

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24591172

研究課題名(和文) 間質性肺炎におけるアンジオポエチン様因子の役割の検討

研究課題名(英文) Role of angiopoietin-like protein in the pathogenesis of interstitial pneumoniae

研究代表者

渡辺 正樹 (Watanabe, Masaki)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・特任助教

研究者番号：90398298

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：アンジオポエチン様因子2は、慢性炎症を制御する重要な因子であるが、肺での働きは知られていない。我々は間質性肺炎における役割を検討した。アンジオポエチン様因子2は、マウス間質性肺炎モデルにおいて発現が増強していた。アンジオポエチン様因子2遺伝子を欠損したマウスに間質性肺炎を誘導すると、正常マウスと比べて間質性肺炎は増悪した。また間質性肺炎患者では、健常者と比べて血清中のアンジオポエチン様因子2の濃度が著明に上昇していた。以上から、アンジオポエチン様因子2は間質性肺炎の病態を抑制する重要な因子であり、新たな治療の対象となり得る。

研究成果の概要(英文)：Angiopoietin-like protein 2 (ANGPTL2) is a chronic inflammatory mediator associated with various pathologies. However, its role in lung has not been fully described. To clarify a potential function in lung, we first monitored ANGPTL2 protein expression in mouse lung tissue. We observed ANGPTL2 expression in both alveolar epithelial type I and type II cells and in alveolar macrophages. Next, we generated a bleomycin-induced interstitial pneumoniae (IP) model in wild-type or ANGPTL2 knockout mice to assess ANGPTL2 function in IP. ANGPTL2 knockout mice developed more severe IP than wild-type mice after bleomycin treatment. Next, we examined serum ANGPTL2 levels in IP patients. Serum ANGPTL2 levels were significantly elevated in IP patients compared to healthy controls. From these results, we conclude that ANGPTL2 deficiency enhances IP, suggesting that ANGPTL2 plays an important role in the pathogenesis of IP.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：アンジオポエチン様因子 間質性肺炎

1. 研究開始当初の背景

間質性肺炎 (Interstitial Pneumonia : IP) は、肺胞隔壁に慢性的な炎症と線維化を来たす疾患であり、有効な治療法は乏しく、予後は極めて不良である。肺胞上皮細胞と血管内皮細胞が傷害を受けると、炎症メディエーターの放出、好中球や肺胞マクロファージの誘導、血管透過性亢進などを介して病変の形成が始まると考えられているが、詳細な病態生理は解明されていない。

申請者らは、これまで IP を始めとする難治性呼吸器疾患の病態解析と新規治療法の開発に取り組んできた。すなわち、臓器再生因子である Hepatocyte Growth Factor の肺胞上皮細胞および血管内皮細胞への選択的遺伝子導入により、効果的に炎症および線維化を抑制できること (*Mol Ther* 2005)、血管内皮細胞増殖因子 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) に対するモノクローナル抗体を肺局所で長期間産生するベクターの開発により、透過性肺水腫や転移性肺腫瘍などの発症および進展の抑制に有効であること (*Hum Gene Ther* 2008, *Hum Gene Ther* 2009, *Gene Ther* 2010)、急性および慢性炎症反応におけるサイトカインシグナル抑制因子の新たな知見と治療への応用などを報告してきた。

アンジオポエチン様因子 (Angiopoietin-like protein : Angptl) は、血管新生因子アンジオポエチンと類似の構造を持つ分泌タンパク質であり、ヒトでは7種類のファミリー分子が同定されている。血管新生制御に関する他に、糖、脂質、エネルギー代謝に関する多彩な機能も有する。最近、Angptl2 が慢性炎症を誘導する重要な因子であることが判明した。炎症を惹起する機序としては、低酸素や小胞体ストレスによって発現した Angptl2 が、血管内皮細胞の炎症経路活性化、血管透過性亢進、マクロファージの浸潤などを促すことが確認されている。

2. 研究の目的

Angptl は、慢性炎症を基盤とする生活習慣病の病態に関与するなど、多彩な機能を有することが最近、明らかになりつつある。難治性呼吸器疾患の IP で推測されている病態機序と Angptl が有する生物学的機能は共通する点が多い。本研究では、IP の病態における Angptl の役割を解析して、新しい概念による病態解明と治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

IP 病態における Angptl2 の役割を解明するために、以下の研究過程を進める。

1) IP モデルにおける Angptl2 の発現細胞、発現動態の検討

IP は、マウスにブレオマイシンを気管内投与して誘導する。申請者らが開発した免疫染色用の抗 Angptl2 抗体を用いて、Angptl2 の発現細胞を無刺激と IP モデルで比較する。発現動態の確認は、気管支肺胞洗浄液、血清中の Angptl2 濃度を ELISA にて測定する。

2) Angptl2 遺伝子欠損マウス (Angptl2 KO) を用いた IP モデルの解析

IP における Angptl2 の役割を明らかにするために、Angptl2 に IP を誘導して、肺病理組織像、肺内ヒドロキシプロリン量を基に、線維化の重症度を野生型と比較する。次に、Angptl2 KO の呼吸機能障害を Flexivent システムを用いて分析する。

3) IP 患者における Angptl2 の動態の検討

特発性肺線維症患者 (13 人) における血清中 Angptl2 濃度を健常者 (12 人) と比較して、これらが疾患の早期発見、活動性、病期、予後推測のマーカーになりうるかを解析する。

