

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15955

研究課題名(和文) 特発性肺線維症の発症と進行におけるTET遺伝子制御を介したマイクロRNAの関わり

研究課題名(英文) Involvement of microRNA via TET gene regulation in the pathology of idiopathic pulmonary fibrosis

研究代表者

高木 弘一 (TAKAGI, KOICHI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・特任助教

研究者番号：40707866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は特発性肺線維症におけるmiRNA22とTET遺伝子の関わりについて明らかにすることを目的に研究を開始した。miRNA22KOマウスで肺線維症モデルを作成し野生型マウスと比較したが、肺線維化について有意な差を認めなかった。そのため、TET遺伝子に研究対象を絞り研究を進めた。肺線維症モデルマウス肺においてTET1遺伝子の発現が減弱した。TET1遺伝子の発現を減弱させた培養ヒト肺線維芽細胞株ではSMAの発現が亢進した。肺線維症モデルマウスにDNAメチル化阻害薬を経気道投与することにより肺線維化の抑制を認めた。以上より、肺線維症の病態にTET遺伝子が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究成果より、肺線維症では肺組織内でTET1遺伝子の発現抑制が誘導されることでDNAメチル化が促進し、肺内の線維芽細胞が筋線維芽細胞に分化することで肺の線維化が亢進することが示唆された。プレオマイシン誘導肺線維症モデルマウスにおいて、DNAメチル化阻害薬により肺線維化が抑制されたことより、難治性肺疾患である肺線維症において、肺局所のDNAメチル化を抑制することが新規治療となりうる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the present study was to clarify the association between miRNA22 and TET gene in idiopathic pulmonary fibrosis. A model of lung fibrosis was created in miRNA22KO mice and compared with wild type mice, but no significant difference was observed in lung fibrosis. Therefore, we focused our research on the TET gene and proceeded with the research. The expression of TET1 gene was attenuated in the lung of a model mouse of pulmonary fibrosis. The expression of SMA was enhanced in the cultured human lung fibroblasts in which the expression of TET1 gene was attenuated. Inhibition of lung fibrosis was observed by intratracheal administration of a DNA methylation inhibitor to pulmonary fibrosis model mice. The present study suggested that the TET gene is involved in the pathological condition of pulmonary fibrosis.

研究分野：呼吸器科

キーワード：肺線維症 TET遺伝子 DNAメチル化

## 1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症は難治性疾患であり、診断時からの平均余命は約5年とされている。その病因は、遺伝子の網羅的解析で型肺胞上皮細胞の異常が病態の中心として明らかになりつつある。一方で肺胞上皮細胞の損傷・修復に関与する肺胞マクロファージやリンパ球由来のサイトカインの関与や上皮間葉移行などの概念も指摘され、肺線維化を進行、修飾する要因と考えられるようになっている。

Ten-eleven translocation (TET) 遺伝子は急性骨髄性白血病などで特定された遺伝子であり、DNAメチル化に関与している。呼吸器疾患においては、COPD患者の肺組織中におけるTETの発現と一秒量との相関があること(Lancet Respir Med 2015; 3:769)や肺腺癌患者の約12%にTET遺伝子のmutationが認められる(Oncotarget 2016; 7:61755)などの報告がなされている。また、加齢に伴い骨髄由来のマクロファージでTET遺伝子の発現が減弱することにより、NLRP3インフラマソームを増加させ、動脈硬化を誘導することが示されている(Science 2017; 355:842)。

microRNA(miRNA)は21~25塩基程度の一本鎖RNAであり、細胞内に存在してタンパク質をコードする遺伝子のうち30%以上のものに対して発現調節を行っていると考えられている。miRNA-22はTET遺伝子を標的とし、乳癌細胞における上皮間葉移行に関わるとした報告(Cell 2013; 154:311)がある。miRNA-22がTET遺伝子の発現を抑制することで、インフラマソームの増加や肺胞上皮細胞におけるEMTを誘導し、特発性肺線維症発症及び進行が促進する可能性がある。

