

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16123

研究課題名（和文）特発性肺線維症における核膜恒常性破綻の関与について

研究課題名（英文）The involvement of disruption of nuclear envelope homeostasis in idiopathic pulmonary fibrosis.

研究代表者

伊藤 三郎 (Ito, Saburo)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：30865291

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：特発性肺線維症は進行性の肺線維化をきたす予後不良な疾患である。細胞核を覆う核膜は核内容物を保護するだけでなく、クロマチン制御、圧シグナル応答、テロメア保護などの様々な役割を持つ。IPFにおいて核膜恒常性の破綻が病態へおよぼす影響を検証した。核膜構成成分のLamin B1をノックダウンした肺線維芽細胞では、刺激による筋線維芽細胞分化が強く誘導された。ブレオマイシン肺線維症モデルマウスではブレオマイシン投与により線維化部位細胞の核膜形態の変形が認められたが、核膜保護薬は線維化を抑制しなかった。今回の検討では核膜恒常性維持は持続的圧負荷のかかる異常な細胞環境下では保護作用を示さない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

本研究は特発性肺線維症（IPF）肺の線維化進行の病態における核膜異常の関与を明らかにすることを目的とした。これまで核膜異常の視点からIPF病態について検討した研究は少ない。我々は以前、慢性閉塞性肺疾患（COPD）病態で核膜の劣化が病態進行に関与することを世界に先駆けて示したが、本研究はその進歩を同じ老化関連の線維化病態を示しながらも顕著に異なった臨床病態を示す疾患であるIPFで検証したものである。本研究から得られる知見が呼吸器疾患における特異的な新規治療標的の創生につながる可能性があると考えた。今回の研究結果はCOPD病態とIPF病態での核膜機能の病態への関わりの差について示すものとなった。

研究成果の概要（英文）：Idiopathic pulmonary fibrosis, characterized by progressive pulmonary fibrosis, exhibits poor prognosis and there is no cure except for lung transplantation. We examined the effects of nuclear envelope homeostasis protection in the pathogenesis of IPF. Lamin B1 is the main component of nuclear envelope. Lamin B1 knocked down enhanced myofibroblast differentiation in pulmonary fibroblast in in vitro experiment. In bleomycin pulmonary fibrosis mouse model, bleomycin caused deformation of nuclear envelope morphology in fibrosis cells, but NAT-10, a nuclear envelope protection drug, did not suppress fibrosis. The present study suggests that nuclear envelope protection may not be useful under abnormal cellular conditions such as sustained pressure loading.

研究分野：呼吸器疾患

キーワード：核膜 特発性肺線維症 細胞老化 TGF- lamin B1

## 1. 研究開始当初の背景

### 1) 特発性肺線維症(IPF)病態について

特発性肺線維症 idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)は慢性進行性の肺線維化により呼吸不全をきたす原因不明の呼吸器疾患である。3年生存率が約50%と非常に予後不良な疾患である。IPFの病因・病態解明は十分でなく、かつ生命予後を改善する有効な治療法は確立されていない。IPFの病態では多機能性サイトカインのTGF- $\beta$ がsmadの核移行を誘導することが線維化シグナル進行の主要因であることがわかっている。またIPF患者の線維化部分において核形態に異常を認めるという報告は古くからある。IPF患者ではテロメア長が健常人に比べ短縮しており、複数の家族性肺線維症においてテロメラーゼ遺伝子異常が見つかり、核膜はテロメア短縮に対して保護的作用があることが知られている。