4. 研究成果

1) IP モデルにおける Angptl2 の発現細胞、発現動態の検討

Angptl2 は、無刺激の野生型マウス肺において型、型肺胞上皮、肺胞マクロファージに発現していた。このマウスに IP を誘導すると、IP 病変部において、肺胞上皮細胞を始めとした様々な細胞で Angptl2 は著明に発現が増強した。さらに、IP モデルの気管支肺胞洗浄液および血清中の Angptl2 濃度も上昇することを確認した。

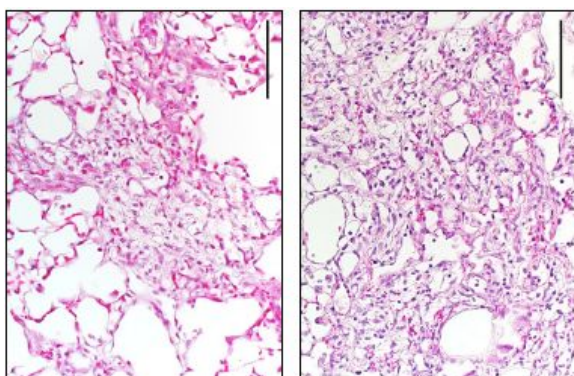
2) Angptl2 KO を用いた IP モデルの解析

Angptl2 KO に IP を誘導したところ、野生型と比べて病理学的に肺線維化およびコラーゲンの沈着が増強していた (図 1)。また、肺内ヒドロキシプロリン量も Angptl2 KO において増加していた。以上から、Angptl2 の欠損により肺線維化は増強することを見出した。

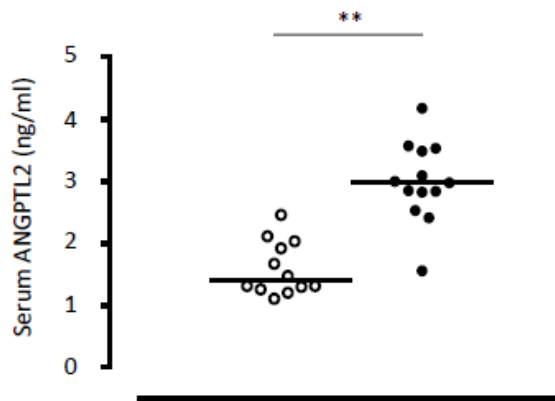
次に、Angptl2 KO の呼吸機能を野生型と比較した。Respiratory system resistance、newtonian resistance、tissue damping に差異は無かったが、respiratory system elastance と tissue elastance は Angptl2 KO で増加していた。これらは、Angptl2 KO の中枢気道に異常は無いが、末梢肺領域は障害されていることを意味しており、IP で認める拘束性肺障害に矛盾しない所見である。

3) IP 患者における Angptl2 の動態の検討

特発性肺線維症患者では健常者と比べて血清中 Angptl2 濃度が著明に上昇していた (図 2)。



(図 1;左:野生型, 右:Angptl2 KO)



(図 2;左:健常者, 右:特発性肺線維症患者)

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1) Kubota S, Watanabe M, Shirato M, Okuno T, Higashimoto I, Machida K, Yokomizo, Inoue H
An inhaled phosphodiesterase 4 inhibitor E6005 suppresses pulmonary inflammation in mice
Eur J Pharmacol, 査読有, 768, 2015, 41-48
DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.10.013.

2) Hamada T, Samukawa T, Kumamoto T, Htanaka K, Tsukuya G, Yamamoto M, Machida K, Watanabe M, Mizuno K, Higashimoto I, Inoue Y, Inoue H
Serum B cell-activating factor (BAFF) level in connective tissue disease associated interstitial lung disease
BMC Pulm Med, 査読有, 15, 2015, 110
DOI:10.1186/s12890-015-0105-0.

3) Watanabe M, Machida K, Inoue H
A turn on and a turn off:BLT1 and BLT2 mechanisms in the lung
Expert Rev Respir Med, 査読有, 8, 2014, 381-383
DOI: 10.1586/17476348.2014.908715.

[学会発表] (計 2 件)

1) Kubota S, Watanabe M, Inoue H
Intratracheal administration of E6005, a novel PDE4 inhibitor, ameliorates LPS-induced

pulmonary inflammation

第 42 回日本免疫学会学術集会, 2013.12.11-13,
幕張メッセ (千葉県千葉市)

2) Kubota S, Watanabe M, Inoue H

Intratracheal administration of E6005, a novel
dry powdered PDE4 inhibitor, to suppress
LPS-induced pulmonary inflammation

American Thoracic Society International
Conference, 2013.5.17-22, Philadelphia (USA)

[その他]

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 呼吸器
内科学 ホームページ

<http://www2.kufm.kagoshima-u.ac.jp/field/advanced-therapeutics/f104/04.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 正樹 (WATANABE Masaki)

鹿児島大学医歯学総合研究科・呼吸器内科学・
特任助教

研究者番号 : 90398298

(2) 研究分担者

井上 博雅 (INOUE Hiromasa)

鹿児島大学医歯学域医学系・呼吸器内科学・
教授

研究者番号 : 30264039

(3) 連携研究者

尾池 雄一 (OIKE Yuichi)

熊本大学大学院生命科学研究部・分子遺伝学
分野

研究者番号 : 90312321