

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15460

研究課題名(和文)細胞老化と細胞骨格調節機構から紐解く肺線維症発症機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the pathomechanism of lung fibrosis from the viewpoint of cellular senescence and cytoskeletal organization

研究代表者

中里 雅光(Nakazato, Masamitsu)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：10180267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では肺上皮細胞特異的Pten欠損マウス(Pten-KOマウス)を用い解析を進めた。Pten-KOマウス肺で、AECでの老化細胞増加とp53発現亢進がみられた。Pten-KOマウスで、気管支肺胞洗浄液中総細胞数の増多がみられ、単離AECでIL-6とIGFB5の発現亢進がみられた。さらに、30週齢のPten-KOマウスでは、肺リモデリングを示唆する平均肺胞径と肺胞破壊指数の増加がみられた。また興味深いことに、Pten-KOマウスのAECでは紡錘体形成不全がみられた。以上より、上皮Ptenの欠損は紡錘体形成不全を介して細胞老化が加速し、肺リモデリング亢進を引き起こすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the roles of epithelial Pten in the pathogenesis of lung fibrosis by using lung epithelial-specific Pten deficient (Pten-KO) mice. Pten-KO mice showed increased cell senescence and enhanced p53 expressions in alveolar epithelial cells (AECs). Pten-KO mice also showed enhanced cellular senescence-associated secretory phenotype in the lungs, and Pten-KO mice at 30 weeks old showed enhanced lung architectural remodeling (increased mean linear intercept of alveoli and alveolar destruction index). Interestingly, AECs of Pten-KO mice showed impaired bipolar spindle formations. These results indicated that epithelial Pten deficiency causes accelerated cellular senescence of AECs through p53 upregulation and the impairment of bipolar spindle formations, and subsequently enhances lung architectural remodeling.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺線維症 肺リモデリング 細胞老化 細胞骨格 Pten RhoA Ror2

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) は原因不明の肺線維増殖性疾患で、進行性の呼吸不全を来し、生存期間中央値 2.5 年と予後不良である。IPF の病態解明と有効な治療法の開発は急務の医療課題であると考えられる。肺胞上皮細胞 (alveolar epithelial cells: AECs) の損傷と修復異常は、IPF の発症・進展機構に重要な役割を担い、その過程で AECs の可塑性制御機構の破綻が注目を集めている。IPF の殆どが 60 歳以降に発症し、年齢とともに発症率が増加する。老化に伴う生物学的特徴の中で、テロメア短縮や細胞老化が IPF 症例の AEC で高頻度にみられる。一方、IPF の線維化は両側肺底部胸膜直下から始まることが知られ、数理モデル解析の結果から、換気に伴う力学的進展が最も加わる肺胞領域は同領域であることが最近報告された。申請者らは、AECs 特異的 Pten 欠損マウスは AECs バリア統合性保持と修復不全を介した機序で肺損傷後の線維化が亢進すること、IPF 症例の AECs で PTEN 発現が低下していることを見出した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、肺線維症における AEC 内分子の病態生理学的意義を、細胞老化と細胞骨格調節機構という新たな観点から解析し、IPF に対する治療戦略を創出することである。本研究では、IPF での細胞老化と細胞骨格調節機構破綻という本質的かつ新たな観点から、上皮 Pten/Wnt/Rho-ROCK/Wnt5a-Ror2 経路の役割を検証し、IPF の発症・進展機構を解明することで、将来的に同疾患に対する有効な治療戦略を構築する。

3. 研究の方法

(1) AEC 特異的 Pten 欠損マウスでの AEC 細胞老化の解析

AEC 特異的 Pten 欠損マウス (*SOPten* / マウス) とコントロールマウスのそれぞれ 10 週齢、30 週齢のマウスを用い、肺組織中の老化 AEC を酸性ガラクトシダーゼ活性染色にて測定する。細胞老化関連シグナル分子の発現動態について、単離 AEC での p53, p16Ink4a, p21, p19ARF 発現をウエスタンブロッティングと定量 RT-PCR にて測定する。

(2) AEC 特異的 Pten 欠損マウスでの肺線維症自然発症の解析

SOPten / マウスと野生型マウスのそれぞれ 10 週齢、30 週齢のマウスを用い、肺組織の Azan 染色と Masson Trichrome 染色を行い、肺線維症の自然発症の有無を評価する。細胞外マトリックス産生について、肺組織中のハイドロキシプロリンとコラーゲンを測定する。またコラーゲン I とコラーゲン II の mRNA を定量 RT-PCR にて測定する。AEC 細胞骨格変化を抗アクチン抗体による免疫組織染色とファイロジン染色にて評価する。さらに機能解析として、whole body

plethysmography を用い肺コンプライアンスと全肺気量を測定する。

(3) Pten dominant negative 遺伝子導入肺上皮細胞での細胞老化シグナル解析

ヒト不死化肺上皮細胞株 (BEAS-2B) に、レンチウイルスを用いて野生型 Pten/dominant negative 型 Pten/GFP コントロールを遺伝子導入する。各遺伝子導入細胞株の cell lysate を用いて酸性ガラクトシダーゼ活性を測定し、Pten 欠損が与える細胞老化への影響を評価する。細胞老化関連シグナル分子の発現動態について、p53, p16Ink4a, p21, p19ARF 発現をウエスタンブロッティングと定量 RT-PCR にて測定する。

