

様式3

群馬大学生体調節研究所内分泌・代謝学共同研究拠点共同研究報告書

平成 28年 4月 21日

群馬大学生体調節研究所長 殿

所属機関名 東京大学
職 名 保健・健康推進本部 助教
研究代表者 齋藤 朗

下記のとおり平成27年度の共同研究成果を報告します。

記

(課題番号: 15014)

1. 共同研究課題名	肺上皮細胞における Rab27 関連分子の機能の解明				
2. 共同研究目的	肺上皮細胞からの生理活性物質の分泌における Rab27 関連分子の作用を明らかにすることで、肺での生理反応の制御機構に関する理解を深める				
3. 共同研究期間	平成 27年 4月 1日 ~ 平成 28年 3月 31日				
4. 共同研究組織					
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担		
(研究代表者) 齋藤 朗	東京大学保健・健康推進本部	助教	主任研究者		
(分担研究者) 堀江 真史	東京大学保健・健康推進本部	助教	分担研究者		
5. 群馬大学生体調節研究所 の共同研究担当教員	分野名	遺伝生化学	氏 名	泉 哲郎	

※ 次の6, 7, 8の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

(課題番号:)

6. 共同研究計画

肺上皮細胞は、長年、病原体などの外的異物の体内侵入を防ぐ単なる物理的バリアーとして作用すると考えられてきたが、近年、分泌細胞としての機能が明らかにされ、肺での生理反応の制御における肺上皮細胞由来の生理活性物質の重要性が、特に注目されている。インスリンやカテコラミンなど顆粒に蓄えられている物質の分泌を担う調節性分泌機構において中心的な役割を果たす Rab27 及びそのエフェクター分子が、肺上皮細胞に発現することは既に報告されているが、その役割は、ほとんど解明されていない。本申請研究では、個体、細胞、両レベルの実験系を用いて、Rab27 関連分子の肺上皮細胞における機能を明らかにすることで、肺内ホメオスタシスの維持や、喘息、肺線維症、癌など、様々な呼吸器疾患の病態形成における Rab27 関連分子の役割を解明したいと考え、下記の実験計画を立てた。

1) 細胞レベルでの検討:

マウス肺から単離した肺上皮細胞や、ヒトやマウス肺上皮細胞セルラインを用いて、肺上皮細胞における Rab27 関連分子の発現を確認する。更に、各分子の遺伝子欠損マウス由来肺上皮細胞や、各分子をノックダウンした肺上皮細胞を用いて、各分子の欠損が肺上皮細胞からの生理活性物質(サーファクタント、サイトカイン、エキソソームなど)の放出に及ぼす効果を検討する。免疫染色により、肺上皮細胞における生理活性物質と Rab27 関連分子との局在パターンを解析する。

2) 個体レベルでの検討:

肺上皮細胞がその病態形成上重要な役割を果たすと考えられている各種呼吸器疾患(喘息、肺線維症、癌など)モデルにおける野生型マウスと各分子の遺伝子欠損マウスの表現型の違いを検討する。

7. 共同研究の成果

本共同研究において、H27 年度には下記の結果を得た。

1) 細胞レベルでの検討の結果:

肺上皮細胞の中でも、II 型肺胞上皮細胞は、肺サーファクタントやサイトカインなど、様々な生理活性物質を分泌する細胞として知られている。そこで、本研究では、まずこの II 型肺胞上皮細胞に注目し、そこでの Rab27 関連分子の発現を検討した。定法に則り、Dispase および DNase I を用いて肺単細胞懸濁液を作成した後、血球系のマーカーである CD45 および上皮細胞のマーカーである CD326 を、蛍光色素が結合した各マーカー特異的な抗体を用いて染色した後、CD45-CD326+ の上皮細胞成分を、FACS sorting により単離した。単離後の CD45-CD326+ の細胞の純度は 95%前後であった。なお、この方法により単離される上皮細胞は、ほとんどが SPC 陽性の II 型肺胞上皮細胞であることは既に報告されている。次に、単離した II 型肺胞上皮細胞から mRNA を抽出し、real time RT-PCR 法にて、各種 Rab27 関連分子の mRNA の発現を検討した。その結果、既報通り、Rab27 の二つのアイソタイプ Rab27a, Rab27b いずれもの発現を確認した。そして、活性型 Rab27 に結合してその機能を修飾するエフェクター分子(11種類が報告されている)に関しては、4種類のエフェクター分子の発現を確認した。H28 年度は、下記の個体レベルでの検討の結果に伴い、これら II 型肺胞上皮細胞に発現を認めた Rab27 関連分子の中の1つの分子に特に注目して、その細胞内局在や機能を明らかにしていきたいと考えている。

2) 個体レベルでの検討の結果:

上記の細胞レベルの検討の結果 II 型肺胞上皮細胞に発現を認めたすべての Rab27 関連分子に関して、その分子の遺伝子欠損マウスと野生型マウスとで、喘息モデルの表現型を比較検討した。その結果、4分子の遺伝子欠損マウスで、喘息の増悪を認めた。これらの分子は、いずれも、血球系免疫担当細胞にも発現を認めた。そこで、各遺伝子欠損マウスにおける喘息増悪の責任細胞が、肺上皮細胞などの非血球系細胞なのか、血球系細胞なのかを明らかにするために、野生型マウスと各分子遺伝子欠損マウスとの間で骨髓キメラマウスを作製し、喘息モデルの表現型を比較検討した。その結果、4分子の中の1分子の遺伝子欠損マウスの表現型表出が非血球系細胞に依存するのに対し、残りの3分子の遺伝子欠損マウスの表現型が、血球系細胞に依存することを確認した。そこで、H28 年度は、その遺伝子欠損マウスの喘息増悪の責任細胞が非血球系細胞であることが明らかになった1分子に特に着目して、その欠損が喘息を増悪させる機序を解明していきたいと考えている。

8. 共同研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本研究所の担当教員の氏名の記載、又はこの共同研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

本研究成果は、現在、論文投稿準備中である。