

令和 3 年 5 月 20 日現在

機関番号：32644

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08156

研究課題名（和文）創薬にむけたIPF急性増悪の病態研究：ステロイド不応性シグナル伝達経路に着目して

研究課題名（英文）Pathological study of IPF acute exacerbation for drug discovery: Focusing on steroid refractory signal transduction pathway

研究代表者

伊藤 洋子（ITO, YOKO）

東海大学・医学部・准教授

研究者番号：90286451

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：特発性肺線維症の急性増悪は予後不良因子であるが、経験的にステロイド治療が行われるが、その効果は十分ではない。本研究では特発性肺線維症の病態の標的細胞である肺胞上皮細胞を用いて、急性増悪の機序とステロイドの影響を検討した。本研究の成果として1)新規研究室でのラット肺胞上皮細胞分離培養システムの確立、2)ステロイドは小胞体ストレスおよび小胞体ストレス下の肺胞上皮細胞機能障害を改善させない、3)急性増悪誘発因子である放射線照射が、肺胞上皮細胞のバリア機能障害を引き起こす、4)急性増悪誘発因子であるLPSで肺胞上皮細胞に誘導された遺伝子の中にステロイド投与で元に戻らない遺伝子群がある、ことが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果から、特発性肺線維症の病態に関与する小胞体という細胞内小器官のストレスや急性増悪を引き起こす因子（放射線、LPS:細菌の構造の一部で炎症を惹起）が肺胞上皮細胞傷害を引き起こすが、ステロイドではその肺胞上皮細胞傷害の予防・修復が完全にはできないことが判ってきた。今後、本研究の成果をさらに発展させることで、本研究開始当初の目的であった、特発性肺線維症の急性増悪に対してステロイドにプラスした新たな治療法を発見することができる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Acute exacerbation (AE) is the worst prognostic factor in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), which is empirically treated by glucocorticosteroid. However, the effect of glucocorticosteroid is not enough for the patients to recover completely. In this study, 1) we could establish the isolation and culture systems of rat alveolar epithelial cells in my new research laboratory. We have found 2) dysfunction of alveolar epithelial cells induced by endoplasmic reticulum stress was not restored by glucocorticosteroid, 3) irradiation, which causes AE, to alveolar epithelial cells led to epithelial barrier dysfunction, and 4) LPS, which also leads to AE, changed many gene expressions in alveolar epithelial cells, which were not abrogated by glucocorticosteroid.

研究分野：肺胞上皮細胞傷害と修復

キーワード：肺胞上皮細胞 急性肺障害 ステロイド

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (Idiopathic Pulmonary Fibrosis: IPF) は、予後不良で原因不明の間質性肺炎であり、急性増悪は IPF の予後規定因子である。急性増悪に対する確立された治療法はなく、臨床現場ではステロイドパルス療法とそれに引き続くステロイドの漸減療法が一般的に行われている。しかしながら、ステロイド治療に全く反応を示さない症例や、一旦は反応を示すもののステロイド漸減中に再増悪し死亡する症例が大部分であり、IPF の急性増悪の治療法の確立は急務といえる。そこで、申請者は、IPF の急性増悪において活性化された異常シグナル伝達経路のうち、ステロイド投与で抑制されない経路を明らかにすれば、その経路の正常化をターゲットにした新しい IPF 急性増悪の治療法を発見できるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

(研究開始当初の目的)

IPF では、肺泡領域で隣接する肺泡上皮と線維芽細胞が互いに異常シグナルを出し合い、互いの細胞や自らの細胞の形状や機能障害を起こし、病態を形成している。そこで、肺泡上皮と線維芽細胞の共培養システムを用いて、IPF 急性増悪モデルを作成し、

- (1) 肺泡上皮細胞の機能障害は、ステロイドにより修復されるのか否か？
- (2) 肺泡上皮と線維芽細胞で活性化された異常シグナル伝達経路のうち、どの経路がステロイド投与で抑制されないのか？
- (3) そして、その抑制されない経路を正常化することで、肺泡上皮細胞の機能障害は修復されるのか？

