

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17197

研究課題名（和文）p53誘導性タンパク質であるMieap液滴による特発性肺線維症の病態の制御

研究課題名（英文）The role of Mieap, a p53-induced protein, in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis

研究代表者

竹越 大輔 (TAKEKOSHI, Daisuke)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：80868084

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：当研究では、ミトコンドリア機能の恒常性維持に働くMieapタンパク質が肺線維症モデルや実際の肺線維症疾患肺において病態に関与しているかを検討した。Mieapノックアウトマウスを用いてブレオマイシンモデルによる肺の線維化を野生型マウスと比較したが差は見いだせなかった。また、疾患肺におけるMieapタンパクの発現の違いを検討したが、こちらも有意な違いを証明できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性肺線維症は予後不良で治療方法が限られた難病である。このため、新規治療法の開発が希求されており、新規ターゲットとしてMieapタンパク質の同疾患に果たす役割を検討したが、今回の検討では示唆は得られたものの、有意な役割を証明するに至らなかった。今回の検討では新規治療ターゲットとしての証明には至らなかったが、さらなる検討に値する候補ターゲットと確認できたことは学術的・社会的に意味があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We evaluated the role of Mieap in the pathogenesis of pulmonary fibrosis, using bleomycin pulmonary fibrosis mouse model and actual human lung tissue. We could show some tendency of augmentation of fibrosis in Mieap-KO mice with bleomycin model, but failed to demonstrate statistically significant difference. We were unable to show clear difference of Mieap expression in fibrosis lung and normal lung.

研究分野：呼吸器疾患

キーワード：Mieap ミトコンドリア 線維化 細胞老化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症を典型とする肺の線維化病態は現段階で不可逆的で有効な治療法が存在せず、そのメカニズムの解明と新規治療法の開発が求められている。肺線維症患者の肺線維芽細胞において、ミトコンドリアの機能異常と ROS 産生亢進が肺線維化病態に寄与していることを我々のグループは過去に見出し、報告している (Inflamm Regen. 2018 Oct 24;38:18)。一方で、ミトコンドリアの恒常性維持に Mieap という液滴を形成する新規 p53 誘導性タンパク質 Mieap が重要な役割を果たすことが近年報告されている (Cancer Sci 2017; 108: 809-817)。しかし、肺線維化病態において、mieap によるミトコンドリアの恒常性機構がどのように、そしてどれくらい寄与しているかは知られていない。よって、我々は、mieap 液滴によるミトコンドリアの恒常性維持機構が肺線維化に果たす役割の解明を目的として当研究を開始した。

2. 研究の目的

Mieap タンパクによるミトコンドリア恒常性維持機構が肺線維化病態にはたす役割の解明と、それに基づいた新規治療法開発が本研究の目的である。

3. 研究の方法

(1) 放射線による培養細胞に対する DNA ストレスモデル

X 線照射装置 (MBR-1520R-3、日立) を用い、培養細胞に対して X 線照射を行った。管電圧は 250kV に設定し、線源と照射台との距離は 450mm で統一した。照射直前に培養細胞の培地を 3.5cm dish の場合は 2mL、6cm dish の場合は 4mL、8 well slide chamber の場合は各 well あたり 400 μ L で置換してから照射を行った。

(2) ミトコンドリア ROS の測定

MitoSOX 試薬 (Invitrogen, Cat# M36008) を用い、MACSQuant (Miltenyi Biotec) で検出を行った。手技は添付のマニュアル通り行った。簡単にのべると、測定対象の培養細胞を PBS で一度リンスした後、MitoSox 5 μ M に調整した PBS を全体が液面に没するのに十分な量 dish に添加した。インキュベーターで 37 $^{\circ}$ C 10 分間静置したのち、試薬入 PBS を吸引除去した。PBS で 2 回リンスを行ったのち、トリプシン/EDTA 溶液にて細胞を剥離、FBS 入培地でトリプシンを不活化した後、細胞を回収。300G 5 分で培地を除去し、PBS に細胞を再懸濁、MACSQuant にて蛍光強度を測定した。

(3) プレオマイシン肺傷害・肺線維化モデル

経気管的プレオマイシン投与による一般的な肺傷害・線維化モデルを用いた。具体的には、マウスの平均体重を求め、50 μ L 投与にて 2.5U/kg になるようにプレオマイシン PBS 溶液を調整した。体重が平均より 10% 以上外れたマウスに関しては外れ値として個別にプレオマイシン PBS 溶液を調整した。3 種混合麻酔を腹腔投与した後、気管内に噴霧した。21 日前後でサクリファイスし、肺組織を回収した。

