

令和元年6月14日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09571

研究課題名(和文) 肺線維症における活性酸素シグナリングの役割とその制御機構

研究課題名(英文) The role and regulatory mechanisms of ROS signaling in the pathogenesis of pulmonary fibrosis

研究代表者

松野 洋輔 (Matsuno, Yosuke)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：30633177

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：肺線維症の病態における活性酸素(ROS)シグナリングの意義の解明を目的に研究を行った。TGF-beta1で誘導される肺胞上皮細胞の上皮間葉移行(EMT)においては、TGF-beta1によって産生されたROSが、酸化ストレス応答因子であるNrf2を介してNotchシグナリングを活性化させ、EMTを誘導していた。線維芽細胞の細胞濃度に依存したアポトーシスでは、ROSの関与は明らかでなかったが、細胞濃度の増加とともに活性化されたNotchシグナリングがIL-6の発現を誘導し、アポトーシスを制御していた。ROSと、関連したシグナル経路は、肺線維症の進展において重要な役割を担うことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、ROSが細胞・組織障害を引き起こすだけでなく、シグナル伝達物質として機能し、Notch経路の活性化を通してEMTを誘導することを明らかにした。またNotch経路は、線維芽細胞のアポトーシス制御にも関与していた。ROSシグナリングとNotch経路は、肺の細胞の分化・運命決定の調節を通して、肺線維症の進展において重要な役割を担うことが示唆された。今後これらのシグナル経路について、肺線維症で担う役割の解明が進み、新規治療標的となりうるかどうか検証されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We explored the role of ROS signaling in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. In TGF-beta1-induced EMT of alveolar epithelial cells, TGF-beta1 production of ROS induced EMT through Nrf2-mediated Notch signaling activation. In cell density-dependent apoptosis of fibroblasts, while the involvement of ROS was not clear, cell density-dependent activation of Notch signaling regulated apoptosis via transcriptional activation of IL-6. ROS and its related signaling pathways are suggested to play a pivotal role in the development of pulmonary fibrosis.

研究分野：炎症性肺疾患

キーワード：肺線維症 活性酸素 Notchシグナリング 上皮間葉移行 アポトーシス Nrf2 肺胞上皮細胞 線維芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (Idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) は肺胞上皮障害を契機とし、線維芽細胞・筋線維芽細胞の増殖、細胞外基質の沈着を生じ、進行性の肺の構造改変を来す、予後不良の疾患である。IPF の発症・進展には、肺胞上皮細胞の上皮間葉移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition, EMT) や、線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化・アポトーシス耐性などが重要な役割を演じるとされるが、病態の理解は依然として不十分であり、有効な治療法は存在せず、新規治療法の開発は喫緊の課題である。

活性酸素 (reactive oxygen species, ROS) は酸化ストレスを誘導して細胞障害を引き起こす。一方、ROS はシグナル伝達物質としても機能するが、IPF におけるその役割は不明である。転写因子 Nrf2 は ROS にて活性化され生体の酸化ストレス応答を担う。Nrf2 は細胞内 ROS の制御を通して、ROS シグナルを調節している可能性があるが、その詳細は不明である。

Notch 経路は細胞同士の接触を通して活性化されるシグナル伝達機構で、発生や恒常性の維持に重要な役割を演じている。我々はヒト肺胞上皮細胞における TGF- β 1 誘導性 EMT において、活性化した Notch 経路が Snai1 の転写を増強させて EMT を誘導することを報告しているが (Matsuno et al. *Int J Biochem Cell Biol* 2012) Notch 経路の活性化は TGF- β 1 によって産生された ROS に依存していた。また Nrf2 と Notch 経路の間のクロストークも報告されており、Notch 経路が ROS や Nrf2 が関わるシグナル経路において重要な役割を担うことが示唆される。

2. 研究の目的

肺線維症において ROS シグナルが担う役割とその制御機構を解明し、ROS を標的とする新規治療法の開発に向けた分子基盤の確立を目指す。ROS 下流の経路として Notch 経路に、ROS シグナルの制御系として Nrf2 に焦点を当て、肺線維症の進展に関わる肺胞上皮の EMT と線維芽細胞のアポトーシスにおいて、これらのシグナル経路が担う役割を解析する。

3. 研究の方法

(1) 肺胞上皮細胞の TGF- β 1 誘導性 EMT

A549 細胞を TGF- β 1 で刺激し EMT を誘導する。DCFDA を用い細胞内 ROS を測定する。Nrf2 の活性化を、核タンパクにおける Nrf2 の発現や標的アンチオキシダント遺伝子の発現にて評価する。N-acetylcysteine (NAC) 投与による ROS の低下が、Nrf2、Notch 経路、EMT に及ぼす影響を解析する。Nrf2 に対する siRNA のトランスフェクション、もしくは Nrf2 活性を抑制する Keap1 の過剰発現による Nrf2 の活性化抑制が、Notch 経路、EMT に及ぼす影響を解析する。

(2) 線維芽細胞の細胞濃度依存性アポトーシス

NIH 3T3 細胞では、細胞濃度に依存して、STAT3 の活性化を伴いアポトーシスが誘導され、STAT3 の活性阻害によりアポトーシス細胞が増加することが知られている。NIH 3T3 を異なる細胞濃度で培養し、細胞内 ROS、Notch 関連分子の発現、を解析する。Notch 経路の阻害、または Notch 経路の恒常的な活性化が、アポトーシスに及ぼす影響を解析し、さらにその分子機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 肺胞上皮細胞の TGF- β 1 誘導性 EMT

TGF- β 1 刺激後、NOX4 の発現、細胞内 ROS が増加し、Nrf2 の活性化が認められ (図 1)、Nrf2 の標的遺伝子である HO-1 の発現が増加した。NAC の投与により細胞内 ROS を低下させると、Nrf2

と Notch 経路の活性化の抑制とともに、EMT が抑制された(図 2)。Nrf2 に対する siRNA または Keap1 の過剰発現により、Notch 経路の活性化の抑制とともに、EMT が抑制された(図 3)。Notch 関連分子のうち、Notch4 の発現は Nrf2 の発現に依存していた。Notch4 の転写開始部位から上流 2500 塩基対までのプロモーター領域に、Nrf2 が結合しうる抗酸化物質応答配列(antioxidant responsive element, ARE)の候補を 2 つ認めた。Nrf2 による Notch4 の直接的な転写活性化の可能性を検討するため、プロモーターアッセイを行った。2 つの ARE それぞれに点突然変異を導入したコンストラクトを作成してルシフェラーゼアッセイを行ったところ、一方の ARE はプロモーター活性と無関係であったが、上流 157 塩基対から始まるもう一方の ARE については、予想に反し、プロモーター活性を抑制していることが明らかとなった。この ARE については内部に AP-1 結合部位も含まれることから、AP-1 が Notch4 のプロモーター活性を抑制している可能性が示唆された。以上より TGF- β 1 刺激で産生された ROS による Nrf2-Notch 経路の活性化が EMT の誘導に必要であることが示唆された。

図 1. TGF- β 1 投与後の ROS 産生増加、Nrf2 活性化

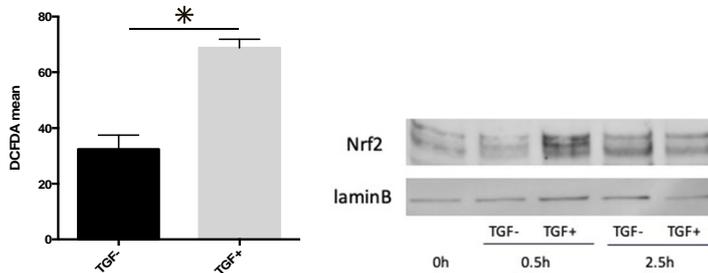


図 2. NAC 投与による Notch 経路・EMT の抑制

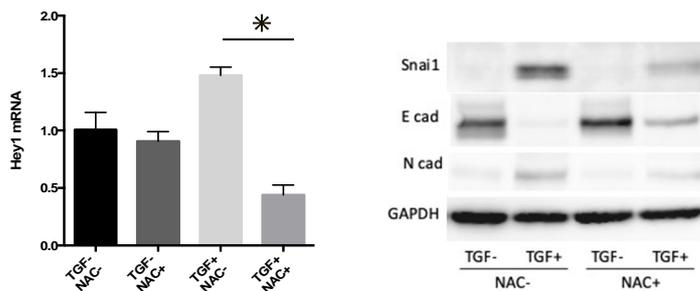
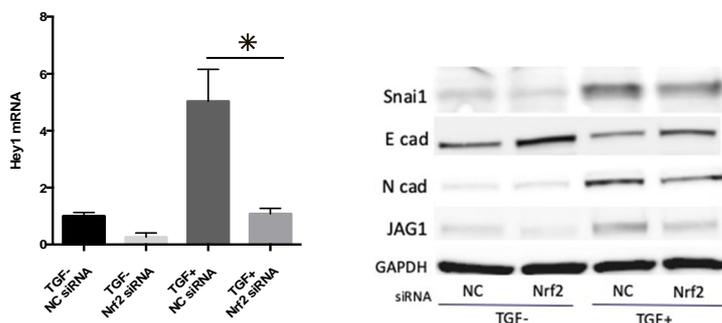


図 3. Nrf2 siRNA による Notch 経路・EMT の抑制



(2) 線維芽細胞の細胞濃度依存性アポトーシス

細胞濃度に依存して Notch 経路は活性化していた(図 1)。細胞濃度の増加に伴い ROS は低下し、一方 HIF-1 α の発現が増加していたことから、Notch 経路の活性化には ROS の増加でなく、低酸素など他の因子が関与していると考えられた。細胞濃度依存性に発現が増加した IL-6 が、STAT3 活性化を介してアポトーシスを制御していた。siRNA を用いた Notch リガンド(Jagged1)

の発現抑制、または γ -secretase 阻害剤による Notch 経路阻害の効果 (図 2) より、Notch 経路の活性化は IL-6 の発現誘導に必要であることが判明した。Notch1 細胞内ドメインの過剰発現により Notch 経路を恒常的に活性化させると IL-6 の発現が誘導された (図 3)。IL-6 の転写開始部位より 67 塩基対上流に Notch 応答配列を認めた。ChIP アッセイ、ルシフェラーゼアッセイにより、Notch 1 はこの配列に結合し、IL-6 の転写を活性化していることが明らかとなった。Notch 経路の活性化による細胞濃度依存性アポトーシス制御の模式図を示す (図 4)。

