

研究種目：基盤研究 (B)  
 研究期間：2007-2008  
 課題番号：19390225  
 研究課題名（和文）肺損傷と再生における末梢気道の役割とナノテクノロジーをもちいた治療法の開発  
 研究課題名（英文）The role of small airways in lung injury and regeneration, and the treatment strategy using nanotechnology

研究代表者  
 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

## 研究成果の概要：

マウス肺線維症モデルにおける細気管支の細胞死、再生と線維化に関与する因子について検討した。マウスにおける細気管支障害モデルにおいて、細気管支上皮細胞の RNA を選択的に抽出し、上皮細胞特異的な mRNA 発現を検討した。特に、細気管支上皮細胞の細胞死、老化、再生に関与する因子について解析した。ナノスフェアに Bax siRNA を封入し、気道上皮細胞の細胞死に及ぼす効果を検討した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,600,000	2,280,000	9,880,000
2008 年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
年度			
年度			
年度			
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：肺損傷、肺線維症、細気管支、再生、アポトーシス、ナノテクノロジー

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) アポトーシスと肺損傷・線維化

肺線維症は、これだけ医療が高度に進歩した現代においても難治性でかつ予後不良な肺疾患であり、有効な治療法の開発が急がれている。これまでに我々は肺損傷・線維化におけるアポトーシスの重要性を明らかにしてきた。

## (2) 肺修復過程における負のスパイラル

肺線維化の病態に肺損傷後の組織の再生過程の異常が深く関わっていることが明らかとなっている。線維化の過程は、肺上皮細胞損傷に始まり、不適切な修復であるリモデリングの結果生じる。線維芽細胞巣が形成されると隣接部位の再上皮化の過程が阻害され、負のスパイラルに陥る。

### (3) 肺損傷・線維化における再生

喪失した細胞を補うことは修復過程にとって必須である。前駆細胞 (basal cell, neuroendocrine cell, Clara cell, alveolar type II cell) や、骨髄幹細胞がその役割を果たすと考えられている。再生が障害されれば正常な機能は失われ、さらに負のスパイラルが増強する。

### (4) 細気管支病変と肺損傷

COPDの9割は喫煙が原因であり、細気管支病変が重要である。肺線維症においても、喫煙は増悪因子であり、細気管支上皮はDNA傷害が顕著である。ブレオマイシン肺臓炎モデルは、細気管支上皮傷害が起点となる。抗Fas抗体吸入モデルでは、最初にClara cellのアポトーシスに始まり、それが肺損傷・線維化へと進行する。細気管支が、肺損傷と線維化において重要な役割を果たすことを示している。

## 2. 研究の目的

(1) マウスにおけるブレオマイシン肺臓炎モデル、ナフタレンモデルを用いて、laser micro dissectionによって細気管支上皮細胞のRNAを選択的に抽出し、microarrayを行い、同時に免疫染色によって蛋白発現を検討する。細気管支上皮細胞の損傷・修復・再生過程における重要な因子の発現を解析する。

(2) ブレオマイシン肺損傷モデル、ナフタレン肺損傷モデルを用いて、重要と思われる因子を特異的なsiRNAの経気道投与により発現を抑制することで、肺領域、あるいは細気管支の役割を修飾することによって、肺組織の損傷・線維化に及ぼす影響を検証する。その投与に関しては、細胞内移行、細胞内での長時間にわたる蛋白や核酸放出能が期待されるナノスフェアを用いる。このナノスフェアは、粒子の大きさを変えることによって細気管支と肺領域へ選択的に投与することが可能である。

## 3. 研究の方法

(1) マウス・肺損傷モデルにおける肺損傷と線維化関連因子の検討

ブレオマイシン肺臓炎モデルにおいて、細気管支上皮細胞におけるRNA発現、蛋白発現を検討する。その中でTGF- $\beta$ , collagenase, erythropoietin, の意義、及び最近話題となったepithelial mesenchymal transitionの重要性について検討する。

(2) マウス・肺損傷モデルにおいてlaser micro dissectionによって選択的に採取した細気管支上皮細胞における再生に関わる因子のmicroarrayによるRNA発現解析

ナフタレンモデルにおいて、laser micro dissectionによって選択的に得られた細気管支上皮細胞における再生に関わるRNA発現、蛋白発現をmicroarrayによって検討する。

(3) ナノスフェア封入siRNAによる遺伝子導入のための基礎的検討

難治性肺疾患に対する治療戦略においては、①分子標的治療、②核酸・遺伝子治療が有用と期待されるが、その臨床応用には細胞、臓器への損傷性が少なく、細胞・臓器特異的であり、全身への影響が最小限に抑制され、核酸・遺伝子という薬物を狙い通りに機能させるためのDDSが極めて有効である。そこで、ナノスフェア封入核酸による肺疾患の治療における基礎的検討を行う。

