

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 24 日現在

機関番号：21601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2014

課題番号：23659436

研究課題名(和文) 軽微な線維化肺を用いた網羅的遺伝子発現解析による特発性肺線維症の病態・病因解明

研究課題名(英文) Determination of new candidate molecule for lung fibrosis by comprehensive gene expression analysis of mild fibrotic lung

研究代表者

棟方 充 (MUNAKATA, MITSURU)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：00209991

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)： 軽微な肺線維化肺と正常肺の網羅的遺伝子発現解析を行い25遺伝子を選別した。既知のIPF関連遺伝子を除外し複数の候補遺伝子を選別した。今回はミドカイン(MDK)に着目した詳細検討を行った。血清MDKはIPF患者で増加、BAL液中MDKは炎症細胞比率と逆相関した。Bleomycine(BLM)径気管支投与で、野生型(WT)マウス肺組織ではMDK-mRNAの増加が認められた。TGF β で正常肺線維芽細胞を刺激するとMDK-mRNA発現が増強した。MDK-KOマウスではBAL液中蛋白とリンパ球比率が低く、TNF α 発現も低下していた。以上の結果から、MDKが間質性肺炎の病態修飾因子であることが判明した。

研究成果の概要(英文)： Comprehensive gene expression analysis was done for mild fibrotic lung and normal lung and 25 genes which showed different expression levels were selected. These genes included several previously reported candidate genes for pulmonary fibrosis. Excluded these genes, Midkine (MDK) gene was selected one of the candidate gene and further precise analysis was done. Serum MDK levels were increased in patients with pulmonary fibrosis. In bronchoalveolar lavage fluid (BALF), MDK levels were reversely correlated with inflammatory cell counts. In mouse, intra-tracheal BLM induced fibrosis, and enhanced MDK-mRNA expression. In addition, stimulation of normal lung fibroblast by BLM increased MDK-mRNA expression. In MDK-KO mouse, protein levels in BALF were significantly decreased and correlated with lymphocyte percentage. TNF- α expression was also decreased. These results suggested that MDK is one of the molecule which modifies pathophysiology of pulmonary fibrosis.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：間質性肺炎 網羅的遺伝子発現解析 ミドカイン

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (IPF) は、原因不明の間質性肺炎であり、未だ有効性の高い治療法もない。その予後は非常に悪く、診断から 2-3 年で 50%以上の患者が死亡する。この難治性疾患を克服するためには、その発症病態に強く関与する要因を明らかにすることが重要である。しかし、本症は慢性の経過をとる疾患で、発症当初は自覚症状や画像所見に乏しいため、初期病態を評価することは非常に難しい。また、ある程度病状が形成された後に遺伝子発現解析などを行っても、既に構築された病態の影響が強く反映されるため、発症に直接関与する因子を解析することは必ずしも容易でない。

2. 研究の目的

本研究は、NEDO 橋渡し研究プロジェクトの一環として、肺癌手術組織ならびに非癌部組織を本邦で独自開発された遺伝子発現解析技術 (32K プラットフォーム) を活用した網羅的遺伝子発現解析結果を応用した研究である。既に集積された肺癌患者の胸部高分解能 CT を検討した結果、非癌部分に軽度の「びまん性間質性肺炎」を有する症例がかなり含まれていることが判明した。本研究は、この非癌部分の肺組織から得られる網羅的遺伝子発現情報を体系的に解析し、正常肺と極軽微な線維化肺における遺伝子発現の差に注目することにより、IPF およびその他の慢性間質性肺炎の初期病態形成に関与する重要分子を解明しようとする萌芽的研究である。

3. 研究の方法

A. 32K 遺伝子発現解析データの比較検討

我々は 2007 年より NEDO の一環として肺癌手術症例の肺癌組織ならびに非癌部組織の遺伝子発現解析を行っている。既に遺伝子発現解析が終了した 153 症例の高分解能 CT(HRCT)を解析した結果、一部の症例では軽度ではあるが線維化所見が認められた。また、これら線維化の認められた全ての症例で低吸収域 (low attenuation area; LAA) も存在していた。このため、本研究における対象は、性・年齢・喫煙歴・肺機能をマッチさせ HRCT で軽度の線維化所見のある症例 (IP(+)LAA(+)) 群、LAA はあるが線維化所見の明らかではない症例 (IP(-)LAA(+)) 群、LAA・線維化所見ともに見られない症例 (IP(-)LAA(-)) 群の 3 群とした。これら 3 群で 32,000 の遺伝子発現程度を比較し、発現亢進遺伝子と発現抑制遺伝子を選別し、クラスター解析なども加え、IP(+)LAA(+)) 群に特徴的な遺伝子発現パターンを解析した。

B. 既存データ解析から得られた分子の IPF における発現解析

上記の解析結果から、IP(+)LAA(+)) 群に特徴的な発現パターンを示す遺伝子群を抽出し、それぞれの遺伝子の機能を調査するとともに、文献的考察を行い、間質性肺炎との関連が報告されているか否かを検討した。更に、これまでに間質性肺炎との関連が報告されておらず、機能的には間質性肺炎発症に関与する可能性があると考えられる幾

つかの遺伝子を抽出した。

C. 候補遺伝子産物に着目した詳細研究

これらの遺伝子の中で今回は midkine (MDK: NM002391)に注目し、その産物である midkine(MDK)について、患者血清中の濃度、肺胞洗浄液(BALF)中の濃度、細胞分画との関連、剖検肺や VATS 生検肺を用いた免疫染色等による肺内局在等の解析などを行った。更に、MDK-KO マウスを入手し、ブレオマイシン肺臓炎モデルを作成し、野生型マウスとの比較を行った。

4. 研究成果

32K 遺伝子発現解析データの解析結果

倫理委員会承認、UMIN 登録を行った後、各症例の遺伝子発現情報、臨床情報を解析し、IP(+)/LAA(+)/群 7 例、IP(-)/LAA(+)/群 7 例、IP(-)/LAA(-)/群 12 例を抽出した。その結果、LAA の有無では遺伝子発現に有意な差が認められず、間質性肺炎(IP)の有無で有意に発現亢進あるいは発現減少を認めた 25 の遺伝子を選別した(図 1)。これらの遺伝子の詳細な文献的考察を行った結果、この中には Osteopontin(NM000582(2))や Caveolin-1(NM001753)など、既に IPF 病態との関連が報告されている複数の遺伝子が含まれていた。これら既に IPF との関連が報告されている遺伝子を除外した遺伝子について文献的考察を行い、IPF 病態への関与が考えらる複数の遺伝子を選別した。更に、その中から、最も可能性の高いと考えられた MKD(NM002391)に着目し、以後

の研究を遂行することとした。

Midkine(MDK: NM002391)に着目した研究結果

MDK(NM002391)は midkine(MDK)をコードする遺伝子である。MDK は塩基性の低分子蛋白質で、細胞の増殖、生存、遊走等、種々の生物活性を持つ。成体での発現は弱いですが、炎症性疾患での組織障害の修復過程で強く発現することが知られている。このため、まず、ELISA 法により、健常者と IPF 患者の血清 MDK 濃度、ならびに IPF 患者、膠原病肺に伴う間質性肺炎患者、サルコイドーシス患者の BAL 液中 MDK 濃度を測定した。MDK は、IPF 患者血清では健常者と比較して有意に増加していた(図 2)。また、IPF 患者 BALF 中の MDK は健常者との比較はできなかったが、特発性間質性肺炎(IPF)、膠原病肺(CVD-IP)、Sarcoidosis の 3 群間では有意な差を認めなかった(図 3)た。しかし、BALF 中の好中球比率と有意な相関関係を認めた($r=0.48$, $p=0.013$)。これらの結果から、MK は IPF 患者の血清で増加し、肺への好中球遊走に関与している可能性が示唆された。

次に、MK の間質性肺炎への関与メカニズムを解明するため、Wild type (WT) マウス(C57BL/6J)と MK-KO マウスを用い、Bleomycine(BLM)マウス気管内投与による間質性肺炎モデルを用いた検討を行った。WT マウス肺組織では、BLM 投与早期(3 日目)と後期(14、21 日)で MK mRNA の有意な増加が認められた(図 4)。また、ヒト肺線維芽細胞(WI-38)を TGF- β で刺激

すると、3時間でMK mRNAの発現増強がみられた。また、MK-KOマウスでは、BLM投与後のBAL液中の蛋白濃度とリンパ球比率がWTマウスと比較し有意に低下し、TNF- α の発現も有意に低下していた。これらの結果から、MKはBLM肺障害を抑制する可能性が示唆された。