図 1. 細胞濃度に依存した Notch 経路の活性化。

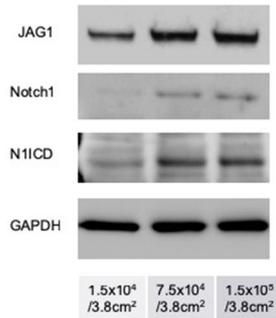


図 2. γ -secretase 阻害剤(GSI)による IL-6 発現・STAT3 活性化の抑制、アポトーシスの増加。

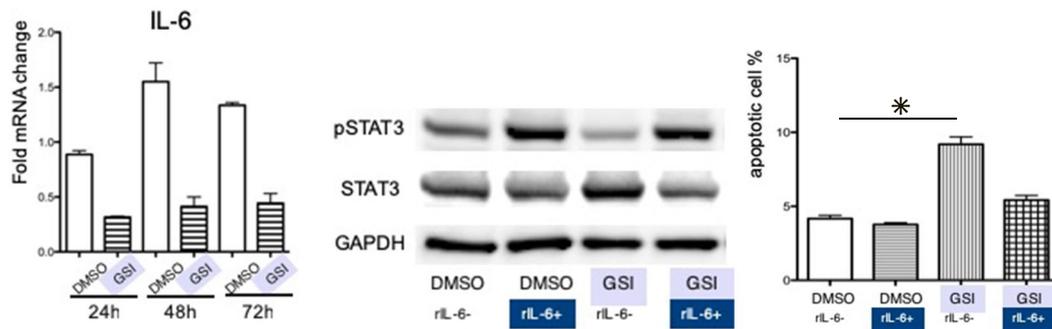


図 3. Notch1 細胞内ドメイン過剰発現による Notch 経路の恒常的活性化による IL-6 発現増加と STAT3 活性化。

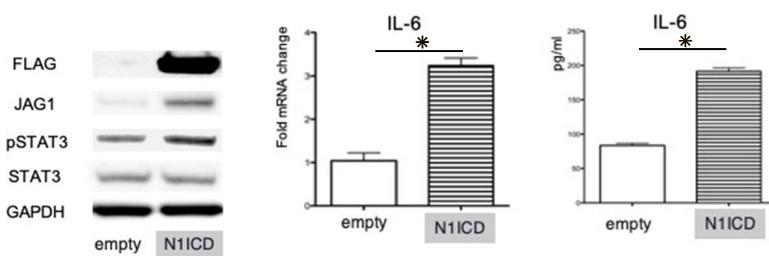
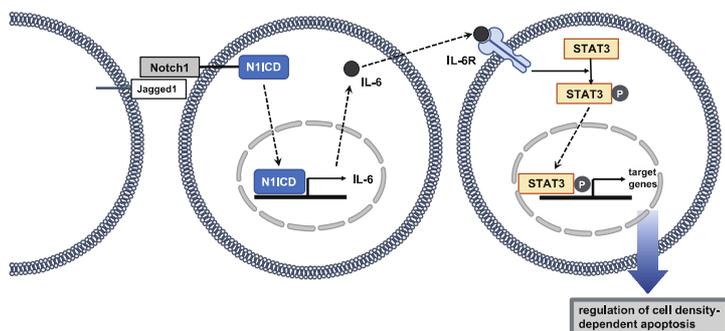


図 4. Notch 経路による細胞濃度依存性アポトーシス制御の模式図。

Under dense culture condition



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Sakurai H, Morishima Y, Ishii Y, Yoshida K, Nakajima M, Tsunoda Y, Hayashi S, Kiwamoto T, Matsuno Y, Kawaguchi M, Yamamoto M, Hizawa N. Sulforaphane ameliorates steroid insensitivity through an Nrf2-dependent pathway in cigarette smoke-exposed asthmatic mice. Free Rad Biol Med, 129, 473-485, 2018. 査読あり
doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.400.
2. Matsuno Y, Kiwamoto T, Morishima Y, Ishii Y, Hizawa N, Hogaboam CM. Notch signaling regulates cell density-dependent apoptosis of NIH 3T3 through an IL-6/STAT3 dependent mechanism. Eur J Cell Biol, 97(7): 512-522, 2018. 査読あり
doi: 10.1016/j.ejcb.2018.09.001.

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Matsuno Y, Matsuyama M, Kiwamoto T, Morishima Y, Ishii Y, Hizawa N. ROS-Nrf2 pathway mediates TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition through the interaction with Notch signaling pathway. The International Conference of the American Thoracic Society 2018 in San Diego, USA.
2. Hayashi S, Matsuno Y, Tsunoda Y, Sakurai H, Kiwamoto T, Kawaguchi M, Morishima Y, Ishii Y, Hizawa N. The Role of T-bet in Emphysema. The International Conference of the American Thoracic Society 2017 in Washington DC, USA.
3. 林士元、松野洋輔、角田義弥、櫻井啓文、際本拓未、森島祐子、檜澤伸之。肺気腫形成における転写因子 T-bet の役割の検討 第 56 回日本呼吸器学会学術講演会 京都 2016 年 4 月

〔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：

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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://respmed.tsukubauniv.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：石井 幸雄

ローマ字氏名：ISHII, Yukio

所属研究機関名：筑波大学

部局名：医学医療系

職名：教授

研究者番号（8桁）：80272194

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。