

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591127

研究課題名(和文) mTOR 関連細胞生存シグナルの制御による慢性閉塞性肺疾患発症およびその機序の解明

研究課題名(英文) Investigation of the pathophysiological mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease by the inhibition of mTOR-related cell proliferative signal

研究代表者

安尾 将法 (YASUO, Masanori)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・講師

研究者番号：20402117

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究は慢性閉塞性肺疾患(COPD)の病態解明を目的としたものである。肺を構成している細胞の細胞死による減少が肺気腫を発症することがわかってきている。

今回はシロリムスという薬剤を使用して細胞増殖に必要なmTORシグナルを阻害することによって肺気腫が形成されるか、そのメカニズムは何かを解析した。シロリムスはAkt、VEGFといった肺胞構成細胞の維持・増殖に必要なシグナルを阻害し、ラット肺に気腫様の病変を形成した。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to elucidate the pathophysiological mechanisms of chronic obstructive pulmonary disease. It has been reported that the apoptosis of lung structure maintenance cells causes emphysema.

Our hypothesis was mTOR inhibition may reduce lung cell proliferation and induce emphysematous changes in rat lung. We administered sirolimus, a mTOR inhibitor, to rat and investigated the rat lungs. Sirolimus induced rat lungs revealed that alveolar enlargement and lung cell apoptosis due to the reduction of VEGF and phosphor Akt expression.

The mTOR signal may important to maintain the lung structure cell maintenance.

研究分野：慢性閉塞性肺疾患(COPD)、喘息、呼吸器内視鏡

キーワード：肺気腫 動物モデル アポトーシス mTOR阻害薬

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性閉塞性肺疾患 (COPD) は今後増加が最も懸念されている疾患の一つである。COPD の病態の解明、治療法の開発は未だ途上であり、COPD 発症機序を解明すること、病態の進展にどのような因子がかかわっているかを解明することが重要である。

COPD の発症、特に肺気腫発生に関わる病態において、新たな概念として提唱されてきている肺胞構成細胞のアポトーシスがある。この肺胞構成細胞のアポトーシスに関わる重要な因子として血管内皮成長因子 (VEGF) の発現低下が報告されてきた (Kasahara Y et al. J Clin Invest. 2000; 106: 1311-9.)。我々はこの VEGF の発現低下の原因として、ヒト COPD 肺における低酸素誘導因子 (HIF-1) の発現低下を報告した。

mTOR ( mammalian target of rapamycin ) はマクロライド系抗生物質ラパマイシンの標的分子として同定されたセリン・スレオニンキナーゼであり、細胞の分裂や成長、生存における調節因子としての役割を果たしている。低酸素による HIF-1 の活性化には PI3K 経路が関与している (Zundel W et al. Genes Dev. 2000;14: 391-6.) とされ、Hudson らは、mTOR がこの活性化経路において正の調節因子として働き、mTOR の阻害によって HIF-1 の活性化が抑制されることを報告している (Hudson CC et al. Mol Cell Biol. 2002; 22: 7004-14.)

(2) このように PI3K-Akt-mTOR シグナルは HIF-1 -VEGF 経路の上流でもあり、また VEGF シグナルの下流としての経路でもあり、いずれも細胞生存に深くかかわっていることがわかる。これまで我々が示してきている COPD における HIF-1 -VEGF 経路の重要性とその維持に PI3K-Akt-mTOR シグナルがかかわっている可能性が考えられることから、PI3K-Akt-mTOR シグナルの低下は COPD 発症の重要な要素である可能性が強く示唆される。

## 2. 研究の目的

(1) COPD 肺における細胞生存シグナルとして重要であると思われる PI3K-Akt 経路を mTOR 阻害剤 (Temsirrolimus) によって阻害することで小動物(ラット)において COPD (肺気腫) 様病変が作成できるかを検討する。

(2) この気腫様病変で HIF-1 -VEGF が低下していることを確認する。

(3) この肺で何が起きているのか (酸化ストレスの亢進、アポトーシスの亢進、炎症性メディエーターの亢進など) を確認し、中心となる因子はどれかを細胞実験で確認する。

