

令和元年5月21日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09591

研究課題名(和文)特発性肺線維症病態における老化細胞除去機構の役割

研究課題名(英文) Role of senescent cell removal mechanism in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis

研究代表者

柳澤 治彦 (Haruhiko, Yanagisawa)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：00773425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：IPFでは上皮細胞が老化していることが報告されている。老化上皮細胞の肺線維化における役割を明らかにするため、マウス放射線肺臓炎モデルにて検討を行った。マウス肺に放射線を照射すると気道上皮細胞の細胞老化が誘導された。ナフタレンにて老化気道上皮細胞を除去すると放射線による肺線維化が抑制された。放射線肺臓炎において気道上皮細胞老化が線維化進展に重要な役割を果たしている可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IPFは進行性の疾患で、診断されてから生存期間中央値は約3年とする報告や、5年生存率は20～40%と示されており非常に予後が不良である。老化関連呼吸器疾患の一つであり、肺組織では老化上皮細胞が増加している。種々のサイトカインを産生し病態を悪化させる。IPFにおける老化上皮細胞の除去機構を解明し、制御することができれば、IPFの病態を改善できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Several lines of evidence suggest that epithelial cells are senescent in Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF). To elucidate the role of epithelial cell senescence in lung fibrosis, we used mouse model of radiation-induced lung fibrosis.

Radiation to mouse lung induced cellular senescence in bronchial epithelial cells. Elimination of senescent bronchial epithelial cells by naphthalene inhibited radiation-induced lung fibrosis. Bronchial epithelial cell senescence may play important roles in the pathogenesis of radiation-induced lung fibrosis.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：IPF 線維化 細胞老化

1. 研究開始当初の背景

1) IPFにおける老化細胞の役割

IPFは、慢性かつ進行性に肺組織の線維化をきたす予後不良の呼吸器疾患であり、上皮細胞の損傷と、引き続き異常な修復が病態の中心と考えられている。IPF肺では、上皮細胞が損傷され、アポトーシスなどにより除去された後、正常の修復機構が働かず、老化した化生上皮細胞が出現する。実際に、IPF肺を老化の代表的なマーカーである Senescence-associated galactosidase(SA-βgal)染色すると、IPF肺では、正常肺、COPD肺に比べ老化上皮細胞が著明に増加しており、老化細胞の増加がIPFの病態に重要な役割を果たしている可能性が高い。

老化上皮細胞は Senescence associated secretory phenotype (SASP)と呼ばれる表現型を呈し、種々のサイトカインを産生し、線維芽細胞を含む間葉系細胞との相互作用を介して線維化病態進展に重要な役割を果たしている。事実、IPFの線維化進展部位と考えられる、Fibroblastic foci(FF)では、老化上皮細胞の周囲に線維芽細胞、筋線維芽細胞が集簇し、老化上皮細胞はIL-1などのサイトカインを分泌し、近傍の線維芽細胞の増殖、筋線維芽細胞分化を促進し、線維化を促進すると考えられている。

2) IPFにおける老化細胞除去機構

IPFのFFを覆う老化上皮細胞は、p63を発現することから、気道上皮由来と考えられているが、一方、その除去機構に関しては明らかとなっていない。前述のようにIPF肺では老化細胞が増加しており、老化細胞除去機能が低下している可能性がある。線維化を促進する老化細胞を効率的に除去することができれば、線維化の抑制、病態の改善につながると予想される。

老化細胞の除去機構に関しては、これまで、主に、腫瘍細胞においてその機序が検討されている。腫瘍細胞は化学療法剤などのDNA障害を引き起こす種々の刺激により老化が誘導されるが、同時にMHC class I chain-related gene A (MICA)、MICB、UL16-binding proteins(ULBPs)などのnatural killer group 2, member D(NKG2D)リガンドを発現する。老化腫瘍細胞のNKG2DリガンドはNK細胞のNKG2Dにより認識され、その結果、老化腫瘍細胞はNK細胞により傷害され、除去される。これが化学療法剤の腫瘍の抑制機構の一つとされている。

IPFにおける老化細胞除去機構に関してはこれまでほとんど検討されていないが、代表的なNKG2DリガンドであるMICAの遺伝子多型がIPFの疾患感受性と関連したとの報告²があり、NKG2Dリガンドの発現の異常により老化上皮細胞の除去が低下している可能性がある。また、IPF肺ではTGF-βが

増加し、TGF-βシグナルが活性化していることが知られているが、TGF-βは老化を誘導するだけでなく、NKG2Dリガンド発現を変化させる。IPFでは、TGF-βの作用により老化上皮細胞のNKG2Dリガンド発現が低下し、老化細胞の除去が障害されるために、老化細胞が長期に残存し、線維化を促進している可能性がある。

2. 研究の目的

IPFは老化関連呼吸器疾患の一つであり、肺組織では老化上皮細胞が増加している。老化細胞は Senescence associated secretory phenotype (SASP)と呼ばれる表現型を呈し、種々のサイトカインを産生し、病態を悪化させる。IPFにおける老化上皮細胞の除去機構を解明し、制御することができれば、IPFの病態を改善できる可能性がある。

本研究では、IPFにおける老化上皮細胞の除去機構を明らかとし、IPFの病態解明、治療法開発のための知見を得る。

3. 研究の方法

本検討では老化誘導刺激である放射線をマウス肺に照射し、放射線誘導肺線維症マウスモデルを作成し、検討を行った。

放射線照射後、経時的に肺組織を採取し、老化細胞の出現時期、細胞腫を同定した。(肺組織のSA-βgal染色、p16,p21発現など)

放射線照射後、最も早期に気道上皮細胞に細胞老化が誘導され、同細胞がその後の線維化進展に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。そこで、気道上皮細胞老化の線維化進展への影響を評価するため、ナフタレン投与により老化気道上皮細胞の除去し、肺線維化への影響を評価した。

、放射線肺臓炎マウスモデルの作成：

動物実験用エックス線照射装置(MBR-1520R)を用いて、10週齢雌C57BL/6Jマウスの両肺にエックス線6Gy/日・5日間、照射を行った。(両側肺以外への照射を予防するため、タングステンシートを用いた。)照射後6~20週に肺の摘出を行い、細胞老化を senescence-associated

-galactosidase (SA-βGal)染色(SIGMA Senescence Cells Histochemical Staining Kit #CS0030)、P21、P16、LaminB1の免疫組織染色で評価した。

肺の線維化は、Masson trichrome染色、Picro-sirius red染色、Sircol Soluble Collagen Assay(biocolour ; Sircol Soluble Collagen Assay Kit #S1000)にて評価した。

、ナフタレンによる老化上皮細胞除去モデルマウスの作成：

10週齢雌C57BL/6Jマウスにcorn oilに溶解したナフタレン200mg/bodyを腹腔内投与(intraperitoneal injection : ip)した。

このモデルではナフタレン投与後 2~5 日後にクラブ細胞の大部分が脱落し、14 日後には再生、修復する。(B.R.Stripp et al, Am J Physiol.1995)
 ナフタレン投与後、クラブ細胞の脱落を、Clara cell 10-kD protein(CC-10)による肺組織の免疫染色で確認した。

、老化上皮細胞除去(ナフタレン投与)による放射性肺臓炎への影響の検討:

10 週齢雌 C57BL/6J マウスの両肺にエックス線 6Gy/日・5 日間の照射を行った。照射 6 週間後、ナフタレン 200mg/body を ip 投与した。照射 20 週後に肺組織の評価を行った。

肺の線維化は、Masson trichrome 染色、Picro-sirius red 染色、Sircol Soluble Collagen Assay にて評価した。

コントロール群[コーンオイル(ナフタレンの溶媒)ip 群]、ナフタレン単独群[ナフタレン ip 群]、放射線単独群[放射線照射+コーンオイル ip 群]、放射線照射+ナフタレン投与群[放射線照射+ナフタレン ip 群]、それぞれの群の比較にて行った。

4. 研究成果

、放射線肺臓炎マウスモデルの作成:

