 単独投与の場合はラット耳組織への肥満細胞の集積が観察されたが、SP-A の同時投与により肥満細胞の集積は有意に抑制されていた。

OVA 吸入により作製した喘息モデルラットに hBD3 を経気道的に投与すると気管への肥満細胞の集積が見られたが、hBD3 と SAP01 の同時投与では、気管に観察される肥満細胞は明らかに少なかった。SAP01 は、呼吸器においても hBD3 による肥満細胞遊走を抑制しうることを示している。

( 3 ) タバコ煙成分による肺サーファクタント蛋白質の化学修飾と機能への影響

SP-A 溶液にたばこ煙抽出液 (CSE)、あるいは、アクロレインを添加して 24 時間後、SP-A を SDS-PAGE により分析したところ、還元状態で通常分子サイズ (約 36kDa) の上方部に新たなバンドが認められた。CSE とアクロレインの曝露により、SP-A 分子内の reactive thiol の減少とアクロレイン付加が認められた。SP-A のアクロレイン修飾部位として、Histidine116 が得られた。CSE とアクロレインにより修飾された SP-A の大腸菌増殖抑制機能を調べたところ、修飾 SP-A は明らかに菌の増殖抑制活性が低下していた。

( 4 ) 今後の展望

SP-D と SP-A は肺がん細胞の EGF シグナルを抑制し、細胞増殖・遊走・浸潤を抑制することが明らかになった。特に、SP-D は、糖鎖認識領域を介して EGFR の高マンノース型糖鎖に結合し、EGFR のリガンド結合を阻害することで、下流シグナルを抑制すると考えられた。本研究は、レクチンが EGFR の N 型糖鎖に結合することによってリガンド結合が阻害され、下流シグナルが抑制されるという新たな EGF シグナルの制御機構を提唱している。さらに、EGFR は肺がんに対する治療戦略で最も重要な標的分子の一つであるので、SP-A と SP-D が EGFR 細胞外ドメインに作用することを考えると、EGFR 遺伝子変異が陰性で、EGFR チロシンリン酸化阻害薬に抵抗性の肺がんに対する治療に応用できる可能性を示唆している。

喘息患者では感染に反応して産生された hBD3 によって肥満細胞が過剰に活性化され、喘息を憎悪させる可能性もあるので、本研究による成果は、喘息憎悪の予防を目的として、SP-A ペプチドを応用できる可能性を示している。

肺サーファクタント蛋白質は COPD の発症進展への関連が報告されている。本研究では、COPD の憎悪因子と考えられる喫煙の肺サーファクタント蛋白質への影響を調べた。CSE とアクロレインが SP-A 分子を修飾し、その機能の現弱を招くことが本研究で示された。

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 )

- 1) Takahashi M, Hasegawa Y, Ikeda Y, Wada Y, Tajiri M, Ariki S, Takamiya R, Nishitani C, Araki M, Yamaguchi Y, Taniguchi N, Kuroki Y. (2013) Suppression of heregulin  $\beta$ -signaling by the single N-glycan deletion mutant of soluble ErbB3 protein. J. Biol. Chem. 288:32910-32921. DOI:10.1074/jbc.M113.491902(査読有)

- 2) Takamiya R, Takahashi M, Uehara Y, Ariki S, Hashimoto J, Hasegawa Y, Kuroki Y. (2014) The single N-glycan deletion mutant of soluble ErbB3 protein attenuates heregulin beta 1-induced tumor progression by blocking of the HIF-1 and Nrf2 pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 454:364-368. (査読有)  
DOI:10.1016/j.bbrc.2014.10.086
- 3) 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. (2015) Surfactant protein D suppresses lung cancer progression by downregulation of epidermal growth factor signaling. *Oncogene* 34:838-845. DOI:10.1038/onc.2014.20 (査読有)

[学会発表](計18件)

- 1) 長谷川喜弘、高橋素子、有木茂、高宮里奈、上原康昭、橋本次朗、高橋弘毅、黒木由夫．肺コレクチンによる EGF シグナルの制御機構．2013 年 9 月 11 日～13 日 第 8 6 回日本生化学会大会．パシフィコ横浜（横浜）
- 2) 高橋素子、長谷川喜弘、有木茂、高宮里奈、和田芳直、田尻道子、黒木由夫．可溶性 ErbB3 糖鎖欠損変異体とラパチニブのヘレグレンシグナル抑制作用における相乗効果．2013 年 9 月 11 日～13 日 第 8 6 回日本生化学会大会．パシフィコ横浜（横浜）
- 3) Takamiya R, Takahashi M, Ariki S, Hasegawa Y, Kuroki Y. Regulation of tumor microenvironment by tumor associated sialyl-tn antigen on integrin. 2014 年 4 月 16 日～21 日 American Thoracic Society International Conference 2014, San Diego (USA)
- 4) Hasegawa Y, Takahashi M, Ariki S, Uehara Y, Kuroki Y. Surfactant protein D suppresses lung cancer progression by downregulation of EGF signaling. 2014 年 4 月 16 日～21 日 American Thoracic Society International Conference 2014, San Diego (USA)

- 5) Uehara Y, Ariki S, Saito A, Takahashi M, Hasegawa Y, Kuroki Y. Surfactant protein A-derived peptide decreases cytotoxicity of human  $\beta$ -defensin 3 without attenuating antimicrobial activity. 2014 年 4 月 16 日～21 日 American Thoracic Society International Conference 2014, San Diego (USA)
- 6) 黒木由夫．特別講演：肺サーファクタントを巡る最新の話と今後の展望「肺コレクチンの研究から」 2015 年 10 月 31 日 日本肺サーファクタント・界面医学学会学術研究会 帝人ホール（大阪）

[図書](計1件)

高橋素子、有木茂、黒木由夫（2014）肺サーファクタントの感染・炎症防御における役割．*呼吸器内科* 26、科学評論社．P33-41

6. 研究組織

(1) 代表研究者

黒木由夫 (KUROKI YOSHIO)  
札幌医科大学・医学部・教授  
研究者番号：70161784

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

高橋素子 (TAKAHASHI MOTOKO)  
札幌医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：00303941

有木茂 (ARIKI SHIGERU)  
札幌医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：80464478

長谷川喜弘 (HASEGAWA YOSHIHIRO)  
札幌医科大学・医学部・助教  
研究者番号：90643180

(4) 研究協力者

高宮里奈 (TAKAMIYA RINA)  
上原康昭 (UEHARA YASUAKI)  
斎藤充史 (SAITO ATSUSHI)  
高橋弘毅 (TAKAHASHI HIROKI)