## 3. 研究の方法

(1) ラット肺気腫モデルの作成

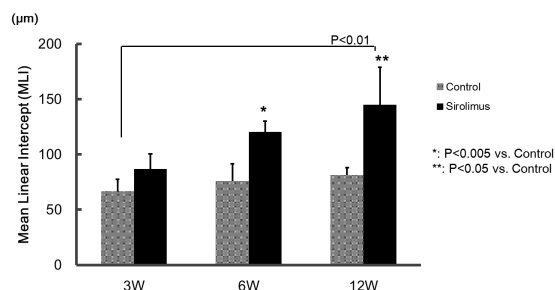
mTOR 阻害薬としてはシロリムスを用いた。はじめに至適投与量と投与期間を決定するための検討を行った。雄性 SD ラットに対して 2 および 6mg/kg/day のシロリムスを腹腔内注射した。投与方法は 6 日間/週で 6 週間継続投与を行った。尚、シロリムスはエタノールで溶解したが、この溶解液のみを投与したものをコントロールラットとした。

(2) 6 週後にラットを解剖し、肺組織を組織学的、分子生物学的評価を可能とするように取得、保存した。また血清についても解剖時に取得、凍結保存した。

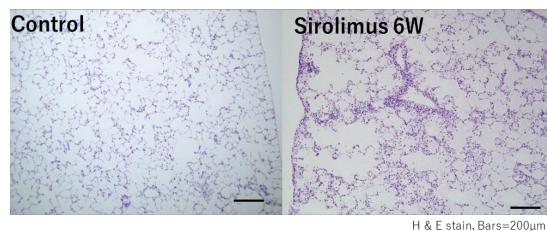
(3) 上記(1)、(2)の結果から、至適投与量が 2mg/kg/day であることがわかり、また気腔の拡大がみられたことから、経時的変化をみるために 3 および 12 週間投与のラットも追加して検討した。

## 4. 研究成果

(1) シロリムス腹腔内継続投与ラットは肺に気腫様変化を生じた。コントロールラットと比較して、6 週以降に有意な気腔の拡大を生じていた。MLI (Mean Linear Intercept) における結果を示す。



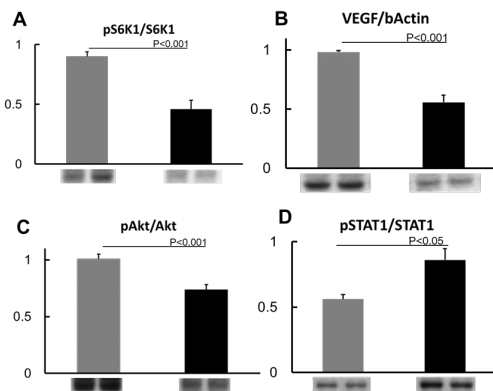
組織学的にも 6、12 週投与のラットにおいて気腔の拡大と考えられる所見が得られた (下図: 6 週投与の例)。



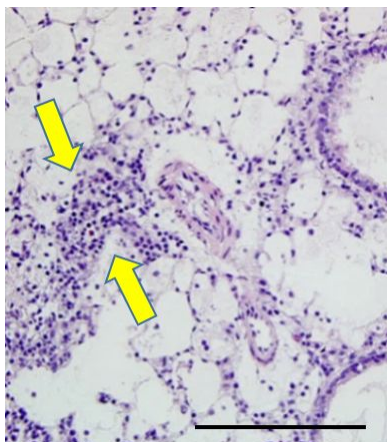
(2) シロリムス投与ラット肺において、VEGF の発現低下、アポトーシスの亢進がみられた。シロリムス投与ラット肺で 3, 6, 12 週とも、mTOR 活性が有意に阻害されていることを S6K1 の活性化の低下で確認した (下図 A: 6 W の例: ウェスタンブロット法による)。

