

サーファクタント SCGB3A2 を利用した COPD 治療薬開発のための基盤研究

山形大学大学院理工学研究科

准教授 黒谷 玲子

(共同研究者)

山形大学大学院理工学研究科 教授 阿部 宏之

はじめに

慢性閉塞性肺疾患(COPD)は、主に長期喫煙による気道と肺胞の慢性炎症により発症する。現在、日本の禁煙は進んでいるが、20歳代から喫煙を始めた40歳代以上の喫煙者のCOPD発症は多い。COPDでは末梢気道壁の肥厚・狭窄、肺胞壁の破壊、肺胞マクロファージ数の増加などの特徴を示す。新規サーファクタントセクレトグロビン(SCGB)3A2は、肺炎や肺線維症の改善効果と肺発生における細胞増殖効果を有し、種々の呼吸器疾患の改善薬としての応用が期待される⁽¹⁻⁴⁾。しかし、SCGB3A2はエンドトキシン(LPS)と高親和性であり⁽⁵⁾、リコンビナント(r)SCGB3A2精製が困難である。そこで、先行研究として、一部のSCGB3A2合成ペプチドの生理活性評価を行い、rSCGB3A2と同様の効果を得た。一般的に、合成ペプチドの活性や生体内での安定性が問題視されるが、経気道法による直接的な肺への投与が可能であるため、これらの問題を回避できる可能性が高い。そこで、COPD治療薬開発のためのSCGB3A2活性部位の決定とペプチド薬の開発を目指し、サーファクタントSCGB3A2を利用したCOPD治療薬開発のための基盤研究を行った。実験では、《1》合成ペプチドを用いたSCGB3A2の活性部位の決定、《2》*Scgb3a2*遺伝子改変マウスを用いたタバコ煙曝露COPDモデルの解析によるSCGB3A2のCOPDに対する改善効果の検証、《3》*Scgb3a2*遺伝子改変マウスの老化過程での肺の病理解析および遺伝子解析を行った。さらに、《4》呼吸器疾患モデルとして、肺炎マウスモデルに対するSCGB3A2ペプチドの投与時の抗炎症効果の検討を計画した。

結 果

SCGB3A2には、スプライシングによって3タイプ(Type A, B, C)が存在し⁽⁶⁾、Type AはE16.5(胎生16.5日)から8週齢(若齢, 成獣)までの肺で発現が高く、Type CはE16.5とE18.5の肺発現が高いが、8週齢の肺ではほとんど発現しないことが明らかになっている。このことから、呼吸器疾患に機能するSCGB3A2はType Aであり、肺発生ではType AおよびType Cが機能することが示唆された。

そこで、初めに、最も長いアミノ酸配列であるType Cに対して網羅的に20アミノ酸残基のペプチドを合成し（図1）、各Type C ペプチド（pep 1-9、図中①～⑨）存在下での細胞増殖効果、気管支分岐促進効果、アポトーシス抑制効果を検討した。初めに、マウス線維芽細胞株MLg細胞の細胞増殖率をMTTアッセイによって求めた結果、

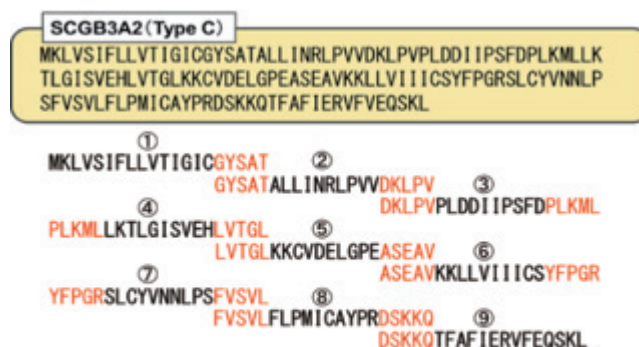


図1 SCGB3A2 Type Cペプチドの合成

しかし、pep 1はシグナルペプチドのため生体内の生理機能には関与しない。次に、ICRマウスのE11.5肺の器官培養によって、Type C pep 6とpep 9による有意な気管支分岐率増加を認めた（図2B）。さらに、肺気腫の原因物質アクロレイン（ACR）誘導性アポトーシスは⁽⁷⁾、Type C pep 8で有意に減少し、Type C pep 6でも減少傾向が示された（図2C）。以上より、Type CのC末端側の

