

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670604

研究課題名(和文)オートタキシン阻害によって肺移植後の閉塞性細気管支炎の抑制を目指した基礎研究

研究課題名(英文)The study for suppression of obliterative bronchiolitis by inhibiting autotaxin activity

研究代表者

丹藤 由希子(Yukiko, Tando)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・非常勤講師

研究者番号：70596212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：閉塞性細気管支炎は細気管支領域が不可逆的閉塞をきたすことにより呼吸不全を引き起こす疾患であり、その主因は肺移植による慢性免疫拒絶である。その病態には不明な点が多く、有効な治療・予防法がない。本研究は、オートタキシン-リゾフォスファチジン酸(LPA)系を抑制することで本症の発症を予防できるかを検証した。

肺移植モデルマウスを用いた実験で、LPA1およびLPA3のアンタゴニスト投与が病態初期に起こる気道上皮の脱落を抑制することを明らかにした。また、ヒト気道上皮細胞を用いた実験で、LPAが細胞の基質への接着を減弱させ、それがLPA1を介していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Obliterative bronchiolitis (OB), a fibroproliferative disorder of the small airways, is the main manifestation of chronic lung allograft rejection. Because of poor understanding of the mechanism, there is currently no treatment of this disease. The aim of this study was to repress OB by the administration of an autotaxin (ATX) inhibitor or lysophosphatidic acid (LPA) receptors (LPARs) antagonist.

The administration of Ki16198 attenuated airway epithelial cell loss in the heterotopic tracheal transplant allograft model. The number of apoptotic epithelial cells was decreased in the allografts treated with Ki16198. In addition, LPA inhibited the attachment of BEAS-2B to the ECM, which was restored by the presence of Ki16425. Accordingly, LPA signaling is involved in the loss of airway epithelial cells through the inhibition of cell adhesion to the ECM in an alloimmune-environment. This finding suggests LPA as a novel therapeutic candidate target in human OB after lung transplantation.

研究分野：分子生物学

キーワード：肺移植 LPA モデルマウス 閉塞性細気管支炎

## 1. 研究開始当初の背景

肺移植は末期肺疾患の治療法として定着しつつあり、その実施数は着実に増加している。しかしながら、移植後の患者の予後が非常に悪い点が大きな問題となっている。その原因の大多数を占めるのが閉塞性細気管支炎の発症であり、肺移植を受けた患者の約50%が5年以内に本症を含めた症候群の罹患で死亡している。このような状況にもかかわらず、本症の発症機序には未だ不明な点が多い。臨床では主に免疫抑制剤を用いた治療法が行われてきたが、効果の面からは有用な治療法とは言えない。よって、本症の効果的な予防法または治療法を見出すことが、肺移植後の予後を向上させるための最も重要な課題である。

近年、リゾフォスファチジルコリン (LPC) を基質としてリゾフォスファチジン酸 (LPA) を産生する酵素であるオートタキシン (ATX) の生理学的多様性が次々と明らかになっている。ATX は癌、線維症、肝硬変といった疾患との関連性も示唆されているため、創薬ターゲットとして注目されている。そこで、閉塞性細気管支炎の発症に関与する可能性を持つ新たな因子として、この ATX に着目した。

## 2. 研究の目的

本研究では、以下の研究から閉塞性細気管支炎の発症への ATX の関与を明らかにし、臨床応用への有用性を提唱することを目的とした。

- (1) ATX 阻害による閉塞性細気管支炎の病態の抑制効果を検討する。
- (2) 閉塞性細気管支炎における ATX-LPA-LPA 受容体経路の存在とそのメカニズムを解明する。
- (3) 肺移植後の閉塞性細気管支炎と ATX の関連性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) ATX 阻害による閉塞性細気管支炎の発症抑制効果の検討

heterotopic tracheal transplantation (HTT) モデルマウスを作出し、ATX 阻害剤を投与する実験群と vehicle を投与する対照群からなる実験系で、気管閉塞の程度を比較した。比較は、先行研究に則った組織学的な評価方法で行った。また、1型及び3型の LPA 受容体のアンタゴニストを同モデルマウスに投与し、気管閉塞の程度を比較した。