シロリムス投与ラット肺組織における VEGF, pAkt の有意な低下と pSTAT1 (アポトーシスに陥る細胞の核内で活性化される) の有意な亢進は 6 週以降でみられた (下図 B-D: 6 週の例)。HIF-1 の発現は今回の研究ではみられず、シロリムス投与ラットにおける気腔の拡

大は HIF-1 活性とは関係ないことが示唆された。12 週と 6 週については同様の傾向であった。

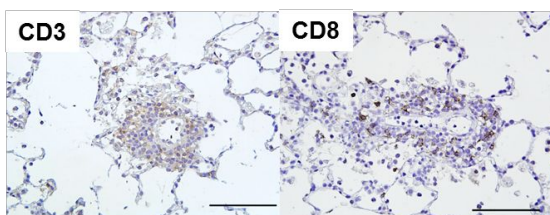


3) シロリムス投与ラット肺では気腔の拡大以外に CD8 陽性 T 細胞浸潤がみられた。今回作成できたラット COPD モデル (肺気腫モデル) では、気腔の拡大以外に小血管の周囲に小円形細胞の浸潤がみられた (図)。この円形細胞は免疫組織学的検討により、CD3、CD8 陽性の T 細胞であることが判明した。



H & E stain, Bar=200μm

次に浸潤した CD8 陽性 T 細胞のアポトーシス

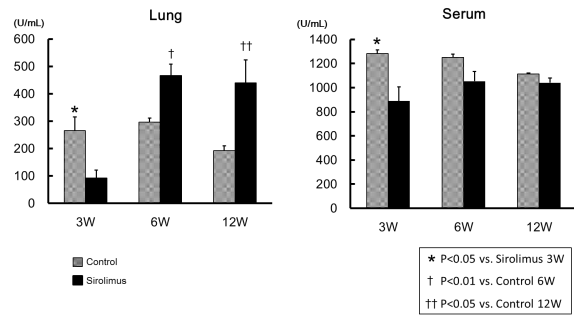


Bars=200μm

に関連する活動性の有無をみるため、グランザイム B 活性を測定した。測定は Abcam 社 (東京) Granzyme B Activity Assay Kit (ab157403) を用いた。

シロリムス投与ラット肺においてグランザイム B の活性が 6 週、12 週で有意に亢進していた。一方、血清中のグランザイム B の活性は亢進していなかった (図)。

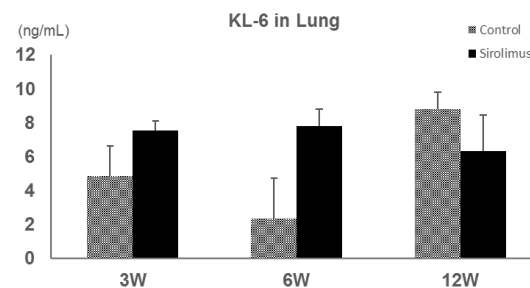
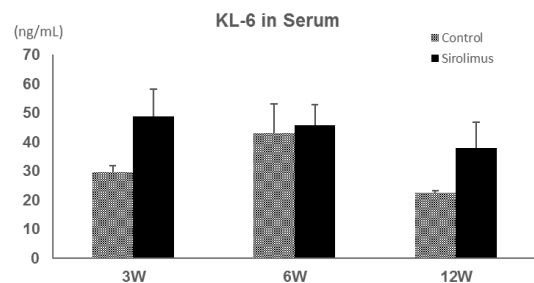
#### < グランザイム B 活性 (肺、血清) >



#### 4) 薬剤性肺障害 (間質性肺炎) としての評価

今回の研究で発見された肺内小血管周囲の円形細胞浸潤が、いわゆるシロリムスによる薬剤性肺障害と関連している可能性について、間質性肺炎の活動性を反映するとされる、KL-6 について ELISA 法を用いて測定した。測定は MyBioSource 社 (San Diego, California, USA) の rat kl-6 Elisa キット (MBS732388) を用いた。