以上の結果から、MKはIPF病態の重要な修飾因子であることが判明した。

まとめ

軽微な線維化肺を用いた網羅的遺伝子発現解析による間質性肺炎の病態・病因の解明を試みた。本法により、25の間質性肺炎への関与が疑われる分子が選定された。それらの分子の中には、既にIPF発症に重要な関与をすることで報告された複数の分子が含まれていた。また、これまで注目されていなかった分子の中から、Midkineを選定し、患者血清・BAL・肺組織の検討、遺伝子改変マウスを用いた検討などを行った結果、間質性肺炎病態に重要な関与をすることが明らかになった。これらの結果から、今回取り組んだ新たな研究手法が、間質性肺炎病態解明に非常に有用であることが判明した。今後、Midkine以外の分子の解析結果により、更なる情報が得られることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕なし

〔学会発表〕(計3件)

Misa K, Tanino Y, Wang XT, Fukuhara N,

Nikaido T, Uematsu M, Fukuhara A, Sato S, Saito K, Yokouchi H, Ishida T, Munakata M. Role of midkine in idiopathic pulmonary fibrosis. Annual Meeting of European Respiratory Society (ERS), 2013 (Viena)

美佐健一、谷野功典、王新涛、福原奈緒子、二階堂雄文、佐藤祐樹、東川隆二、鈴木康仁、植松学、福原敦朗、佐藤俊、齋藤純平、棟方充。急性肺炎における血中midkineの検討。第55回日本呼吸器学会学術講演会、2015(東京)

Misa K, Tanino Y, Wang XT, Nikaido T, Fukuhara N, Sato Y, Togawa R, Suzuki Y, Uematsu M, Fukuhara A, Sato S, Saito J, Munakata M. Midkine inhibits bleomycin-induced lung injury in mice. Annual Meeting of American Thoracic Society, 2015 (Dever)

〔図書〕なし

〔産業財産権〕

○出願状況：なし

○取得状況：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者：棟方 充(MUNAKATA Mitsuru)

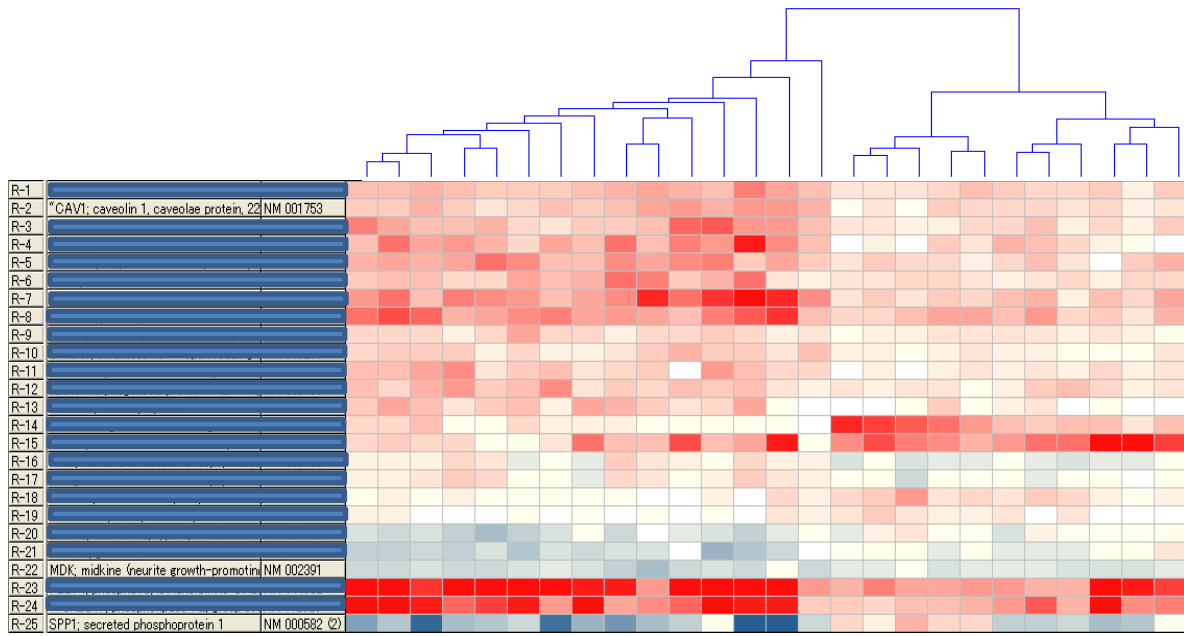
福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：00209991