### (2) 閉塞性細気管支炎の発症に関与する LPA-LPA 受容体経路の解明

細胞の接着における LPA の影響を検証するため、ヒト上皮細胞株 BEAS-2B の細胞懸濁液に LPA および LPA 受容体アンタゴニストを加えて培養プレートに播種し、1.5 時間後に 4%PFA で固定・ファロイジン染色したのち、細胞の真球度および最大幅を定量した。また、すでに接着している細胞における LPA の影響を見るために、BEAS-2B の培養液に LPA および LPA 受容体アンタゴニストを加えて 6 時間後に Hoechst33342 を取り込ませ、蛍光強度を測定した。さらに、これらの現象に 1型と 3型どちらの LPA 受容体に関与しているのかを明らかにするため、siRNA 導入によって各受容体遺伝子の発現をノックダウンし、上記と同様に細胞の接着について検証した。

## 4. 研究成果

### (1) HTT モデルマウスを用いた LPA 受容体阻害による移植片閉塞抑制効果

HTT モデルマウスを作出し、ATX 阻害剤を投与する実験を行った結果、移植 10 日目で ATX 阻害剤投与群と vehicle 投与群の間で移植片の炎症に差は見られなかった。一方、6種類の LPA 受容体のうち 1型 (LPA1) および 3型 (LPA3) の LPA 受容体に対するアンタゴニストである Ki16198 を投与した群は、

vehicle 投与群に比べて組織評価の項目である気道上皮の脱落が抑えられた(図1)。また、TUNEL 法により、Ki16198 投与群では上皮のアポトーシスが抑制されていることが分かった(図2)。ATX の阻害と LPA 受容体の阻害で結果に違いが見られたことについては、ATX 阻害剤が組織に浸透せず、局所的な ATX の活性が抑制できなかった可能性が考えられる。

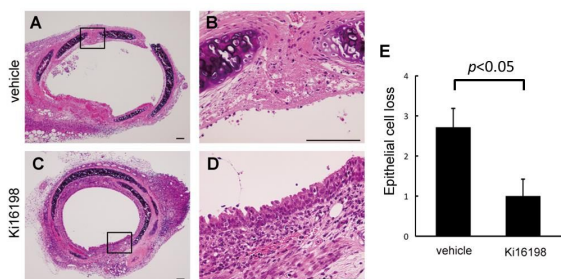


図1. HTTモデルマウスにKi16198を投与して10日目の移植片横断切片。Vehicle投与群(A, B)に比べ、Ki16198投与群(C, D)は上皮の脱落が抑えられている(E)。

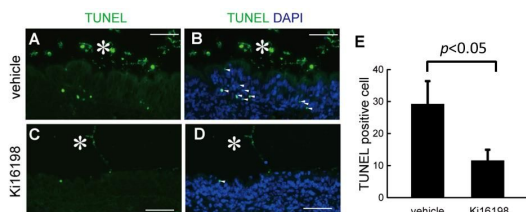


図2. HTTモデルマウスにKi16198を投与して10日目の移植片横断切片におけるTUNEL染色。Vehicle投与群(A, B)に比べ、Ki16198投与群(C, D)はTUNEL陽性の上皮が少ない(E)。\*移植片の気道内腔。

## (2) ヒト気道上皮細胞に対する LPA 暴露の影響

モデルマウスの実験で LPA が上皮損傷に関与していることが示唆されたため、ヒト気道上皮細胞株 BEAS-2B を用いて LPA が気管上皮細胞に与える影響を検証した。BEAS-2B 細胞懸濁液に LPA を加えて培養プレートに播種したところ、プレート底面に接着した細胞の伸展が抑制された。また、BEAS-2B の培養液中に LPA を加えると、細胞の培養プレートからの剥離が誘導された。これらの現象は、LPA1 および LPA3 のアンタゴニストである Ki16425 の添加によって抑えられた(図3、4)。

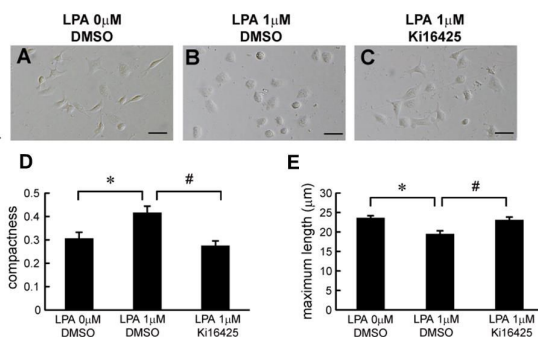


図3. BEAS-2Bの培養プレートへの接着におけるLPAの影響。BEAS-2Bを培養プレートに播種すると、LPA非存在下(A)では細胞が伸展するが、LPA存在下(B)では進展が抑制される。Ki16198を添加することで抑制が解除される(C)。細胞の真球度はLPAのみの添加で増加し(D)、最長幅は減少する(E)。n=3(各回について100細胞のデータを計測)

