

令和元年5月15日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19433

研究課題名(和文) mTOR阻害薬による薬剤性肺障害の病態解明と疾患関連蛋白のバイオマーカーの検索

研究課題名(英文) Analyses of alveolar epithelial injury via lipid-related stress in mammalian target of rapamycin inhibitor-induced lung disease

研究代表者

國保 成暁(kokuho, nariaki)

日本医科大学・大学院医学研究科 呼吸器内科学・特別研究生

研究者番号：90595167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)： mTOR阻害薬(mTOR-i)は抗腫瘍薬作用を有する薬剤であるが、高頻度で薬剤性肺障害や脂質代謝異常を合併することが知られている。更に脂質代謝異常が肺線維症に関与するという報告もあり、本研究では脂質ストレス関連因子を介したmTOR-i肺障害の病態について、ヒト臨床病理検体・マウスモデル・培養細胞を用いて各種解析を行った。

その結果、mTOR-iは全身性および肺胞上皮における脂質代謝ストレスを介して上皮傷害を惹起していると考えられた。mTOR pathwayの下流に位置するPPAR- $\alpha$ の発現変化がmTOR-iによる肺胞上皮傷害に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

mTOR阻害薬(mTOR-i)は抗腫瘍作用を有する薬剤ではあるが、薬剤性肺障害を高頻度(約30%)に発症すると報告されている。本研究においては、mTOR-iによる薬剤性肺障害の病態解明を目的とし、同薬剤による脂質代謝への影響と肺胞上皮への作用について、特に脂質関連因子(PPAR- $\alpha$ )に着目して検討を行った。

mTOR-i肺障害の病態は局所性ないし全身性の脂質代謝ストレスを介した肺胞上皮傷害であり、PPAR- $\alpha$ の発現低下が肺内脂質の恒常性の破綻と炎症を惹起することで、上皮傷害に関与したと考えられた。脂質代謝ストレスと肺胞上皮傷害の関係性は、今後の肺障害研究において新たな糸口になると考えられた。

研究成果の概要(英文)： Although mammalian target of rapamycin inhibitors (mTORi) are used to treat various malignancies, they frequently induce active alveolitis and dyslipidemia. Abnormal lipid metabolism affects alveolar surfactant function and results in pulmonary disorders; however, the pathophysiology of lung injury and its relationship with lipid metabolism remain unknown. We investigated the relationship between lipid metabolism and alveolar epithelial injury, focusing on peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ) as a lipid stress-related factor in mTORi-induced lung injury.

In conclusion, the pathogenesis of mTORi-induced lung disease may be involved in alveolar epithelial injury, via lipid metabolic stress associated with downregulated PPAR- $\alpha$  expression. Focusing on the relationship between lipid metabolic stress and alveolar epithelial injury represents a potentially novel approach to the study of pulmonary damage.

研究分野：びまん性肺疾患

キーワード：mTOR阻害薬肺障害 Temsirolimus 脂質代謝ストレス Pioglitazone PPAR- $\alpha$  脂質異常症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

mTOR は、PI3K-Akt signal 下流に位置する serine/threonine kinase であり、細胞周期やアポトーシス、血管新生、代謝の調節因子としての役割を果たしている。その阻害薬である mTOR 阻害薬 (mTOR-i) は腎細胞癌・乳癌・神経内分泌腫瘍に対して抗腫瘍作用を有しているが、薬剤性肺障害を高頻度 (約 30%) に発症することが問題となっている。そして、mTOR-i が様々なサイトカイン産生を介して肺の炎症を惹起することも報告されている。

一方で mTOR-i は、脂肪組織への脂肪の取り込みを抑制することで、脂質異常症を高率で発症する (20%以上) ことでも知られる。脂肪酸摂取や高遊離脂肪酸血症は慢性間質性肺炎のリスクであり、脂質代謝異常が肺胞サーファクタントの構成成分や機能に影響して肺線維症を惹起する可能性が示唆されている。肺内脂質環境の変化といった脂質代謝ストレスは、肺疾患における病態形成にとって重要な因子である。

今回我々は、mTOR-i 投与によって生じた肺障害について、ヒト症例や動物モデルや培養細胞を用いて、肺胞上皮の泡沫化と脂質代謝関連因子に焦点を当てて解析し、脂質代謝ストレスと肺胞上皮傷害の関係について検討考察することとした。

### 2. 研究の目的

mTOR-i による薬剤性肺障害の病態解明を目的として、同薬剤による脂質代謝への影響と肺胞上皮への作用について、特に脂質関連因子 (PPAR-) に着目して検討を行った。

### 3. 研究の方法

ヒト mTOR-i 肺障害 3 症例の肺病変を臨床病理学的に検討した。脂質関連分子である PPAR- に着目してマウスと培養細胞 (マウス肺胞上皮株 MLE12) を用いて mTOR-i 肺障害モデルを作製して病理および生化学的解析を行った。C57/BL6 マウスを用い Temozolimum (10mg/kg/day) を 3 回/週で計 4 週間投与したモデルと、正常対照群として Vehicle 投与モデルを、障害対照群として BLM 投与モデルを作製して比較した。MLE12 においては Temozolimum を 0-20 $\mu$ M の濃度で投与し 24 時間まで解析した。Pioglitazone 投与下で同様に Temozolimum を投与し影響の解析を行った。

### 4. 研究成果

ヒト mTOR-i 肺障害例では脂質異常症と肺胞上皮の泡沫化を伴う上皮傷害をきたす

我々は当院で経験した mTOR-i 肺障害 3 症例の臨床病理的評価を施行した。いずれの症例も脂質異常症を認めており、間質性肺炎マーカーである血清 SP-D 値は高値を示し上皮傷害が確認された。BAL の細胞分画はリンパ球の著明な上昇を認めており、リンパ球性胞隔炎が示唆された。病理学的にはリンパ球性胞隔炎があり、上皮を染める Cytokeratin 染色では泡沫化した肺胞上皮の腫大と増生が確認された。

Temozolimum はマウスにおいても脂質異常をきたす

本研究では mTOR-i 投与肺障害マウスモデルを作製したが、正常対照群として Vehicle マウスを、強い肺障害対照群として BLM 肺障害マウスを作製して mTOR-i 肺障害マウスとの比較を行った。その結果、コントロール群や BLM 群と比較して mTOR-i 群では血清 T-cho と遊離脂肪酸 (FFA) が有意に高値を示しており、ヒト症例と同様に脂質代謝異常が確認された。

Temozolimum は血管透過性を亢進させ、気管支肺胞洗浄液中のリンパ球を増加させる

肺組織の炎症を検討する為に我々は BALF の解析を施行した。mTOR-i 投与群の BALF の細胞数はコントロール群と比較して有意な上昇を認めていた。細胞分画ではコントロール群と比較してリンパ球数が有意に上昇しており、リンパ球性炎症の存在が示唆された。コントロール群と比較して mTOR-i 投与群では BALF 中のタンパク量は有意に上昇していた。障害対照群である BLM 群ではいずれも更に高値を示しており、より強いリンパ球性胞隔炎に伴う血管透過性の亢進が示唆された。

Temozolimum は肺胞上皮傷害を起こし、II 型肺胞上皮細胞質内に脂肪滴が貯留する

Temozolimum 投与による肺障害を示すために、我々は各種モデルマウスに対して Micro-CT による放射線画像解析に加えて肺組織の形態や SP-C や Ki-67 を用いた免疫染色による病理的解析を行った。

mTOR-i マウスの胸部 CT 画像は局所的に hyperintensity を呈しており、肺組織所見では肺腔内には泡沫化した組織球や II 型肺胞上皮の増生が認められ、その一部には Ki-67 が陽性であった。BLM マウスではびまん性に hyperintensity を呈しており、肺組織所見では多数のリンパ球や好中球の浸潤と II 型肺胞上皮の増生による肺胞壁の肥厚像を認めていた。血清と BALF での SP-D 値の測定においては、mTOR-i 投与群ではコントロール群と比較して有意に上昇しており、BLM 群では更なる上昇を示していた。

HE と Cytokeratin 染色においては mTOR-i 投与群と BLM 投与群のいずれも泡沫化した上皮の増生所見を認めていた。上皮の泡沫化は脂質を染色する Sudan III によって脂肪滴であることが確認され、II 型肺胞上皮を染色する SP-C と脂質を染色する Nile red を使用した多重蛍光染色にて脂肪滴は II 型肺胞上皮細胞質内にあることが示された。そこで mTOR-i 投与群における II 型肺胞上皮の脂肪滴が BLM 投与群と比較すると相対的に目立つ印象が見られたため、電子顕微鏡を用いて各群の II 型肺胞上皮における細胞質内脂肪滴数の解析したところ、mTOR-i 投与群においては Control 群 ( $p < 0.01$ )、BLM 群 ( $p < 0.05$ ) と比較して有意に高値を示すことが確認された。

Temsirolimus はマウス肺において PPAR- $\alpha$  発現を低下させる

mTOR はその signal pathway において mTORC1 を形成しており、その下流には脂肪酸の合成や吸収などを制御する PPAR- $\alpha$  が存在し、mTORC1 により特異的に発現を調整されることが分かっている。mTOR-i マウス肺組織のライセートを使用した解析では、mTOR のリン酸化が抑制されており、mTOR-i が効果している事が確認されたが、この状況下で PPAR- $\alpha$  の発現は抑制されていた。

Temsirolimus 投与により II 型肺胞上皮細胞株の PPAR- $\alpha$  発現低下と Cleaved Caspase 3 の発現が見られ、細胞質内に脂肪滴が沈着する

mTOR-i 肺障害マウスの肺組織で起きている現象を肺胞上皮で確認する為に、マウス肺胞上皮株 (MLE-12) を使用した検討を施行した。

Temsirolimus を MLE-12 に投与した所、PPAR- $\alpha$  の mRNA 発現量の低下が見られた。次に Temsirolimus の濃度を振り分けてタンパク量の継時的変化を WB 法にて解析した。すると PPAR- $\alpha$  は時間依存性に抑制され、一方で Cleaved Caspase 3 の発現は時間・濃度依存性に増加していた。また Temsirolimus 20 $\mu$ M 投与 24 時間後に Nile red を用いて脂肪の蛍光染色を施行したところ、II 型肺胞上皮細胞の細胞質に多数の脂肪滴が出現することが確認された。

Pioglitazone 前投与にて Temsirolimus によって生じた Cleaved Caspase 3 の発現が軽減する。

mTOR-i 投与にてマウス肺胞上皮細胞株では PPAR- $\alpha$  のタンパク発現が減少して Cleaved Caspase 3 の発現が誘導されたので、マウス上皮株に対して PPAR- $\alpha$  agonist である Pioglitazone 前投与下で Temsirolimus を投与して Cleaved caspase 3 の動態を観察した。Temsirolimus 投与によって生じた Cleaved caspase 3 の発現が、Pioglitazone の前投与により軽減した。

以上より mTOR-i は、全身性および肺胞上皮における脂質代謝ストレスを介して上皮傷害を惹起していると考えられ、その病態には mTOR pathway の下流に位置する PPAR- $\alpha$  の発現変化が関与する可能性が示唆された。すなわち mTOR-i 投与による PPAR- $\alpha$  発現抑制が、肺内脂質環境の改変によるサーファクタント脂質関連ストレスを介して修復作用や抗炎症作用の抑制を引き起こして肺傷害の発症に影響した可能性が示唆された。

mTOR-i 肺障害モデルにおける肺胞上皮の泡沫化に着目した脂質ストレス関連因子を介した肺障害の解析結果は、広く肺障害の病態解析のアプローチとしても新たに展開できる重要な病態と思われた。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Analyses of alveolar epithelial injury via lipid-related stress in mammalian target of rapamycin inhibitor-induced lung disease. Lab Invest. 2019 Feb 6.

Kokuho N, Terasaki Y, Kunugi S, Saito Y, Urushiyama H, Terasaki M, Hayashi H, Gemma A, Shimizu A.

doi: 10.1038/s41374-018-0158-9.

〔学会発表〕(計2件)

mTOR 阻害薬肺障害における肺胞上皮での脂肪滴貯留の検討

國保成暁, 寺崎泰弘, 齋藤好信, 功刀しのぶ, 寺崎美佳, 弦間昭彦, 清水章, 日本医科大学医学会総会 (第 84 回)

The analyses of alveolar epithelial injury through the lipid metabolic stress in the mammalian target of rapamycin inhibitor induced lung disease

Nariaki Kokuho, Shinobu Kunugi, Yoshinobu Saito, Hirokazu Urushiyama, Mika Terasaki, Akihiko Gemma and Yasuhiro Terasaki, ATS Conference 2017, American Thoracic Society

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。