### 2) 核膜傷害と呼吸器疾患について

核膜は細胞核を覆い遺伝情報などの内容物を保護する構造的な役割がある。近年の研究から核膜は構造的な役割以上に核内外の成分との相互作用によりエピジェネティックな制御に関与することがわかってきた。核膜は遺伝情報であるDNAなどの核内容物を外部から保護するだけでなく、核膜孔を介した核-細胞質輸送による転写因子の局在制御、核膜とヒストン蛋白との直接的・間接的結合によるクロマチン相互作用を介した転写調節、メカノセンシングと呼ばれる外的な物理刺激に対するシグナル応答、テロメアメンテナンスなどの様々な役割を持つ。核膜辺縁はDNAを保持するヒストン蛋白と直接的に結合することにより結合部位のDNAの転写を抑制する。核膜辺縁はテロメアの安定化に寄与し過剰なテロメア短縮を抑制する。核膜には核膜孔と呼ばれる細胞質-核輸送の際の出入り口となる構造が存在し、細胞質からの転写因子の移送に関与する。これらの核膜の能動的な細胞機能への関与は核膜障害により劣化し、特に老化細胞では核膜裏打ち構造のラミンB1の発現が低下しており細胞老化を深化させる。我々はIPFと同様老化関連呼吸器疾患である慢性閉塞性肺疾患 chronic obstructive pulmonary disease (COPD)においてラミンB1の発現低下がmTORの活性化を介してミトコンドリア由来の活性酸素増加を引き起こし慢性炎症の病態に関与することを報告した。疾患病態において細胞核に起こる変化は発癌との関連が古くから示されている。しかし、**喫煙刺激で核の形態に変化が起きることやIPF患者肺において核の形態的な変化が起こることは以前から観察されている事実であるにも関わらずあまり検討されていない。**

### 3) 核膜恒常性維持機構について

近年の基礎研究から核膜の恒常性維持にESCRT-IIIを中心とした膜修復機構が関与していることが明らかとなった。ESCRT機構は生体膜の物理的な切断・融合において機能しこれまでエンドサイトーシス、細胞分裂時の膜断裂、神経細胞突起の伸長、ウイルスの出芽など様々な細胞機能に関与することが知られていた。核膜は脂質二重膜であり他の生体膜と同様にESCRT機構による膜修復機構を有することが最近報告された。しかし、呼吸器疾患病態における核膜および核膜恒常性維持機構としてのESCRT機構に着目した検討はこれまで行われていない。

## 2. 研究の目的

**・外的刺激により引き起こされた核膜異常が筋線維芽細胞分化誘導に関与し、核膜保護が線維化を抑制することを明らかにする。**

**・核膜保護は肺線維症モデルマウスで病態進展抑制効果があることを明らかにする。**

**・IPF肺におけるESCRT-III発現と核膜の変化および病態進展との関連性を明らかにする。**

## 以上の検討から、核膜傷害が線維化に与える影響を明らかにし核膜保護が IPF 病態に対する新たな治療標的となることを明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### 核膜傷害は肺線維化病態に関与するか？

末梢肺組織から肺線維芽細胞を分離培養し検討に用いる。IPF モデルとして transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) を細胞刺激に使用する。核の形態的な変化を 3 次元顕微鏡で評価する。培養上清中への DAMPs の放出(IL-1 $\beta$  / HMGB1 など)は ELISA 方法で定量する。核膜に傷害を引き起こす外的刺激としては H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、抗癌剤(シスプラチン)、放射線照射などが知られている。これらの刺激時に起こる核の形態的变化の評価および核膜蛋白の変化を定量する。また、より核膜異常に特異的な現象を観察するため、NAT-10 リコンビナント蛋白や siRNA ラミン B1 ノックダウンを用いて評価を行う。Remodelin は NAT-10 の特異的阻害剤で核膜保護に働くことが示されている。上述した様々な外的刺激による線維芽細胞の筋線維芽細胞分化において Remodelin が線維化を阻害するかどうか評価する。TGF- $\beta$  刺激による筋線維芽細胞分化は、 $\alpha$ -SMA、type I collagen、Fibronectin 発現で評価する。ESCRT-III 発現ベクターによる過剰発現と siRNA によるノックダウンにより、ESCRT-III 発現を制御し TGF- $\beta$  による筋線維芽細胞分化誘導における ESCRT-III の役割を明らかにする。

