

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2022

課題番号：19K23980

研究課題名(和文)血管内皮ミトコンドリアSirt3を標的としたARDS後肺線維症治療法の探索

研究課題名(英文) Targeting vascular endothelial mitochondrial Sirt3 for the treatment of post-ARDS pulmonary fibrosis

研究代表者

鈴木 敏夫 (Suzuki, Toshio)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：70771856

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：Sirt3と、その脱アセチル化ターゲットである抗酸化遺伝子のIDH2とSOD2の発現について、健常肺よりも線維化肺において低下していた。ヒト肺血管内皮細胞を用いた検討では、Sirt3-siRNAによってミトコンドリアDNA損傷が増加し、EndMT発生率も上昇することが明らかになった。LPS反復投与により作成したARDS後肺線維症モデルマウスを用いて解析したところ、Sirt3に関するEndMTは微小毛細血管レベルで確認された。ヒト肺サンプルを用いて樹立したPulmosphere ARDS後肺線維症モデルに対するSirt3活性化効果を持つジヒドロミリセチンの薬効は確認できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を開始して間もなく、新型コロナウイルスの世界的流行が始まり、post ARDS pulmonary fibrosisが「コロナ後遺症」として認知されるに至った。上皮細胞への傷害を起点に線維化が誘発されるのではなく、血管内皮を起点に誘発される病態形成は新型コロナウイルス感染症においてもあてはまり、その病態の一端を探索する形となった。

研究成果の概要(英文)：Expression of Sirt3 and its deacetylation targets, the antioxidant genes IDH2 and SOD2, was lower in fibrotic lungs than in healthy lungs. Investigation of human pulmonary vascular endothelial cells revealed that Sirt3-siRNA increased mitochondrial DNA damage and EndMT, and analysis using a mouse model of post-ARDS pulmonary fibrosis generated by repeated LPS administration showed that Sirt3-related EndMT was identified at the capillary level. The drug effect of Sirt3 activator, dihydromyricetin on post-ARDS pulmonary fibrosis pulmosphere model could not be confirmed.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：Sirt3 異常リモデリング 肺血管内皮 内皮間葉転換 ARDS 肺線維症

1. 研究開始当初の背景

Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS)は死亡率が高く、特に線維増殖期に移行した場合は予後不良である。これまで好中球をターゲットにした治療はなされてきたが、それ以外の作用機転を持つ新規治療法の確立が望まれている。敗血症に起因したARDSの場合、血管内皮細胞が傷害の起点となり、その形質転換は新規治療ターゲットの一つとして考慮される。これまで我々はNADPH oxidase由来の活性酸素種が誘導する内皮間葉転換(Endothelial-to-mesenchymal transition; EndMT)がARDS後の肺の線維化に関与している事を報告してきた。一方で、血管内皮細胞膜の脂質中に局在する高度不飽和脂肪酸が、活性酸素種により過酸化脂質となり、それがアセチルCoAの調整を介してEndMTを制御する事も最近報告されている。

2. 研究の目的

今回我々は、脂肪酸の β 酸化を触媒する長鎖アシル CoA 脱水素酵素の制御遺伝子 Sirt3 が、EndMT の調節に関与していると仮説を立て、それをターゲットにした新規線維症治療法確立を目的として研究を立案した。

3. 研究の方法

肺線維症患者肺と健常ドナー肺のミトコンドリアにおけるSirt3発現量の比較

肺線維症サンプルと健常肺サンプルよりミトコンドリアを単離し、Sirt3発現量の比較を遺伝子・蛋白レベルで行った。

ARDS後肺線維症患者肺と健常ドナー肺における抗酸化遺伝子のアセチル化の検討

Sirt3の脱アセチル化ターゲットである抗酸化遺伝子のIDH2とSOD2の発現について、肺線維症患者肺と健常ドナー肺検体でウエスタンブロッティング(WB)法を用いて検討した。

ROSが肺血管内皮細胞のSirt3発現及び脱アセチル化能に与える影響についての検討

まず、酸化ストレスがSirt3発現量に関与しているかについて検討を行った。具体的には、健常ヒト肺血管内皮細胞に対して、 H_2O_2 (20-100 μ M)で24時間刺激し、qPCR、WBにてSirt3発現量を確認した。また同時に、抗酸化遺伝子アセチル化の程度をWBで確認した。

Sirt3ノックダウンが肺血管内皮細胞のミトコンドリアDNA損傷/間葉転換に与える影響についての検討

まず、Sirt3遺伝子発現が肺血管内皮細胞のミトコンドリアDNAの傷害の程度に関与しているかについて検討を行った。具体的には、siRNAでSirt3をノックダウンした肺血管内皮細胞を H_2O_2 で刺激した後、細胞を回収し、ミトコンドリアDNA 8.8kb(ヒト)長を定量PCRで14~18サイクル行い、その後、リアルタイムPCRを使って増幅・定量を行った。