## 2. 研究の目的

特発性肺線維症に対するTET遺伝子の関わりについて明らかにすることで、特発性肺線維症の発症機序及び新規治療の可能性について模索する。

## 3. 研究方法

microRNA-22 deficient (microRNA22<sup>-/-</sup>) マウス及び野生型マウスに、麻酔薬(イソフルラン: 導入4%、維持2%)を麻酔器にて吸入させた後に気管切開下にプレオマイシン 2mg/kgを気管内に単回投与を行い、14日後に検体採取を行った。老齢モデルとして24~40週齢マウスにも同様の処置を行った。DNAメチル化阻害薬をプレオマイシン投与日から5日間鼻腔内投与を行った。採取した肺からRNAを抽出し、PCR法にて遺伝子の発現を調べた。

normal human lung fibroblast (NHLF: Lonza社)をFGF2(Lonza社)で培養し、Lipofectamine iMAXを用いてsmall interfering RNA(siRNA-negative control, siRNA-TET1)を遺伝子導入した。遺伝子導入24時間後にTGFβ 5ng/ml/wellを加え、6時間後及び24時間後に検体を採取し、RNA及び蛋白を抽出した。抽出した検体を用いて遺伝子の発現をPCR法にて、蛋白発現をWestern blot法にて調べた。

肺線維症患者から外科的肺生検で採取した肺組織を用いて、RNAを抽出しTET1遺伝子の発現をPCR法にて調べた。

## 4. 研究の成果

microRNA-22 deficient (microRNA22<sup>-/-</sup>) マウスにプレオマイシン誘導肺線維症モデルを作成し、野生型マウスと肺線維症の程度について、Col1a1遺伝子の発現をPCR検査で比較

した。若年マウスでは microRNA-22<sup>-/-</sup>では Col1a1 の発現が野生型マウスと比較し亢進していた(図1)。microRNA-22 の発現は加齢にて亢進するため、老齡マウスで同様の実験をおこなった。結果は予想に反して、microRNA-22<sup>-/-</sup>で Col1a1 及び Col1a2 の発現が減弱した(図2)。

今回、若年マウスと老齡マウスで相反する結果が得られた要因として、microRNA-22 は他の

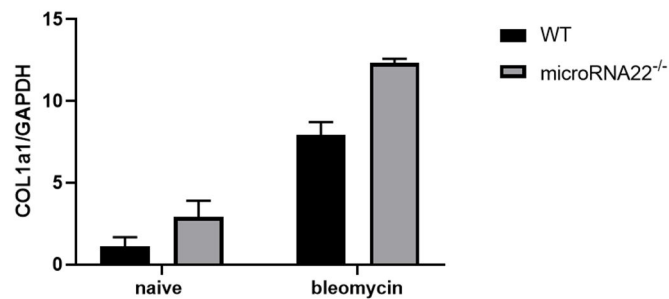


図1. microRNA22<sup>-/-</sup>マウス (8~12週齡) でのブレオマイシン誘導肺線維症モデル

microRNAと同様に、その配列から多数の遺伝子を標的とすることが関与していると考えられた。つまり、肺線維症の病態に関わり miR-22 の標的となりうる遺伝子が、TET 遺伝子による肺線維化の制御に影響を与えることが示唆された。そのため、今回の研究において miR-22 の関与については除外し、研究対象を TET 遺伝子に局限して研究をすすめた。

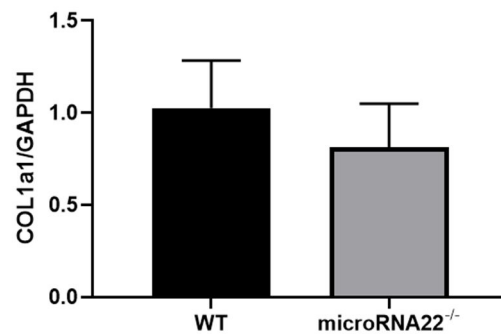


図2. microRNA22<sup>-/-</sup>マウス (老齡: 24~40週齡) でのブレオマイシン誘導肺線維症モデル

肺線維症症例では、線維化の進行した

肺組織において、TET1 遺伝子の発現が低下していた(図3)。ブレオマイシン誘導肺線維症モデルの肺組織では、naive マウスと比較し TET1 遺伝子の発現が減弱していた(図4)。ヒト培養肺線維芽細胞において、TET1 遺伝子の発現を減弱させると、TGF 刺激による SMA の発現が control 株と比較し亢進を認めた(図5)。ブレオマイシン誘導肺線維症モデルにたいして DNA メチル化阻害薬を投与することで、肺線維化は抑制された(図6)。

今回の研究結果より、ブレオマイシン誘導肺線維症モデルでは、肺組織内で TET1 遺伝子の発現抑制が誘導されることで DNA メチル化が促進し、線維芽細胞が筋線維芽細胞に分化することで線維化が亢進することが示唆された。この肺線維化は、DNA メチル化阻害薬で抑制されたことより、難治性肺疾患である肺線維症において、肺局所の DNA メチル化を抑制することが新規治療となりうる可能性がある。

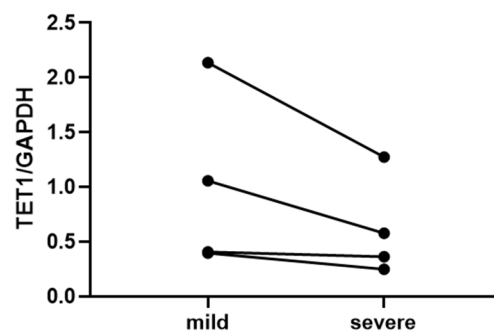


図3. 肺線維症患者肺における TET1 遺伝子発現 mild: 線維化が弱い部位 severe: 線維化が強い部位

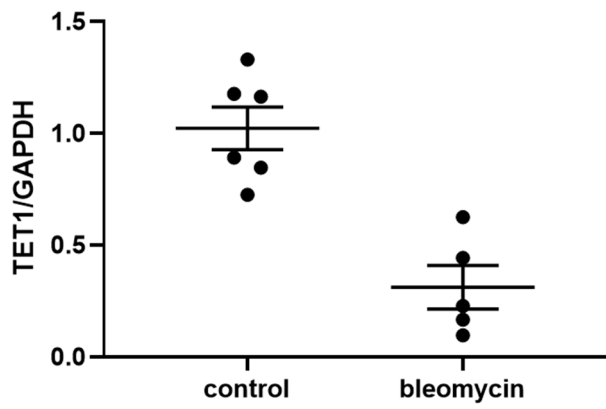


図4. プレオマイシン誘導肺線維症におけるTET1遺伝子の変化

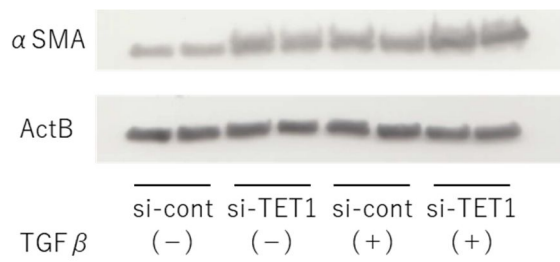


図5. ヒト肺線維芽細胞における $\alpha$ SMAの発現  
 si-cont: si-negative control  
 TGF $\beta$  5ng/ml 48h

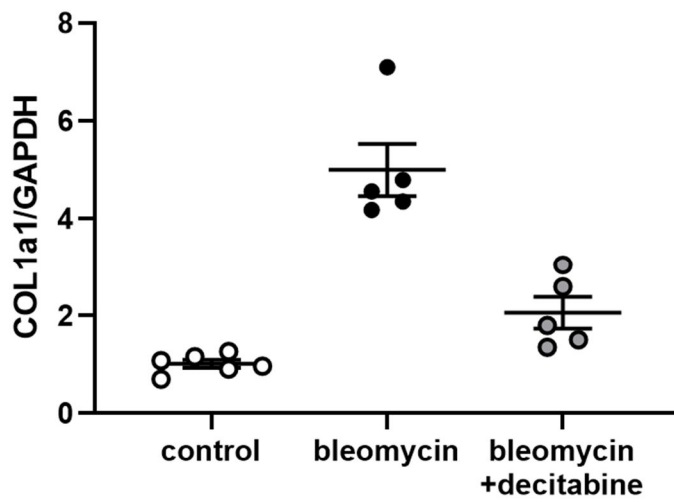


図6. プレオマイシン誘導肺線維症におけるDNAメチル化阻害薬の治療効果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takagi Koichi, Machida Kentaro, Inoue Hiromasa, et al
2. 発表標題 Involvement of TET in the pathology of diffuse diseases
3. 学会等名 ATS 2020 international conference (国際学会)
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----