#### 肺線維症モデルマウスにおいて核膜保護は病態を改善するか？

マウスプレオマイシン肺線維症モデルに対する小分子化合物の有効性検討(動物モデル)6-10 週齢マウス(C57BL/6)野生型および ESCRT-III ノックアウトマウスを用いて、day0 にプレオマイシン 3U/kg を経気道的に注入する。線維化開始時期の day7 から小分子化合物を経口投与する。day21 に気管支肺胞洗浄液(BALF)の採取と肺の摘出を行う。気管支肺胞洗浄液(BALF)は細胞数、細胞分画、炎症性サイトカイン(IL-1、IL-8)を測定する。ホルマリン固定肺は Hematoxylin-Eosin、EVG 染色を行い、ヒドロキシプロリン定量により肺線維化を評価する。免疫組織染色により筋線維芽細胞分化誘導( $\alpha$ -SMA、type I collagen)を検討する。

#### IPF 肺組織中に核膜関連蛋白質の変化は検出されるか？

IPF 肺組織のホルマリン固定標本を用いて、免疫染色により ESCRT-III 発現、核膜の形態的な特徴を評価する。その発現と呼吸機能や HRCT 所見での重症度との相関関係を検討する。

### 4. 研究成果

In vitro 検討では肺線維芽細胞を用いた検討を行なった。核膜傷害を誘導する刺激として過酸化水素とタバコ煙抽出液を用いた。過酸化水素やタバコ抽出液により肺線維芽細胞の核膜の変形が認められた。また、核膜構成成分である lamin B1 をノックダウンしたところ予想通り刺激時の核膜変形はコントロール群に比べ顕著であった。lamin B1 のノックダウンにより、過酸化水素やタバコ煙抽出液刺激による  $\alpha$ -SMA、type I collagen、fibronectin の発現はさらに上昇が認められ、筋線維芽細胞分化が強く誘導されたと考えられた。Remodelin は過酸化水素やタバコ煙抽出液刺激の  $\alpha$ -SMA、type I collagen、fibronectin の発現を抑制する傾向が見られた。

In vitro の結果をもとに in vivo での核膜恒常性維持の効果をプレオマイシン肺線維症モデルで検討した。プレオマイシン投与において線維化部位における線維芽細胞や肺上皮細胞において核膜形態の変形が認められた。しかし Remodelin の投与はプレオマイシン肺線維症モデルにおいて線維化の進行を抑制しなかった。特発性肺線維症患者の肺組織において核膜形態の変化や核膜関連タンパクの発現は線維化の程度との一致は見られず有用な指標としては用い難い結果であった。

(考察と結論)

今回の検討では核膜恒常性の維持は正常な細胞環境下では保護的に働くが、線維化病態のような持続的な圧負荷がかかる異常な細胞環境下ではむしろ増悪因子として働く可能性が示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Matsubayashi Sachi, Ito Saburo, Araya Jun, Kuwano Kazuyoshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Drugs against metabolic diseases as potential senotherapeutics for aging-related respiratory diseases	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Endocrinology	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2023.1079626	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 -
1. 著者名 Hara Hiromichi, Okuda Keitaro, Araya Jun, Utsumi Hirofumi, Takekoshi Daisuke, Ito Saburo, Wakui Hiroshi, Minagawa Shunsuke, Numata Takanori, Kuwano Kazuyoshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Possible relationship between esophageal dilatation and severity of M. abscessus pulmonary disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0261866	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 -
1. 著者名 Seed Robert I., Kobayashi Kenji, Ito Saburo, Takasaka Naoki, Cormier Anthony, Jespersen Jillian M., Publicover Jean, Trilok Suprita, Combes Alexis J., Chew Nayvin W., Chapman Jocelyne, Krummel Matthew F., Lou Jianlong, Marks James, Cheng Yifan, Baron Jody L., Nishimura Stephen L.	4. 巻 6
2. 論文標題 A tumor-specific mechanism of T <sub>reg</sub> enrichment mediated by the integrin $\alpha$ 8	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Immunology	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciimmunol.abf0558	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 該当する
1. 著者名 Araya Jun, Saito Nayuta, et. al. (among authors, Ito Saburo)	4. 巻 207
2. 論文標題 Impaired TRIM16-Mediated Lysophagy in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Pathogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 65 ~ 76
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.2001364	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
---------	---------