

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670419

研究課題名(和文)上皮統合性維持機構を標的とする急性呼吸促迫症候群発症機構の解明と新規治療法の探索

研究課題名(英文)The exploration of new therapeutic target and the investigation of the role of maintaining alveolar-epithelium cell integrity in acute respiratory distress syndrome

研究代表者

中里 雅光(Nakazato, Masamitsu)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：10180267

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)：急性呼吸促迫症候群(ARDS)は急性呼吸不全を呈する予後不良な疾患である。ARDSにおいて肺上皮損傷に伴う肺上皮バリアの破綻が過剰な線維化の原因と考えられている。癌抑制遺伝子PtenはAkt経路を負に制御するが、肺上皮における役割は不明である。本研究では肺上皮特異的Pten欠損マウス(SOPten /)を用いて、肺上皮Ptenが肺損傷における上皮統合性に必須の分子であること、Pten/Akt経路がARDSの治療標的となり得ることを示した。

研究成果の概要(英文)：The pathological features of acute respiratory distress syndrome (ARDS) include injuries of alveolar epithelial cells (AECs) and destruction of the alveolar capillary barrier, which cause subsequent devastating lung fibrosis. Pten, a tumor suppressor gene, negatively regulates the PI3K/AKT pathway. To clarify the biological role of Pten in AEC in the pathogenesis of lung fibrosis, we used a AEC-specific null mutation of Pten mice (SOPten /). SOPten / mice showed excessive lung fibrosis compared with the control after bleomycin administration. The expression of epithelial-mesenchymal transition (EMT) related molecules and the number of epithelial derived myofibroblasts were increased in the lungs of bleomycin-treated SOPten / mice. Systemic administration of the Akt inhibitor ameliorated the BLM-induced lung injury. Our results indicate that Pten has the essential role in AEC integrity and they highlight the Pten/Akt pathway as a potential therapeutic target in ARDS.

研究分野：神経内分泌

 キーワード：上皮統合性 肺損傷 急性呼吸窮迫症候群 タイトジャンクション リモデリング グレリン P t e
 n 基底膜

1. 研究開始当初の背景

急性呼吸促進症候群 (ARDS) は急速に呼吸不全に陥る予後不良の疾患である。肺上皮 (AEC) 損傷に伴う肺水腫と不可逆性の肺線維化を特徴とし、死亡率は 40%以上に達するが、有効な治療法がない。

正常肺では、AEC が互いにタイトに結合した強固なバリアとして存在し、液性成分や蛋白質の血中から肺胞腔内への滲出を抑制している。ARDS の進行には、肺損傷に伴う AEC アポトーシスによる肺胞壁からの脱落が重要で、高度の肺損傷により AEC 脱落が広範囲な場合には、AEC バリアを修復しきれずに、細胞外物質や線維芽細胞の肺胞腔への浸潤が生じ、非可逆性の肺線維化に陥るとされる。申請者は、AEC 特異的 Pten 欠損 (*SOPten^{ΔΔ}*) マウスを用い、*SOPten^{ΔΔ}* マウスが野生型と比較し、肺損傷後に著明な肺水腫と肺線維化を来すことを見出した。AEC 損傷において、タイトジャンクションの破綻、細胞極性の喪失、基底膜の断裂からなる上皮統合性の喪失が ARDS 発症と関連すると考えられることから、上皮統合性の維持に Pten が関与していることが考えられる。

2. 研究の目的

申請者らが世界に先駆けて研究を推進してきた ARDS における上皮 Pten の病態生理学的意義を、上皮統合性再構築制御という新たな観点から解析し、ARDS に対する治療戦略を創出することが本研究の目的である。ARDS 進展における上皮 Pten/Akt/Snail の役割を解明し、ARDS に対する有効な治療戦略の構築を目指す。また、細胞外マトリックスリモデリングに参与する H1 α -regulated lysyl oxidase (LOX) は ARDS の病態に参与すると考えられるが、ARDS 症例における LOX の意義は不明である。本研究では ARDS 症例を対象として、気管支肺胞洗浄液中の LOX と炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL-6 等) を測定し、ARDS の予後予測バイオマーカーを探索する。

3. 研究の方法

上皮統合性再構築制御と ARDS 発症・進展の関連を検証するため、AEC 特異的 Pten 欠損マウスを用い、肺損傷後タイトジャンクション構成蛋白の発現動態、肺損傷後細胞外マトリックスリモデリングの変化、肺損傷後上皮統合性制御分子の動態、肺損傷後 AEC の上皮間葉転換の解析を行う。また、野生型 Pten/ dominant negative Pten /Snail/HIF 遺伝子導入 AEC 株での損傷修復機構、細胞外マトリックス成分が与える AEC バリア強固性とタイトジャンクション構成蛋白発現動態を解析する。上皮統合性再構築制御を標的とした ARDS 治療戦略の創出を目的とし、Pten 欠損マウスおよび野生型マウスの肺損傷モデルを作成し、Akt 阻害剤を投与によるレスキュー効果を検討する。上皮統合性再構築

