

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09180

研究課題名(和文) 間質性肺炎における新規脂質メディエーターの役割の検討

研究課題名(英文) The role of new lipid mediator in the pathogenesis of interstitial pneumonia

研究代表者

渡辺 正樹 (WATANABE, Masaki)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：90398298

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)：アンジオポエチン様因子2は、慢性炎症を基盤とする様々な病態に関連する。しかし、肺における役割は不明であるため、間質性肺炎における役割を検討した。Angptl2は、型、型肺胞上皮細胞と肺胞マクロファージに発現しており、間質性肺炎の病変では発現が増強していた。さらに、Angptl2欠失マウスでは病態が増悪した。Angptl2は肺局所由来であった。以上の結果から、間質性肺炎では組織修復やホメオスタシスの維持に要する炎症反応、すなわち肺保護にAngptl2が寄与しているのではないかと考えた。

研究成果の概要(英文)：Angiopoietin-like protein 2 (ANGPTL2) is a chronic inflammatory mediator that is associated with various pathologies. However, little is known about its activity in lung. We observed abundant ANGPTL2 expression in both alveolar epithelial type I and type II cells and in resident alveolar macrophages under normal conditions. Bleomycin-treated wild type mice showed specifically upregulated ANGPTL2 expression in areas of severe interstitial pneumonia, while Angptl2^{-/-} mice developed more severe lung fibrosis than did comparably treated wild-type mice. Angptl2 loss in myeloid cells does not underlie fibrotic phenotypes. We conclude that Angptl2 deficiency in lung epithelial cells and resident alveolar macrophages causes severe lung fibrosis seen following bleomycin treatment, suggesting that ANGPTL2 derived from these cell types plays a protective role against fibrosis in lung.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：間質性肺炎 アンジオポエチン様因子2

1. 研究開始当初の背景

間質性肺炎 (Interstitial Pneumonia : IP) は、肺胞隔壁に慢性的な炎症と線維化を来たす疾患であり、有効な治療法は乏しく、予後は極めて不良である。肺胞上皮細胞と血管内皮細胞に損傷が生じると、炎症メディエーターの放出、好中球や肺胞マクロファージの誘導、血管透過性亢進などを介して病変の形成が始まると考えられているが、詳細な病態生理は解明されていない。

申請者らは、これまで IP を始めとする難治性呼吸器疾患の病態解析と新規治療法の開発に取り組んできた。すなわち、臓器再生因子である Hepatocyte Growth Factor の肺胞上皮細胞および血管内皮細胞への選択的遺伝子導入により、効果的に炎症および線維化を抑制できること (*Mol Ther* 2005)、血管内皮細胞増殖因子 Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) に対するモノクローナル抗体を肺局所で長期間産生するベクターの開発により、透過性肺水腫や転移性肺腫瘍などの発症および進展の抑制に有効であること (*Hum Gene Ther* 2008, *Hum Gene Ther* 2009, *Gene Ther* 2010)、急性および慢性炎症反応におけるサイトカインシグナル抑制因子の新たな知見と治療への応用などを報告してきた。

アンジオポエチン様因子 (Angiopoietin-like protein : Angptl) は、血管新生因子アンジオポエチンと類似の構造を持つ新しい脂質メディエーターであり、ヒトでは7種類のファミリー分子が同定されている。血管新生の制御に関係する他に、糖、脂質、エネルギー代謝に関する多彩な機能も有する。最近、Angptl2 が慢性炎症を制御する重要な因子であることが判明した。

2. 研究の目的

脂質メディエーターは、生活習慣病の他にも慢性炎症を基盤とするアレルギーや癌の病態に関与するなど、多彩な機能を有することが明らかになりつつある。本研究は、これ

まで肺における作用を報告されていない新規脂質メディエーターの Angptl2 に着目して、難治性呼吸器疾患である間質性肺炎の病態における役割を解析することにより、新しい概念による病態解明と治療法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

IP 病態における Angptl2 の役割を解明するために、以下の研究過程で進める。

1) IP モデルにおける Angptl2 の発現細胞、発現動態の検討

IP は、マウスにブレオマイシンを気管内投与して誘導する。申請者らが開発した免疫染色用の抗 Angptl2 モノクローナル抗体を用いて、Angptl2 の発現細胞をナイーブ肺と IP モデルで比較する。発現動態の確認は、気管支肺胞洗浄液、血清中の Angptl2 濃度を ELISA にて測定する。

2) Angptl2 欠失マウス (Angptl2 KO) を用いた IP モデルの解析

IP における Angptl2 の役割を明らかにするために、Angptl2KO に IP を誘導して、肺病理組織像、肺内 collagen α (COL1A1, COL1A2)、ヒドロキシプロリン量を基に、IP の重症度を野生型と比較する。

3) Angptl2 由来組織の同定

IP モデルにおける Angptl2 が肺局所に由来するのか、骨髄に由来するのかを特定するために、野生型と Angptl2KO の骨髄細胞を入れ替えたキメラマウス IP を誘導して重症度を評価する。Angptl2KO に野生型マウスの骨髄を移植して表現型が消退すれば Angptl2 は骨髄細胞由来であると判断できる。逆に、これまで同様の表現型を示せば、Angptl2 は肺局所由来と判断できる。

4) Angptl2 が IP を制御する機序の同定

In vitro で Angptl2 をマウス線維芽細胞に添加して、IP の形成に関連する因子の動向を解析する。

5) IP 患者における Angptl2 の動態の検討
特発性肺線維症患者 (13 人) における血清中 Angptl2 濃度を健常者 (12 人) と比較して、これらが疾患のマーカーになりうるかを解析する。