## 4. 研究成果

(1) 肺損傷、線維化関連因子に関する研究

①ブレオマイシン肺臓炎モデルにおけるTGF- $\beta$ の役割

ウイルスではない plasmid を用いて TGFRII gene の in vivo gene transfer によって肺線維症モデルを抑制した。In vivo gene transfer は、マウスの大腿筋に plasmid を遺伝子導入し、大腿筋内で可溶性 TGFRII 蛋白を発現させる。血流によって可溶性 TGFRII は肺へと運ばれ作用する。可溶性 TGFRII の有意な発現は1回の遺伝子導入によって2週間継続した。遺伝子導入によって肺上皮細胞のアポトーシスおよび肺線維化は抑制された。TGF- $\beta$ は肺線維化の中心的役割を果たし、ウイルスを用いないことによってヒトへの応用が可能であり、一回の遺伝子

導入で2週間作用することから、今後の臨床への応用が期待される。

### ②肺損傷と線維化における erythropoietin の意義

ブレオマイシン肺臓炎モデルに対して様々な細胞に対する保護作用を有することが注目されている erythropoietin を投与した。マウスの肺における erythromycin の受容体は、気管支上皮、肺上皮、血管内皮細胞に発現し、ブレオマイシンを経気管支内注入すると増強した。erythromycin をブレオマイシン投与後5日—14日後にかけて腹腔内投与した。その結果、肺上皮細胞のアポトーシスと、肺損傷および線維化が抑制された。肺組織のホモジェネートを用いた western blot, 組織免疫染色の結果、Akt, ERK を介する生存シグナル活性化による肺上皮細胞のアポトーシス抑制がその機序と考えられた。

### ③epithelial mesenchymal transition(EMT) と肺線維化

本来、EMT は、胎生期における分化、癌細胞の浸潤と転移において知られた現象であったが、組織損傷における治癒過程における意義が注目されてきた。EMT の基本的な現象は上皮細胞の特性である細胞間の接着、細胞の極性を喪失し、間葉系細胞の特性である遊走能を獲得することである。即ち、肺線維化における EMT は、上皮細胞が線維芽細胞に変化する EMT の過程を経て、線維化へ寄与する可能性を示している。EMT を細胞レベル、組織レベルにおいて検出するためには、上皮細胞に特異的な分子の発現が減少し、間葉系細胞に特異的な分子の発現が増加することを、上皮細胞において証明することによって通常なされている。

動物実験モデルにおいて、各臓器の線維化における EMT の関与が示唆されている。胆管結紮による肝線維化、慢性の腎障害における腎尿管上皮細胞の EMT の存在も報告されている。培養細胞においてはこの現象は TGF- $\beta$ によって強力に誘導される。肺上皮細胞においても、TGF- $\beta$ によって間葉系細胞特異的な蛋白発現の亢進が認められ、細胞の形態も線維芽細胞に変化する。肺線維化におい

ても EMT が関与することは十分に可能性があることと思われる。

上皮細胞に特異的に $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) を発現させたマウスに、TGF- $\beta$  を強発現させることによって肺線維化モデルを作成すると、間葉系細胞に特異的な蛋白発現と、線維芽細胞様の形態を呈する $\beta$ -gal 陽性細胞が認められる。従って、EMT が線維化に寄与しているとする報告がある。

特発性肺線維症における報告は、免疫二重染色によって、上皮細胞のマーカーであるサーファクタント蛋白と筋線維芽細胞のマーカーである $\alpha$ -SMA が共に陽性である上皮細胞が、実に 88%を占めると報告している。これに対して、我々の同様の検討では、二重に染まる細胞は見いだせなかった。laser captured microdissection によって特発性肺線維症の fibroblastic foci の被覆上皮を採取し、RNA と蛋白を抽出し検討した結果は、これらの上皮は $\alpha$ -SMA を発現しておらず、EMT に関しては否定的な結果であった。

EMT が培養上皮細胞において誘導されることは疑いないようであるが、in vivo での肺線維化への寄与は、未だ明らかでない。線維芽細胞の起源について、骨髄細胞の寄与、局所の前駆細胞・幹細胞の寄与について解明されるべき問題が残っている。

### (2) 細気管支上皮細胞特異的な損傷と再生関連因子

#### ①細気管支上皮細胞の再生に関わる因子の RNA 発現解析

ナフタレンモデルにおいて、laser micro dissection によって選択的に得られた細気管支上皮細胞における再生に関わる RNA 発現、蛋白発現を microarray によって解析した。正常コントロールと比較して ratio10 以上の増加をしめしたものは、amphiregulin (ratio28)、TIMP1 (ratio28)、creatine kinase, brain (ratio10)、胃粘膜上皮から産生される成長ホルモン ghrelin (ratio10-30)、resistin like beta (RELM-beta) (ratio10)、lectin, galactose binding, soluble 3 (galectin3) (ratio 10)などであった。ghrelin は sepsis 急性肺損傷が抑制されるとの報告があり、RELM は、アレルギー性炎症での気道リモデリン

グとの関連が報告されている。Galectin は細胞間接着や基底膜との結合にかかわる蛋白であり、上皮細胞増殖やマクロファージ、好中球の活性化に関与している。その他、2倍以上の上昇を示した mRNA は約 1500 にのぼるが、上皮細胞の再生、修復に関与する因子がその多くを占めた。細気管支上皮が損傷の修復に深く関与し、重要な役割を担っていることが予想された。

今回発現が有意に増加した因子は、その多くの分子が様々な動物モデルや人の検体を用いた実験によって損傷と修復に関与していることが報告されている。今後その中でいまだ役割の明らかでない因子を選択し、病態における役割をナノスフェアを用いた研究によって明らかにする予定である。

### (3) ナノスフェア封入 siRNA による遺伝子導入のための基礎的検討

#### ① ナノスフェア封入核酸による肺疾患の治療を目的とする基礎的検討

エマルジョン溶媒拡散法によって調整された PLGA ナノスフェアは機能性化粧品や育毛剤として実用化されており、生体において使用実績がある点から、他の遺伝子キャリアよりも実用化しやすい生体内分解性高分子材料といえる。

In vitro において、肺上皮細胞細胞株である A549 細胞を用いた。PLGA をキトサンによって修飾することによって細胞内への取り込みと封入された siRNA は徐放化され、効果がより長時間維持される。遺伝子を封入する場合に細胞内部に封入する必要性が明らかとなった。

siRNA を PLGA ナノスフェアに封入して用いることによって、標的とする蛋白発現は DOTAP 複合体と比較し、効果のピークが遅れて現れる。この点もこれまでのウイルスベクターと異なる特色である。ナノスフェアを修飾することや、異なるベクターを用いることによって、初期に抑制したり持続的に抑制するなど様々なパターンでの発現制御が可能になると考えられた。

In vitro におけるナノスフェア封入 siRNA の動態に関する基礎的検討を行ってきたが、期間内に in vivo における検討までは至らな

かった。今後は、肺損傷、肺線維化モデルマウスを用いて in vivo における動態と効果を検討する予定である。

#### 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 9 件)

1. Ouchi H, Fujita M, Kuwano K, et al. The role of collagenases in experimental pulmonary fibrosis. *Pulm Pharmacol Ther* 21:401-8, 2008.
2. Yamada M, Kuwano K, Hamada N, et al. Dual-immunohistochemistry provides little evidence for epithelial-mesenchymal transition in pulmonary fibrosis. *Histochem Cell Biol* 129:453-62, 2008.
3. Yoshimi M, Hamada N, Kuwano K et al. Recombinant human erythropoietin reduces epithelial cell apoptosis and attenuates bleomycin-induced pneumonitis in mice. *Respirology*. 13:639-45, 2008.
4. Kuwano K. Involvement of epithelial cell apoptosis in interstitial lung diseases. *Intern Med* 47:345-53, 2008.
5. Kuwano K, Araya J, Nakayama K. Epithelial cell fate following lung injury *Expert Rev Respir Med* 2:573-582, 2008
6. Yamamoto H, Kawashima Y et al. Establishing chitosan coated PLGA nanosphere platform loaded with wide variety of nucleic acid by complexation with cationic compound for gene delivery. *Int J Pharm* 354:210-216, 2008
7. Yamada M, Kuwano K, Maeyama T, et al. Gene transfer of soluble transforming growth factor type II receptor by in vivo electroporation attenuates lung injury and fibrosis. *J Clin Pathol* 60(8):916-20, 2007.
8. Kuwano K. Epithelial cell apoptosis and lung remodeling. *Cell Mol Immunol* 4:419-29, 2007.

9. Yamamoto H, Kawashima Y et al.

PLGA ナノスフェアを用いた遺伝子デリバリーシステムの開発  
YAKUGAKU ZASSHI 127:1541-1548, 2007

〔学会発表〕（計 2 件）

1. Kuwano K.

Lung injury, repair, and remodeling-Mechanisms of apoptosis in lung diseases-  
6<sup>th</sup> ERS Lung Science Conference 2008, March 14-16, Estoril, Portugal (Invited Lecture)

2. Kuwano K.:

Mechanisms of pulmonary fibrosis. Alveolar cell injury and apoptosis.  
European Respiratory Society Annual Congress 2007, September 14-19, Stockholm (symposium)

〔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

なし。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

濱田 直樹 (HAMADA NAOKI)  
東京慈恵会医科大学・医学部・助教  
研究者番号：00423567

前山 隆茂 (MAEYAMA TAKASHIGE)  
九州大学・大学病院・助教  
研究者番号：40380456

川島 嘉明 (KAWASHIMA YOSHIAKI)  
愛知学院大学・薬学部・教授  
研究者番号：30082978

山本 浩充 (YAMAMOTO HIROMITU)  
愛知学院大学・薬学部・教授  
研究者番号：30275094

(3) 連携研究者

なし。