

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590987

研究課題名（和文）

血管内皮間葉系細胞転換機序を標的とした肺線維症および肺高血圧症の治療戦略の構築

研究課題名（英文）

The establishment of therapeutic strategy for pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension in targeting endothelial-mesenchymal transition

研究代表者

橋本 直純 (Naozumi Hashimoto)

名古屋大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30378020

研究成果の概要（和文）：

肺線維症の線維化病変においてさまざまな細胞起源由来線維芽細胞の存在が証明された。その中で血管内皮間葉系細胞転換による線維化病変は低酸素状態をもたらす。遷延化低酸素状態は線維化微小環境として更なる線維化および肺構成細胞間葉系形質転換を介した線維芽細胞誘導をもたらすことを明らかにした。これらの知見は、線維化形成における誘導因子を解明することにつながり新たな治療標的を確立できると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Current evidence suggests that the pathogenesis of pulmonary fibrosis might be due to the heterogeneity of fibroblast origins. In this study, persistent tissue hypoxia might be involved in active fibrosis in an *in vivo* model of BLM-induced lung injury/fibrosis, likely due to endothelial-mesenchymal transition. These findings indicate that persistent tissue hypoxia as tissue microenvironment may promote secondary EMT and lung fibrosis. These also indicate the clue to understand the underlying mechanism of lung fibrosis, leading the new therapeutic strategy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：呼吸器病学

## 1. 研究開始当初の背景

特発性間質性肺炎（IIPs）は、臓器不全の

終末症状として呼吸不全をもたらす予後不良な疾患であるが有効な治療法は確立され

ておらず対策が急務な疾患であると認識されている。

IIPs に対するステロイドを含む抗炎症薬の治療効果の欠如により、線維化病変に存在する多様な表現型を有する線維芽細胞とその線維化経路自体への関与の解明が焦点となっている。そうした中、骨髄由来細胞や肺上皮細胞などさまざまな細胞起源由来線維芽細胞の存在が証明されるに至り、線維化機序を制御する新たな治療戦略の構築のために重要な知見となった。さらに、IIPs では Fibroblastic foci を中心とした顕著な線維化病変内での肺血管床破壊・減少 (Vascular Regression) 所見がしばしば認められ、二次性肺高血圧症との関連が指摘されている。IIPs に続発する二次性肺高血圧症 (Secondary PH) は、IIPs の予後や Quality of life (QOL) の低下に直接的影響をもたらす最も重要な合併症のひとつと考えられている。

## 2. 研究の目的

- (1) Endothelial-MT 誘導因子の遺伝子導入による血管内皮細胞由来線維芽細胞の作成効率
- (2) 肺高血圧症モデルにおける Endothelial-MT 機序の病態への関与
- (3) 上皮細胞および血管内皮細胞からの線維芽細胞形質転換 (Lung Cells- Mesenchymal Transition) 誘導因子による骨髄細胞からの線維芽細胞誘導効果
- (4) 肺構成細胞および肺組織での Endothelial-MT 誘導因子発現と線維化誘導に対する局所低酸素下状態の影響
- (5) 特発性間質性肺炎 (IIPs) 症例における Endothelial-MT 誘導因子発現に基づいた血管内皮細胞由来線維芽細胞の存在
- (6) Endothelial-MT 誘導因子発現調節を標的とした治療による肺線維症モデルおよび肺高血圧症モデルでの線維化抑制の効果

これらにより血管内皮間葉系細胞転換 (Endothelial-MT) 機序を標的とした肺線維症および肺高血圧症の治療戦略の構築を行なうことを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 肺線維症モデルに線維化病変の低酸素状態の存在

ブレオマイシン (BLM) 誘導肺線維症モデルを作成した。線維化期である BLM 投与後 28 日目 (Day 28) の全肺摘出 90 分前に低酸素反応物質である pimonidazole を投与した。摘出肺に対して pimonidazole 検出染色をおこなったところ、コントロール肺には pimonidazole を確認できなかった。一方、BLM 肺では線維化病変に pimonidazole 強発現を確認できた (Figure 1)。