(4) II 型 AEC 特異的 RhoA 欠損マウスを用いた細胞骨格シグナルが与える肺線維症発症への影響の解析

RhoA は Rho-ROCK 経路の上流分子であり、細胞基質間接着と細胞移動を制御する。*RhoA* flox/flox マウスと *Sftpc-CreERT2* マウスを交配し、タモキシフェン誘導性に後天的かつ II 型 AEC 特異的に RhoA を欠損するマウスを作成する。10 週齢と 30 週齢の *RhoA* flox/flox: *Sftpc-CreERT2* マウスとコントロールマウスの肺組織の Azan 染色と Masson Trichrome 染色を行い、肺線維症の自然発症の有無を評価する。細胞外マトリックスについて、肺組織中のコラーゲン値を蛋白レベルと mRNA レベルで測定する。AEC 細胞骨格変化を抗アクチン抗体による免疫組織染色とファイロジン染色にて評価する。基底膜への AEC の接着と AEC 間連結について電子顕微鏡にて解析する。*RhoA* flox/flox: *Sftpc-CreERT2* マウスとコントロールマウスのそれぞれ 10 週齢、30 週齢のマウスを用い、上皮細胞統合性の破綻について、電子顕微鏡にて肺胞上皮細胞間隙を観察する。

(5) II 型 AEC 特異的 Ror2 欠損マウスを用いた細胞骨格シグナルが与える肺線維症発症への影響の解析

Wnt5a-Ror2 経路は JNK 活性化とフィロポディア形成を介して細胞極性と細胞移動を制御する。*Ror2* flox/flox マウスと *Sftpc-CreERT2* マウスを交配し、タモキシフェン誘導性に後天的かつ II 型 AEC 特異的に Ror2 を欠損させたマウスを作成する。10 週齢と 30 週齢の *Ror2* flox/flox: *Sftpc-CreERT2* マウスとコントロールマウスの肺組織を用い、肺線維症の自然発症の有無を評価する。これらのマウスの肺水腫や上皮細胞統合性を評価することで、II 型 AEC での Wnt5a-Ror2 経路が有する肺胞上皮細胞バリアへの影響を解析する。

4. 研究成果

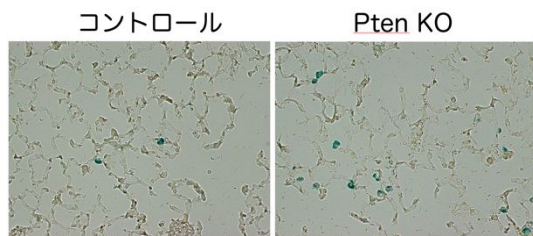
AEC 特異的 Pten 欠損マウス (*SOPten* / マウス) を用い、上皮 Pten が与える細胞老化と肺線維症発症の関連を検証した。*SOPten* / マウスは、AEC でのアポトーシスはコントロールマウスと比較し差がない一方、AEC での細胞増殖は

有意に低下していた。酸性ガラクトシダーゼ活性(SA-GAL)染色の結果、30週齢の *SOPten*^{-/-} マウスは、AECでの老化細胞が有意に増加していた(図1)。単離AECを用いた解析の結果、*SOPten*^{-/-} マウスでは、AECでのp53発現亢進がみられた。また、*SOPten*^{-/-} マウスでは、細胞老化の特性であるsenescence-associated secretory phenotype(SASP)を示唆する気管支肺泡洗浄液中総細胞数の増多がみられ、単離AECでIL-6とIGFB5の発現亢進がみられた。さらに、30週齢の *SOPten*^{-/-} マウスでは、肺リモデリングを示唆する平均肺胞径と肺胞破壊指数の増加がみられた(図2)。

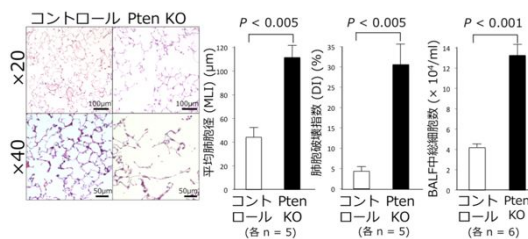
Pten-siRNAを導入したヒト不死化肺上皮細胞株(BEAS-2B)では、MMTアッセイでの増殖能低下がみられた。以上から、上皮Ptenの欠損は細胞老化の加速、細胞増殖能の低下、SASPを惹起し、肺リモデリング亢進を引き起こすことが示唆された。また興味深いことに、*SOPten*^{-/-} マウスのAECでは紡錘体形成不全がみられ、紡錘体チェックポイント蛋白であるBub1とPttg1の発現が有意に低下していた。以上の結果から、上皮Ptenの欠損は紡錘体形成不全を介して細胞老化が加速し、肺リモデリング亢進を引き起こすことが示唆された。

Wnt5a-Rorシグナル解析のために *Ror2*^{flx/flx} マウスを神戸大学細胞生理学分野より、RhoA-ROCKシグナル解析のために *RhoA*^{flx/flx} マウスを和歌山県立医科大学分子医学研究部より導入し、タモキシフェン誘導性II型肺胞上皮(alveolar epithelial type II: AT2)特異的Cre発現マウス(*Sftpc-CreER*^{T2} マウス)をJackson laboratoryより導入した。各々のマウスを現在交配中であり、*Sftpc-CreER*^{T2}:*Pten*^{flx/flx} マウス、*Sftpc-CreER*^{T2}:*Ror2*^{flx/flx} マウス、*Sftpc-CreER*^{T2}:*RhoA*^{flx/flx} マウスの作製を進めている。今後、AT2内Pten/RhoA-ROCK/Wnt5a-Ror2経路の組織幹細胞ニッチとAT2脆弱性における役割を各々のAT2特異的遺伝子欠損マウスを用いて解明することで、IPFにおけるAT2内分子の意義を、組織幹細胞ニッチを制御する細胞老化/細胞移動調節機構という新しい観点から解明し、IPFに対する有効な治療戦略を創出したい。

(図1)



(図2)



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4件)

- 1) Yanagi S, Tsubouchi H, Miura A, Matsuo A, Matsumoto N, Nakazato M: The impacts of cellular senescence in elderly pneumonia and in age-related lung disease that increase the risk of respiratory infections. *Int J Mol Sci* 18, E503, (2017).
- 2) Otsubo K, Goto H, Nishio M, Kawamura K, Yanagi S, Nishie W, Sasaki T, Maehama T, Nishina H, Mimori K, Nakano T, Shimizu H, Mak TW, Nakao K, Nakanishi Y, Suzuki A. MOB1-YAP1/TAZ-NKX2.1 axis controls bronchioalveolar cell differentiation, adhesion and tumour formation. *Oncogene* 36, 4201-4211, (2017).
- 3) Matsumoto N, Tsubouchi H, Imazu Y, Arimura Y, Yanagi S, Iiboshi H, Nakazato M. Clinical application of ghrelin for chronic respiratory failure. *Endocrine J* 64, S1-S3, (2017)
- 4) Tsubouchi H, Onomura H, Saito Y, Yanagi S, Miura A, Matsuo A, Matsumoto N, Nakazato M. Ghrelin does not influence cancer progression in a lung adenocarcinoma cell line. *Endocrine J* 64, S41-S46, (2017)

[学会発表](計5件)

- 1) 中里雅光. Development of early diagnostic biomarkers candidates of lung cancer and pancreatic cancer by the detection of cancer-derived protein fragments in urine using the original MRM method. JPrS2017 15thJHUP Conference, 2017年7月26日-28日、大阪.
- 2) 中里雅光. グレリン研究アップデート. 第90回日本内分泌学会学術総会, 2017年4月20日-22日、京都.
- 3) 中里雅光. Development of early diagnostic biomarkers candidates of lung cancer and pancreatic cancer by the detection of cancer-derived protein fragments in urine using the original MRM method. AMED-ERDN Joint

- Workshop. 2017年3月18日-19日, 東京.
- 4) Masamitsu Nakazato. Early Cancer Diagnosis by the Detection of Cancer-derived Proteins in Urine by a Novel MRM Technique. 3rd JAPAN-US Workshop for Cancer Research. 2017年03月06日-2017年03月09日. USA, Arizona
 - 5) Ayako Miura, Hironobu Tsubouchi, Shigehisa Yanagi, Nobuhiro Matsumoto, and Masamitsu Nakazato. The role of Pten in the cell-fate determination of epithelial cells in lung development. European Respiratory Society International Congress 2016. 2016年09月06日, United Kingdom, London EXCEL

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中里雅光 (NAKAZATO Masamitsu)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：10180267

(2) 研究分担者

柳 重久 (YANAGI Shigehisa)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：60404422

坪内拓伸 (TSUBOUCHI Hironobu)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：60573988

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし