

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591164

研究課題名(和文) 間質性肺炎における血管新生関連因子の機能解析と臨床応用

研究課題名(英文) Analysis of angiogenetic factor in interstitial pneumonia

研究代表者

功刀 しのぶ(Kunugi, Shinobu)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：30350036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：私達は、間質性肺炎の病態解明のために、特に早期線維化巣に着目し、線維化巣に侵入する間質細胞と肺胞上皮の再生、血管新生の違いを観察している。特発性間質性肺炎やARDSは難治性で病態マーカーの検索は重要な問題である。現在までに間質性肺炎において、血清・気管支肺胞洗浄液中のmiRNA、エクソソーム由来miRNAの報告はない。本研究では、間質性肺炎の線維化形成過程に関わる細胞の中で、エクソソームの主たる産生細胞として肺胞上皮に注目し、すでに知られている細胞小器官の一つのラメラ体との関係を踏まえて血清・気管支肺胞洗浄液のmiRNA、エクソソーム由来miRNAの検索モデル動物を用いて行った。

研究成果の概要(英文)：We have been investigated pathogenesis of early intra-alveolar fibrotic process in interstitial pneumonia. We showed fibroblast differentiation into myofibroblast and decreased neovascularization in intra-alveolar fibrotic lesion of idiopathic pulmonary fibrosis. However, there is only limited information concerning the role of miRNA in lung fibrotic process. Furthermore, microRNA and exosomal miRNA in bronchoalveolar lavage in lung fibrotic process are not investigated. We investigate exosomal miRNA in bronchoalveolar lavage fluid in mouse model of bleomycin induced lung fibrosis.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：呼吸器内科

キーワード：間質性肺炎 肺胞上皮 miRNA

1. 研究開始当初の背景

1) 私達は、種々の間質性肺炎に共通な早期肺胞腔内線維化に侵入する間質細胞と再生肺胞上皮及び血管新生の程度の違いがあり、予後、治療反応性の異なる病態が形成される事を示すことにより、血管新生の重要性を示してきた。特に慢性に経過し予後の悪い通常型間質性肺炎(IPF/UIP)にみられる IPF の予後に相関する報告がされている早期線維化巣 (fibroblastic foci) や急速に発症し進行するびまん性肺胞傷害(DAD の早期線維化巣の線維芽細胞は、1)筋線維芽細胞化し (Am J Pathol 118: 452-75, 1985, Am J Pathol 137: 415-424, 1990)、2) 早期線維化巣の matrix metalloproteinase とその阻害因子 (TIMP) のインバランスがみられ、UIP では TIMP 優位で新生血管はみられず、治療反応性の良い非特異的間質性肺炎 (NSIP)、特発性器質化肺炎 (COP) の早期線維化巣では MMPs 優位であり、その早期線維化巣には血管の形成が見られる事を報告した (Lab Invest 78:687-9, 1998)。また VEGF-A やその受容体 VEGFR-2 の発現レベルは UIP, DAD より NSIP の方が高かった (J Nippon Med Sch 75.1, 2008)。

2) 早期線維化に沈着する細胞外器質として、型コラーゲンが UIP や DAD の早期線維化巣に NSIP, COP に比して優位に沈着し強く認める事を見い出している。(Hum Pathol. 40:1618-27, 2009)。

3) 転写後調整に重要な機能をもつことが発見されたマイクロ RNA は (miRNA) は約 22 塩基配列からなる低分子 RNA の一種である。癌の腫瘍形成や薬剤耐性等のプロセスにおいて重要な役割を担う事が報告されている他、細胞外に分泌される miRNA、とくにエクソソームに含まれる miRNA は癌の診断、治療の新たなマーカーに応用できることがわかってきている。肺の線維化や血管新生に関わる miRNA や細胞外に分泌される miRNA の報告は少ない。

2. 研究の目的

1) 外科的切除された間質性肺炎の中で UIP, NSIP を用いて早期線維化巣の血管新生の違いを明らかにし、それに関わる因子を解析する。

2) プレオマイシン肺臓炎モデルを用いて細胞外に分泌される miRNA を検索するため、気管支肺胞洗浄液を用いてエクソソームの分離とそこに含まれる miRNA を検索する。

3. 研究の方法

1) 外科的切除された NSIP と UIP のホルマリン固定標本を用いて、早期線維化巣における血管新生の程度を血管内皮マーカー CD31 抗体を用いて免疫染色を行い血管を同定し統計学的解析を行

った。

2) 新鮮凍結検体を用いて、血管新生に関わる VEGF-A とそのレセプター VEGFR-2 と早期線維化巣の細胞外器質の産生と分解に関わる MMP-2, MMP-9, TIMP-2 の mRNA を RT-PCR により解析した。

3) プレオマイシン肺臓炎モデルを用いて気管支肺胞洗浄液中の分泌型 miRNA の検索と線維化、血管新生に関わる miRNA を抽出する。

4. 研究成果

1) UIP, NSIP の早期線維化巣を比較し、血管新生の程度が UIP 比して NSIP で優位である事が統計的に明確になった (図 1, 2)

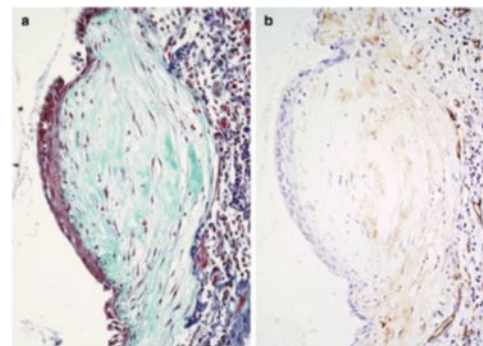
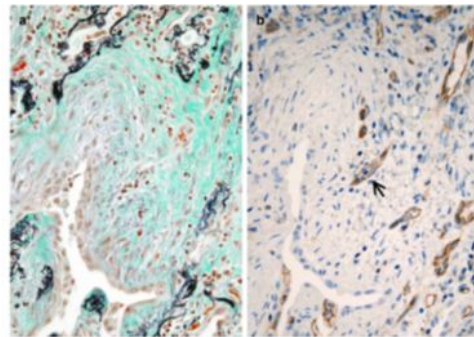


図 1 NSIP (上) と UIP (下) の早期線維化巣 EMG 像と CD31 抗体を用いた免疫染色の結果

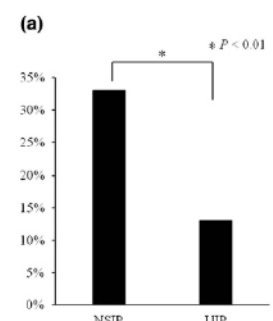


図 2 早期線維化巣での小血管割合

- 2) 血管新生に関わる因子と細胞外基質の産生、分解に関わる因子の mRNA を RT-PCR にて解析したところ、VEGF-A と MMP-2 が NSIP で優位に上昇していた。(図 3)

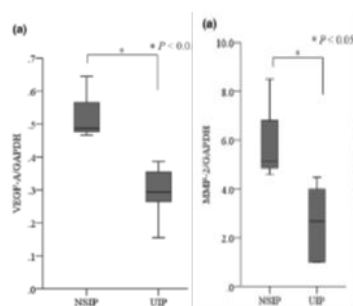


図 3 VEGF-A と MMP-2 が UIP に比し、NSIP で優位である

- 3) プレオマイシン肺臓炎モデルを用いて、気管支肺胞洗浄液を採取し、エクソゾームの分離、解析を行った。腹水や培養上清からのエクソゾームの分離には、超遠心法により分離することが知られているが、気管支肺胞洗浄液では、サーファクタントを多く含む分画の抽出法が知られており、その方法の一つ分画遠心法を応用し、肺胞上皮から分泌されるラメラ体分画とエクソゾーム分画をわけて解析を行った。(図 4)

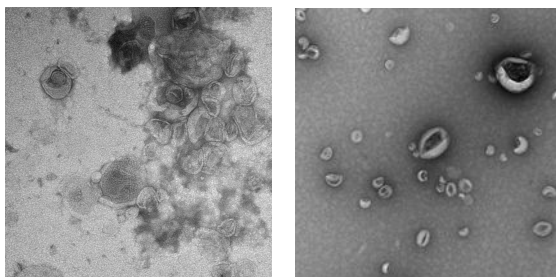


図 4 気管支肺胞洗浄液のラメラ体分画とエクソゾーム分画の電子顕微鏡像

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 4 件)

- 1) Matsui S, Hebisawa A, Sakai F, Yamamoto H, Terasaki Y, Kurihara Y, Waseda Y, Kawamura T, Miyashita T, Inoue H, Hata N, Masubuchi H, Sugino K, Kishi J, Kobayashi

H, Usui Y, Komazaki Y, Kawabata Y, Ogura T. Immunoglobulin G4-related lung disease: clinicroadiological and pathological features. (査読有)

Respirology. 2013 Apr;18(3):480-7.

- 2) Kuse N, Abe S, Hayashi H, Kamio K, Saito Y, Azuma A, Kudoh S, Kunugi S, Fukuda Y, Setoguchi Y, Gemma A. Familial interstitial pneumonia in an adolescent boy with surfactant protein C gene (Y104H) (査読有)

Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis. 30(1):73-7. 2013

- 3) Terasaki Y, Terasaki M, Urushiyama H, Nagasaka S, Takahashi M, Kunugi S, Ishikawa A, Wakamatsu K, Kuwahara N, Miyake K, Fukuda Y. Role of survivin in acute lung injury: epithelial cells of mice and humans. (査読有) Lab Invest. 93(10):1147-63. 2013

- 4) Takahashi M, Kunugi S, Terasaki Y, Terasaki M, Urushiyama H, Kuwahara N, Wakamatsu K, Nakayama T, Fukuda Y. The difference of neovascularization in early intra-alveolar fibrosis between nonspecific interstitial pneumonia and usual interstitial pneumonia. (査読有) Pathol Int. 63(5):237-44. 2013

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 1 件)

功刀 しのぶ, 福田 悠. 間質性肺炎の基本と考え方: 病理. メジカルビュー社, 臨床画像, 30(3): 260-269, 2014 年 3 月

[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

功刀 しのぶ (KUNUGI SHINOBU)
日本医科大学・医学部・講師
研究者番号：30350036

(2) 研究分担者

寺崎 泰弘 (TERASAKI YASUHIRO)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：50332870

(3) 連携研究者

永坂 真也 (NAGASAKA SHINYA)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：00573239

三宅 弘一 (MIYAKE KOUICHI)
日本医科大学・医学部・准教授
研究者番号：90267211

高橋 美紀子 (TAKAHASHI MIKIKO)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号：40516077