4 . 研究成果

1) IP モデルにおける Angptl2 の発現細胞、発現動態の検討

Angptl2 は、野生型マウスのナイーブ肺において型、型肺胞上皮、肺胞マクロファージに発現していた。IP を誘導すると、病変部において、肺胞上皮細胞で著明に発現が増強した。さらに、IP モデルの気管支肺胞洗浄液中の Angptl2 濃度も上昇することを確認した。

2) Angptl2 KO を用いた IP モデルの解析

Angptl2 KO に IP を誘導すると、病理学的に野生型と比べて線維化およびコラーゲンの沈着が増強した。また、IP の指標である肺内 COL1A1、COL1A2 の発現とヒドロキシプロリン量も増加した (図)。以上から、Angptl2 の欠失により IP は増悪することが分かった。

3) Angptl2 由来組織の同定

Angptl2KO に野生型骨髄を移植して IP を誘導しても表現型は変わらず、IP は増悪した。よって、IP モデルにおいて Angptl2 は肺局所由来であると判断した。

4) Angptl2 が IP の進行を抑制する機序の同定

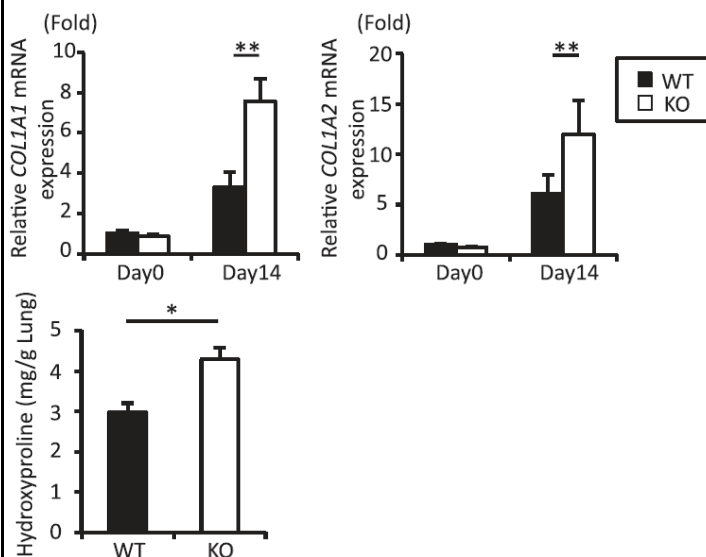
Angptl2 を線維芽細胞に添加すると、線維化促進因子である TGF- β 1、TGF- β 2、TGF-R1、TGF-R2 の発現には影響しなかったが、TGF- β 1 を活性化する Thrombospondin 1 (TSP1) および TGF- β 1 の下流シグナルに属する COL1A1、COL1A2 の発現は有意に低下した。

5) IP 患者における Angptl2 の動態の検討

特発性肺線維症患者では健常者と比べて血清中 Angptl2 濃度が著明に上昇していた。

以上の結果から、Angptl2 は TSP1 を抑制す

ることにより TGF- β の活性化を阻害して、間質性肺炎の進行を抑制するものと考えた。Angptl2 は間質性肺炎の新たな治療法として有用な可能性がある。



(図:左上 COL1A1, 右上 COL1A2, 左下 ヒドロキシプロリン)

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

- 1) Motokawa I, Endo M, Terada K, Horiguchi H, Miyata K, Kadomatsu T, Morinaga J, Sugizaki T, Ito T, Araki K, Morioka MS, Manabe I, Samukawa T, Watanabe M, Inoue H, Oike Y Interstitial pneumonia induced by bleomycin treatment is exacerbated in Angptl2-deficient mice
Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 査読有, 311, 2016, L704-L713
DOI: 10.1152/ajplung.00005.2016.
- 2) Kamikawaji K, Seki N, Watanabe M, Mataka H, Kumamoto T, Takagi K, Mizuno K, Inoue H Regulation of LOXL2 and SERPINH1 by antitumor microRNA-29a in lung cancer with idiopathic pulmonary fibrosis
J Hum Genet, 査読有, 61(12), 2016, 985-993
DOI: 10.1038/jhg.2016.99.
- 3) Kubota S, Watanabe M, Shirato M, Okuno T, Higashimoto I, Machida K, Yokomizo, Inoue H

An inhaled phosphodiesterase 4 inhibitor E6005 suppresses pulmonary inflammation in mice
Eur J Pharmacol, 査読有, 768, 2015, 41-48
DOI: 10.1016/j.ejphar.2015.10.013.

4) Hamada T, Samukawa T, Kumamoto T, Htanaka K, Tsukuya G, Yamamoto M, Machida K, Watanabe M, Mizuno K, Higashimoto I, Inoue Y, Inoue H

Serum B cell-activating factor (BAFF) level in connective tissue disease associated interstitial lung disease

BMC Pulm Med, 査読有, 15, 2015, 110
DOI:10.1186/s12890-015-0105-0.

〔学会発表〕(計1件)

1) 本川郁代, 渡辺正樹, 寒川卓哉, 井上博雅, 遠藤元誉, 尾池雄一

Angptl2 と肺線維化に関する検討
第57回日本呼吸器学会学術講演会, 2017

〔その他〕

鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 呼吸器内科学 ホームページ
<http://www2.kufm.kagoshima-u.ac.jp/field/advanced-therapeutics/f104/04.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 正樹 (WATANABE, Masaki)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任助教
研究者番号：90398298

(2) 研究分担者

井上 博雅 (INOUE, Hiromasa)
鹿児島大学・医歯学域医学系・教授
研究者番号：30264039

(3) 連携研究者

尾池 雄一 (OIKE, Yuichi)
熊本大学大学院生命科学研究部・分子遺伝学

分野

研究者番号：90312321

(4) 研究協力者

本川 郁代 (MOTOKAWA, Ikuyo)