ラット肺組織、血清中のいずれの KL-6 も有意な上昇はみられなかった (図)。



#### 5) 本研究によって得られた成果のまとめとインパクトについて

本研究によって、mTOR 阻害薬 (シロリムス) の長期継続投与は、HIF-1 の抑制と関係なく肺胞構成細胞の VEGF および pAkt 活性を抑制し、アポトーシスを惹起して気腔の拡大 (= 肺気腫様の病変) を来することが示された。この結果はこれまでの我々の研究業績と部分的に合致するが、部分的に合致しないところもみられた。これまで我々は “炎症” が関与しない肺気腫形成を主に VEGF の発現低下という観点から報告してきた。今回の mTOR 阻害薬投与による気腔の拡大は mTOR 活性を阻害することで惹起される pAkt の低下を契機とする VEGF 発現の低下 アポトーシスの亢進 気腔の拡大 (肺気腫化) と、mTOR 阻害薬継続投与によって惹起される CD8 陽性 T

細胞によるグランザイムBの活性亢進 アポトーシスの亢進という両者の影響が考えられた。mTOR 阻害薬であるシロリムスの長期投与において、CD8 陽性 T 細胞がシロリムスの細胞増殖抑制効果を免れて発現してくる事実は過去に臨床的にも報告されている (Slavik JM et al. J Immunol. 2001; 166: 3201-9.)。我々にとって当初は肺での CD8 陽性 T 細胞浸潤は予想外であったが、この報告と矛盾しないことが分かった。

シロリムスは近年リンパ脈管筋腫症 (LAM) の治療薬として使用されつつあり、今後長期投与例も出てくるものと考えられる。今回の我々の投与量は LAM で使用される用量よりも多く、種も異なるが、シロリムスの長期投与が LAM 患者において気腔の拡大を悪化させる可能性も考えられ、血中濃度の測定や経時的な呼吸機能、胸部 CT による経過観察が必要であると思われた。

一方、mTOR 阻害薬は腎細胞癌の治療薬など、抗癌剤としても使用されるが、このときの副作用として薬剤性肺障害 (間質性肺炎) が問題となる。今回我々は、mTOR 阻害薬投与ラット肺において炎症細胞浸潤を認めたためこれが mTOR 阻害薬による薬剤性肺障害と関連があるかどうかについて、KL-6 を用いて検討した。結果は血清、肺ともに KL-6 の上昇はみられず、薬剤性肺障害との関連は KL-6 という観点からは否定的と考えられた。

以上、近年注目されている mTOR 阻害薬に関連する、長期持続投与に伴う肺気腫や炎症細胞浸潤の可能性について初めて言及した点でインパクトのある研究と考えられる。

#### 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2件)

Yasuo M, Mizuno S, Allegood J, Kraskauskas D, Bogaard HJ, Spiegel S, Voelkel N. Fenretinide causes emphysema which is prevented by sphingosine 1-phosphate. PLOS ONE., published 11 Jan 2013, 査読有  
DOI:10.1371/journal.pone.0053927

Voelkel NF, Mizuno S, Yasuo M. Does drug-induced emphysema exist? Eur Respir J. 2013; 42(6): 1464-1468, 2013, 査読有  
DOI: 10.1183/09031936.00110513

[学会発表](計2件)

Masanori Yasuo, Hitomi Imamura, Masatomo Kawakubo, Masayuki Hanaoka  
American Thoracic Society (ATS) 2015

International Conference,  
2015.5.19, Denver, Colorado

Masanori Yasuo, Masayuki Hanaoka,  
Michiko Ito, Masatomo Kawakubo, Hitomi  
Imamura, Yayoi Tokoro, Nobumitsu  
Kobayashi, Keishi Kubo  
Acrolein as a systemic disease of  
chronic obstructive pulmonary disease  
American Thoracic Society (ATS) 2013  
International Conference, 2013.5.19,  
Philadelphia, Pennsylvania

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

安尾 将法 (YASUO, Masanori)  
信州大学・学術研究院医学系 (医学部附属  
病院)・講師  
研究者番号: 20402117

##### (2) 研究分担者

花岡 正幸 (HANAOKA, Masayuki)  
信州大学・学術研究院医学系・教授  
研究者番号: 20334899

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: