

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860621

研究課題名(和文) 特発性肺線維症合併肺癌の術後急性増悪におけるwnt/ cateninの関与の解明

研究課題名(英文) Elucidating WNT/beta-catenin in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis after lung cancer surgery

研究代表者

石本 裕士 (ISHIMOTO, Hiroshi)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：00457558

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ブレオマイシン(BLM)肺臓炎モデルマウスを用いてWNT10AとTGF- β の発現を評価し、細胞実験ではTGF- β あるいはBLMとWNT10Aの相互関係を評価した。また外科的肺生検が実施されたIPF患者におけるWNT10A発現と予後の検討を行った。BLMマウスではWNT10AとTGF- β の発現は亢進していた。リアルタイムPCRおよびルシフェラーゼレポーターアッセイではTGF- β によるWNT10AとTGF- β の発現を確認した。WNT10A陽性のIPF患者では予後不良であり、急性増悪発症予測因子であった。WNT10AはTGF- β を介した線維化に重要な役割を担っており、急性増悪の予測因子になり得る。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the expression of WNT10A and TGF- β in bleomycin (BLM)-treated mice and the interactions between TGF- β or BLM and WNT10A in vitro. Additionally, we investigated IPF patients who underwent video-assisted thoracoscopic surgery to determine whether the WNT10A expression is related to the survival. Increased WNT10A and TGF- β expressions were noted in the BLM-treated mice. Real-time PCR and luciferase reporter assays demonstrated the levels of WNT10A and collagen in the fibroblasts cells to increase after TGF- β administration. A Kaplan-Meier survival analysis demonstrated a tendency toward a poor survival among the IPF patients with a WNT10A-positive expression compared to those with a negative expression. An overexpression of WNT10A was found to be significantly predictive of an acute exacerbation of IPF (AE-IPF). WNT10A plays an important role in the pathogenesis of IPF via TGF- β activation and it may also be a sensitive predictor for the onset of an AE-IPF.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：特発性肺線維症 急性増悪 WNT/ β -catenin signaling

1. 研究開始当初の背景

特発性間質性肺炎は厚生労働省難治性疾患克服研究事業の対象指定疾患であり、その中でも特発性肺線維症(IPF)は最も頻度が高く、平均不良疾患である。急性増悪による死亡が最も多いが、その病態は未だに未解明である。

WNT/ β -catenin シグナルは 1980 年代に乳癌の癌遺伝子としてクローニングされて以降、癌や線維化などの病態において関与していることが次々に判明し、WNT 遺伝子に注目とした難治性疾患の病態解明が期待されている。

2. 研究の目的

我々は、細胞の分化・増殖という観点で WNT/ β -catenin シグナルに注目し、IPF における線維化の機序ならびに急性増悪における WNT/ β -catenin シグナルの関与について解明することを目的とした。

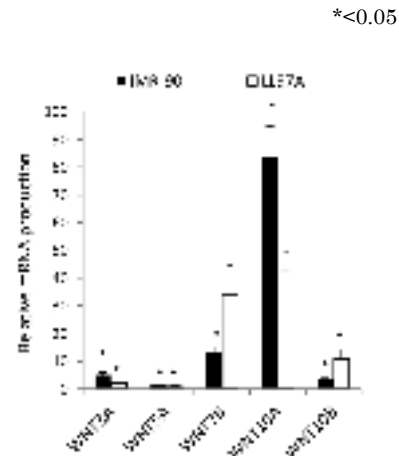
3. 研究の方法

まず C57BL/6 を用いて、プレオマイシン肺臓炎モデルマウスを作成し、肺内における WNT 遺伝子の発現ならびに局在について調べた。さらに、ヒト線維芽細胞(LL97A, IMR-90)を用いて、線維化を促進させるサイトカインである TGF- β 1 と WNT/ β -catenin シグナルの関連について検討を行った。また、外科的肺生検によって UIP (Usual Interstitial Pneumonia) の組織診断が得られた IPF 患者 30 名を対象とし、WNT/ β -catenin シグナルに関連したタンパク質の免疫染色を行うことで、発現程度と予後の関連について検討を行った(倫理委員会番号：H26-004)。

4. 研究成果

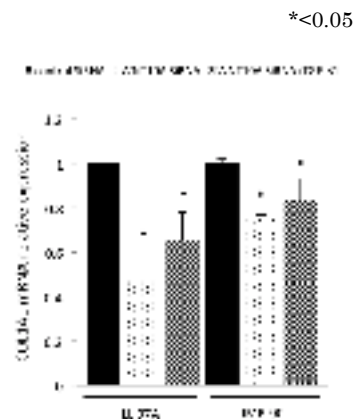
C57BL/6 を用いたプレオマイシン肺臓炎モデルマウスでは、線維芽細胞の細胞質

