

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591139

研究課題名(和文) 肺線維症の線維化に関するEGFRファミリーとリガンド、プロテオグリカンの検討

研究課題名(英文) The role of proteoglycans in the modulation of EGFR family and it's ligand in lung fibrosis

研究代表者

城 大祐 (Jo, Taisuke)

東京大学・保健・健康推進本部・助教

研究者番号：30376470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：特発性肺線維症は原因不明で予後不良な進行性の肺疾患で、治療法は確立していない。本研究ではマウスの肺線維症モデルを用いて肺線維化に関わるEGFRとそのリガンド、プロテオグリカンを検討した。線維化しやすいマウス系統のC56BL6でBalb/cより肺の線維化とコラーゲンの増加がみられた。マウス肺組織の遺伝子発現の比較でEGFRはC56BL6で低下、amphiregulin、epiregulin、versicanやdecorinは増加の可能性が示唆された。これらの分子発現の関連性の検討を進めてゆくための知見が得られたと考える。

研究成果の概要(英文)：Idiopathic Pulmonary Fibrosis is a progressive disease with poor clinical outcome. And yet treatment strategy has not been well-established. In this study we examined the expression of Epidermal Growth Factor Receptors (EGFR) and it's ligands in isolated lungs from mouse model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. We compared C56BL6 and Balb/c, a strain known to show stronger fibrotic change and mild fibrotic change with bleomycin, respectively. Proteoglycan expression was concomitantly evaluated with intention to explore the association with EGFR and EGFR ligands. Lungs from C56BL6 mice appeared to have apparent fibrotic changes and higher collagen content compared to Balb/c mice. Expression of amphiregulin, epiregulin, versican and decorin seemed to be lower in C56BL6 compared Balb/c mice, whilst EGFR seemed to be highly expressed in C56BL6. These findings provide bases for further investigation.

研究分野：呼吸器内科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺線維症 プロテオグリカン EGFRファミリー マウス ブレオマイシン

1. 研究開始当初の背景

(1) 特発性間質性肺炎は 50 歳以降の男性に多く発症する原因不明の進行性の肺疾患である。経過中にしばしば急性増悪をきたし、また肺癌を高率に合併する。診断確定後の平均生存期間が 2.5 年から 5 年との報告もある予後不良な疾患である。自覚症状は慢性の乾性咳嗽や労作時呼吸困難で QOL が阻害される。治療として抗線維化剤の投与や更には副腎皮質ホルモンと免疫抑制剤の併用が行われるが、不十分な効果、副作用など問題点も多い。

本疾患肺組織の病理学的検討では、慢性の病変と考えられる線維化病変と活動性の病変である線維芽細胞巣が同時に観察され、また蜂巢肺と呼ばれる周囲に線維化と平滑筋の増生、細気管支上皮の増生をともなう末梢気腔の嚢胞性拡張の存在が特徴である。気管支肺泡洗浄液では肺泡マクロファージと顆粒球を認める。急性増悪の際の病理組織ではびまん性肺泡障害 (Diffuse alveolar damage: DAD) を認める。DAD は滲出期、器質化期、線維化期に分けられる。肺泡構造が保たれ、間質の浮腫や肺泡上皮の変性・剥離、弾性線維の断裂、硝子膜の形成、肺泡腔内への液性滲出を主体とする滲出期が DAD における特徴的な急性の変化と言える。本来、肺泡上皮細胞を主体とした肺泡構造が前述のような線維芽細胞をはじめとした間葉系細胞に置換されていることからその線維化の機序として、間質に存在する線維芽細胞の増殖、線維芽細胞による糖蛋白質の合成のほか、全身循環に存在する骨髄由来の線維芽細胞の遊走、上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition: EMT) が提唱され近年研究がさかんに行われている。

(2) 実験動物のプレオマイシン肺線維症モデルは 1970 年頃から用いられ始め、マウスのプレオマイシン投与モデルは肺線維症モデ

ルとして普及している。またマウス近交系が異なると線維化の程度が異なることも報告されている。プレオマイシンによるマウスの肺線維症モデルでは肺の線維芽細胞の増殖と線維化がみられ骨髄由来の線維芽細胞の遊走や EMT の存在が報告されている。

