

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462067

研究課題名(和文)炎症性腸疾患におけるサーファクタントプロテインD (SP-D) の臨床応用

研究課題名(英文)The impact of surfactant protein d on inflammatory bowel disease

研究代表者

長谷川 博俊 (Hasegawa, Hirotoshi)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：00218455

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)：サーファクタントプロテイン D (SP-D)をコードする SFTPD 遺伝に注目し、UCにおけるSP-Dの役割について検討した。大腸炎モデルマウスは対照群に比して血中のSP-D濃度および、大腸粘膜におけるSP-Dタンパクレベルの上昇を認めた。さらに、SP-Dノックアウトマウスにおいて大腸炎モデルマウスを同様に作成したところ、通常の大腸炎モデルマウスに比して腸炎が軽減される傾向を認めた。SP-DがUCの発症・重症化に關与していることが示唆され、治療薬や発症の予防などに応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：We focused on surfactant, pulmonary-associated protein D (SFTPD) which encodes surfactant protein D (SP-D) and evaluated the role of SP-D in ulcerative colitis (UC) in this current study. In model mouse with dextran sulfate sodium (DSS) induced colitis, the serum level of SP-D was significantly higher compared with control mouse. In addition, relatively higher level of SP-D protein was observed in mucosa of colon in the mouse with DSS induced colitis mouse. Moreover, the severity of colitis induced by DSS was mitigated in SP-D deficiency mouse compared to wild mouse. Collectively, SP-D would be associated with pathogenesis and progression of UC and could be expected a target for prevention or treatment.

研究分野：大腸外科

キーワード：サーファクタントプロテインd 炎症性腸疾患

1. 研究開始当初の背景

潰瘍性大腸炎(UC)は直腸から連続性に大腸粘膜に慢性炎症を引き起こす特徴的な病理学像を呈する原因不明の炎症性腸疾患であり、その発症には遺伝子異常の関わりが示唆されている。網羅的解析により同定された感受性遺伝子として DLG5(10q22.3)、遺伝子間領域(10q21.1)、NKX2-3(10q24)などが surfactant protein D (SP-D)をコードする SFTPD 遺伝座(10q22.2-23.1)の近傍であることが明らかとなった()。その一塩基多型が UC の早期発症と関連していることが多く、その際の病変腸粘膜に SP-D が産生されていたことから、UC の病態に SP-D が関与している可能性が示唆された()。

SP-D は主に Ⅱ型肺胞上皮細胞で生成され、分子量 40kDa、通常 12 個の多量体で存在していて、肺構造の維持のみならず、抗体非依存自然免疫に重要である。肺において SP-D は炎症、免疫反応と深く関連しており、十二量体を形成している場合には抗炎症作用を示し、NO の存在下で 3 量体に変換されると炎症亢進作用を示す 2 面性を持っている()。また、SP-D が三量体に変換されることで分子量が小さくなり、血管透過性が亢進することで血中移行し、末梢血での SP-D が濃度上昇することが知られている()。SP-D は肺以外にも様々な臓器で発現していることが知られているが、その働きは明らかではない()。

外界と連続して常に細菌や抗原に曝露され、抗体非依存自然免疫機構が発達している肺と腸管はその相同性が知られており、炎症性腸疾患と慢性肺疾患においてもその相同性は同様に報告されている()ことから、何らかの腸炎が起きることで NOS 活性が上昇して NO が産生されることで、腸内の SP-D が三量体に形成され、その炎症亢進作用により腸炎の炎症が慢性持続することが、炎症性腸疾患の原因であるという仮説を立てた。

2. 研究の目的

UC における SP-D の役割について明らかにするために、大腸炎モデルマウスを作成し、SP-D の関与につき検討した。

3. 研究の方法

C57BL/6 マウス(6~8 週齢、雄)にデキストラン硫酸ナトリウム溶液(DSS)を 7 日間自由飲水させた大腸炎モデルマウス(DSS 群)を作成し、通常の飲料水を与えたコントロール群(control 群)と血中および組織の SP-D レベルにつき比較検討した。さらに DSS 群、SP-D ノックアウトマウスの大腸炎モデル(SP-D-KO DSS 群)、control 群について大腸炎の程度(臨床的重症度スコア、肉眼的重症度スコア、ミエロペルオキシダーゼ[MPO]活性、インターロイキン[IL]-6 濃度定量)につき比較検討した。

4. 研究成果

血中 SP-D 濃度の SP-D レベルに関しては DSS 群 25 匹(1 匹は死亡)、control 群 12 匹のマウスを、大腸炎の評価に関しては DSS 群 10 匹(1 匹は死亡)、SP-D-KO DSS 群 10 匹(1 匹は死亡)、control 群 12 匹のマウスを用いて行った。

血清 SP-D 濃度については DSS 群では control 群に比較して有意に高く(22.3 ± 5.46 vs. 6.88 ± 1.42 ng/mL, $p=0.02$ 図 1)、摘出大腸の免疫組織染色法による検討においても大腸粘膜に SP-D タンパクの発現が高い傾向が見られた(図 2)。

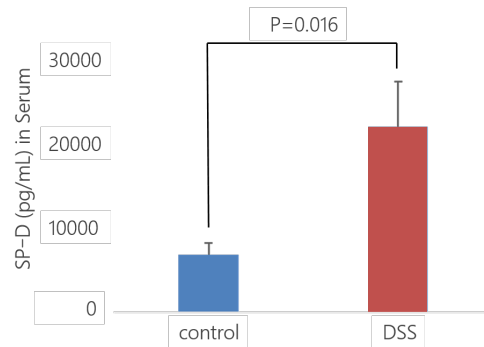


図 1 血清 SP-D レベル

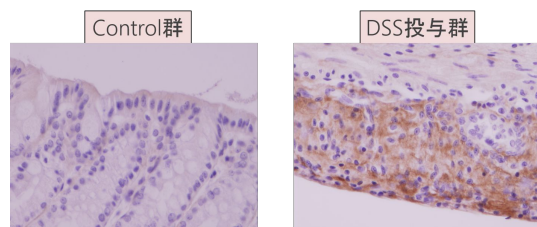
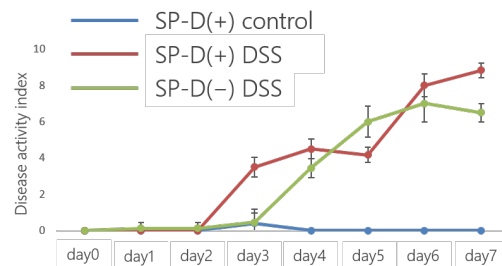


図 2 大腸粘膜の SP-D 免疫染色

大腸炎の評価については、臨床的重症度スコア(DSS 群 8.83 ± 0.41 , SP-D-KO DSS 群 6.50 ± 0.50 , control 群 0.00 ± 0.00 図 3)、肉眼的重症度スコア(DSS 群 5.33 ± 1.21 , SP-D-KO DSS 群 3.44 ± 0.73 , control 群 0.00 ± 0.00)では SP-D-KO DSS 群では DSS 群より有



意に腸炎の程度が低かった($p < 0.01$ 図 4)。

図 3 臨床的重症度スコア

摘出大腸における MPO 活性(DSS 群 0.91 ± 0.89 , SP-D-KO DSS 群 0.32 ± 0.31 , control 群 0.01 ± 0.01 U/mg of tissue)、IL-6 濃度定量(DSS 群 4.00 ± 3.71 , SP-D-KO DSS 群 1.58 ± 2.48 , control 群 0.18 ± 0.08 ng/mL)においても、

SP-D-KO DSS 群では DSS 群より腸炎の程度が低い傾向であった(ともに $p=0.08$ 図 5)。

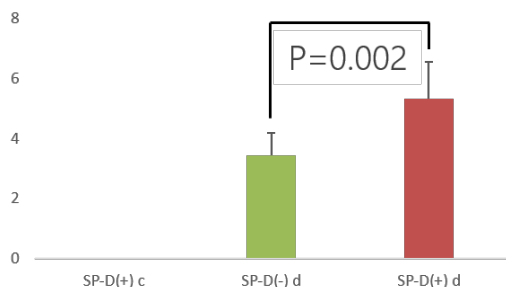


図 4 肉眼的重症度スコア

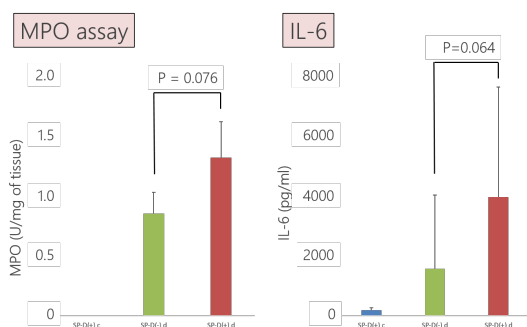


図 5 MPO 活性、IL-6 定量化

UC において、SP-D がその発症・重症化に関与していることが示唆された。今後、その分子的なメカニズムなどを明らかにすることで、治療薬や発症の予防などに有用となる可能性がある。

引用文献

Stoll M, Corneliusen B, Costello CM et al. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2004; 36: 476-80.

Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* 2007; 39: 596-604.

Parkes M, Barrett JC, Prescott NJ et al. Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility. *Nat Genet* 2007; 39: 830-2.

Tanaka M, Arimura Y, Goto A et al. Genetic variants in surfactant, pulmonary-associated protein D (SFTPD) and Japanese susceptibility to ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 918-25.

Atochina-Vasserman EN. S-nitrosylation of surfactant protein D as a modulator of pulmonary

inflammation. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1820: 763-9.

Sin DD, Leung R, Gan WQ et al. Circulating surfactant protein D as a potential lung-specific biomarker of health outcomes in COPD: a pilot study. *BMC Pulm Med* 2007; 7: 13.

Keely S, Talley NJ, Hansbro PM. Pulmonary-intestinal cross-talk in mucosal inflammatory disease. *Mucosal Immunol* 2012; 5: 7-18.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

発表者(代表)名: 矢作 雅史、長谷川 博俊
 発表演題: 潰瘍性大腸炎における新規増悪因子 surfactant protein D についての検討
 学会等名: 第 15 回 肺サーファクタント分子病態研究会
 発表年月日: 2016 年 6 月 4 日
 発表場所: 札幌医科大学(北海道札幌市)

発表者(代表)名: 矢作 雅史、長谷川 博俊
 発表演題: 潰瘍性大腸炎の新規感受性分子 surfactant protein D の可能性
 学会等名: 第 23 回 日本消化器関連学会週間消化器病学会
 発表年月日: 2015 年 10 月 9 日
 発表場所: グランドプリンスホテル新高輪(東京都品川区)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

長谷川 博俊 (HASEGAWA, Hirotochi)
 慶應義塾大学・医学部・准教授
 研究者番号: 00218455

(2) 研究分担者

鶴田 雅士 (TSURUTA, Masashi)
 慶應義塾大学・医学部・助教
 研究者番号: 00348666

(3) 連携研究者

なし

(4)研究協力者

矢作 雅史 (YAHAGI, Masashi)

田島 佑樹 (TAJIMA, Yuki)

豊田 尚潔 (TOYODA, Naoyoshi)