

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 5 月 25 日現在

機関番号：17601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22790763

研究課題名（和文）肺線維症・上皮間葉転換を制御するマイクロRNAの探索とその作用機序の解明

研究課題名（英文）Exploration of micro RNA regulating lung fibrosis and epithelial mesenchymal transition

研究代表者

柳 重久 (YANAGI SHIGEHISA)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：60404422

研究成果の概要（和文）：

本研究では、Pten の肺線維症における役割を解析した。Pten 欠損マウスでは上皮由来線維芽細胞の増加を認めた。肺傷害後の肺上皮特異的 Pten 欠損マウスは pAkt, pS6K, Snail 発現亢進を呈した。Akt 阻害剤投与によりこれらの表現系はキャンセルされた。ヒト IPF 症例肺組織において、AECs での PTEN 発現低下と pAKT 発現亢進を認めた。以上の結果から、肺上皮 Pten は上皮間葉転換を制御することで、急性肺損傷や肺線維症の病態制御に必須であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

To determine the role of epithelial Pten in lung fibrosis, we compared the responses to bleomycin administration between wild-type and bronchioalveolar epithelium-specifically Pten-deleted [SP-C-rtTA/(tetO) γ -Cre/Pten $\Delta\Delta$ (SOPten $\Delta\Delta$) mouse. Epithelial-derived myofibroblasts were increased in epithelium-specific Pten-deficient mice. Lungs of bleomycin-treated SOPten $\Delta\Delta$ mice showed increased pAkt, pS6K, Snai1 expressions. Akt inactivation definitively saved SOPten $\Delta\Delta$ mice. Finally, we detected a reduction of PTEN expression and AKT hyperactivation in the AECs of human IPF lungs. Our results highlight epithelial Pten as a crucial gatekeeper controlling lung fibrosis by modulating integrity of AECs.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2011 年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

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：肺線維症、マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (Idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) は慢性進行性の肺線維化疾患で、有効な治療法は無く、患者数は年々増加

傾向にある。IPFは、上皮傷害とそれに引き続く筋線維芽細胞増殖、細胞外マトリックス (ECM) 沈着を特徴とし、正常肺構築の破壊が生じて最終的に呼吸不全に陥る。線維化の開始

と進行に、上皮が”火付け役”として中心的役割を成し、なかでも上皮細胞が筋線維芽細胞に形質転換する上皮間葉転換(Epithelial mesenchymal transition:EMT)が、筋線維芽細胞の起源として重要とされる。

EMTや幹細胞未分化性維持などの細胞 reprogramming制御に、マイクロRNA(miR)が関与する。miRは21~23塩基長の1本鎖RNAで特定のmRNAと相補性を有し、mRNAの分解や翻訳の阻害により標的遺伝子の発現を調節する。ヒトでは700種程のmiRが同定され、個々のmiRの発現に組織選択性がある。肺では発生に関与するmiRの報告はあるが、肺線維化におけるmiRの役割は全くわかっていない。

PTEN(Phosphatase and Tensin homolog Deleted on chromosome Ten)はPIP3を主な基質とする脂質フォスファターゼで、PI3キナーゼ/Akt経路を負に制御する癌抑制遺伝子である。全身Ptenヘテロ欠損マウスで肺傷害後の肺線維化が亢進する報告がある。しかしながら、肺上皮細胞におけるPTENの肺線維化における役割およびPTEN発現の制御機構は明らかにされていない。

申請者は細気管支肺胞上皮特異的 Pten 欠損マウス(*SOPten^{fllox/fllox}*マウス)を作出し、細気管支肺胞上皮細胞での Pten 発現が細気管支肺胞上皮幹細胞(BASCs)の恒常性維持に必須であることを明らかにした(*J Clin Invest*, 2007)。糖尿病性腎症モデルにおいて、TGF- β はmiRによるPten不活化を介しAktを活性化する報告がある(*Nat Cell Biol*, 2009)。申請者は、傷害肺上皮において、特定のmiR発現異常が生じることでPTEN等の標的遺伝子の発現変化が起こり、過剰なEMTを起こすことがIPFの発症と進行に重要と考えた。これまでの研究実績を基盤に、本研究は、PTEN発現制御やEMTに関与するmiRを探索し、候補miRのEMTや肺線維化発症進行に与える影響をin vivoで検証することで、IPFに対する新しい治療戦略を確立することを目的とする。

2. 研究の目的

本研究では申請グループのPTENでの研究基盤を踏まえ、以下の6つの課題を明らかにすることを目標とする。

- (1) Quadruple TGマウスを用いた細気管支肺胞上皮PtenによるEMT制御機構の解析
- (2) IPF症例肺組織での上皮PTEN発現と予後関連因子との関連の解析
- (3) 肺線維化疾患モデル肺組織とIPF症例肺組織を用いたmiR発現プロファイリング
- (4) 候補miRの標的遺伝子の同定
- (5) 合成miR/anti-miRの肺線維化に対する治療効果の検討
- (6) 合成miR/anti-miRのEMT、BASCs恒常性維持への影響の検証

以上の研究課題を設定し、上皮PTENによる肺線維化制御機構とEMT制御との関連を検証する。IPF肺組織での上皮PTEN発現と予後因子との関連を解析し、上皮PTENのIPFでの病態生理学的意義を検討する。

次に、IPF肺組織を用い、PTEN発現および線維化・EMT・幹細胞恒常性関連遺伝子発現を制御するmiR発現プロファイリングを行う。候補miRの合成miRまたはanti-miR投与による肺線維化への治療効果を検討することで、miRの肺線維化制御機構を解明し、IPFに対する新しい治療法を開拓する。

本研究の遂行は、IPF病態の首座を成している上皮傷害に引き続く筋線維芽細胞増殖、EMT、BASCs恒常性維持破綻に対するmiRの役割を解明することで、IPFの発症機序の解明に貢献するものと考えられる。さらに、これまでに予測因子や有効な治療法の無かったIPFの疾患予測因子・治療薬開発につながる臨床応用への研究展開も期待できる。

3. 研究の方法

(1) Quadruple TGマウスを用いた細気管支肺胞上皮PtenによるEMT制御機構の解析

細気管支肺胞上皮特異的Pten欠損マウス(*SOPten^{fllox/fllox}*マウス)およびコントロールマウスに、*EGFP^{fllox/fllox}*マウスを交配し、細気管支肺胞上皮特異的にPtenを欠損かつEGFPを発現するマウスを作成する(*EGFP-SOPten^{fllox/fllox}*マウス)。それぞれのマウスにブレオマイシン(0.05単位/匹)を気管内投与し、投与前と14日後の肺組織を摘出する。筋線維芽細胞マーカーである α -SMAとGFPの二重免疫染色を行い、*EGFP-SOPten^{fllox/fllox}*マウスとコントロールマウスの α -SMA/GFP二重陽性細胞数を比較することで、in vivoにおける肺上皮PTENのEMT制御を評価する。また、同肺組織を用い、フローサイトメトリーにてGFP陽性細胞をソーティングする。*EGFP-SOPten^{fllox/fllox}*マウスとコントロールマウス間で、上皮系・間葉系マーカー発現をウエスタンブロッティングにて比較検討する。さらに、野生型PTENおよびDominant negative型PTEN発現ヒト不死化肺上皮細胞株を用い、上皮系・間葉系マーカー発現を解析し、肺上皮PTENのEMT制御についてin vitroにおいても検討する。

(2) IPF症例肺組織での上皮PTEN発現と予後関連因子との関連の解析

IPF症例肺組織とコントロール肺組織を用いて、 α -SMAとPTEN、およびE-cadherinとPTENの二重免疫染色を行い、IPF症例肺組織の上皮でのPTEN発現を評価する。また、肺病理組織所見においてIPFの予後関連因子とされている線維芽細胞巣スコア(*Am J Resp Crit Care Med*, 2001)と、上皮でのPTEN発現との関連を解析し、IPF症例での肺上皮PTENの病態生理学

的意義を検討する。また、同肺組織からPTENの下流分子であるpAktとTGF- β の下流分子であるpSmad2の免疫沈降抗体反応を行い、肺上皮PTENによるTGF- β 経路活性化機序についても解析する。

(3) 肺線維症疾患モデル肺組織とIPF症例肺組織を用いたmiR発現プロファイリング

①TGF- β 刺激後のヒト不死化肺上皮細胞株とヒト肺線維芽細胞株、②プレオマイシン気管内投与マウス肺組織(投与前と14日後)、および③IPF症例肺組織とコントロール症例肺組織よりRNAを抽出する。上記RNAを用い、1. TGF- β により発現が調節され、線維化関連分子発現を制御するmiR(miR-29 family, miR-21, miR-133, miR-30c, miR-192)、2. PTEN発現を制御するmiR(miR-216a, miR-217)、3. EMT制御に関与するmiR(miR-200 family, miR-205)、4. 幹細胞未分化性維持に関与するmiR(let-7 family, miR-137, miR-124)の発現動態を、定量RT-PCRにて解析する。

(4) 候補miRの標的遺伝子の同定

研究計画(3)で発現変化を認めたmiRの合成miRとanti-miRを作成する。ヒト肺上皮細胞株およびヒト肺線維芽細胞株をそれぞれ合成miRとanti-miRにて刺激し、個々のmiRに対応する標的遺伝子{線維化関連分子(CTGF, ELN1, COL1A1, COL1A2, COL3A1, FBN1)、PTEN、EMT制御関連分子(ZEB1, ZEB2, SNAI1, SNAI2, TWIST1)、幹細胞未分化性維持関連分子(IMP-1, LIN28, LIN28B, c-MYC, JAG2, INHBC, INHBE)}の発現動態をRNAレベル、蛋白レベルにて解析し、候補miRの標的遺伝子を確認する。また、標的遺伝子の3' UTR配列をluciferase遺伝子の下流に組み込んだreporter vectorを細胞株にtransfectionし、標的遺伝子に対するmiR活性を定量的に評価する。

(5) 合成miR/anti-miRの肺線維症に対する治療効果の検討

候補miRの肺線維症に対する治療効果をin vivoで検討するために、(1)候補miRの合成miR(5nM)およびPBS(合成miR投与に対する陰性コントロール)、もしくは(2)候補miRに対するanti-miR(80mg/kg)およびmismatch miR(anti-miR投与に対する陰性コントロール)を10週齢マウスに静脈注射する。Anti-miRによる候補miRノックダウンを、Anti-miR投与3日後の肺組織を用いたノザンプロットングにて確認する。各oligonucleotide投与3日目にプレオマイシンおよびPBSを気管内投与し、気管内投与14日後のKaplan-Meier生存曲線を評価する。呼吸機能評価について、動脈血ガス分析を行う。また、気管内投与前および14日後の肺組織を摘出し、肺組織の形態学的評価(HE染色、Masson-trichrome染色)を行う。ECM産生について、collagen1 \cdot 1の発現をRNAレベル、蛋白レベルにて定量する。肺線維芽

細胞の活性化(増殖能、アポトーシス抵抗性、遊走能、筋線維芽細胞への分化能)について、肺線維芽細胞の初代培養を行い、それぞれWST-1アッセイ、TUNELアッセイ、Boyden chamberアッセイ、および α -SMAの細胞免疫染色により評価する。

(6) 合成miR/anti-miRのEMT、BASCs恒常性維持への影響の検証

細気管支肺胞上皮特異的EGFP発現マウスに対して、研究計画(5)と同プロトコルで合成miR/anti-miRの静脈注射とプレオマイシンおよびPBSの気管内投与を行う。気管内投与14日後に肺組織を摘出し、 α -SMAとGFPの二重免疫染色を行い、陰性コントロールマウスと α -SMA/GFP二重陽性細胞数を比較することで、in vivoにおけるmiRによるEMT制御を検証する。また、同肺組織を用いたフローサイトメトリーにてBASCs細胞(CD34^{pos}/Sca-1^{pos}/CD31^{neg}/CD45^{neg})数を比較し、BASCs恒常性維持への影響を検討する。

4. 研究成果

Quadruple TGマウスを用いた細気管支肺胞上皮PtenによるEMT制御機構の解析を行った。まず、細気管支肺胞上皮特異的にPtenを欠損かつEGFPを発現するマウスと、EGFP発現のみ生じるマウスを作成した(EGFP-SOPten^{flox/flox}マウス、EGFP-SOPten^{wt/wt}マウス)。それぞれのマウスにプレオマイシン(0.05単位/匹)を気管内投与し、投与前と14日後の肺組織を摘出し、筋線維芽細胞マーカーである α -SMAとGFPの二重免疫染色を行い、EGFP-SOPten^{flox/flox}マウスとコントロールマウスの α -SMA/GFP二重陽性細胞数を比較した。結果、肺傷害後のEGFP-SOPten^{flox/flox}マウスにて、EMT由来の筋線維芽細胞数がコントロール群と比較して著明に増加していた(図1-A, B)。一方、非EMT由来筋線維芽細胞数には両群間に差はなかった。以上のことから、肺上皮でのPten発現はEMTを制御し、肺線維症発症抑制に重要であると考えられた。

肺上皮でのPten不活化は上皮由来線維芽細胞の活性化を惹起した(図2)。

肺上皮Ptenの肺線維症進展と上皮間葉転換に関与する分子への影響を解析した。Pten欠損マウスは野生型と比較して肺傷害後の気管支肺胞洗浄液中活性型TGF- β 濃度に差がなかった一方、肺組織抽出蛋白および単離肺上皮抽出蛋白であった一方、肺組織抽出蛋白および単離肺上皮抽出蛋白において、EMTを正に制御するpAkt, pS6K, Snailの発現が亢進し、EMTを負に制御するE-cadherin, claudin-4, lamininの発現が低下していることを見出した(図3)。

Akt 阻害剤を肺傷害後 Pten 欠損マウスに連日腹腔内投与した結果、肺線維化が軽減し対照群と比較して有意に生存率を延長した(図 4)。

IPF 症例の肺組織を用い、IPF 症例群では対照群と比較して肺上皮での PTEN 蛋白発現減弱と pAKT 発現亢進があることを見出した(図 5)。以上の結果から、肺上皮細胞における Pten/Akt 経路が、とくに常軌を逸した EMT 過程を制御することにより、肺線維症の治療標的に成り得ることが示された。

図 1-A

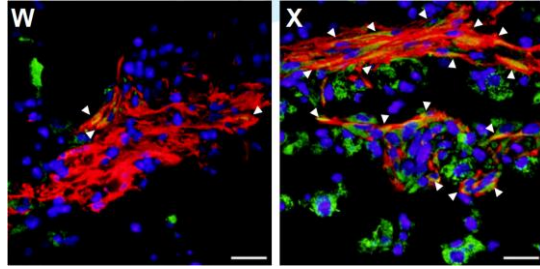


図 1-B

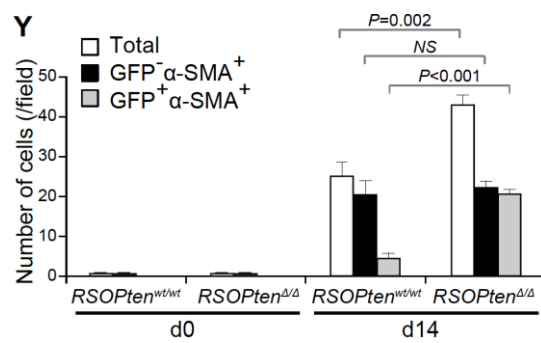


図 2-A

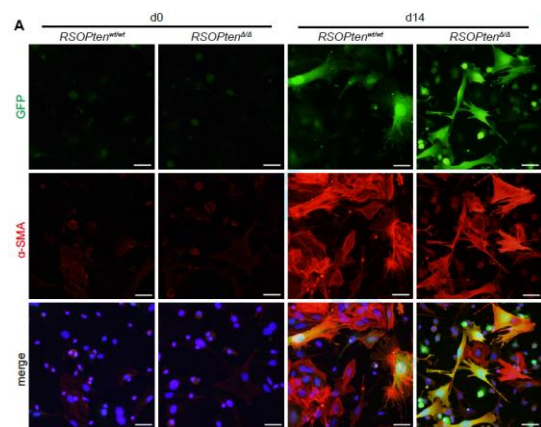


図 2-B

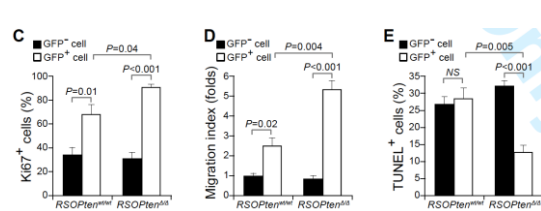


図 3

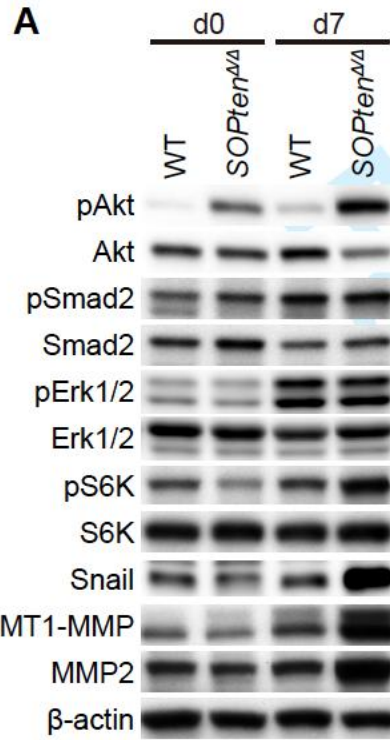


図 4-A

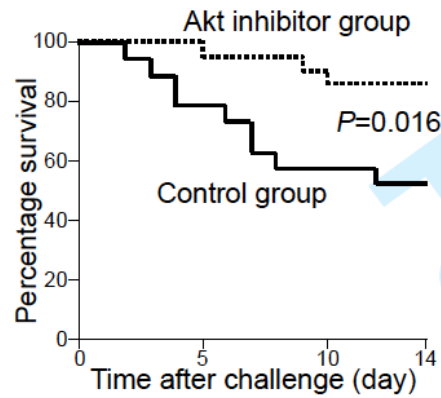


図 4-B

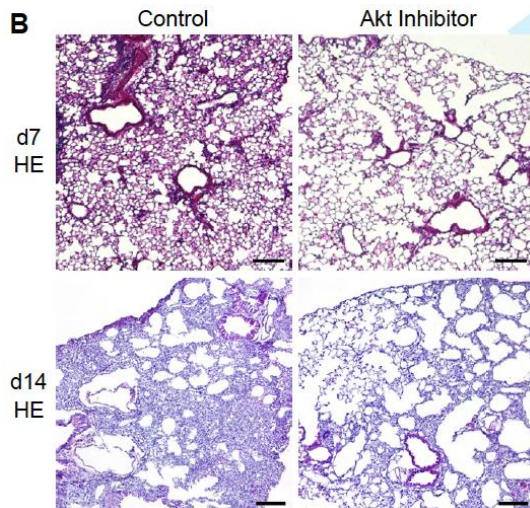


図 5A

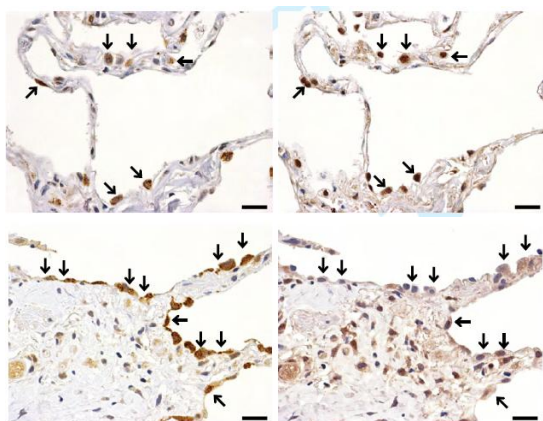
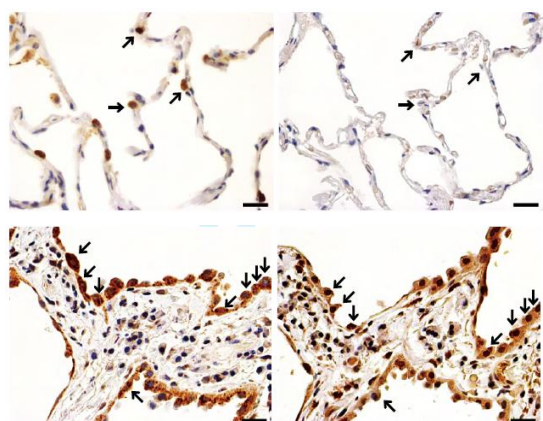


図 5B



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 1 件)

Imazu Y, Yanagi S, Miyoshi K, Tsubouchi H, Yamashita S, Matsumoto N, Ashitani J, Kangawa K, Nakazato M. Ghrelin ameliorates bleomycin-induced acute lung injury by protecting alveolar epithelial cells and suppressing lung inflammation. *Euro J Pharmacol.* 15: 153-158, 2011. (査読有)

[学会発表] (計 4 件)

1) Yanagi S, Miyoshi K, Tsubouchi H, Imazu Y, Matsumoto N, Nakazato M: Epithelial Pten plays an essential role in preventing pulmonary fibrosis by regulating the epithelial-mesenchymal transition. 106thAmerican Thoracic Society International Conference, 2011.5.16, Denver, Colorado. USA.

2) Miyoshi K, Yanagi S, Tsubouchi H, Imazu Y, Matsumoto N, Yamashita S, Nakazato M:

Epithelial Pten plays an essential role in preventing pulmonary fibrosis by regulating the epithelial-mesenchymal transition. The 51st Annual Meeting of The Japanese Respiratory Society, 2011.4.22, Tokyo.

3) Yanagi S: Lung cancer, Lung tissue stem cell, and Lung cancer stem cell (Symposium) . The 9th Annual Meeting of Japanese Society of Medicine Oncology, 2011.7.22, Yokohama.

4) 坪内拡張, 柳重久, 三好かほり, 中里雅光: 特発性肺線維症の細気管支肺胞上皮におけるPten/PI3K/Akt経路関連分子発現に関する検討. 第50回日本呼吸器学会学術講演, 2010.4.25, 京都

[図書] (計 1 件)

柳重久, 三好かほり, 坪内拡張, 中里雅光: 8. 肺癌とHIFs. *Annual Review 呼吸器* 2012. 46-56, 2011

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳重久 (YANAGI SHIGEHISA)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号: 60404422

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: