

令和元年6月21日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19467

研究課題名（和文）パート-ホッグ-デュベ症候群における肺嚢胞形成機序の解明

研究課題名（英文）investigation on the mechanisms of cyst formation in Birt-Hogg-Dube syndrome

研究代表者

星加 義人 (Yoshito, Hoshika)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：70772515

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：Birt-Hogg-Dubacute;症候群（BHDS）患者の肺組織から線維芽細胞、II型肺胞上皮細胞（ATII）、胸腔洗浄液から中皮細胞を分離培養し機能解析を行った。BHDSのATIIは増殖が遅くアポトーシスを来しやすい傾向があった。BHDS線維芽細胞の網羅的遺伝子発現解析では対照と大きな差は認めなかったが、BHDS中皮細胞では接着、細胞増殖、創傷治癒および凝固系に関連した遺伝子の変化が際立っていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝的に気胸発症しやすいBHDS患者の肺構成細胞を検討したところ、ATIIと中皮細胞により強い機能や遺伝子発現の変化が認められた。非遺伝性の自然気胸や嚢胞性肺疾患の病態においても、これら2種類の細胞が重要である可能性が示唆される。気胸や嚢胞形成の病態研究における方向性を示した点に学術的意義がある。

研究成果の概要（英文）：We isolated type II alveolar epithelial cells (ATII) and fibroblasts from lung tissues that was resected during operation of pneumothorax in patients with Birt-Hogg-Dubacute; syndrome (BHDS). Additionally pleural mesothelial cells (PMC) was isolated from pleural lavage fluid that was also obtained during operation. ATII derived from BHDS showed decreased proliferation in the 3-D organoid culture system and increased apoptosis as compared with ATII obtained from normal lung tissues (a normal part of lobectomied lung in patients with lung cancer). We performed gene expression microarray analysis using lung fibroblasts from BHDS and control and PMC from BHDS and primary spontaneous pneumothorax. We found no apparent difference in gene expression of lung fibroblasts, but significant differences in PMC regarding genes involved in migration, adhesion, wound healing and coagulation.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：FLCN 肺胞上皮細胞 線維芽細胞 中皮細胞 細胞外マトリックス 自然気胸 肺のう胞

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

1. 研究開始当初の背景

自然気胸は、背が高く痩せ型の若い男性 (10~20代) に起こりやすい common disease で、胸膜直下のプレブ・ブラや嚢胞形成とその破裂により発症すると考えられている。従来、気胸治療では、破裂部の閉鎖・ブラを含む肺組織の切除、等の外科手術手技や器具の開発研究など、治療学への関心が寄せられていたが、成因に関する十分な基礎研究はなされていない。一方、気胸の術後再発率は 10%前後と高率であり、切除断端に新規にブラが生じる (以後、ブラ新生) ためと考えられている。ブラ新生は、早いものでは術後数週間で生じるため、喫煙による細気管支炎などの慢性炎症によるものとは考えがたく、組織の脆弱性、機械的ストレス、等が背景因子と推測されているが、生化学的・細胞生物学的な詳細は不明なままである。気胸の術後再発を減少させ患者の術後 QOL を向上させるため、従来の治療学一辺倒から病因・病態研究への転換が迫られている。

パート-ホッグ-デュベ症候群 (Birt-Hogg-Dubé 症候群; BHDS) は、顔面を主体とする小丘疹 (線維毛包腫)、多発性の肺嚢胞と自然気胸、腎腫瘍を臨床的特徴とする常染色体優性遺伝性疾患である。2002 年に BHDS の原因遺伝子として、腫瘍抑制遺伝子である *FLCN* 遺伝子が同定された (Nickerson et al, Cancer Cell 2:157, 2002)。 *FLCN* 遺伝子は、第 17 染色体短腕 (17p11.2) 上にあり、579 個のアミノ酸よりなるフォリクリンをコードしている。フォリクリンの機能は基礎研究により徐々に明らかにされ、1) FNIP1 や FNIP2 などの結合タンパク質と会合して Akt-mTOR 細胞内シグナル系で機能する、2) TGF- β シグナル伝達系、核内転写因子の経路を調節する、3) 上皮細胞の adherence junction に発現する PKP4 と相互作用し、細胞間接着に関与する、4) 細胞の生存やエネルギー代謝情報の伝達に重要な役割を果たす AMPK-mTOR シグナル系で機能する、などの多種類のパートナー蛋白質と会合して機能することが明らかにされてきている。最近、 *Flcn* ノックアウトマウスのモデル動物実験系では、II 型肺胞上皮細胞でのフォリクリン発現が消失すると、II 型肺胞上皮細胞のアポトーシスが亢進し肺胞腔の拡大が生じるとの報告がなされた (Goncharova EA et al. Cell Reports 7:412, 2014)。申請者は、これらの細胞やマウスを用いたモデル実験系での基礎研究成果をヒト疾患肺において検証することは、BHDS における嚢胞形成や気胸発症機序を解明する上で重要であると考えられる。また、単一遺伝子異常疾患での研究成果を、同一病態である非遺伝性の原発性自然気胸やブラ新生の機序解明に帰納することは重要な展望であると考えられる。