に WNT10A が発現していることを確認した。また、ヒト線維芽細胞(LL97A, IMR-90)に対し TGF- β 1(5ng/ml)で刺激を行ったところ、WNT ligands のうち WNT10A が最も強く誘導された(Fig.1)。また、ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて、転写調節領域での活性も確認した。



(Fig. 1: TGF- β 1 による WNT 10A 誘導)

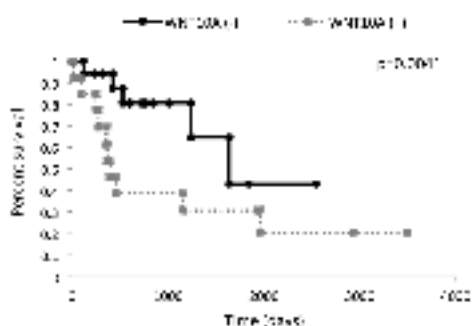
さらに、SiRNA で特異的に WNT10A の発現を阻害することで、細胞外基質の産生が抑制された(Fig.2)。



(Fig.2: WNT10A SiRNAによるCOL1A1抑制)

IPF 患者における肺内の WNT10A 発現は、*in vivo* の実験と同様に線維芽細胞で発現が確認されたが、染色程度は症例毎に異なっていた。そのため、染色程度によって陽性群と陰性群の 2 群に分け、カプラン・マイヤー曲線を示すと WNT10A 陽性群で明らかに予後不良であった(Hazard ratio

5.351, p=0.0041)(Fig.3)。



(Fig.3: WNT10A 発現と IPF の予後)

また、WNT10A 発現は急性増悪の発症と関連していることが判明した(Odds ratio 13.69, p=0.013)。

IPF では、上皮間葉系移行(epithelial mesenchymal transition: EMT)により活性化した線維芽細胞が細胞外基質を大量に産生することで最終的に呼吸不全に陥る。我々は、WNT ligands の中でも特に WNT10A が線維芽細胞に恒常的に発現していることを確認し、さらに TGF- β 1 の刺激によって細胞外基質の産生を調整していることを示した。WNT/ β -catenin シグナルの特異的な阻害は、IPF における創薬につながる可能性があるだけでなく、急性増悪の発症にも関与している可能性が示唆された。以上のことから本研究成果は、特発性肺線維症における新たなエビデンスの構築に貢献できるものと考えられる。

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 6 件)

1. Oda K, Yatera K, Izumi H, Ishimoto H, (10 名中 4 番目) et al. Profibrotic role of WNT10A via TGF- signaling in idiopathic pulmonary fibrosis.

Respiratory Research. 2016 Apr 12;17:39. (査読有)

2. Sakamoto N, Ishimatsu Y, Kakugawa T, Yura H, Tomonaga M, Harada T, Nakashima S, Hara S, Hara A, Ishimoto H, (13 名中 10 番目) et al. Elevated plasma α -defensins in patients with acute exacerbation of fibrotic interstitial pneumonia. Respir Res. 2015 Feb 109:265. (査読有)
3. Ishimoto H, (8 名中 1 番目) et al. A serious mediastinum abscess induced by endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration (EBUS-TBNA): a case report and review of the literature. Intern Med. 2015; 54: 2647.
4. 小田桂士, 石本裕士 (4 名中 2 番目) 他: 特発性肺線維症における WNT/ β -catenin シグナルの関与. 厚生労働科学研究委託業務 難治性疾患実用化研究事業 びまん性肺疾患に対するエビデンスを構築する新規戦略的研究 平成 26 年度研究報告書; 137-140, 2015. (査読無)
5. Oda K, Ishimoto H, (16 名中 2 番目) et al. Autopsy analyses in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. Respiratory Research. 2014 Sep 1;15:109. (査読有)
6. Ishimoto H, (8 名中 1 番目) et al. Case of immunoglobulin G4 (IgG4)-related disease diagnosed by transbronchial lung biopsy and endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration. J UOEH. 2014 Dec 1; 36: 199.

[学会発表](計 2 件)

1. 小田桂士, 石本裕士 (4 名中 2 番目)

他：特発性肺線維症における WNT10A
発現とその意義 ～急性増悪との関
連～．第 112 回日本内科学会講演会
（2015.4.10-10，みやこめっせ，京都
府京都市）

2．小田桂士，石本裕士（4名中2番目）

他：特発性肺線維症における WNT/
-catenin シグナルの関与．厚生労働科
学研究委託業務難治性疾患実用化研
究事業 びまん性肺疾患に対するエ
ビデンスを構築する新規戦略的研究
班 第2回班会議総会（2014.12.13，
大正製薬（株）本社ビル，東京都豊島
区）

6．研究組織

(1)研究代表者

石本裕士（ISHIMOTO, Hiroshi）

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：00457558