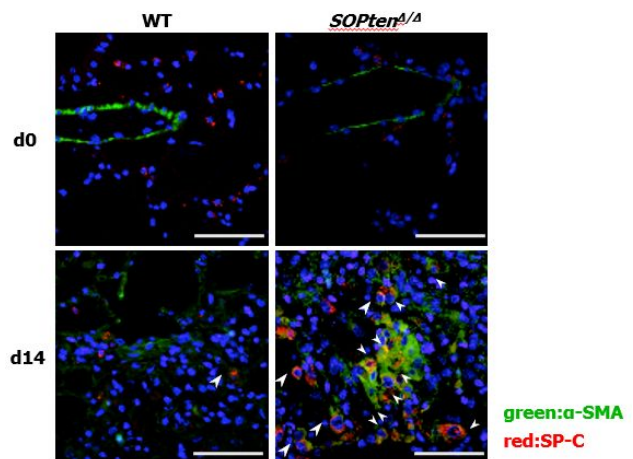
制御の ARDS 症例での意義を探索するため、ARDS 症例検体中の LOX 濃度と予後との関連を評価する。

4. 研究成果

SOPten^{ΔΔ} マウスを用いて、上皮統合性制御と ARDS の発症と進展の関連を検証した。10 週齢の *SOPten^{ΔΔ}* マウスと野生型マウス (WT マウス) にプレオマイシン (BLM) 0.3 mg/kg を気管内投与し、BLM 肺傷害モデルを作成した。*SOPten^{ΔΔ}* マウスでは WT マウスと比較し、BLM 投与 7 日後の肺炎症が高度だった。

免疫組織化学染色と western blotting 法による解析の結果、*SOPten^{ΔΔ}* では WT マウスと比較し、BLM 気管内投与 7 日後の肺組織においてタイトジャンクション (TJ) 構成分子 (claudin-4 と E-cadherin) および基底膜構成分子 (laminin β -1) の発現低下、上皮統合性破綻関連分子群 (pAkt, pSmad2, pErk, pS6K, Snail) の発現亢進を認めた。Sircol Soluble Collagen Assay 法による解析では、BLM 気管内投与 7 日後と 14 日後において *SOPten^{ΔΔ}* では肺組織中コラーゲン沈着が亢進していた。CD31-/CD45-細胞のソーティング解析により、*SOPten^{ΔΔ}* では AEC における上皮統合性破綻関連分子の発現が亢進していた。

TJ と基底膜の破綻による上皮統合性の喪失は、AEC の線維芽細胞への上皮間葉転換を引き起こす。上皮間葉転換は肺線維化に寄与することが示唆されていることから、BLM 気管内投与後の *SOPten^{ΔΔ}* を用いて、AEC の上皮間葉転換の程度を解析した。その結果、*SOPten^{ΔΔ}* マウスでは WT マウスに比べ、AEC 由来筋線維芽細胞が有意に増加していた。

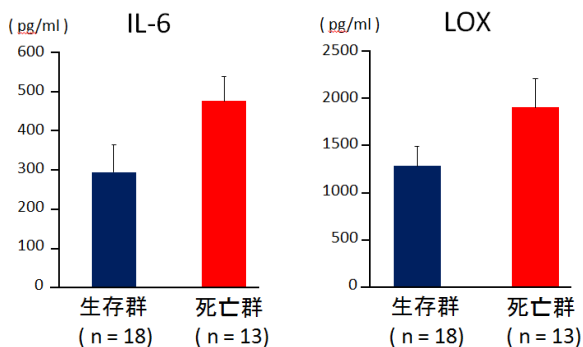


以上から、上皮 Pten の欠損は TJ 破綻と基底膜破綻からなる上皮統合性の破綻、肺損傷後細胞外マトリックスリモデリング亢進ならびに AEC の過剰な上皮間葉転換を引き起こすことが示された。

BLM 気管内投与後から連日 Akt 阻害剤を *SOPten^{ΔΔ}* マウスへ腹腔内投与した結果、肺炎症 (day 7) および肺線維化 (day 14) が軽減し

た。以上の結果から、AEC 損傷による肺線維化において Pten/Akt 経路が治療標的になり得ることが示された。

細胞外マトリックスリモデリングは H1 α -regulated lysyl oxidase (LOX)を介したさらなる上皮統合性破綻を引き起こすことから、ARDS 症例における気管支肺胞洗浄液 (BALF)中の LOX 値および炎症性サイトカイン値 (IL-1 β , IL-6)と予後の関連を検証した。ARDS 死亡群 (n = 13)は生存群 (n = 18)と比較して、LOX および IL-6 値が有意に高かった。以上から、BALF 中の LOX および IL-6 値は ARDS の予後予測因子として有用である可能性が示唆された。



本研究により、上皮 Pten が肺損傷における上皮統合性に重要な分子であることが明らかになった。また、ARDS 症例の BALF 中の LOX 値は、予後予測因子となり得ることが示された。

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 8 件)

Matsumoto N, Miki K, Tsubouchi H, Sakamoto A, Arimura Y, Yanagi S, Iiboshi H, Yoshida M, Souma R, Ishimoto H, Yamamoto Y, Yatera K, Yoshikawa M, Sagara H, Iwanaga T, Mukae H, Maekura R, Kimura H, Nakazato M, Kangawa K.: Ghrelin administration for chronic respiratory failure: a randomized dose-comparison trial. *Lung*, 193: 239-247 (2015) 査読無, DOI. 10.1007/s00408-015-9685-y. Epub 2015 Jan 30.

Kawaguchi M, Kanemaru A, Fukushima T, Yamamoto K, Tanaka H, Haruyama Y, Itoh H, Matsumoto N, Kangawa K, Nakazato M, Kataoka H.: Ghrelin administration suppresses inflammation-associated colorectal carcinogenesis in mice. *Cancer Sci*, 106: 1130-1136 (2015) 査読無, DOI.10.1111/cas.12725. Epub 2015 Jul 14.

Yanagi S, Tsubouchi H, Miura A, Matsumoto N, Nakazato M.: Breakdown of

Epithelial Barrier Integrity and Overdrive Activation of Alveolar Epithelial Cells in the Pathogenesis of Acute Respiratory Distress Syndrome and Lung Fibrosis.

Biomed Res Int, 573210 (2015)

査読有, DOI.10.1155/2015/573210. Epub 2015 Oct 7.

柳 重久, 坪内拓伸, 松元信弘, 中里雅光: ARDS と肺線維症の病態機構における肺胞上皮細胞統合性の役割.

呼吸, 34: 554-559 (2015) 査読無, DOI.

<http://mol.medicalonline.jp/library/archive/search?jo=aj0kkyud&ye=2015&vo=34&issue=6&UserID=133.54.97.44>

Tsubouchi H, Yanagi S, Miura A, Iizuka S, Mogami S, Yamada C, Hattori T, Nakazato M.: Rikunshito ameliorates bleomycin-induced acute lung injury in a ghrelin-independent manner.

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 306: L233-245 (2014)

査読有, DOI.10.1152/ajplung. 00096. 2013. Epub 2013 Nov 27.

Tsubouchi H, Yanagi S, Miura A, Matsumoto N, Kangawa K, Nakazato M.: Ghrelin relieves cancer cachexia associated with the development of lung adenocarcinoma in mice.

Eur J Pharmacol, 743: 1-10 (2014) 査読有,

DOI.10.1016/j.ejphar.

2014.09.025. Epub 2014 Sep 23.

Tsubouchi H, Yanagi S, Miura A, Mogami S, Yamada C, Iizuka S, Hattori T, Nakazato M.: Rikunshito ameliorates cachexia associated with bleomycin-induced lung fibrosis in mice by stimulating ghrelin secretion

Nutr Res, 34: 876-885 (2014) 査読有, DOI. 10.1016/j.nutres.2014.08.014.

Epub 2014 Sep 3.

Oda K, Ishimoto H, Yamada S, Kushima H, Ishii H, Imanaga T, Harada T, Ishimatsu Y, Matsumoto N, Naito K, Yatera K, Nakazato M, Kadota JI, Watanabe K, Kohno S, Mukae H.: Autopsy analyses in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis.

Respir Res. 15: 109 (2014) 査読有, DOI. 10.1186/s12931-014-0109-y.

[学会発表](計 2 件)

坪内拓伸, 柳 重久, 松元信弘, 中里雅光: プレオマイシン肺傷害モデルにおける六君子湯のグレリン分泌を介した cachexia 改善効果. 第 54 回 日本呼吸器学会学術講演会, 大阪国際会議場リー

ガロイヤルホテル, 大阪府, 大阪市 (2014.4.25)

飯塚正一, 柳 重久, 坪内拓伸, 十枝内

厚次,最上祥子,山田ちひろ,服部智久,
中里雅光:プレオマイシン誘発肺線維症
モデルにおけるグレリンを介した六君
子湯の摂食調節作用. 第35回日本肥
満学会,シーガイアコンベンションセン
ター,宮崎県,宮崎市(2014,10,25)

(4)研究協力者
なし

〔図書〕(計1件)

柳 重久,坪内拓伸,中里雅光:Annual Review
2015呼吸器(分担)呼吸器疾患におけるPTEN
の役割 中外医学社(東京)248(2015)
107-118

〔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

中里 雅光(Masamitsu, Nakazato)
宮崎大学医学部・教授
研究者番号:10180267

(2)研究分担者

坪内 拓伸(Hironobu, Tsubouchi)
宮崎大学医学部・助教
研究者番号:60573988

松元 信弘(Nobuhiro, Matsumoto)
宮崎大学医学部・助教
研究者番号:70418838

三浦 綾子(Ayako, Miura)
宮崎大学医学部
研究者番号:70710903

(3)連携研究者

なし