を明らかにし、IPF 急性増悪の新しい治療法の発見に寄与することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(研究開始当初の方法)

2018 年度は、米国勤務中に取得したラット 2 型肺泡上皮細胞分離・培養システムの立ち上げを現在の勤務先で行い、また、IPF の好発年齢が中高年男性であることより、18 - 24 か月 (ヒトの 45 - 60 歳に相当) の雄の Sprague-Dawley Rat から肺泡 2 型上皮細胞と線維芽細胞を分離する。

2019 年度は、ラット肺泡 2 型上皮と線維芽細胞の共培養システムを、小胞体ストレス誘導物質である tunicamycin と IPF 増悪因子のひとつである gefitinib (EGFR-TKI) とで刺激して IPF 急性増悪モデルを作成し、現在の一般的な治療薬であるステロイド (dexamethasone) を加えてから適切な time point で細胞培養液と cell lysate (RNA と蛋白抽出用) をそれぞれ採取して以下の項目を検討する。

- (1) 肺泡 2 型上皮細胞の機能障害はステロイドにより修復されるのか？

肺泡 2 型上皮細胞は、サーファクタント産生分泌、肺泡上皮障害の修復、線維芽細胞の増殖抑制、自然免疫などに関与している。肺泡 2 型上皮細胞の正常な形態および機能の維持は、肺泡領域の恒常性維持に必須であるが、IPF では、繰り返される肺泡上皮細胞損傷の修復障害、epithelial-mesenchymal transition (EMT)、サーファクタント蛋白 C (SP-C) の mutation などの肺泡 2 型上皮細胞の機能異常が認められる。そこで、肺泡 2 型上皮細胞と線維芽細胞の共培養 IPF 急性増悪モデルで、肺泡 2 型上皮細胞の機能異常がステロイドで修復されるか否かを明らかにする。

- (2) ステロイド投与で抑制されない異常シグナル伝達経路は何か？また、その経路の正常化によって、肺泡 2 型上皮細胞の機能障害は修復されるのか？

Cell lysate から RNA を抽出し、Agilent Rat Genome 230 2.0 Array で遺伝子発現解析を行い、肺泡 2 型上皮および線維芽細胞からそれぞれ異常シグナル伝達経路を抽出する。その抽出された伝達経路の遺伝子発現を、RT-PCR を用いて確認後、この共培養モデルに、これらの異常シグナル伝達経路の抑制剤、誘導剤、リコンビナント蛋白などを投与することで、肺泡 2 型上皮細胞の機能が修復されるかどうかを判断し、IPF 急性増悪の新しい治療ターゲットになりうるかを検討する。