(3) 線維芽細胞の増殖や遊走のみならず EMT に関しても上皮細胞成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor: EGFR) の関与がヒト気管支上皮細胞や腎髄質内層集合管細胞で報告されている。EGFR は癌細胞の成長因子受容体として 1975 年に同定され、その後の研究で種々の病態で組織の修復や疾患の増悪に関与していることが明らかになった。EGFR ファミリーとして EGFR (erbB1/HER), erbB2 (HER2/neu), erbB3 (HER3) と erbB (HER4) が知られている。これらはホモ二量体またはヘテロ二量体を形成し受容体として機能する。二量体の組み合わせによりその下流のシグナル伝達の持続時間や経路が異なり、また結合するリガンドが限定される。EGFR ファミリーのリガンドとしては EGF、HB-EGF、TGF- α 、アンフィレギュリン、エピレギュリン、エピゲン、ベータセリュリン、ニューレギュリン 1-5 がこれまでに報告され、ニューレギュリンを除く 7 種のリガンドが EGFR に結合する。更に EGFR の機能の調節には線維芽細胞が産生するプロテオグリカンが関与していることが報告されている。リガンドと受容体の結合形態として、エンドクライン、パラクラインではリガンドが細胞膜貫通部位よりプロテアーゼなどの酵素により切断され可溶性となったりリガンドがそれぞれ遠隔のまたは近隣の細胞の受容体に結合し、オートクラインでは同様に切断されたリガンドが自身の細胞の受容体に結合する。これらは細胞の増殖などにかかわっていると考えられている。一方ジャクスタクラインは細胞膜に結合したまま近隣の細

胞の受容体に直接結合する状態を差し、細胞のアポトーシス制御への関与が考えられている。また EGFR ファミリーではG蛋白質共役受容体などの活性化に関連したトランスアクチベーションと呼ばれるプロテアーゼによるリガンドの遊離を介した活性化が想定されている。EGFR ファミリーとそのリガンドについては種々の癌細胞において研究され、乳がんにおける抗 HER2 モノクローナル抗体 (trastuzumab) を用いた治療や非小細胞癌にたいする EGFR のチロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) である gefitinib や erlotinib による治療、いわゆる分子標的治療はすでに実臨床で用いられている。しかしながら EGFR-TKI の肺癌治療において初期に間質性肺炎 (DAD) が致死的な副反応として生じた事が問題となり肺線維症が併存する肺癌症例においては使いにくい現状がある。EGFR ファミリーとそのリガンドは肺線維化の抑制という観点からは治療の標的としてのポテンシャルが高いと考えられる。マウスのプレオマイシン肺線維症モデルを用いた検討および TGF- によるマウスの肺線維化モデルでは線維化の予防効果や改善が報告されている。他方、マウスのプレオマイシンモデルで EGFR-TKI により肺障害が増強したとの報告も存在することや前述の肺癌治療の臨床における問題ある。また最近の検討では組み換えのアンフィレギュリン投与がプレオマイシンによる肺障害を減弱することが示された。これらの結果から EGFR ファミリーを標的にした肺線維症の治療に関してはマクロファージを始めとした炎症細胞や関連する細胞に於いて各リガンドの果す役割が異なる可能性を考慮する必要性が考えられる。従って更に詳細な検討が必要と考えられた。

2 . 研究の目的

本研究ではマウスのプレオマイシン肺線維症モデルを用いて線維化および線維芽細胞、

平滑筋細胞の増生さらには上皮間葉転換 (EMT) の過程において前記増生細胞およびマクロファージ/単核球に発現する EGFR ファミリーおよびそのリガンドを明らかにする。また EGFR リガンドと線維芽細胞により産生されるプロテオグリカンの関連を検討する。以上を主たる研究目的とした。更に気道上皮細胞の上皮間葉転換の評価、線維芽細胞の収縮や活性化の評価法を確立することを目的とした。

3 . 研究の方法

8-10 週の C57BL6 および Balb/c 近交系マウスを用いた。イソフルレン麻酔下にプレオマイシンを腹腔内投与し、肺線維症モデルを作成した。プレオマイシン投与前、24 時間後、7 日後、28 日後にマウスを収穫し検討を行った。

(1) 組織標本の作製は、左主気管支と右副葉を結紮切離したのちに右肺を摘出した。10%ホルマリンで固定して用いた。気管および末梢肺組織のパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリンエオジン染色、マッソントリクローム染色を行った。染色組織の評価は CCD カメラ (Olympus) で撮影して行った。

(2) 肺のコラーゲンの定量は左主気管支を結紮した後に、左肺を摘出し用いた。Sircol Collagen Assay Kit を用いて定量した。

(3) 遺伝子発現の評価のために肺組織より総 RNA の抽出を行った。右の副葉を切除し摘出したのちに液体窒素で凍結保存し、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) 用いて RNA を抽出した。EGFR, erbB2, erbB3 と erbB4 の EGFR ファミリーと EGF, HB-EGF, TGF- 、アンフィレギュリン、エピレギュリン、エピゲン、ベータセリュリン、ニューレギュリン 1 などの EGFR リガンド及びデコリン、バイグリカン、ルミカン、パーシカンなどのプロテオグリカンの

プライマーを作成した。プライマー (Invitrogen) は eEnsembl (EBI/EMBL) 及び Entrez Gene (NCBI) で検索した遺伝子配列から primer3 で配列を決定後 BLAST (NCBI) で確認し作成した。PRISM 7000 (ABI) を用いたリアルタイム定量 PCR 法で遺伝子の発現量の違いを評価した。

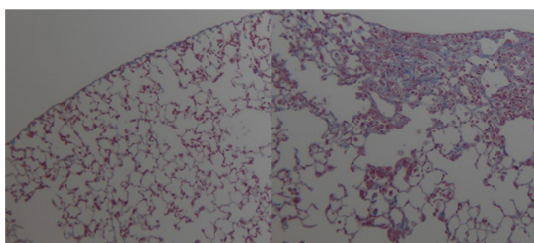
TGF- β 1 や TNFS14 (LIGHT) を投与して行った。

(4) 上皮間葉転換の評価法は A549 細胞に TGF- β 1 や TNFS14 (LIGHT) を投与して行った。上皮系マーカーである E-cadherin と間葉系マーカーである vimentin の Western blotting による蛋白発現の評価およびこれらのマーカーのリアルタイム定量 PCR による遺伝子発現の評価を行った。またゲルコントラクション法により細胞の収縮能を評価した。

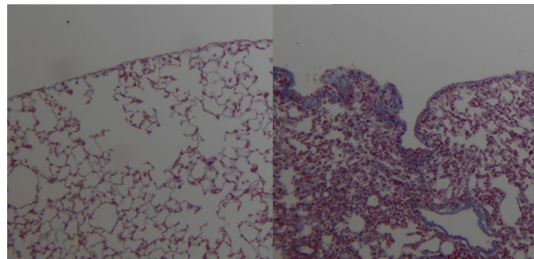
(5) 繊維芽細胞の収縮や活性化の評価法については、ヒトの肺の手術検体から単離した線維芽細胞にヒスタミンを投与し検討を行った。ゲルコントラクション法による線維芽細胞の収縮能の評価と Fura2AM を用いた 2 波長励起法による細胞内カルシウムの評価を行った。

4. 研究成果

(1) プレオマイシの腹腔内投与により、マウスの肺組織で経時的に線維化の進行がみられ、その程度は Balb/c より C57BL6 に顕著であった。下にマッソン・トリクローム染色による典型的な画像を示す。



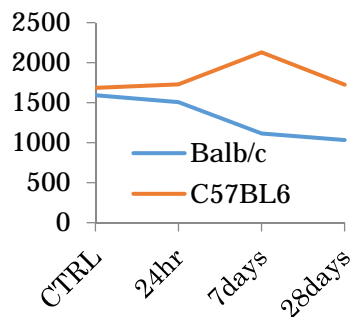
C57BL6 左がコントロール、右は 28 日後



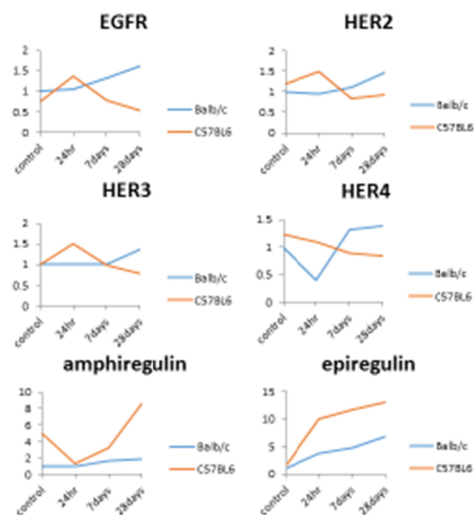
Balb/c 左がコントロール、右は 28 日後

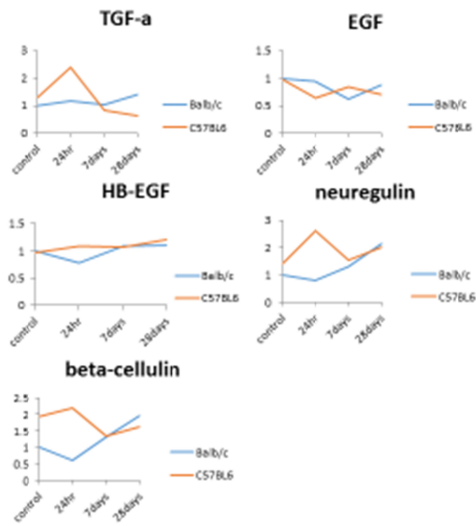
(2) コラーゲンの経時的に定量したところ

C57BL6 で Balb/c よりコラーゲン量の増加がみられた。

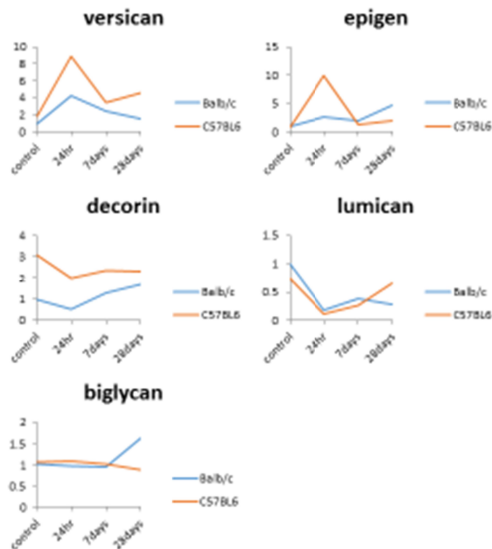


(3) EGFR ファミリーおよびそのリガンドの遺伝子発現の検討では、線維化の見られる 28 日後には C57BL6 で Balb/c と比較して EGFR の低下傾向と amphiregulin と epiregulin の発現の増加傾向が見られた。

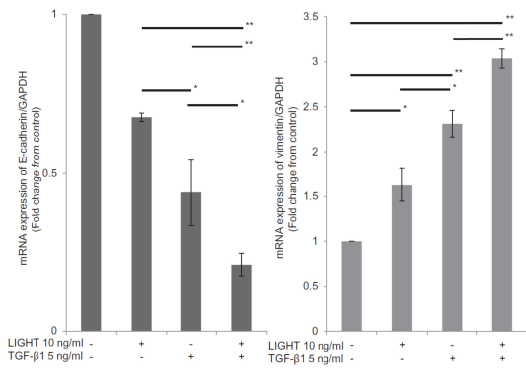
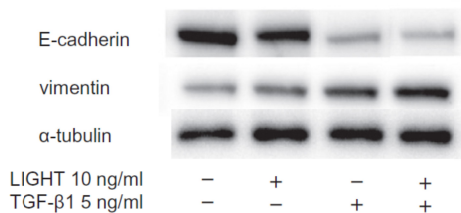




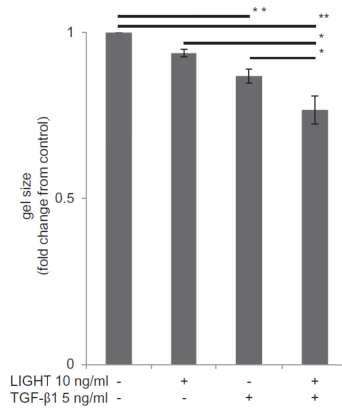
プロテオグリカンの遺伝子発現の検討では versican と decorin の発現が C57BL/6 で Balb/c より増加している可能性が示された。



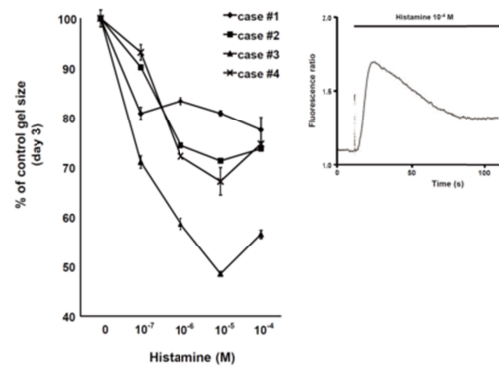
(4) EMT の評価を行った。TGF- α や LIGHT の投与によりウェスタンブロッティング及びリアルタイム定量 PCR で、上皮系マーカーである E-cadherin が減少し、間葉系マーカーの vimentin が増加することを示した。



ゲルコントラクション法で収縮能の増加が示された。



(5) 線維芽細胞はヒスタミンの投与により収縮を認め、細胞内カルシウム濃度は増加した。



(6) 今回の検討により、肺線維症のマウスモデルにおいて線維化を起こしやすい系統のマウスと起しにくい系統のマウスの間に EGFR 及びそのリガンドの発現に違いがあること示唆された。プロテオグリカンについても同様に系統による発現の違いが示唆された。また、上皮細胞の EMT 及び線維芽細胞の活性化についての評価法を確立した。今後は

培養上皮細胞や線維芽細胞を用いた in vitro の検討により、今回のマウスを用いた検討で示された遺伝子発現の違いについての相互の関連性について検討を進めてゆく必要があると考える。

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2件)

Mikami Y, Yamauchi Y, Horie M, Kase M, Jo T, Takizawa H, Kohyama T, Nagase T, Tumor necrosis factor superfamily member LIGHT induces epithelial-mesenchymal transition in A549 human alveolar epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun. 査読あり 428(4):451-7, 2012
doi: 10.1016/j.bbrc.2012.10.097.

Horie M, Saito A, Yamauchi Y, Mikami Y, Sakamoto M, Jo T, Nakajima J, Takizawa H, Nagase T, Kohyama T, Histamine induces human lung fibroblast-mediated collagen gel contraction via histamine H1 receptor. Exp Lung Res. 査読あり 2014 Jun;40(5):222-36.
doi: 10.3109/01902148.2014.900155.

[学会発表](計2件)

Yasuhiro Yamauchi, Taisuke Jo, Masafumi Horie, Yu Mikami, Satoshi Noguchi, Osamu Narumoto, Kazutaka Takami, Tadashi Kohyama, Hajime Takizawa, Takahide Nagase, Interleukin-17A Enhances Interferon-Gamma-Induced CXCL10/IP-10 Production In BEAS-2B Human Bronchial Epithelial Cells. American Thoracic Society International Conference 2013, Pennsylvania Convention Center

Yu Mikami, Yasuhiro Yamauchi, Masafumi Horie, Satoshi Noguchi, Osamu Narumoto, Taisuke Jo, Tadashi Kohyama, Hajime

Takizawa, Takahide Nagase, Tumor Necrosis Factor Super Family Member LIGHT Induces CXCL8 Production In BEAS-2B Human Bronchial Epithelial Cells Via Erk1/2 Pathway. American Thoracic Society International Conference 2013, Pennsylvania Convention Center

6. 研究組織

(1)研究代表者

城 大祐 (Taisuke Jo)

東京大学・保健・健康推進本部・助教

研究者番号：30376470

(2)研究分担者

山内 康宏 (Yasuhiro Yamauchi)

東京大学・保健・健康推進本部・助教

研究者番号：00323585

齋藤 朗 (Akira Saito)

東京大学・保健・健康推進本部・助教

研究者番号：90591412

(3)連携研究者

長瀬 隆英 (Takaide Nagase)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：40208004

幸山 正 (Tadashi Kohyama)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：00302703