

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08212

研究課題名（和文）ステロイド治療を補う新たな治療薬開発に向けた放射線肺炎の病態研究

研究課題名（英文）The research for the pathogenesis of radiation pneumonitis to develop new treatment to supplement glucocorticosteroid

研究代表者

伊藤 洋子 (Ito, Yoko)

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：90286451

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）：急性肺障害モデルとしての放射線照射モデルは十分なバリア機能障害を引き起こせず、TNFαによるバリア機能障害モデルで検討。TNFα誘導ラット肺胞上皮細胞のバリア機能障害はglucocorticoids (GCs)で回復し、その機序は、myosine light chain kinase の発現の抑制 myosine light chainのリン酸化の抑制 zonula occludens-1の細胞間隙への集簇によると考えられた。この成果は、PLOS ONEに発表した。GCsが肺胞上皮細胞の創傷治癒を遅延させるメカニズムは、肺胞上皮由来の創傷治癒遅延にかかわる因子は発見できず、今後も検討を続ける。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性呼吸窮迫症候群や間質性肺炎急性増悪といった難治性急性肺障害に対する薬物療法は確立されたものがなく、予後不良な疾患である。グルココルチコイドが経験的に投与されるが、急性期にはある程度効果があるが、長期的な効果は限定的で、長期投与による合併症も問題になる。私たちの今回の検討では、上皮バリア機能にはプラスに働くものの、上皮傷害の修復にはマイナスに働くことが証明された。そこで、今後は、グルココルチコイドのプラスの面を生かして、マイナスの面を補うことのできる因子を見つけることによって、難治性急性肺障害の治療法の開発につなげたいと考えている。

研究成果の概要（英文）：The TNFα-induced barrier dysfunction in rat alveolar epithelial cells was restored by glucocorticoids (GCs), and the mechanism was suggested to be the inhibition of myosine light chain kinase expression inhibition of myosine light chain phosphorylation aggregation of zonula occludens-1 in the intercellular spaces. These results were published in PLOS ONE. The mechanism by which GCs delays wound repair of alveolar epithelial cells is still under investigation, as we have not found any factors involved in the prolonged wound healing derived from alveolar epithelium.

研究分野：急性肺障害

キーワード：急性肺障害 グルココルチコイド 上皮バリア機能 上皮創傷治癒

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

放射線肺炎の発症は、局所進行肺癌における集学的治療の継続や、慢性呼吸器疾患合併肺癌患者の治療方針を左右する主要な因子となる。加えて、ステロイド治療のみでは、治療効果は十分ではない。しかしながら、放射線肺炎の発症から修復までの過程で、肺胞上皮細胞のバリア機能と創傷治癒に対する放射線および Glucocorticoids (GCs) の影響は十分検討されていない。

放射線照射のバリア機能への影響は、表皮、腸管上皮や血管内皮での報告はあるが、肺胞上皮細胞での報告はない。GCs のバリア機能への影響は、気道上皮や cell line で tight junction 蛋白である claudin の発現を亢進させたという報告が僅かにあるが、プライマリーの肺胞上皮細胞での報告はない。

一方、GCs の肺胞上皮細胞創傷治癒への影響は、ラット肺胞上皮細胞単層培養の scratch wound を刺激すると、その治癒が遷延するとの報告が 1 つあるが、機序は明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

GCs 治療の効果が不十分で、完全に病勢をコントロールできない症例、減量中の再燃や呼吸機能障害を残してしまう症例があることが、放射線肺炎治療の現在の問題点である。しかし、なぜ効果が不十分であるかは判っていない。そこで、本研究では、