2020 年度は、それまでの研究成果の学会発表を行う。また、本プロジェクトで得た研究結果を発展させるための研究費の申請準備をする。

### 4. 研究成果

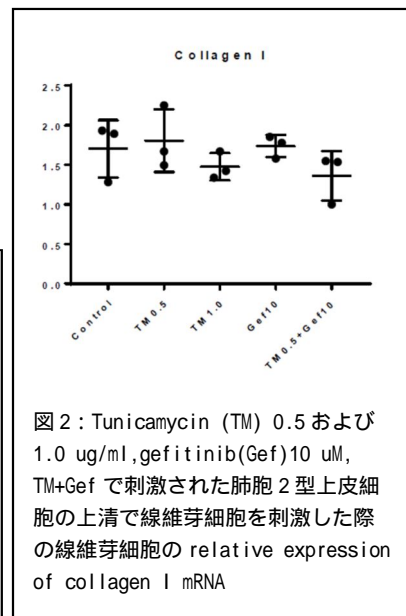
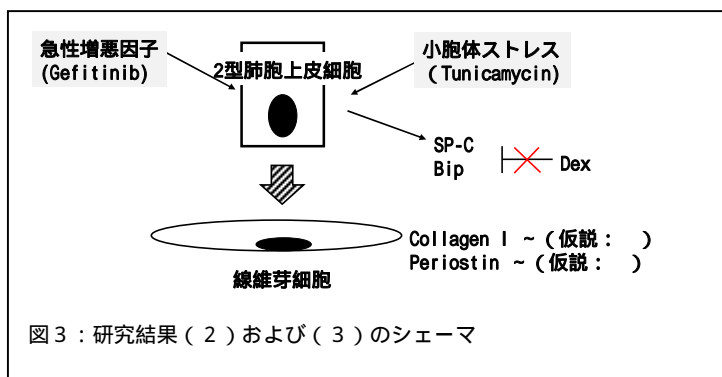
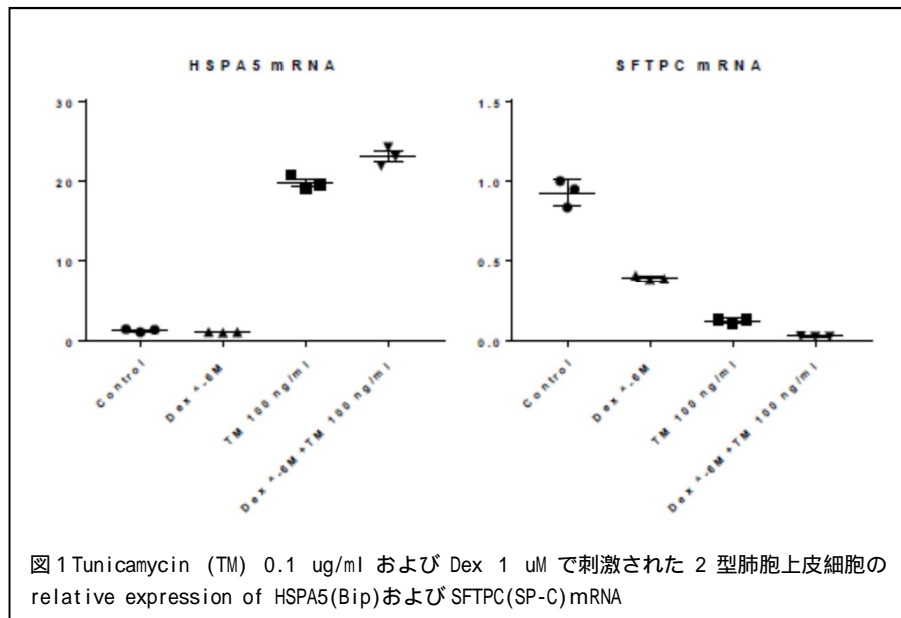
- (1) 米国でラットから 2 型肺泡上皮細胞、線維芽細胞、肺泡マクロファージ (気管支肺泡洗浄細胞) の分離・培養を行っていたが、今回、現在の研究室ではゼロからのスタートであり、分離に必要な実験器具・消耗品・試薬の購入、手技の確立 (肺をラット本体から分離 FC40 を肺に注入 エラスターゼで肺を digestion 肺を mincing Optiprep の density gradient を用いて 2 型肺泡上皮細胞を遠心分離) をするのに予想以上に時間を要してしまった。しかし、現在では

順調に分離できるようになり、ラット 2 型肺胞上皮細胞の分離・培養システムを確立した。また、加齢ラットからも 2 型肺胞上皮細胞と線維芽細胞を分離した。しかしながら、加齢ラットの 2 型肺胞上皮細胞を用いて、本研究を遂行する予定であったが、ラットの飼育に予想以上の時間と経費を要し、また採取できた加齢ラットの細胞の培養プレートやゲルへの接着が悪く、本研究では加齢ラットの細胞を使用することは断念することとした。ただし、加齢ラット細胞での研究は、慢性呼吸器疾患において重要であり、今後再挑戦したいと考えている。

(2) IPFでは、肺胞領域で隣接する肺胞上皮と線維芽細胞が互いに異常シグナルを出し合い、互いの細胞や自らの細胞の形状や機能障害を起こし、病態を形成している。しかしながら、IPFの2型肺胞上皮細胞では小胞体ストレスがかかっており、まずは、ラットから分離培養した単培養の2型肺胞上皮細胞を、小胞体ストレス誘導体 ( tunicamycin:TM) で刺激して、小胞体ストレスマーカーのHSPA5(Bip) および2型上皮細胞マーカーであるSFTPC(SP-C) の変化がDexamethasone (Dex)で修飾されるかどうかを確認した。Dexでは修飾されないという仮説を立てていたが、TMで抑制されたSP-Cの発現および増強されたHSPA5 (Bip) の発現はやはり、Dexによって修飾されなかった(図1)。このことより、小胞体ストレスおよびそれとともなう2型肺胞上皮細胞の機能障害はステロイドでは修復されないことが示唆された

(3) 次に、小胞体ストレスが誘導された2型肺胞上皮細胞や急性増悪の因子となる肺癌治療薬であるEGFR-TKI(gefitinib)で刺激された2型肺胞上皮細胞の線維芽細胞の細胞外マトリックス産生能への影響を検討するために、TMや

gefitinibで刺激された2型肺胞上皮細胞の培養上清で線維芽細胞を刺激した。しかしながら、線維芽細胞の細胞外マトリックスの発現 ( collagen I (図2), periostin) は、刺激の有無で変化を認めなかった。そこで、研究を計画した当初は、小胞体ストレス誘導体 +/- gefitinib (急性増悪因子)肺胞2型上皮細胞と線維芽細胞間の異常シグナル伝達経路への影響を検討することを目的としていたが、IPFの病態のなかで線維芽細胞が細胞外マトリックス産生能を異常に亢進することが重要であるにもかかわらず、この実験系ではそれが達成できなかった(図3)。そこで、実験モデルを変更し、急性増悪におけるステロイドの影響について以下の2通りの実験系ですすめることとした。



IPFの急性増悪が発症する際に、肺胞上皮細胞のバリア機能障害が生じると仮説を立て、肺胞上皮細胞単培養で小胞体ストレス (tunicamycin: TM)、EGFR-TKI (gefitinib: Gef),そしてこれらに加えて肺癌治療の際にIPF急性増悪の因子となる放射線照射 (radiation: Rad)によるバリア機能の変化とステロイドによる影響を検討した。TMおよびEGFR-TKIは高濃度ではバリア機能障害を来すものの同時に明らかな細胞傷害を認めた。一方で、放射線照射は線量依存性にバリア機能障害をひき起こすが、明らかな細胞傷害を認めなかった(図3)。そこで、急性増悪因子として、放射線照射を選択することとした。バリア機能には、肺腔内への余分な水分の漏出を防御する細胞間隙の物理的バリアと、肺腔内の過剰な水分の能動輸送によるバリアがある。ステロイド投与が、ENaCの発現を亢進させて能動輸送によるバリア機能を亢進させる(ステロイドの利点)ことは、従来の報告同様検証できた。一方で、バリア機能に対する放射線照射の影響や物理的バリアに対するステロイドの影響は、明らかではない。そこで、放射線照射のバリア機能障害のメカニズム、ステロイドの物理的バリア機能への影響とメカニズムは引き続き、2021年度からの科学研究費基盤Cで検討していく予定である。また、ここまでの放射線照射によるバリア機能障害とステロイドの影響は、preliminary dataではあるが、第62回日本呼吸器学会学術講演会で発表した。IPFの急性増悪の病態にマクロファージの活性化が関与していることが知られている。また、急性増悪を起こす因子には上記の薬剤、放射線に加え感染症も主要な因子である。そこで、lipopolysaccharide (LPS)で刺激した2型肺胞上皮細胞とマクロファージの共培養モデルに、dexamethasone (Dex)を投与して、Agilent Rat SurePrint G3 Arrayで変動遺伝子発現を解析した(図4)。図4に示すArea3はLPSが肺胞上皮細胞で変動させる遺伝子のうち、Dexを投与しても元に戻らない遺伝子群(2681 genes)であり、Enrichment解析で、これらの発現変動遺伝子が有意に濃縮される29のKEGG Pathwayが検出されており、これらは、ステロイド不応性シグナルと考えられるため、今後詳細に検討していく予定である。

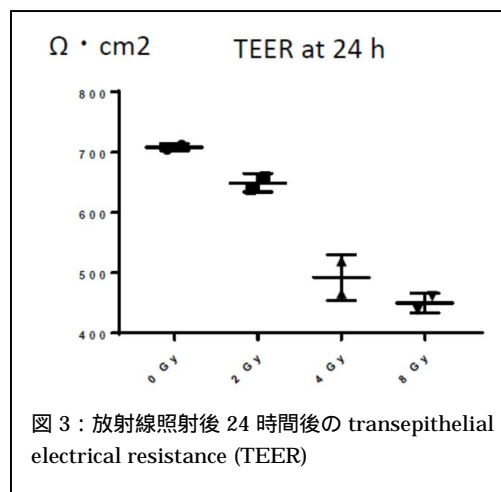


図3：放射線照射後24時間後の transepithelial electrical resistance (TEER)

研究計画当初の研究手法とは異なり、3-(a), (b)の実験系は、小胞体ストレス誘導体やTGFβなどで刺激された肺胞上皮細胞を用いておらず、IPFの急性増悪の疑似モデルではな

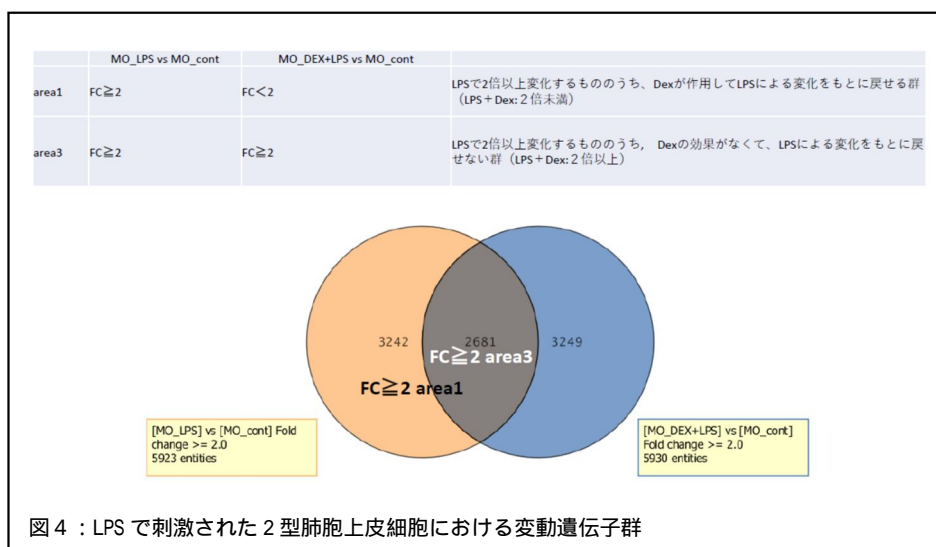


図4：LPSで刺激された2型肺胞上皮細胞における変動遺伝子群

く、急性増悪をおこしうる因子(放射線、LPS)で刺激した肺胞上皮細胞傷害モデルで、それに対するステロイドの作用を検討しているのみではある。しかしながら、本研究費で、ラット肺胞上皮細胞の分離培養システムを確立できたこと、放射線照射肺胞上皮細胞単培養モデル、LPS刺激肺胞上皮細胞-マクロファージの共培養モデルを確立できたことは大きな収穫である。また、本研究の結果からステロイドが、小胞体ストレスやそれによる2型肺胞上皮細胞の機能障害を修復することができないこと、LPS刺激で活性化されたpathwayのうちステロイドで抑制されないpathwayがいくつか見つかったことから、本研究計画当初の目的をいくつか達成することができた。今後は、ステロイドの上皮細胞バリア機能への影響を明らかにすること、さらには本研究の成果で得られたステロイドでは予防・修復できない肺胞上皮細胞の異常シグナル伝達を検討することで、IPFの急性増悪を初めとする急性肺障害のステロイド療法にプラスした新たな治療法を発見する手がかりを得たいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤洋子
2. 発表標題 若手シンポジウム 慢性線維化性間質性肺炎の急性増悪：病態と予防
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 沓澤直賢、伊藤洋子、河野千夏、浅野浩一郎
2. 発表標題 一般演題 ラット肺胞上皮細胞バリア機能への放射線照射および副腎皮質ステロイド薬の影響
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------