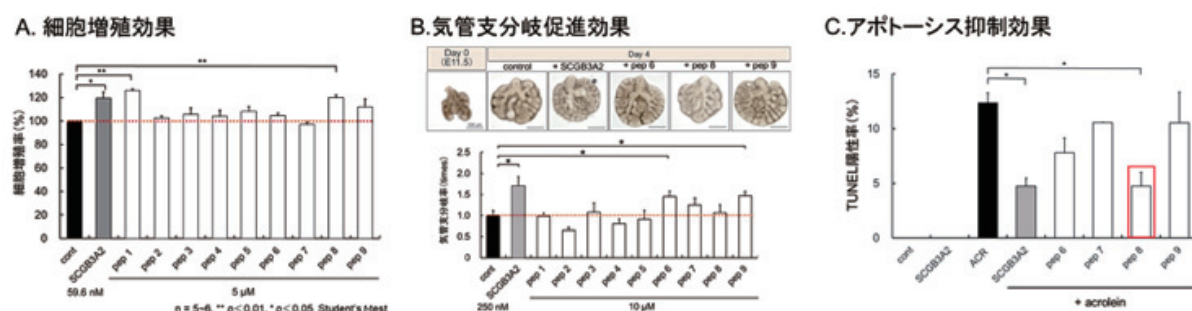


図2 SCGB3A2 Type Cペプチドの機能評価

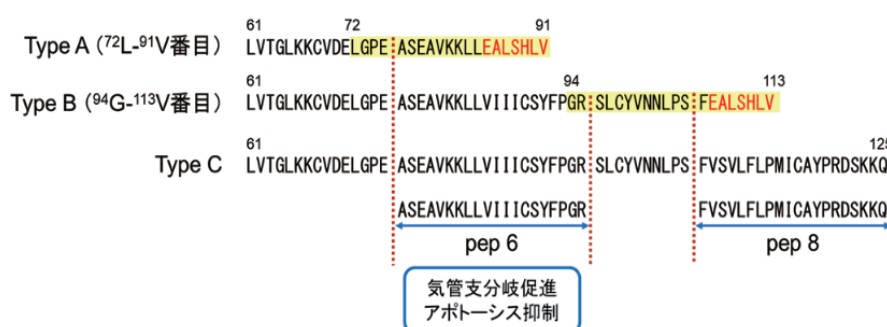


図3 SCGB3A2 Type A、Type Bペプチドの合成とType Cペプチドとの比較

アミノ酸配列がSCGB3A2の生理作用に重要であることが示唆された。そこで、Type AとType BのC末端側のペプチドを合成し（図3）、Type Cと同様の解析とSCGB3A2の細胞内シグナルの一つであるSTAT3の活性を調べた。その結果、Type Aペプチドは、細胞増殖効果、気管支分岐促進効果、アポトーシス抑制効果を有し、Type Bペプチドは気管支分岐促進や