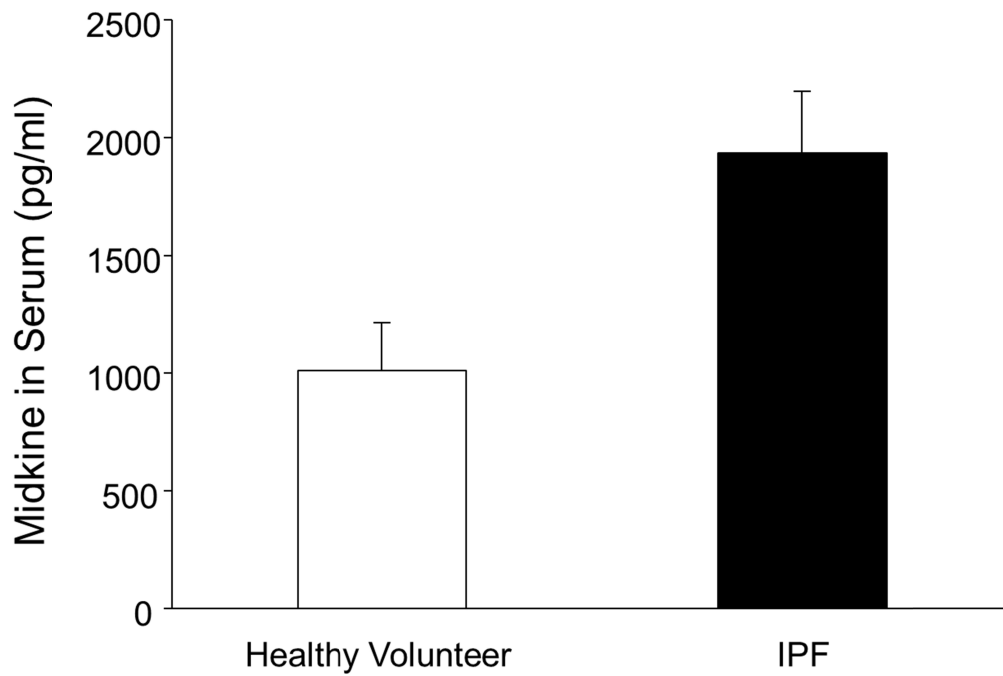
(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし

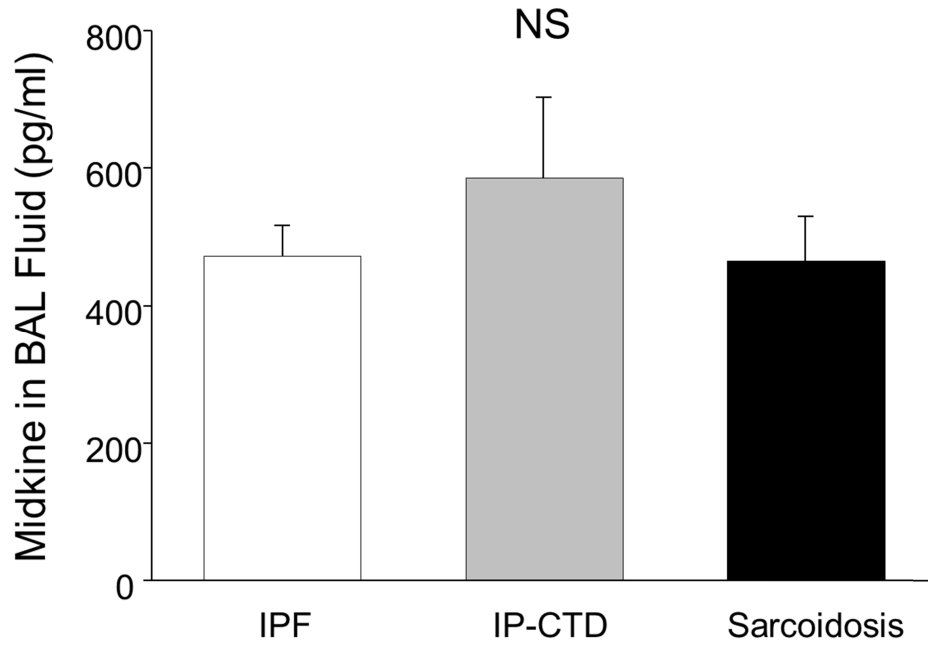
1



2



3



4