目的 1) 放射線照射と GCs による肺胞上皮細胞バリア機能への影響とその機序の解明

目的 2) 放射線照射と GCs による肺胞上皮細胞の創傷治癒への影響とその機序の解明

を目的とし放射線肺炎の病態の理解を深め、GCs の効果の限界の理由を明らかにする。

### 3. 研究の方法

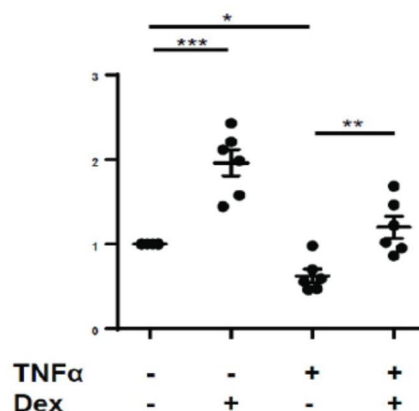
5-7 週齢の雄の Sprague-Dawley Rat から 2 型肺胞上皮細胞を分離し、コラーゲン被覆 12 well transwell 上で 3 日間培養し単層細胞シートを形成させる。この過程で 2 型肺胞上皮細胞は 2 型の性質を失い、1 型肺胞上皮細胞様へ徐々に分化・移行する。申請当初、この単層培養を放射線照射 30 分前に Dex (10 nM) で刺激し、8 Gy の放射線単照射 (MBR-1520R-3; Hitachi Medical Corporation, Tokyo, Japan) を行い、TEER および FD40 透過性を経時的に各々測定しバリア機能への影響を検討する予定であった。しかしこのモデルではバリア機能障害の程度が軽度であり、そのメカニズムと GCs の効果を検討することが困難であり、生体でマクロファージから産生される TNF $\alpha$  が肺胞上皮細胞傷害をきたすため、TNF $\alpha$  で、肺胞上皮細胞を刺激するモデルを急性肺障害モデルとして、そのバリア機能障害への影響と GCs の影響を検討することとした。

創傷治癒モデルは、上記のバリアモデルでの transwell 上のかわりに、コラーゲン被覆 24well plate 上に肺胞上皮細胞の単層シートを形成させた。そして、scratch wound を 200 $\mu$ m 用のチップで用手的に形成し (0 時間) 16 時間後に修復状況の評価した (0 時間時点での wound area - 16 時間時点での残存 wound area = wound)。

### 4. 研究成果

(1) TNF $\alpha$  と GCs による肺胞上皮細胞バリア機能

図 1 : Relative expression of TEER



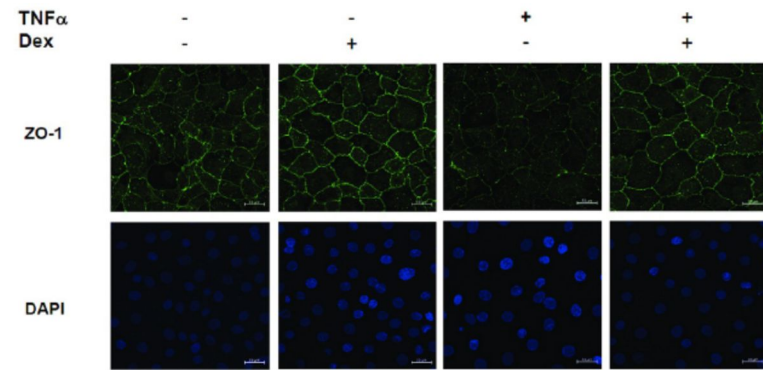
Dex: dexamethasone

への影響とその機序の解明

TNFα はラット肺胞上皮細胞のバリア機能を障害し、その障害は GCs で改善した (TEER 測定 : 図 1)。また、免疫染色で GCs は、tight junction 関連蛋白である ZO-1 (zonula occludens-1) の分布を細胞間隙に集簇させることも判明した (図 2)。そして、その機序は myosine light chain kinase (MLCK) の

発現を GCs が抑制することで myosine light chain (MLC) のリン酸化を抑制させることによると考えられた (図 3)。そこで、最終年度に論文にまとめ PLOS ONE に発表することができた (Kutsuzawa N. Ito Y., et al., PLoS One. 2023 Dec 27;18(12):e0295684. PMID: 38150443)。

図 2



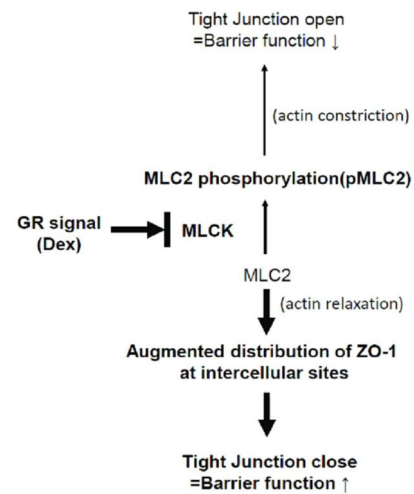
Dex: dexamethasone, ZO-1: zonula occludens-1

(2) GCs による肺胞上皮細胞の創傷治癒への影響とその機序の解明

肺胞上皮細胞傷害治癒モデルに関しては、GCs が治癒を遷延させるという仮説をたてて検討を始めた。まず、過去に線維芽細胞が産生する HGF が肺胞上皮細胞のスクラッチ wound repair モデルの修復を促進させることを報告していることから、GCs が HGF の産生発現を抑制するかを検討した。mRNA レベルではラット線維芽細胞由来の HGF 産生が抑制されることが判明し、recombinant-HGF は、GCs によって遷延した創傷治癒を回復させることが判った (図 4)。

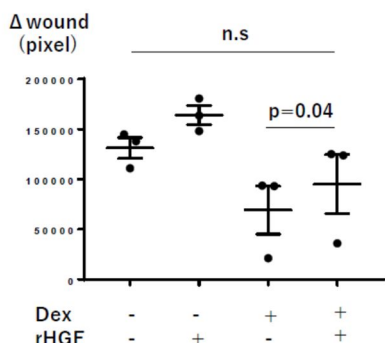
肺胞上皮由来の GCs による創傷治癒遷延の因子に関しては、以前 Stromal-derived factor-1 (SDF1) が肺胞上皮細胞の創傷治癒を促進させることを報告しており、その経路を検討すると、GCs は SDF1

図 3



GR: glucocorticoid receptor, MLC: myosine light chain, MLCK: myosine light chain kinase, ZO-1: zonula occludens-1

図 4



Dex: dexamethasone, rHGF: recombinant hepatocyte growth factor

とその受容体である CXCR4 の発現を低下させることが判明した。しかし、リコンビナント SDF1 蛋白で GCs による肺胞上皮細胞の創傷治癒遷延モデルを刺激した。しかしながら、リコンビナント SDF1 蛋白ではその創傷治癒の遷延を回復させることを証明できなかった。

そこで、以前 施行した microarray のデータから候補にあがったいくつかの因子のリコンビナント蛋白で GCs による創傷治癒遷延の改善があるか検討したが、いずれも negative data であり、本研究期間では、肺胞上皮由来の因子の同定はできなかった。

しかし、過去に keratinocyte では、GCs によって

caveolin-1 の発現が亢進しており、その発現を抑制することによって創傷治癒遷延が改善させることが報告されており、肺胞上皮細胞でも検討した。すると、caveolin-1 は、肺胞上皮細胞でも GCs により発現が亢進しており、その亢進は GCs 受容体を介する経路で制御されていることが判明し、今後も検討を続ける予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kutsuzawa Naokata, Ito Yoko, Kagawa Shizuko, Kohno Chinatsu, Takiguchi Hiroto, Asano Koichiro	4. 巻 18
2. 論文標題 Dexamethasone restores TNF -induced epithelial barrier dysfunction in primary rat alveolar epithelial cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0295684
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0295684	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 沓澤直賢、伊藤洋子
2. 発表標題 グルココルチコイドはmyosin light chain kinase (MLCK)/ MLC2経路を介して肺胞上皮細胞バリア機能を増強する
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤洋子
2. 発表標題 Glucocorticoid (GC)の ラット肺胞上皮細胞における創傷治癒への影響
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 伊藤洋子 沓澤直賢 河野千夏 浅野浩一郎
2. 発表標題 Glucocorticoidと抗線維化薬のラット肺線維芽細胞Hepatocyte Growth Factor (HGF) 発現への影響
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 沓澤直賢 伊藤洋子 河野千夏 浅野浩一郎
2. 発表標題 ラット肺胞上皮細胞バリア機能へのTNF および副腎皮質ステロイド薬の影響
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 沓澤直賢 伊藤洋子 河野千夏 浅野浩一郎
2. 発表標題 ラット肺胞上皮細胞バリア機能へのTNF および副腎皮質ステロイド薬の影響
3. 学会等名 第57回学術研究会
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------