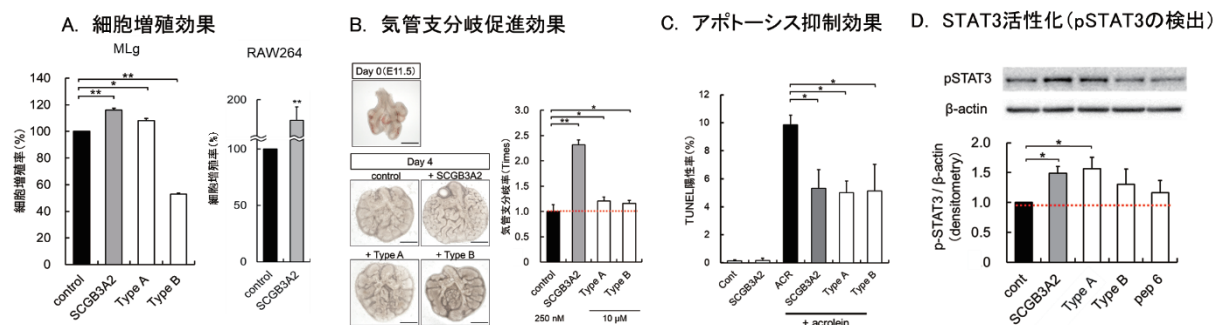


図4 SCGB3A2 Type AとType Bペプチドの機能評価

アポトーシス抑制作用は示したが、細胞増殖を有意に抑制した (図4A-C)。さらに、Type AペプチドはSTAT3を活性化 (pSTAT3) することも明らかになった (図4D)。

SCGB3A2のCOPD改善効果は、既に*Scgb3a2*遺伝子改変マウス (過剰発現:Tg、欠損マウス:KO) を用いたタバコ煙曝露COPDモデル解析によって検証されている。本研究では、STATに着目して⁽⁸⁾、SCGB3A2の肺気腫改善メカニズム解明を行った。SCGB3A2はSTAT3を活性化 (pSTAT3) し、肺気腫の発症抑制に重要な遺伝子である α アンチトリプシン (A1AT、*Serpina1*) の発現を促進すると仮定し、ChIPアッセイとリポーターアッセイを用いて検証した。STAT3の2か所のSTAT結合候補部位への結合は、正常マウス肺とSCGB3A2刺激後のMLg細胞で明らかになった (図5A、B)。加えて、IL-6刺激によるSTAT3発現下のHEK細胞で、*Serpina1*の転写は有意に増加することが示された (図5C)。

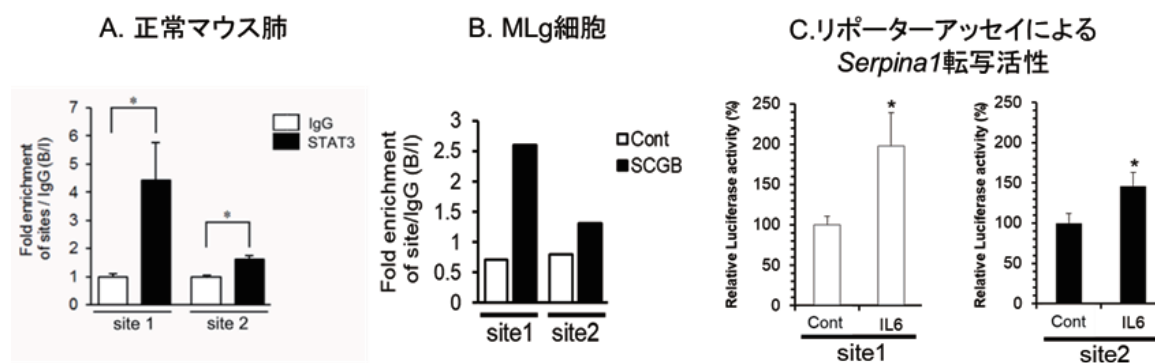


図5 SCGB3A2-STAT3-*Serpina1* (A1AT)メカニズムの検証

ここで、野生型 (WT) と*Scgb3a2*-KOマウスに対し、老化 (8週齢から2年齢) に伴う肺組織観察を行った。1年齢からKOマウスの肺胞腔は拡張し、WTと比較して、平均肺胞壁間距離 (Lm) は有意に増加した (図6)。また、KOマウスのDestructive Index (DI: 肺胞壁の破壊の程度の指標) は、WTと比較して、8週齢から有意に高く、1年齢で増加した (図6)。加えて、KOマウス肺へのリンパ球の集積は、老化に伴い増加した (データは示さない)。KOマウスの老化に伴ったリンパ球増加や肺気腫の発症原因を理解するために、主な肺サーファクタント (SP: SCGB1A1、SP-A、SP-B、SP-C、SP-D) の遺伝子 (*Scgb1a1*、*Sftpa*、

