

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461203

研究課題名(和文)炎症性肺疾患におけるサバイビンの分子病態の解明と新規遺伝子治療法の開発

研究課題名(英文)Elucidation of molecular mechanism of survivin in inflammatory lung disease and development of new gene therapy method

研究代表者

寺崎 美佳 (Terasaki, Mika)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：50372785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：サバイピンは細胞増殖・アポトーシス阻害機能の2つの役割をもつタンパク質で、間質性肺炎の病態に焦点を絞って本因子の作用メカニズムの解析研究を行った。ヒト間質性肺炎組織および様々な間質性肺炎疾患モデル動物において、傷害時に肺では再生性の肺胞上皮を中心にサバイピンの高発現を認めた。培養細胞においても傷害誘発にて同様の発現増加がみられ、サバイピンを抑制すると著しく細胞増殖が抑制された。原因を問わず様々な傷害において、再生上皮にサバイピン発現がみられることから、サバイピンは細胞傷害時の再生に必須であることが明かとなった。

研究成果の概要(英文)：Survivin is a protein having two roles of cell proliferation and apoptosis inhibiting function, and focused on the pathology of interstitial pneumonia and analyzed the mechanism of action of this factor. In human and model mice of interstitial pneumonia disease, high expression of survivin was observed mainly in the regenerating alveolar epithelium. Even in cultured cells, similar expression increase was observed by induction of injury, and suppression of survivin remarkably inhibited cell proliferation. Since survivin expression is observed in the regenerating epithelium in various injuries regardless of the cause, it became clear that survivin is indispensable for regeneration upon cell injury.

研究分野：病理学

キーワード：サバイピン 間質性肺炎 再生

### 1. 研究開始当初の背景

(1) サバイピンは細胞分裂における必須因子であり、またアポトーシス抑制機能の2重の役割を持つユニークなタンパク質である。成人の正常組織では発現が殆どみられず、胎児組織と様々な癌組織で高発現し、癌においてサバイピンの発現は予後との相関がみられる事などより理想的な癌治療のターゲットとしてサバイピンの研究が進んでいる(Mol Cancer Ther, 2006;5:1087-98)。胃エタノール傷害、心筋虚血、急性肝傷害、急性膵炎などの傷害再生の際にもサバイピンの高発現が認められ、癌以外の領域でもアポトーシスの抑制と細胞分裂、或いは、傷害に対する抵抗性や再生性などの病態でサバイピンは重要な働きをしている可能性が考えられる。しかし、正常組織または傷害、再生の病態でのサバイピンに関する報告はわずかで、その詳細な機能は解明されていない。

(2) 急性のびまん性肺胞傷害(ARDS)や特発性を主体にした間質性肺炎(IP)は、現在もお病態解明や治療法が確立されていない致死性肺疾患である。ARDSの病理像の特徴は、高度な肺胞上皮や内皮傷害を背景にした硝子膜形成、筋線維芽細胞の急速な増生と線維化であり、IPも上皮傷害と線維芽細胞の増生、線維化を伴う肺構造改築病変である。またARDSの初期やIPでは肺胞上皮や血管内皮のアポトーシスが認められ(Clin.Chest Med. 1982;3:35-56)、BaxやBcl-2、活性化caspase3等のアポトーシス関連マーカー発現が亢進している(Am J Pathol 1997;151:999-1007)。障害された上皮の再生が、病態改善につながる可能性が考えられ、ARDSやIPの病態においてもアポトーシスの抑制と細胞増殖・再生は、傷害に対する上皮の抵抗性や傷害後の再生という点で大変重要である。

### 2. 研究の目的

ARDSやIP等の肺炎症性疾患の病態において、報告されているアポトーシスの抑制と細胞増殖の重要性や、肺の上皮の傷害とその再生の病態の解明も含め、様々なヒト間質性肺炎や各種マウス肺傷害モデル、培養肺上皮細胞傷害モデルを作製し、傷害再生過程でのサバイピン発現とその分子病態の解明と新規創傷治療法の開発研究を目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 肺傷害に対するサバイピンの機能を解析する目的で、ヒトARDS、肺線維症やマウス肺障害モデル(LPS、ブレオマイシン、高濃度酸素、放射線、粉塵等)を用い、特にアポトーシス、細胞増殖マーカーの動態と対比し、様々な肺傷害における本因子の動態を明らかにする。

(2) 培養肺上皮系細胞を主に用い in vitro でブレオマイシン、粉塵、高濃度酸素、放射線等で同様な傷害を来たした状況での本因子の発現動態を解析する。遺伝子操作による

