



# Rad9 is upregulated and plays protective roles in an acute lung injury model

山本, 正嗣

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4478

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004478>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	山本 正嗣
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学 位 記 番 号	博い第 4478 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Rad9 is upregulated and plays protective roles in an acute lung injury model  
(Rad9 は急性肺傷害モデルで発現が亢進し保護的な役割を果たす)

審 査 委 員

主 査	教 授	平田 健一
	教 授	大北 裕
	教 授	前川 信博

## 背景

急性肺傷害(ALI)の病態は非心原性透過性亢進肺水腫である。肺胞上皮は間質から肺胞腔へのタンパク質と水分の移行を調節する強固なバリアであり、血管内から肺胞内への水分漏出に防御的に働いている。このバリアが破綻すると透過性が亢進し、肺胞腔は滲出液で満たされる。また、損傷を受けた肺胞上皮細胞の修復には線維化が伴い、これがガス交換機能の低下の原因となる。

これまでの報告では ALI で死亡した患者の肺胞上皮細胞にアポトーシスに伴う構造変化が観察されており、またエンドトキシン気管内注入によるマウス肺傷害モデルでも肺胞上皮細胞のアポトーシスが認められている。

細胞は傷害を受けた際にそれを感知し、細胞周期を停止し修復するか細胞死に至るかを決定する機構をもつ。その経路のもっとも上流にある、DNA 損傷に対するセンサーとしての役割を果たすタンパクのひとつに、Rad9-Hus1-Rad1 複合体が知られている。これはヘテロトリマーを形成し、DNA 損傷部位に結合する。細胞周期のチェックポイントや DNA 修復に関わるタンパクを結合する。

本研究では ALI での肺胞上皮細胞に着目し、Rad9 の役割について検討した。リポポリサッカライド(LPS)、ブレオマイシン(BLM)によるマウス肺傷害モデルを作成し、また、肺胞上皮細胞のモデルとしてマウス肺から単離した肺胞上皮細胞と A549 細胞株を用いて細胞周期とその制御タンパクとしての Checkpoint kinase 1 (Chk1)、細胞死について検討した。

## 方法

### 動物モデル

8-10 週令オスの C57BL/6 マウスを用いた。以下の肺傷害モデルを作成し、マウス肺パラフィン切片で Rad9 の免疫染色を行った。肺ホモジネートでウェスタンブロットによる Rad9 の発現量を検討した。

### BLM 肺傷害モデル

気管内投与モデル：

麻酔下に気管を露出し、BLM 10 $\mu$ g/kg を 50  $\mu$ L の PBS に溶解し、29G 針で気管内投与した。

全身投与モデル： Day -6, -4, -2, 0 に BLM 1mg/body を腹腔内投与した。

### LPS 肺傷害モデル

LPS 50mg/kg を腹腔内投与した。

### 細胞モデル

マウス肺から単離した 2 型肺胞上皮細胞、A549 細胞株を用い、BLM、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による細胞傷害モデルを作成し、ウェスタンブロットによる検討を行った。

### siRNA による knockdown

hRad9 の 5'-AAGUCUUUCCUGUCUGUCUUC-3' の配列に対する siRNA を用いて、A549 細胞のノックダウンを行い、BLM、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> による傷害時の細胞周期、生存率の変化を検討した。細胞周期は SRL に外注 (DNA ヒストグラム)、生存率は WST-8 法 (Dojindo, cell counting kit 8) を用いた。

## 結果

### 急性肺傷害モデルでは Rad9 が肺胞上皮細胞に発現する。

BLM 気管内投与モデル肺では、コントロールと比して Rad9 の免疫染色で気道上皮、肺胞上皮を中心に発現が認められた。マウス肺ホモジネートの Western blot 法による Rad9 発現の解析では、BLM 気管内投与 12 時間後より発現が亢進し、24 時間後までに著明に発現が亢進することが示された。BLM 全身投与モデル肺では、胸膜下に炎症とそれに伴う線維化が巣状に生じた。Rad9 の免疫染色ではこうした炎症巣の周囲の肺胞上皮細胞に発現の亢進を認めた。

LPS 全身投与モデルでは肺胞への炎症細胞浸潤が認められる。Rad9 の免疫染色では炎症巣の肺胞上皮細胞に Rad9 が発現していることが認められた。LPS 全身投与後の Rad9 発現量を全肺ホモジネートの Western blot 法で解析すると、投与 4 時間後の早い段階から発現が増加し、24 時間後には発現がピークよりも減少した。

### BLM 暴露によって肺胞上皮細胞での Rad9 発現が増強する。

A549 での Western blot 法では、BLM 暴露によって Rad9 が誘導されることが示された。肺胞上皮細胞をマウス肺から単離し、BLM による傷害をおこしても同様に Rad9 の発現が増強した。

### Rad9 のノックダウンにより細胞がストレスに脆弱になる。

A549 で rad9 のノックダウンを行うと、WST-8 法で BLM による傷害に対してより低濃度で生存細胞数が低下し、より脆弱になることが示された。

### Rad9 のノックダウンにより細胞周期停止が抑制される。

BLM による傷害によって細胞周期が停止し、G2 期の細胞が増加した。Rad9 のノックダウンにより G2 期の割合が低下した。細胞抽出液の Western blot 法では Rad9 のノックダウンによってリン酸化 Chk1 が減少していることが示された。Chk1 の発現量は変化していなかった。

## 考察

細胞周期に関連したタンパクとして p53、p21、PCNA などについては ALI との関連を示す報告がある。今回の検討で、BLM 投与モデルでは、気道上皮細胞、肺胞上皮細胞に Rad9 の発現増加を認めた。気管内投与モデルでは肺傷害の病態のほかに DNA 障害をきたす BLM による直接的な傷害も関与していると考えられる。全身投与モデルで認められる肺野末梢に生じた炎症巣ではとくにその周囲の肺胞上皮細胞に Rad9 の発現の増強を認めた。敗血症と ALI のモデルである LPS 投与モデルでも、炎症細胞の浸潤を認める部分の肺胞上皮細胞に Rad9 の発現を認めた。これら Rad9 の発現は ALI の早い時期に炎症に伴い増強を認めた。A549 細胞、マウス肺より単離した肺胞上皮細胞を BLM、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> で傷害しても 3h 後より Rad9 の増加が認められた。Rad9 は炎症が生じている早期より発現増強していると考えられた。

Rad9 の肺胞上皮細胞での役割を siRNA でノックダウンすることにより検討すると、Rad9 ノックダウンにより細胞が脆弱となった。細胞周期では G2 期停止細胞の割合が低下した。Chk1 リン酸化が Rad9 のノックダウンによって減少していたことから、Rad9 は肺胞上皮細胞において Chk1 のリン酸化を介して G2 停止に関わっていることが示唆された。放射線傷害モデルでも Rad9 をノックダウンすると DNA 合成が抑制されず、逆にそのことで遺伝子変異、染色体異常をきたし、生存率は低下することが報告されている。

Rad9 は DNA 損傷に対する細胞内伝達の初期段階に関与しており、細胞障害に対して細胞周期を停止し、細胞を修復に向かわせるのに必要であることが示唆された。ALI での肺胞上皮細胞においてこうした DNA 損傷に伴う経路がかかわっていることが示された。このような肺胞上皮での傷害のメカニズムの解明によって ALI の早期診断早期治療につながる新たな方策の開発が期待できるものと考えられた。

## 論文審査の結果の要旨

受付番号	甲第 1969 号	氏 名	山本 正嗣
論文題目 Title of Dissertation	Rad9 is upregulated and plays protective roles in an acute lung injury model  Rad9 は急性肺傷害モデルで 発現が亢進し保護的な役割を果たす		
審査委員 Examiner	主 査 平田 健一 Chief Examiner 副 査 前川 信博 Vice-examiner 副 査 大井 和 Vice-examiner		
審査修了日	平成 21 年 1 月 21 日		

(要旨は 1,000 字～2,000 字程度)

急性肺傷害(ALI)の病態は非心原性透過性亢進肺水腫である。これまでの報告では ALI で死亡した患者の肺胞上皮細胞にアポトーシスに伴う構造変化が観察されており、またエンドトキシン気管内注入によるマウス肺傷害モデルでも肺胞上皮細胞のアポトーシスが認められている。細胞は傷害を受けた際にそれを感知し、細胞周期を停止し修復するか細胞死に至るかを決定する機構をもつ。その経路のもっとも上流にある、DNA 損傷に対するセンサーとしての役割を果たすタンパクのひとつに、Rad9-Hus1-Rad1 複合体が知られている。申請者らは ALI での肺胞上皮細胞に着目し、リポポリサッカライド(LPS)、ブレオマイシン(BLM)によるマウス肺傷害モデルを用いて、Rad9 の役割について検討した。また、肺胞上皮細胞のモデルとしてマウス肺から単離した肺胞上皮細胞と A549 細胞株を用いて細胞周期とその制御タンパクとしての Checkpoint kinase 1 (Chk1)、細胞死について検討した。

BLM 気管内投与モデル肺では、コントロールと比して Rad9 の免疫染色で気道上皮、肺胞上皮を中心に発現が認められた。マウス肺ホモジネートの Western blot 法による Rad9 発現の解析では、BLM 気管内投与により発現が亢進した。BLM 全身投与モデル肺では、胸膜下に炎症とそれに伴う線維化が巣状に生じた。Rad9 の免疫染色ではこうした炎症巣の周囲の肺胞上皮細胞に発現の亢進を認めた。LPS 全身投与モデルでは肺胞への炎症細胞浸潤が認められ、炎症巣の肺胞上皮細胞に Rad9 が発現していることが認められた。肺における Rad9 発現量は、投与 4 時間後の早い段階から発現が増加し、24 時間後には発現がピークよりも減少した。

A549 では、BLM 暴露によって Rad9 が誘導されることが示された。肺胞上皮細胞をマウス肺から単離し、BLM による傷害をおこし

でも同様に Rad9 の発現が増強した。A549 で Rad9 のノックダウンを行うと、BLM による傷害に対してより低濃度で生存細胞数が低下し、より脆弱になることが示された。さらに、BLM による傷害によって細胞周期が停止し、G2 期の細胞が増加し、Rad9 のノックダウンにより G2 期の割合が低下した。細胞抽出液の Western blot 法では Rad9 のノックダウンによってリン酸化 Chk1 が減少していることが示された。Chk1 の発現量は変化していなかった。

Rad9 は DNA 損傷に対する細胞内伝達の初期段階に関与しており、細胞障害に対して細胞周期を停止し、細胞を修復に向かわせるのに必要であることが示唆された。ALI での肺胞上皮細胞においてこうした DNA 損傷に伴う経路がかかわっていることが示された。このような肺胞上皮での傷害のメカニズムの解明によって ALI の早期診断早期治療につながる新たな方策の開発が期待できるものと考えられた。

以上、本研究は、ALI での肺胞上皮細胞において Rad9 が DNA 損傷に対する細胞内伝達の初期段階に関与しており、細胞障害に対して細胞周期を停止し、細胞を修復に向かわせるのに必要であることを示したものであり、価値があると認める。よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。