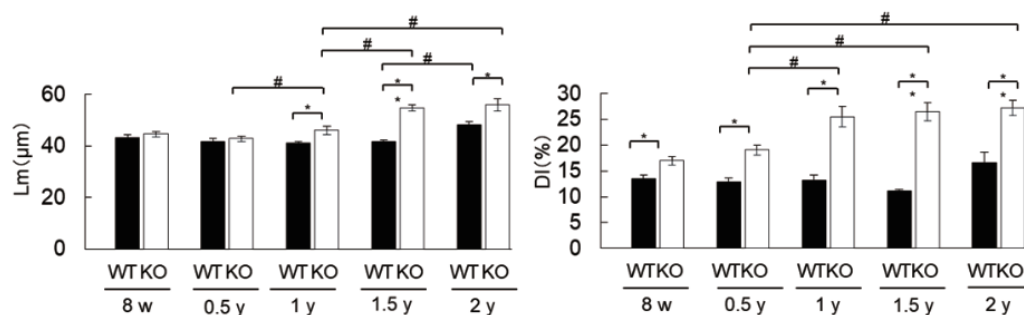


図6 老化に伴うWTマウスとKOマウスのLm(左) とDI(右)評価

Sftpb、*Sftpc*、*Sftpd*) 発現を定量RT-PCRにて測定した。主なSP遺伝子発現は、WTマウスでは若齢である8週齢から2年齢までの期間で一定、もしくは増加するが、KOマウスではほとんど低下していた(データは示さない)。

これまでの研究結果から、SCGB3A2ペプチドのCOPDを含めた呼吸器疾患への有効性が期待された。そこで、SCGB3A2ペプチドの生体内での薬剤効果の検証として、気管支喘息(肺炎)マウスモデルへのSCGB3A2ペプチドの経気道法による投与実験を計画した(データは示さない)。マウスに10 mg/ml/Kgのチキンオボアルブミン(cOVA)を気管支噴霧した結果⁽⁹⁾、予想以上の肺炎が誘導された。そのため、気管支噴霧濃度を1 mg/ml/Kgと2 mg/ml/Kgにした時の肺炎の程度を観察し、肺炎モデル作製のための感作条件をcOVA濃度、2 mg/ml/Kgと決定した。

考 察

先行研究によるタバコ煙曝露COPDマウスモデルの組織解析の結果、SCGB3A2のCOPD治療効果の有効性が期待された。しかし、SCGB3A2はLPS高親和性という薬剤利用としては不都合な性質も有しており、LPSの除去法の確立やLPS混入を避けるSCGB3A2調整法の確立が必要であった。そこで、本研究では、LPS混入回避法の一つとして、rSCGB3A2と同等の生理活性を示すSCGB3A2のペプチドの利用に期待した。

SCGB3A2 Type Cペプチドの生理活性評価によって、SCGB3A2 Type CのC末端側が重要なアミノ酸配列であることが示された。発現時期と発現量解析から、SCGB3A2 Type Aが生体では主な機能を示すと考えられるが、胎仔肺の発生時期には、Type Cの利用も有効であることが初めて示された。また、SCGB3A2 Type Aの生理活性評価によって、Type Aペプチドの利用が期待されるが、SCGB3A2タンパク質の生理活性より弱い活性もあった。おそらく、Type Aペプチドのアミノ酸残基数の増加や糖修飾によって、Type Aペプチドの活性の改善や向上が可能である。

本研究では、SCGB3A2の肺気腫抑制メカニズムとしてSTATに着目した。SCGB3A2はSTAT1のリン酸化と肺線維化抑制に働くSMAD7の発現促進によって肺線維症を抑制する⁽³⁾。

また、COPD発症抑制に関連のあるA1AT発現はSTAT3に調節されるという報告がある⁽⁸⁾。そこで、SCGB3A2刺激によって活性化されたSTAT3 (pSTAT3) がA1AT (*Serpina1*) に直接結合し、*Serpina1* の転写活性を上方制御すると仮定し、*Serpina1* 遺伝子上の2か所のSTAT結合候補部位への結合を検証した。この検証によって、正常マウス肺では通常STAT3が*Serpina1* 遺伝子に結合すること、その結合はSCGB3A2刺激によって促進されることが示唆された。STAT3発現を誘導するIL-6刺激によって*Serpina1* の転写活性は有意に増加したことを考慮すると、SCGB3A2による肺気腫改善効果は、SCGB3A2がSTAT3を活性化 (pSTAT3) させ、pSTAT3が*Serpina1* 遺伝子に直接結合して*Serpina1* 遺伝子 (A1AT) 発現を促進する「SCGB3A2-STAT3-A1AT系」を介したメカニズムによって得られることが示された。

さらに、WTマウスとKOマウスの老化過程の肺組織観察は、SCGB3A2が呼吸器疾患の発症を抑制する重要な役割を持つことを裏付けた。この時、主なサーファクタント (SP) 遺伝子発現解析によって、WTに比べてKOマウスでのSP遺伝子発現は全体的に低い傾向であることが明らかになった。SP-Bは、SP-Cの発現制御や⁽¹⁰⁾、SP-Aの*Sftpb*, *Sftpc*, *Sftpd* の転写調節に関与するほか⁽¹¹⁾、SP-Aとの直接的相互作用⁽¹²⁾ が報告され、加齢における肺の恒常性と肺における免疫系への関与も考えられている⁽¹³⁾。SP-Cは、肺サーファクタントの安定性と炎症の軽減に機能する⁽¹⁴⁻¹⁶⁾。データは示さないが、WTマウスとKOマウス肺の*Sftpa*, *Sftpb*, *Sftpc* の発現レベルの1年齢以降の顕著な違いは、1年齢以降にKOマウス肺でのリンパ球集積増加や肺気腫発生が観察され始めた時期と一致する。すなわち、SP-A、SP-B、SP-Cに加え、SCGB3A2も加齢とともに低下する肺の恒常性と免疫系の維持に必要であると推察する。

一般的に、合成ペプチドは生体内で分解されやすく、不安定であると考えられている。本研究では、ターゲットが肺であることから、経気道法によって合成SCGB3A2ペプチドを肺へ直接投与し、ペプチド分解を回避できる。そこで、肺炎モデルマウス作製のための抗原 (cOVA) 濃度を検討した。参考にした文献の抗原濃度条件では⁽⁹⁾、予想以上に強い炎症が誘導された。この結果は、本研究ではマウス専用の気管内噴霧スプレーを使用して直接肺に抗原を曝露したために、結果的に肺組織内での抗原濃度が増加したためと考えられる。最近の実験で、適切な感作 (曝露) 条件が決定したため、今後の合成ペプチドの効果の検証に期待している。

要 約

本研究によって、SCGB3A2の生理活性部位は、C末端側に存在することが明らかになった。Type Aは胎生期の肺の発生や成熟と呼吸器疾患改善に貢献すること、胎生期にType Cも重要であることが明らかになった。Type A (⁷²L-⁹¹V) の活性は、SCGB3A2タンパク質に類似した活性を示し、今後のペプチド改変による高活性のペプチド作製に期待している。

COPDモデルマウス解析によるSCGB3A2の肺気腫抑制効果は、老化マウスの肺組織解析によっても裏付けられた。また、SCGB3A2の肺気腫抑制メカニズムとして、「SCGB3A2-STAT3-A1AT系」の存在が初めて示された。本研究は、サーファクタントSCGB3A2を利用したCOPD治療薬開発のための基盤研究として、多くの情報を提示できた。しかし、経気道法によるSCGB3A2 Type Aペプチド投与による肺炎の改善効果とCOPD改善効果の検証は残されており、今後のモデル動物実験による検証はSCGB3A2のCOPD治療薬開発の実現に極めて重要であると考ええる。

文 献

1. Chiba Y, UKurotani R, Kusakabe T, Miura T, Link BW, Misawa M, Kimura S. Uteroglobin-related protein 1 expression suppresses allergic airway inflammation in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 173 (9) :958-964, 2006.
2. Kurotani RUH, HTomita TH, HYang QH, HCarlson BAH, HChen CH, HKimura SH. Role of Secretoglobin (SCGB) 3A2 in Lung Development. *Am J Respir Crit Care Med.* 178 (4) :389-398, 2008.
3. Kurotani R, Okumura S, Matsubara T, Yokoyama U, Buckley JR, Tomita T, Kezuka K, Nagano T, Esposito D, Taylor TE, Gillette WK, Ishikawa Y, Abe H, Ward JM, Kimura S. Secretoglobin 3A2 suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis by TGFbeta signaling down-regulation. *J Biol Chem.* 286 (22) :19682-19692, 2011.
4. 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.* 15:72, 2015.
5. Yokoyama S, Cai Y, Murata M, Tomita T, Yoneda M, Xu L, Pilon A L, Cachau RE, Kimura S A novel pathway of LPS uptake through syndecan-1 leading to pyroptotic cell death *Elife.* 7:e37854, 2018
6. Niimi T, Keck-Waggoner CL, Popescu NC, Zhou Y, Levitt RC, Kimura S. *Mol Endocrinol.* 15 (11) :2021-2036, 2001.
7. 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.* 48 (2) :61-68, 2015.
8. Morgan K, Marsters P, Morley S, van Gent D, Hejazi A, Backx M, Thorpe ER, Kalsheker N. Oncostatin M induced alpha1-antitrypsin (AAT) gene expression in Hep G2 cells is mediated by a 3' enhancer *Biochem J.* 365 (Pt 2) , 555-560, 2002.
9. Park S, Baek H, Jung KH, Lee G, Lee H, Kang GH, Lee G, Bae H. Bee venom phospholipase A2 suppresses allergic airway inflammation in an ovalbumin-induced asthma model through the induction of regulatory T cells *Immun. Inflamm. Dis.* 3 (4) :386-397, 2015.

10. Wert SE, Whitsett JA, Noguee LM: Genetic disorders of surfactant dysfunction. *Pediatr Dev Pathol* 12(4) :253-274, 2009.
11. Korutla L, Strayer DS: SP-A as a cytokine: surfactant protein-A-regulated transcription of surfactant proteins and other genes. *J Cell Physiol* 178 (3) :379-386, 1999.
12. Sarker M, Jackman D, Booth V: Lung surfactant protein A (SP-A) interactions with model lung surfactant lipids and an SP-B fragment. *Biochemistry* 50 (22) :4867-4876 2011.
13. Botas C, Poulain F, Akiyama J, Brown C, Allen L, Goerke J, Clements J, Carlson E, Gillespie AM, Epstein C et al: Altered surfactant homeostasis and alveolar type II cell morphology in mice lacking surfactant protein D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (20) :11869-11874, 1998.
14. Glasser SW, Burhans MS, Korfhagen TR, Na CL, Sly PD, Ross GF, Ikegami M, Whitsett JA: Altered stability of pulmonary surfactant in SP-C-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (11) :6366-6371, 2001.
15. Jin H, Ciechanowicz AK, Kaplan AR, Wang L, Zhang PX, Lu YC, Tobin RE, Tobin BA, Cohn L, Zeiss CJ et al: Surfactant protein C dampens inflammation by decreasing JAK/STAT activation during lung repair. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 314 (5) :L882-L892, 2018,.
16. Mulugeta S, Beers MF: Surfactant protein C: its unique properties and emerging immunomodulatory role in the lung. *Microbes Infect* 8 (8) :2317-2323, 2006.