本因子の発現の抑制や亢進を調節した際の傷害状況の違いを in vitro で検討をする。  
(3) 治療応用を念頭におき、遺伝子操作による本因子の発現抑制と亢進の調節を加えて各種マウス肺傷害モデルを解析し傷害効果の違いを in vivo で比較検討する。

### 4. 研究成果

(1) ヒトARDS肺、IPにおいて主に肺胞上皮、気道上皮細胞にサバイピン発現がみられた。またブレオマイシン、LPS、放射線、高濃度酸素傷害モデルマウスにおいても、同様に肺胞上皮および気道上皮にサバイピン発現増加がみられた。活性型 caspase-3 発現の増加と相関がみられた。TUNEL 染色やPCNA 染色にてアポトーシス部およびKi-67にて細胞再生部にサバイピン発現がみられた。以上のように

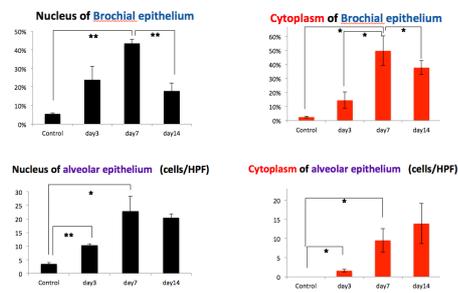


図1 ブレオマイシン肺傷害モデルマウスにおけるサバイピン発現の局在と増加

に、傷害刺激を変えても、上皮細胞に同様のサバイピン発現がみられることから、サバイピンは腫瘍増殖のみならず、正常細胞の炎症からの再生過程に関与していると考えられる。

(2) In vitro においてヒト気道上皮培養細胞を用いて LPS、ブレオマイシン、高濃度酸素にて傷害すると、いずれの傷害時でもサバイ

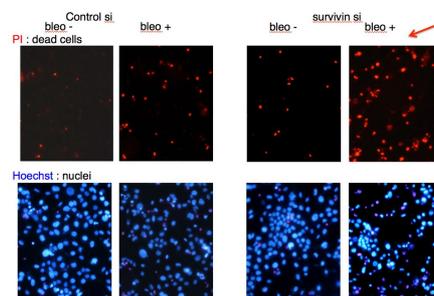


図2 培養細胞におけるサバイピン抑制と死滅細胞の変化

ピン発現上昇が確認出来た。サバイピンを抑制するためサバイピンの siRNA により、in vitro でサバイピン発現の抑制を行うとヒト気道細胞増殖が著しく抑制され、また傷害を

加えた細胞の死細胞数の増加もみられた。アポトーシス関連タンパク質(caspase-3 など)の増加も同様にみられた。逆に培養細胞にサバイピンを過剰発現させた場合は、傷害に対しての死細胞は減少し、生存細胞は過剰発現をさせた細胞では数の増加を認めた。このことから、サバイピンは、傷害細胞の再生過程の中で、傷害後の増殖および抗アポトーシスに関わっていることが明らかとなった。

次に in vivo においてもサバイピンの機能を検索する為に、サバイピン発現を調節したマウスで実験を行う計画を立てた。まず肺に感染しやすい4型アデノ随伴ウィルスベクターを用いサバイピン発現を抑制したマウスの作成をする事にしたが、siRNA より長期発現抑制することができる shRNA(短い干渉ヘアピン)の5種類を準備した。5種類のうち、培養マウス気道上皮細胞 MLE12 でのサバイピン発現抑制の効果が確認できた2種類のサバイピン shRNA を使用する事にした。予備実験で肺に感染しやすい4型アデノ随伴ウィルスベクターだけを感染させたが、肝細胞などに比べ、肺上皮には感染所見が乏しかったので、現在、マウスに経気道的にサバイピン shRNA を組み込んだウィルスベクターを投与し機能解析を進めている。

#### 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6件)

Terasaki Y, Ikushima S, Matsui S, Hebisawa A, Ichimura Y, Izumi S, Ujita M, Arita M, Tomii K, Komase Y, Owan I, Kawamura T, Matsuzawa Y, Murakami M, Ishimoto H, Kimura H, Bando M, Nishimoto N, Kawabata Y, Fukuda Y, Ogura T. Comparison of clinical and pathological features of lung lesions of systemic IgG4-related disease and idiopathic multicentric Castleman's disease. *Histopathology*. 2017 Feb 16. doi: 10.1111/his.13186. [Epub ahead of print]

Kokuho N, Terasaki Y, Kunugi S, Onda N, Urushiyama H, Terasaki M, Hino M, Gemma A, Hatori T, Shimizu A. Localized pulmonary crystal-storing histiocytosis complicating pulmonary mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma presenting with multiple mass lesions. *Hum Pathol*. 2017 Feb 20. pii: S0046-8177(17)30045-X. doi: 10.1016/j.humpath.2016.10.028. [Epub ahead of print]

Kokuho N, Terasaki Y, Urushiyama H, Terasaki M, Kunugi S, Morimoto T, Azuma

A, Usuda J, Gemma A, Eishi Y, Shimizu A. Pulmonary mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma associated with pulmonary sarcoidosis: a case report and literature review. *Hum Pathol*. 2016 May;51:57-63 (査読あり)

Terasaki M, Terasaki Y, Yoneyama K, Kuwahara N, Wakamatsu K, Nagahama K, Kunugi S, Takeshita T, Shimizu A. Uterine leiomyosarcoma with osteoclast-like giant cells associated with high expression of receptor activator of nuclear factor B ligand. *Hum Pathol*. 2015 Nov;46(11):1679-84. (査読あり)

Urushiyama H, Terasaki Y, Nagasaka S, Terasaki M, Kunugi S, Nagase T, Fukuda Y, Shimizu A. Role of 1 and 2 chains of type IV collagen in early fibrotic lesions of idiopathic interstitial pneumonias and migration of lung fibroblasts. *Lab Invest*. 2015 Aug;95(8):872-85. (査読あり)

寺崎 泰弘, 國保 成暁, 寺崎美佳, 功刀しのぶ 【ここまで進んだ! びまん性肺疾患の診断と治療】 びまん性肺疾患の分類と診断 病理診断の現状と問題点 IPF/UIP, NSIP を中心に(解説/特集) 内科 117 巻 2 号 Page205-209, 2016. (査読なし)

[学会発表](計8件)

Kokuho N, Terasaki Y, Terasaki M, Kunugi S, Hebisawa A, Kawabata Y, Fukuda Y and Shimizu A. Comparative Analysis of Lung Lesions of Systemic IgG4-Related Disease and Idiopathic Multicentric Castleman's Disease USCAP (United States and Canadian Academy of Pathology) Annual Meeting 2017(San Antonio), 2017,3.

Kokuho N, Kunugi S, Onda N, Urushiyama H, Terasaki M, Azuma A, Hino M, Gemma A, and Terasaki Y Localized pulmonary crystal-storing histiocytosis complicating pulmonary mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. Transbronchial lung biopsy study was key step for final diagnosis. ATS (American Thoracic Society) 2016(San Francisco), 2016.5.

Terasaki M, Terasaki Y, Kunugi S, Kokuho N, Nagahama K, Urushiyama H, Kajimoto Y, Shimizu A. A case of sarcomatoid mesothelioma with

osteosarcomatous element of the pleura: high expression of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANKL). ATS 2016(San Francisco), 2016.5

寺崎 泰弘 Fibrosing OP の病理所見 第 9 回大阪呼吸器シンポジウム 2016,8

寺崎泰弘 私たちは間質性肺炎をこのように診断、治療している セッション 2: 慢性経過の間質性肺炎病理 第 36 回日本画像医学会、2017.2

國保成暁, 功刀しのぶ, 寺崎泰弘, 漆山博和, 寺崎美佳, 羽鳥努, 清水章 肺 MALT リンパ腫に合併した肺限局性 crystal-storing histiocytosis の 1 例 日本病理学会 (第 105 回), 2016.5

寺崎 美佳, 寺崎 泰弘, 長濱 清隆, 功刀 しのぶ, 國保 成暁, 川瀬 里衣子, 山本 晃人, 黒瀬 圭輔, 内藤 善哉, 清水 章 線維肉腫様成分を伴う卵巣神経外胚葉性腫瘍の一例 日本病理学会 (第 105 回), 2016.5

寺崎 美佳, 寺崎 泰弘, 若松 恭子, 桑原 尚美, 永坂 真也, 高橋 美紀子, 功刀しのぶ, 漆山 博和, 野村 俊一郎, 益田 幸成, 米山 剛一, 竹下 俊行, 清水 章 子宮ポリープ状異型腺筋腫 (atypical polypoid adenomyoma) および子宮類内膜癌におけるサバイピン発現の検討 日本病理学会 (第 103 回), 2014.5

〔図書〕(計 0 件)

〔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

寺崎 美佳 (TERASAKI, Mika)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号 : 50372785

##### (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

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

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

##### (4) 研究協力者

( )