(4) ウェスタンブロッティング、siRNA を用いた KD などの基本的な手技

一般的に行われている方法やキット添付の指示書に準拠して行った。

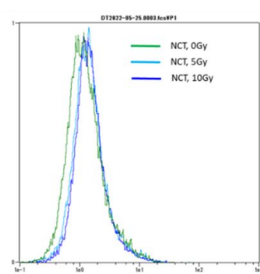
4. 研究成果

(1) Mieap タンパクは放射線傷害によるミトコンドリア ROS 産生を抑制する

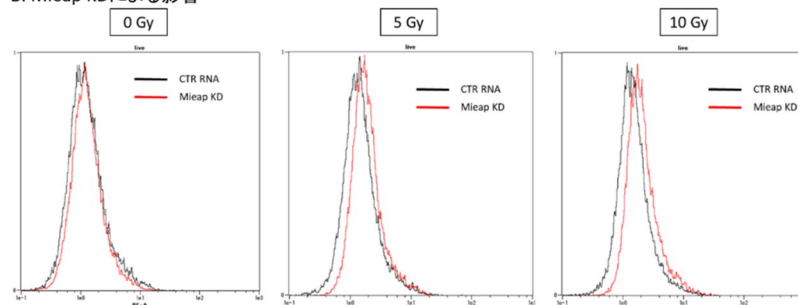
手術検体より得たヒト肺線維芽細胞に X 線を 5Gy、10Gy 照射し、ミトコンドリア ROS を定量した (図 1A)。放射線照射により、ミトコンドリア ROS 産生が高まることが示された。次に、

図 1

A. Dose-response

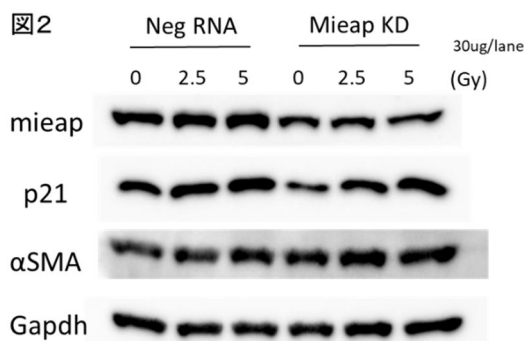


B. Mieap KDによる影響



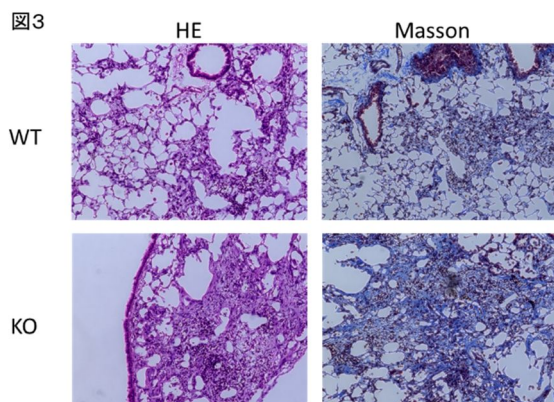
Mieap KD による影響を調べた。放射線照射前日に Lipofectamine (ThermoFisher) を用いて Mieap KD を行った。Mieap KD により放射線照射によるミトコンドリア ROS 産生が亢進することが示された (図 1B)。このことから、Mieap タンパクは放射線傷害によるミトコンドリアの機能異常を抑制することが示唆された。

(2) Mieap タンパク質は細胞老化を抑制しなかったが、筋線維芽分化は抑制するかもしれない
ROS の過剰産生は細胞老化を誘発することが知られており、上記の結果より培養細胞において、Mieap KD を行うことで老化指標である p21 に影響があるかどうかウエスタンブロット (WB) を用いて検討した。図 2 に示す通り、p21 はむしろ Mieap KD 群で低下傾向となっており、Mieap タンパク質が p21 を指標とした細胞老化を抑制しているという証拠は得られなかった。また、老化関連 GAL 染色にても、有意な差は認めなかった (data not shown)。一方、筋線維芽細胞分化を α -smooth muscle actin を指標に評価すると、Mieap KD は筋線維芽細胞促進傾向が認められ、Mieap タンパクが細胞老化以外の経路で筋線維芽細胞分化抑制に関わっている可能性が示唆された。



(3) Mieap タンパク質は Bleomycin 肺線維化マウスモデルでの肺線維化に抑制的に働くかもしれない

次に、In-vivo 実験として、Mieap KO マウスを用いて、Bleomycin 肺線維化マウスモデルを作成し、線維化の程度を野生型 (WT) マウスと比較した。KO マウスでの肺線維化が強い傾向が組織学的検討で見られ、Mieap タンパクが肺線維化抑制に働くことが示唆された。しかし、統計的有意差には至らず、結論がでなかった。



(4) ヒト IPF 肺組織を用いた免染による Mieap 発現の検討

肺切除術手術検体を用い、IPF 疾患肺における Mieap の発現状況を免疫染色を用いて検討を試みた。市販の Mieap 抗体複数種類を用いて検討したが、適当な染色ができず、検討を断念した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------