申請者が所属する研究グループでは、従来から BHDS の診療と臨床・基礎研究に関わり、着実な成果を残してきた。気胸を繰り返し多数の肺嚢胞を有するが線維毛包腫や腎腫瘍を認めない症例に *FLCN* 胚細胞遺伝子変異を同定し、肺病変のみの BHDS 症例があり得ること (BHDS 表現型の多様性) を世界に先駆けて報告した (Gunji et al. J Med Genet 44:588, 2007; Kunogi M et al. J Med Genet 47:281, 2010)。さらに、BHDS 症例の肺嚢胞は大きさが不揃い、不整形で、分布に偏りがあり、肺底部縦隔側や中枢肺血管周囲により多く分布する特徴があることを明らかにし (Tobino K et al. Eur J Radiol 77:403, 2011)、これらの点が BHDS の臨床診断に有用であるとともに、他の嚢胞性肺疾患との鑑別に有用であることを報告した (Tobino K et al. Eur J Radiol. 81:1340, 2012)。最近では、50 例の BHDS 肺組織の詳細な病理形態学的検討により、嚢胞は炎症や腫瘍細胞の出現により生じるのではなく、肺小葉構造の辺縁から生じ始めることを報告し、呼吸に伴う伸展・機械的ストレスがかかりやすく、解剖学的に最も脆弱な肺胞壁と小葉間隔壁との接合部の問題である可能性を報告した (Kumasaka T, et al. Histopathology 65: 100, 2014)。申請者は、BHDS 患者の肺組織から線維芽細胞を分離培養し、正常対照肺線維芽細胞と比較して増殖能には有意差はないが、TGF- β 1、フィブロネクチン、コラーゲン等の産生が減少し、遊走

能やゲル収縮能が低下していることを見出した (Hoshika et al. *Physiol Rep.* 2016;4(21). pii: e13025)。BHDS 患者肺組織から線維芽細胞を分離することは容易であるが、病態の解明には BHDS 患者の肺胞上皮細胞や肺血管内皮細胞でのフォリクリン発現減少の細胞生物学的効果を検討する必要がある。最近、ヒト肺組織から I 型・II 型肺胞上皮細胞、間葉系細胞、血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞、などの肺構成細胞を FACS ソーティングにより分離・分画することが可能となった(Fujino N, et al. *AJRCMB* 46: 422, 2012)。このため、線維芽細胞以外の肺構成細胞、特にマウスモデル研究から BHDS の病態に重要な役割を担うと想定される II 型肺胞上皮細胞を分離し、*FLCN* 遺伝子変異の細胞機能に及ぼす影響を検討する道が開けた。現在までの我々の BHDS 研究の延長線上に、FACS ソーティングで分離した肺細胞の分子・細胞生物学的検討を追加していくことで、モデル動物や細胞の基礎研究成果の検証に加え、ヒトにおける肺嚢胞形成メカニズムの解明が可能になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、1) 単一遺伝子疾患である BHDS 患者の肺構成細胞を詳細に検討して嚢胞形成や気胸発症の機序を解明し、2) その成果を一般的な原発性自然気胸の病因・病態へ帰納させる、ことを目的とする。この目的を達成するために、BHDS 肺の細胞生物学的・分子生物学的特徴を明らかにする、の結果をもとに、肺構成細胞の機能解析を行い、最も重要と推測される細胞機能異常を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) BHDS 患者の診療・*FLCN* 遺伝子診断・臨床検体の収集

BHDS 患者に同意説明文書を用いて研究への参加を依頼し、同意の得られた症例から検体の収集を行う。*FLCN* 遺伝子診断は既報に準じて実施する。

(2) Flow cytometry ソーティングによる肺細胞の分離、機能解析、細胞培養

・ Flow cytometry ソーティングによる II 型肺胞上皮細胞、線維芽細胞の分離

BHDS 患者の気胸手術時に得られた肺組織を蛋白分解酵素で消化して細胞浮遊液を調整し、各種表面抗原の相違を利用し、BD FACS Aria II cell sorter により I 型および II 型肺胞上皮細胞 (ATII)、間葉系細胞 (主に線維芽細胞)、血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞、の各肺構成細胞を分離する。申請者の研究グループではすでに修得済みの技術である。

・ 分離した II 型肺胞上皮細胞 (ATII)、線維芽細胞の解析、培養

ATII を feeder cell (線維芽細胞を使用) を用いた 3 次元培養系で初代培養する(Gotoh S, et al. *Stem Cell Reports* 3:1, 2014)。ATII の確認は電子顕微鏡によるラメラ封入体 lamellar body の確認、蛍光免疫染色による SP-C の発現で確認する。線維芽細胞の遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析し、対照肺組織由来の細胞との比較検討を行う。

・ 伸展刺激による肺線維芽細胞の機能変化の解析

伸展ストレス培養装置で BHDS 患者由来の線維芽細胞に呼吸様の伸展刺激を加え、遺伝子発現や機能変化を検討し、対照肺線維芽細胞の結果と比較する。

(3) BHDS 肺組織の生化学的分析とプロテオーム解析

肺組織中の細胞外基質タンパク質 (エラスチン、コラーゲン、フィブロネクチン) を比色法あるいは ELISA 法により定量する。

(4) 胸膜中皮細胞の分離培養と機能解析

気胸手術中の胸腔洗浄液を回収し、それに含まれる胸膜中皮細胞を培養し、機能解析を行う。生理食塩液による胸腔洗浄液を回収し、培養ディッシュに播いて培養する。付着細胞が順調に増殖している状況でトリプシン/ETDA 液により細胞を回収し、podoplanin と mesothelin の両表面マーカーが陽性の細胞集団を回収する。細胞機能（増殖、遊走、接着、一次線毛形成など）網羅的遺伝子発現解析、を行う。正常中皮細胞由来の細胞株 Met-5A の *FLCN* 遺伝子発現を sh-RNA でノックダウンし、BHDS 由来中皮細胞と類似した機能変化が生じるか検討する。

4. 研究成果

(1) 研究期間内に BHD 症候群が疑われる症例の診断の依頼を受け、50 例を *FLCN* 遺伝子検査により診断した。このうち、手術に際して肺組織が入手できた BHDS 症例は 6 例であった。肺癌患者で肺葉切除した際の非癌・正常肺組織の一部の対照として用いた（計 5 例）。自身で行った先行研究（Hoshika et al. *Physiol Rep.* 2016;4(21). pii: e13025）において、BHDS 患者由来の肺線維芽細胞では TGF- β 1、フィブロネクチン、コラーゲン等の産生が減少し、遊走能やゲル収縮能が低下していることを見いだしていたため、今回は BHDS 4 例、対照 3 例の肺組織から flow cytometry にて間葉系細胞をソーティングして培養し、肺線維芽細胞画分とした。分離培養した線維芽細胞を用い、網羅的な遺伝子発現アレイ解析を行った。しかし、正常対照に比べて BHDS 患者で 2 倍以上に発現が増減した遺伝子はなく、ほぼ同等の発現プロファイル結果であった。

(2) BHDS では肺底部や心臓辺縁などの伸展刺激の強い領域に嚢胞が多いことが観察される。自身で行った先行研究（Hoshika et al. *Physiol Rep.* 2016;4(21). pii: e13025）では、BHDS 肺線維芽細胞は組織修復能力が低下しているため、呼吸に伴う肺組織の伸展ストレスに抗しきれないために嚢胞が生じる可能性を考え、肺線維芽細胞を伸展培養装置にセットしてヒトの呼吸と同様の 20 回/分で伸展刺激を加えて、細胞接着能、アポトーシス亢進や遺伝子発現の変化を検討した。しかし、対照肺線維芽細胞、BHDS 線維芽細胞培養ともに伸展素材のプラスチックシャーレへの接着が悪く（特に BHD 症候群患者由来線維芽細胞でより顕著）実験系を断念した。

(3) *Fln* ノックアウトマウス肺の II 型肺胞上皮細胞（ATII）では ATII のアポトーシスが亢進し嚢胞形成に関与することが報告されているため、BHDS 肺組織からの Flow cytometry にて ATII を分離し、3 次元培養系でオルガノイド培養を試みた。正常対照 3 例で検討し、電子顕微鏡により lamellar body の形成を確認、免疫蛍光染色で SP-C の発現を確認し、ATII を培養できていることを確認した。しかし、BHDS 3 例から分離した ATII は対照肺 ATII に比して増殖が遅くアポトーシスを来しやすい傾向にあることが認められた。しかし、自身の培養系では 4 週間までの 3 次元培養は可能であったが、この時点での細胞のまき直し、及びそれ以降の継代培養が困難であった。更に、3 次元で培養した ATII の機能解析、細胞の遺伝子発現等の検討は細胞数も少なく困難であった。

(4) 嚢胞形成や気胸を発症しやすい BHDS では肺組織の脆弱性が示唆され、かつ自身の先行研究で肺線維芽細胞の間質タンパク産生能が低下していた。そこで、末梢肺組織のプロテオミクス解析を企画していたが、経費面から断念した。代わりに、BHDS 肺組織 6 例、正常対照肺組織 5 例について肺組織をホモジナイズし、細胞外マトリックスタンパク質（コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン）を ELISA 法あるいは比色法で測定した。コラーゲン、フィブロネクチンは正常肺と有意差がなかったが、エラスチンのみ BHDS 肺では正常肺より約 1.4 倍多いことが明らかとなった。しかし、病態におけるデータの意義は解釈が困難であった。

(5) BHDS の診断において肺組織病理診断は有用ではないため、診断のための肺生検は行われ

ない。切除される肺組織は嚢胞部分が主であるため、得られる組織の主成分は嚢胞であり、それ以外の組織量には限りがある。従って、BHDS 肺組織から ATII、間葉系細胞 (= 線維芽細胞) を FACS で分離できる機会は少なかった。他方、手術中に胸腔を生理食塩水で洗浄し、その回収液に含まれる中皮細胞を培養することは、毎回施行可能であるため、胸膜中皮細胞の形態や機能異常の有無も検討し始めた。実際、気胸病態の発生は、臓側胸膜の破綻が原因であり、胸膜の主たる構成細胞は線維芽細胞と中皮細胞である。そこで、BHDS 患者の中皮細胞の機能解析を行うことは、単に入手が容易という理由だけではなく、研究対象として有益であると考えた。対照の中皮細胞は、原発性自然気胸 (PSP) 患者の胸腔洗浄液から調製した。BHDS 患者 4 例、PSP 患者 3 例から手術中の胸腔洗浄液を回収し、胸腔中の中皮細胞を分離培養する方法を確立した。まず、胸腔洗浄液から細胞を遠心分離し、一旦、培養して細胞を増殖させ、podoplanin+/mesothelin+ の細胞分画を flow cytometry で分取し、継代培養することにより中皮細胞を純化した。BHDS 中皮細胞は PSP 中皮細胞と比べ様々な形態異常を認めた。すなわち、培養中の一次線毛形成の遅れ (数や線毛長の増加遅延)、走査電顕で微絨毛形成の減少、細胞培養では接着能、増殖能および遊走能の低下、細胞死 (アポトーシス) の亢進を認めた。接着能の低下は、BHDS 患者由来の II 型肺胞上皮細胞 (ATII) や線維芽細胞でも認めていたが、形態的变化が BHDS 中皮細胞では顕著で、ATII 同様にアポトーシスしやすいことが特徴であった。

(6) *FLCN* haploinsufficiency により BHDS と PSP の中皮細胞の遺伝子発現にどのような違いが生じているのかマイクロアレイ解析で網羅的に検討したところ、39,449 解析遺伝子中 500 遺伝子 (1.27%) が正常対照である PSP に比べて 2 倍以上の変化を示し (増加 226 遺伝子/減少 274 遺伝子)、遺伝子オントロジー解析では細胞増殖や創傷治癒および凝固系に関連した遺伝子の変化が際立っていた。また、adherence junction の構成蛋白である E-cadherin は BHDS で発現が減少しており、BHDS 中皮細胞において細胞間接着能が障害されている可能性が示唆された。正常中皮細胞由来の細胞株 Met-5A の *FLCN* 遺伝子発現を sh-RNA でノックダウンしたところ E-cadherin の発現減少が再現された。今後、E-cadherin を始めとする細胞間接着因子系のタンパク質レベルでの発現状態を確認し、接着因子からのシグナル伝達系の異常を確認する予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yutaka Enomoto, Yukiko Namba, Yoshihito Hoshika, Yoshimitsu Komemushi, Keiko Mitani, Haruki Kume, Etsuko Kobayashi, Yukio Homma, Kuniaki Seyama. A case of Birt-Hogg-Dubé syndrome implying reduced or no wild-type folliculin without mutated protein is pathogenic. in preparation.

〔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：
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

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(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。