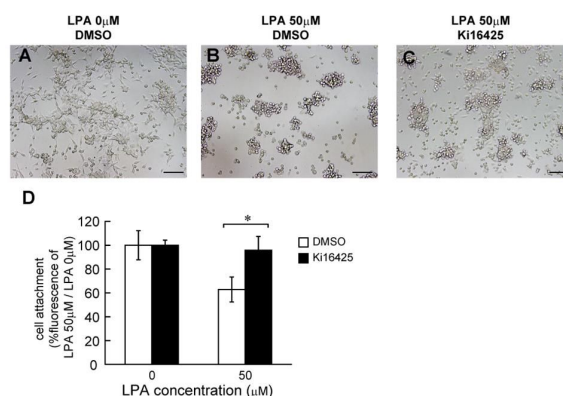


図4. BEAS-2Bの培養プレートからの脱落におけるLPAの影響。LPA非存在下(A)では細胞が伸展した形状をしているが、LPA存在下(B)では球状になり、プレートへの接着の減弱が見られる。Ki16425の添加で接着の減弱が抑えられる(C)。(D)Hoechst33342の蛍光強度の測定によって算出した細胞のプレートへの接着率。n=3

次に、LPA1 または LPA3 それぞれの発現を siRNA でノックダウンしたところ、LPA1 のノックダウンでは LPA による細胞接着の減弱が抑えられたのに対し、LPA3 のノックダウンでは LPA に対する変化がコントロール siRNA と同様であった(図5)。よって、BEAS-2BにおいてLPAはLPA1を介して細胞の培養プレートへの接着を減弱させることが明らかになった。

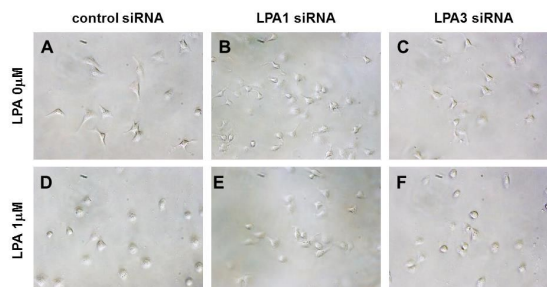


図5. LPA1がBEAS-2Bの培養プレートへの接着に関わる。BEAS-2Bを培養プレートに播種すると、コントロール(A, D)およびLPA3のsiRNA処理を行った細胞(C, F)ではLPA存在下で細胞が休憩になるのに対して、LPA1のsiRNA処理を行った細胞(B, E)ではLPAを添加しても細胞の形状に変化が見られない。

研究の目的(3)の臨床データを用いた肺移植後の閉塞性細気管支炎と ATX の関連性の検討については、肺移植患者の継時的な検体の入手が非常に困難であり、解析することができなかつた。

以上の結果をまとめると、肺移植による閉塞性細気管支炎の発症過程の初期において、LPA が上皮を直接のターゲットとし、その脱落を促進していることを明らかにした。本研究により、閉塞性細気管支炎の発生機序に新たな知見を加えることができた。現在、本研究成果をまとめた論文を投稿し、リバイス実験中である。今後は今回できなかった臨床データを用いた解析を行い、ヒトの疾患におけるデータの蓄積を目指す。

## 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 )

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

Tando Y, Ota C, Yamada M, Takahashi T, Yamaya M, Okudaira S, Aoki J, Kubo H. Autotaxin inhibition attenuated bronchiolitis obliterans in a murine heterotopic trachea transplant model. American thoracic society 2013 international conference. Philadelphia, USA. May 19, 2013.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

丹藤 由希子 ( TANDO, Yukiko )  
東北大学・医学系研究科・非常勤講師  
研究者番号 : 7 0 5 9 6 2 1 2

### (2)研究分担者

近藤 丘 ( KONDO, Takashi )  
東北大学・加齢医学研究所・教授  
研究者番号 : 1 0 1 9 5 9 0 1

### (3)連携研究者

青木 淳賢 ( AOKI, Junken )  
東北大学・薬学研究科・教授  
研究者番号 : 2 0 2 5 0 2 1 9