1、放射線照射による気道上皮、肺胞上皮の細胞老化へ及ぼす影響

放射線照射後、経時的に気道上皮・肺胞上皮の細胞老化を評価した。(SA-β-Gal 染色、p16、p21 染色、LaminB1 染色) 気道上皮細胞では照射後 6 週目より老化細胞が出現し、10 週で最も老化細胞が増加し、その後減少した。一方、肺胞上皮細胞では 10 週目以降、老化細胞が出現した。(Figure1-A,B) 気道上皮と肺胞上皮では老化細胞の出現時期が異なっていた。

2、放射線照射による線維化誘導

エックス線 6Gy/日・5 日間の照射により肺組織に広範に線維化が誘導された。(Masson trichrome 染色; Figure2-A, Picro-sirius red 染色; Figure2-B) ホモジネートを用いた検討では、正常肺と比較し放射線肺臓炎モデルで有意にコラーゲン含有量が増加した。(Sircol Soluble Collagen Assay; Figure2-C)

、ナフタレンによる老化上皮細胞除去モデルマウスの作成:

1、ナフタレン腹腔内投与によるクラブ細胞除去

ナフタレン投与後、4 日後、7 日後の肺組織の CC-10 免疫組織染色を行った。(Figure3) クラブ細胞の大部分が脱落し、7 日後以降に再生していることを確認した。

、老化上皮細胞除去(ナフタレン投与)による放射性肺臓炎への影響の検討: 1、老化上皮細胞除去(ナフタレン投与)の放射線誘

導気道上皮老化へ及ぼす影響

放射線照射 6 週間後にナフタレン投与を行い、照射後 20 週後に肺線維化の評価を行った。(Figure4-A) 老化気道上皮細胞は、ナフタレン投与により減少した。

2、老化上皮細胞除去(ナフタレン投与)による放射線肺臓炎抑制

Masson trichrome 染色 (Figure5-A)、Picro-sirius red 染色 (Figure5-B) いずれにおいても、放射線照射群と比較し、放射線照射+ナフタレン投与群で肺線維化が軽度であった。

ホモジネート肺のコラーゲン含有量も、放射線照射+ナフタレン投与群で有意に減少した。(Sircol Soluble Collagen Assay; Figure5-C)

Figure1

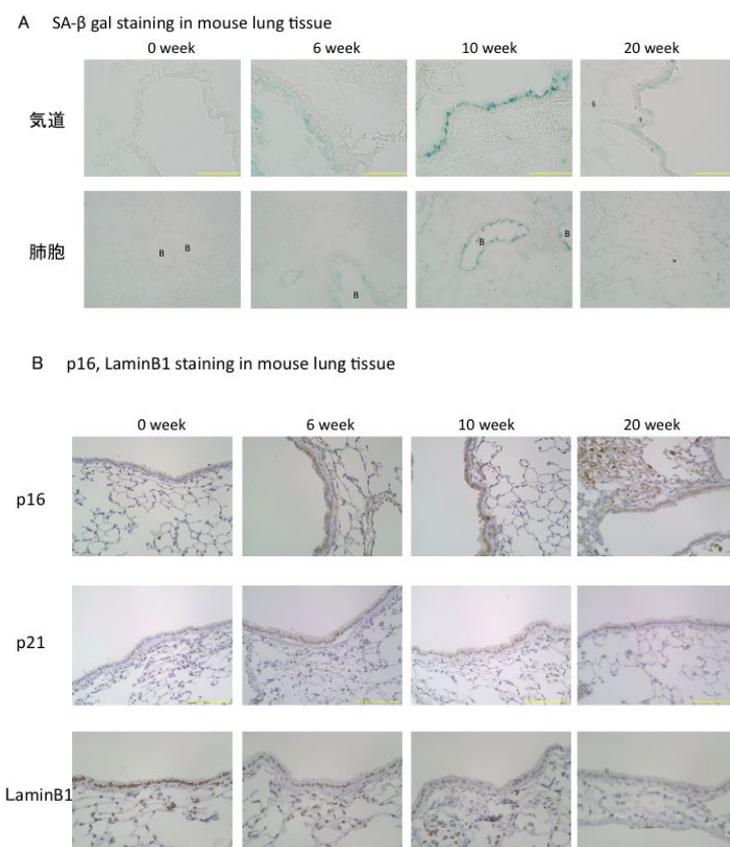
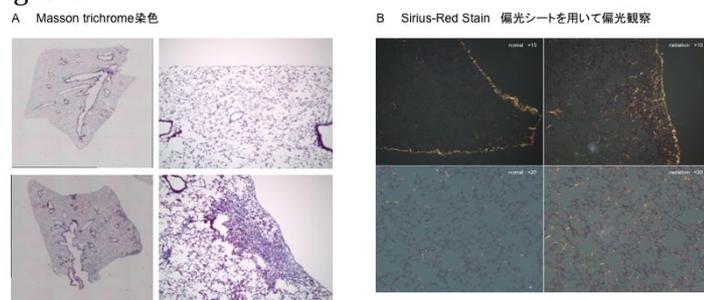


Figure2



C Sircol soluble collagen assay

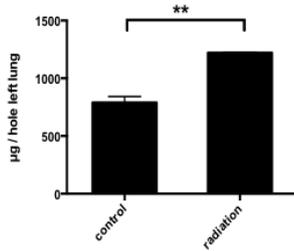


Figure3

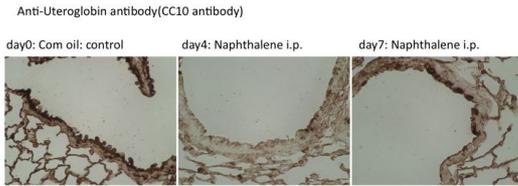


Figure4

A p16, LaminB1 staining in mouse lung tissue

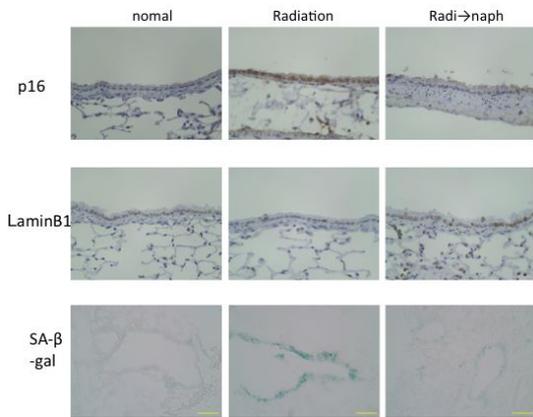
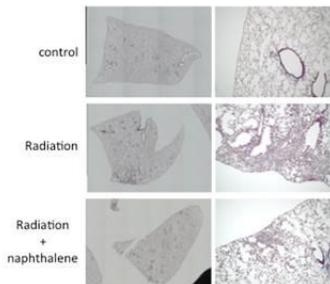
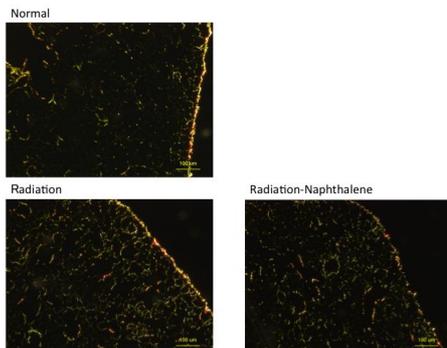


Figure5

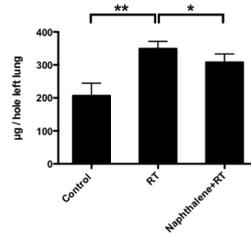
A Masson trichrome染色



B Sirius-Red Stain 偏光シートを用いて偏光観察



C Sircol Collagen Assay



(結論)

ナフタレンによる老化気道上皮細胞の除去により、放射線誘導肺線維化が抑制された。気道上皮細胞老化が放射線誘導肺線維化において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔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

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

柳澤治彦(YANAGISAWA HARUHIKO)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号: 00773425

(2)研究分担者

原 弘道 (HARA HIROMICHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：70398791

桑野 和善 (KUWANO KAZUYOSHI)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：40205266