Figure 1

これらの所見は、低酸素状態で安定発現する hypoxia-inducible factor 1 (HIF1 $\alpha$ ) が線維化病変に確認できた所見と合わせて、線維化病変に遷延化低酸素状態にあることを示唆している。

### (2) 肺線維症の線維化病変における低酸素状態が EMT 誘導にもたらす影響

Surfactant protein D (SP-D) は、急性肺傷害の急性期において上昇することが認められているが、線維化期に認める遷延化低酸素状態での SP-D の推移は明らかにされていなかった。肺線維症病態形成における低酸素化状態の重要性を評価するために、SP-D 発現を上皮細胞特異的のマーカーとして低酸素状態における SP-D 発現の変化を評価した。肺傷害急性期には SP-D 上昇を認める一方、線維化期には SP-D 低下を確認した (Figure 2)。

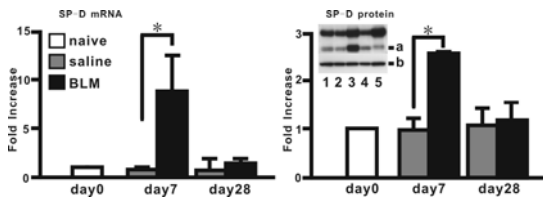


Figure2

また、24時間の急性低酸素暴露において肺上皮細胞での SP-D 発現上昇を認める一方で、72時間の遷延化低酸素暴露においては SP-D の発現抑制を示すことを二つの細胞株を用いた in vitro 実験で確認した (Figure 3)。

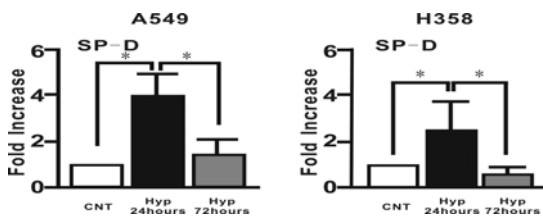


Figure3

さらに、遷延化低酸素暴露において twist の発現上昇を認めるとともに EMT 誘導を確認できた (Figure4)。

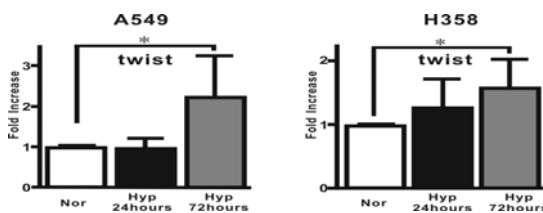


Figure4

(3) EMT 誘導転写因子 twist 発現の肺上皮細胞における EMT 誘導効果

Endothelial-MT の過程の中で、有意な発現誘導を認めた EMT 関連遺伝子の存在を確認した。EMT 関連遺伝子の中で twist に注目して twist の発現ベクターを作成して、肺癌細胞株への強制発現を行い、SP-D に対する効果を検討した。control ベクターを発現させた細胞株と twist を発現させた細胞株の比較をしたところ、twist 発現株では control 発現株と比較して有意な SP-D の発現抑制を確認した (Figure 5)。

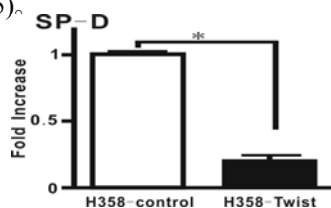


Figure5

#### 4. 研究成果

ブレオマイシン(BLM)誘導肺線維症モデルにおいて、Endothelial-MT を介した微小血管内皮細胞由来線維芽細胞の同定をおこなった。この知見は、間質性肺炎における Fibroblastic foci を中心とした顕著な線維化病変内にしばしば認められる肺血管床破壊・減少(Vascular Regression) 所見に合致すると考えられた。低酸素刺激が EMT を誘導するという報告と合わせて、線維化病変が低酸素化状態に陥っているかどうかを評価した。肺線維症の線維化病変は遷延化低酸素状態を示していた。この知見に基づき、組織微小環境である線維化病変は EMT を誘導して更なる線維化病変の過剰形成をもたらすという認識に至った。

Endothelial-MT を介した微小血管内皮細胞由来線維芽細胞への形質転換は、活性化 Ras と TGF $\beta$  の共刺激により誘導されることを報告したが、さらに血管内皮由来線維芽細胞がもたらす線維化病変では遷延化低酸素状態がもたらされて、その結果更なる線維化が誘導されることが示唆された。この知見を基に、これら複合的な線維化および EMT 誘導刺激を網羅的に制御する遺伝子に着目して、新たな治療戦略の構築につなげている。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Quercetin protects against pulmonary oxidant stress via heme oxygenase-1 induction in lung epithelial cells. Hayashi Y, Matsushima M, Nakamura T, Shibasaki M, Hashimoto N, Imaizumi K, Shimokata K, Hasegawa Y, Kawabe T. Biochem Biophys Res Commun. 2012 417 (1); 169-174. 査読有
2. Acute exacerbation of IPF following diagnostic bronchoalveolar lavage procedures. Sakamoto K, Taniguchi H, Kondoh Y, Wakai K,

Kimura T, Kataoka K, Hashimoto N, Nishiyama O, Hasegawa Y. Respir Med. 2012 106(3):436-42. 査読有

3. Mesenchymal Stem Cells Stably Transduced with a Dominant-Negative Inhibitor of CCL2 Greatly Attenuate Bleomycin-Induced Lung Damage.

Saito S, Nakayama T, Hashimoto N, Miyata Y, Egashira K, Nakao N, Nishiwaki S, Hasegawa M, Hasegawa Y, Naoe T.

Am J Pathol. 2011 179(3):1088-94. 査読有

4. Involvement of the transcription factor twist in phenotype alteration through epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells.

Nakashima H, Hashimoto N, Aoyama D, Kohno T, Sakamoto K, Kusunose M, Imaizumi K, Takeyama Y, Sato M, Kawabe T, Hasegawa Y.

Mol Carcinog. 2011 doi: 10.1002/mc.20802. 査読有

5. Capsaicinoids regulate airway anion transporters through Rho kinase- and cAMP-dependent mechanisms

Hibino Y, Morise M, Ito Y, Mizutani T, Matsuno T, Ito S, Hashimoto N, Sato M, Kondo M, Imaizumi K, and Hasegawa Y Am J Respir Cell Mol Biol. 2011 45(4):684-91. 査読有

6. Attenuation of TGF- $\alpha$ -Stimulated Collagen Production in Fibroblasts by Quercetin-Induced HO-1.

Nakamura T, Matsushima M, Hayashi Y, Shibasaki M, Imaizumi K, Hashimoto N,

Shimokata K, Hasegawa Y, Kawabe T.

Am J Respir Cell Mol Biol. 2011 44(5):614-20. 査読有

[学会発表] (計 4 件)

1. Naozumi Hashimoto

Inhibition of TGF $\beta$  induced epithelial

mesenchymal transition in lung cancer by modulation of PTEN c-terminal tail 日本癌学会総会 2011 年 10 月 4 日 日本、名古屋

2. Naozumi Hashimoto

Inspiratory capacity is a new preoperative risk predictor in the patients with lung cancer undergoing surgical resection European Respiratory Society Congress 2011 年 9 月 27 日 オランダ、アムステルダム

3. Naozumi Hashimoto

Inhibition of Hypoxia-induced phenotype alterations through epithelial-mesenchymal transition (EMT) in lung cancer by gene modulation of phosphorylation sites in tumor suppressor PTEN European Respiratory Society Congress 2011 年 9 月 27 日 オランダ、アムステルダム

4. Naozumi Hashimoto

A critical involvement of chronic obstructive pulmonary disease as a preoperative risk factor in the patients with lung cancer undergoing surgical resection American Thoracic Society 2011 International conference 2011 年 5 月 17 日 アメリカ、デンバー

6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本 直純 ( Naozumi Hashimoto )  
名古屋大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：30378020

(2)研究分担者

長谷川 好規 ( Yoshinori Hasegawa )  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号：20270986

研究分担者

今泉 和良 ( Kazuyoshi Imaizumi )  
藤田保健衛生大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：50362257

(3)連携研究者 なし