次に、Sirt3遺伝子発現が肺血管内皮細胞のEndMTに与える影響について検討を行った。我々の既報の通り、 H_2O_2 でヒト肺血管内皮細胞にEndMTを誘導できる事は証明できている為 (Suzuki T, et al. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2016)、同様の刺激をsiRNAによってSirt3をノックダウンした細胞にも与え、コントロール細胞と比較した。

ARDS後肺線維症モデルを適用した血管内皮特異的Sirt3ノックアウトマウス及びSirt3過剰発現マウスの解析

Sirt3の*in vivo*における発現強弱がARDS後肺線維症モデルマウスにおいてどのように病態に反映されるかを解析する。具体的には、血管内皮特異的Sirt3ノックアウトマウスとSirt3過剰発現マウスにLPS5日連続腹腔内投与(5mg/kg BW)によるARDS後肺線維症モデルを適用した。摘出肺を酵素処理によって細胞分散をした後に、フローサイトメトリーによって血管内皮マーカーと間葉系マーカー染色し、それらが共に陽性になった細胞をEndMT細胞と定義して定量化を行った。同時に肺パラフィン切片を用いて同様の免疫組織染色を行い、Sirt3発現の強弱に伴い、どの部位のEndMTが特に影響を受けるか検討した。

ARDS後肺線維症ヒト肺検体から作成した3D-pulmosphereを用いた検討

Sirt3活性化効果を持つと報告されているジヒドロミリセチンを、肺線維症ヒト肺検体から作成した3D-pulmosphereに添加してリモデリング確立後の病態が改善するかについての検討を行った。

4. 研究成果

肺線維症患者肺と健常ドナー肺のミトコンドリアにおけるSirt3発現量の比較

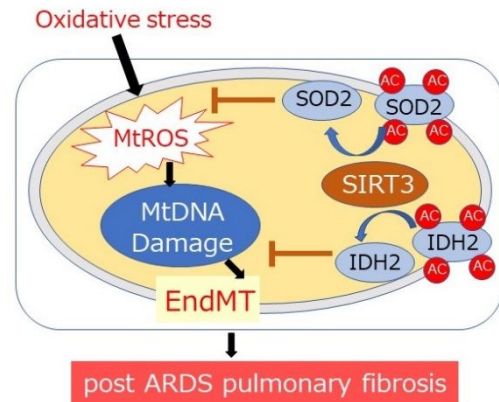
肺線維症サンプルにおけるSirt3発現が有意に低下していることが判明した。

ARDS後肺線維症患者肺と健常ドナー肺における抗酸化遺伝子のアセチル化の検討

IDH2とSOD2の発現についても肺線維症サンプルで有意に低下していることが判明した。

ROSが肺血管内皮細胞のSirt3発現及び脱アセチル化能に与える影響についての検討

H2O2誘導性の酸化ストレスがヒト肺血管内皮細胞のSirt3発現低下に関与することを明らかにした。



Sirt3ノックダウンが肺血管内皮細胞のミトコンドリアDNA損傷/間葉転換に与える影響についての検討

Sirt3をノックダウンしたヒト肺血管内皮細胞においては、酸化ストレス誘導性のEndMTが抑制されることが明らかになった。

ARDS後肺線維症モデルを適用した血管内皮特異的Sirt3ノックアウトマウス及びSirt3過剰発現マウスの解析

Sirt3 overexpression マウスおよびノックアウトマウス共に、WT マウスで線維化を誘導できるレベルのLPS 反復投与で死亡してしまい、検証が行えなかった。一方、肺の線維化を呈する前段階の肺を摘出して免疫染色で確認したところ EndMT が capillary level で確認でき、その発生率は Sirt3 ノックアウトマウスで有意に低いことが明らかになった。

ヒト肺検体から作成した 3D-pulmosphere を用いた検討

ARDS 後肺線維症を模倣してヒト肺サンプルを用いて作成した 3D-pulmosphere を用いた検証では、ジヒドロミリセチンの薬効は確認できず、EndMT の発現率低下も確認できなかった。

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 1件 / うち国際学会 0件）

| |
|-----------------------------------------------|
| 1. 発表者名 鈴木 敏夫 |
| 2. 発表標題 難治性呼吸器疾患における内皮間葉転換 |
| 3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術集会 先端医学研究シンポジウム（招待講演） |
| 4. 発表年 2019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 |
|---------|---------|
|---------|---------|