

令和 4 年 5 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17743

研究課題名（和文）間質性肺炎の線維芽細胞におけるArl4cの機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of Arl4c in fibroblasts of interstitial pneumonia

研究代表者

木村 賢二（KIIMURA, KENJI）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：50795325

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、肺癌の発癌過程に関与している可能性があることが報告があるArl4cが、間質性肺炎において、病的に活性化した線維芽細胞で発現し、肺の線維化や間質性肺炎合併肺癌の発癌過程に与える影響を明らかにすることを目的とした。間質性肺炎合併肺癌切除症例のから単離した活性化線維芽細胞はArl4cを高発現していた。さらにFAP, ACTA2などの線維化活性と関わる遺伝子発現の上昇も認めていた。Arl4cの発現を抑制した線維芽細胞では増殖能が低下し、線維芽細胞の機能的な表現型である遊走能および収縮能の低下を認めた。Arl4cは間質性肺炎の活性化線維芽細胞の機能的において重要な役割を行う可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間質性肺炎の経過中に発症する肺癌は比較的多く、予後も悪いため、早期発見・治療が重要である。治療においては外科治療以外の有効な治療薬開発は重要な課題である。Arl4cは肺癌の前癌病変から発現し癌へと進行する過程に関わる分子として報告がある。今回、間質性肺炎の病態の一つである異常活性化線維芽細胞にArl4cが発現しそれらの機能に関わることがわかった。難治性である間質性肺炎や間質性肺炎合併肺癌に対するArl4cを標的とした新たな治療法確立を目指すという点で非常に重要な発見と思われる。またArl4cは前癌病変から発現する分子であり間質性肺炎合併肺癌の早期発見への貢献も期待できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, our goal is that we elucidate the effect of Arl4c, which has been reported to be possibly involved in the carcinogenic process of lung cancer, on the fibrosis of the lung and the carcinogenic process of lung cancer complicated by interstitial pneumonia. Activated fibroblasts isolated from resected lung cancer patients with interstitial pneumonia expressed high levels of Arl4c. Arl4c-suppressed fibroblasts showed decreased proliferative capacity and reduced migration and contractility, which are functional phenotypes of fibroblasts, suggesting that Arl4c may play an important role in the function of activated fibroblasts in interstitial pneumonia. Arl4c may play an important role in the function of activated fibroblasts in interstitial pneumonia.

研究分野：肺癌

キーワード：間質性肺炎 肺癌 Arl4c

1. 研究開始当初の背景

間質性肺炎、肺線維症は肺の間質に炎症が起こり、徐々に線維化が進行する疾患である。有効な治療法がない難治性疾患で、その診断からの平均生存期間は約 2.5～5 年とされ予後不良である。間質性肺炎の経過中の合併症として、肺高血圧症、急性増悪、気腫性病変、肺感染症などがあるがこれらに加えて、肺癌を高頻度で合併することが知られている。間質性肺炎はそれ自身が肺癌発症の危険因子であることから、間質性肺炎の経過中に発症する肺癌の発癌メカニズムには、間質性肺炎の病態が深く関与していると考えられている。また、間質性肺炎合併肺癌は非合併肺癌と比較すると、手術、化学療法、免疫療法、放射線治療などの既存の肺癌治療後も再発することが多く、悪性度が高い。さらに、これらの治療によって惹起される間質性肺炎の急性増悪が問題となり、治療関連死も多い。以上のことから、間質性肺炎の線維化異常活性メカニズム解明を行うとともに、間質性肺炎合併肺癌に対する新たな治療法の開発は急務である。

一般的な肺癌では、発癌の原因となる Kras 遺伝子変異や EGFR 遺伝子変異に代表されるようなドライバー遺伝子が多数同定されており、それを標的とする特異的分子標的薬が奏功することが知られている。一方で、間質性肺炎合併肺癌に特徴的ながん遺伝子異常や発がん機構については未だ明らかではない。間質性肺炎合併と非合併では、肺癌の発癌過程は異なると考えられている。間質性肺炎は肺間質と呼ばれる肺胞隔壁に炎症・線維化病変の場合があり、正常肺構造が破壊され新たに異常な構造が作られる“リモデリング”と“間質の線維化”が主な病態である。特徴的な病理組織像として、リモデリングで作られる異常構造である気管支上皮化生とその周囲に存在する多数の活性化した線維芽細胞の集まり(線維芽細胞巣)がある。この組織環境の中で、間質性肺炎に合併する肺癌は気管支上皮化生から連続して発生する病変像を認めることが多い。線維芽細胞は増殖因子や炎症性サイトカイン、細胞外基質を産生し、炎症・線維化の進行に重要な役割を果たすとされている。これらのことから、気管支上皮化生した細胞が癌化する際は周囲に存在する活性化線維芽細胞の存在が重要である可能性が考えられる。

Arl4c は、上皮細胞では Wnt/ β -カテニンシグナルと EGF/Ras シグナルが同時協調的に活性化しこれまでに、肺癌・大腸癌・肝癌・舌癌・胃癌・卵巣癌など様々な癌種で癌細胞の増殖能や遊走能に関与することが報告されており、近年、新規癌関連分子として注目されている。共同研究先の大阪大学分子病態生化学教室では Arl4c を標的とした新規癌治療薬を開発し、生体内におけるその治療効果も報告している。また、申請者らは肺癌患者の切除肺病理サンプルを用いた免疫染色で肺腺癌の前癌病変に高率(約 80%)に Arl4c が発現することを確認しており、Arl4c が肺癌の発癌過程に深く関与していると考えている。さらに、申請者らはヒト切除肺病理サンプルの線維化が強い間質に Arl4c 強陽性となることや、ヒト切除肺から単離した human fibroblast を初代培養する実験系で、間質性肺炎合併患者由来の fibroblast (IP-fibroblast)では非合併患者由来の fibroblast (Normal-fibroblast)に比して Arl4c の発現が上昇していることを今回初めて見出した。これらの実験結果に加え、過去の報告で Wnt/ β -カテニンシグナルは間質性肺炎の線維化に関与することが知られていることから、そのシグナルの下流分子である Arl4c も間質性肺炎で起こる線維化の異常活性に影響を与えていることが推測される。間質性肺炎において線維化が病的活性する機序や発癌の詳細なメカニズムや key となる分子は未だ明らかではない部分が多い。申請者らは、線維芽細胞で発現する Arl4c 分子が、間質性肺炎の組織内での線維化組織の異常活性、さらには化生上皮細胞の癌化過程において重要であるかという問いに対し、これを明らかにすることが癌の早期発見や新たな治療法の開発につながり、間質性肺炎合併肺癌患者のみならず、間質性肺炎患者全体の予後を改善させるのに重要であると考えている。

2. 研究の目的

本研究では、間質性肺炎において、病的に活性化した線維芽細胞で発現する Arl4c が肺の線維化や間質性肺炎合併肺癌の発癌過程に与える影響を明らかにすることを目的とした。肺間質の線維化に関与する Wnt/ β -カテニンシグナルの下流分子である Arl4c の発現がヒト由来線維芽細胞において確認できたのは今回が初めてで、その役割は未だ明らかにされていない。この研究を通じて、間質性肺炎に存在する線維芽細胞が Arl4c を介して線維化や癌化へ与える影響が明らかとなれば、それを標的とした治療薬や早期診断マーカーなどの開発につながり、既存の治療では難治性である間質性肺炎合併肺癌患者のみならず、間質性肺炎患者全体の予後を改善させるのに重要であると考えている。ヒト由来線維芽細胞が発現する Arl4c の役割を明らかにすることで、難治性である間質性肺炎や間質性肺炎合併肺癌に対する Arl4c を標的とした新たな治療法確立を目指した。

3. 研究の方法

(1)間質性肺炎由来線維芽細胞で発現する Arl4c の機能解析

間質性肺炎合併肺癌切除症例と非合併肺癌切除症例のそれぞれの背景肺(非癌部)から単離した線維芽細胞(IP-fibroblastやNormal-fibroblast)を用いて、Arl4cの発現や線維芽細胞の活性化に関わる遺伝子の発現をRT-PCR(qPCR)やWestern blotting法(WB)で確認した。

で作製したfibroblastのArl4c遺伝子をノックダウンすることで生じる、fibroblastにおける増殖能や遊走能などの間質性肺炎の線維化活性を反映するとされる表現型の違いを評価した。

(2)ヒト臨床検体での検証： 切除標本を用いて、Arl4cの抗体で免疫染色を行い、その陽性率と臨床病理学的背景との関連について解析を行った。

(3)Arl4cノックアウトマウスを用いた検証： Arl4cノックアウト(Arl4c-KO)マウスと正常(Arl4c-WT)マウス各々にプレオマイシンを吸入し肺線維症を誘導する。肺を摘出し線維化の程度の違いをHE染色やSMA, Periostinなどの既知の線維芽細胞活性化マーカーで免疫組織学的染色を用いて病理学的に評価する。さらに、肺線維症を誘導したArl4cKOとArl4cWTのマウス肺から線維芽細胞を単離し、Arl4c有無による遺伝子発現の違いを網羅的解析(RNAシーケンスなど)で評価する。

4. 研究成果

(1) 間質性肺炎合併肺癌および間質性肺炎非合併肺癌の切除標本において、非癌部の肺組織の一部を採取し、組織を細かく切断した後にcollagenase Iを用いて酵素処理をした後に血清(10%)入りDMEMで10cmディッシュプレートに培養することで、ヒト切除標本より間質性肺炎由来線維芽細胞(IPF)および正常肺線維芽細胞(NF)を樹立しこれらの細胞を実験に用いた。まず初めに、これらの単離した細胞に活性化の違いがあるかを確認するために線維芽細胞の活性化マーカーとして報告されているFAP, SMA, POSTN, CTGF, COL1A1, COL1A2などの線維化活性と関わる遺伝子発現について評価したところ、NFと比較してIPFにおいてこれらの遺伝子発現は上昇を認めていた。これらのことから、IPFはNFに比較して活性化された線維芽細胞であることが確認された。次に、これらの線維芽細胞においてArl4cの発現を比較したところ、IPFでArl4cの発現が高いことがわかった(図1)。Arl4cと線維化細胞の活性化との関連を調べるために、Small interfering RNA (siRNA)を用いて線維芽細胞に発現するArl4cをノックダウンし、上記の線維芽細胞活性化マーカーの発現を確認したが、これらの発現低下は認めなかった。このことから線維芽細胞は活性化された結果、肺癌発癌過程に関わるとして報告があるArl4cの発現が上昇する可能性があることがわかった。

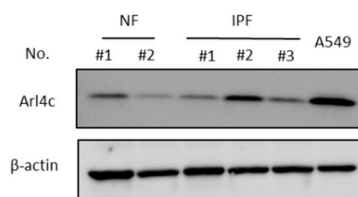
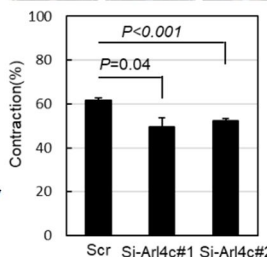
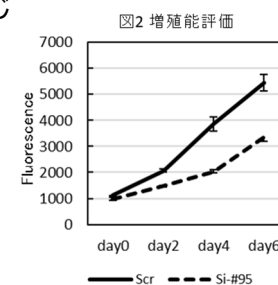


図1 Arl4cの発現

このことから、IPFはNFに比較して活性化された線維芽細胞であることが確認された。次に、これらの線維芽細胞においてArl4cの発現を比較したところ、IPFでArl4cの発現が高いことがわかった(図1)。Arl4cと線維化細胞の活性化との関連を調べるために、Small interfering RNA (siRNA)を用いて線維芽細胞に発現するArl4cをノックダウンし、上記の線維芽細胞活性化マーカーの発現を確認したが、これらの発現低下は認めなかった。このことから線維芽細胞は活性化された結果、肺癌発癌過程に関わるとして報告があるArl4cの発現が上昇する可能性があることがわかった。

(2) 線維芽細胞におけるArl4cの発現をノックダウンすることで生じる表現型の違いを評価した。(1)のヒト肺組織から樹立した線維芽細胞は幾度も継代を重ねることは難しいため、shRNA (short hairpin RNA)を用いて作製するArl4cノックダウン株を樹立できなかった。そのため、siRNAを用いて一過性にArl4cの発現をノックダウンしこれらを実験に用いた。Arl4cをノックダウンした線維芽細胞(Si-Arl4c)では、コントロールの線維芽細胞(Scr)と比較し、2次元培養下での増殖能が有意に低下した(図2)。このことからArl4cの発現は線維芽細胞の増殖能に関わる可能性があることが示唆された。さらに、この増殖能の変化が起こるメカニズムを解明するため、増殖シグナルの一つであるリン酸化Erk(pErk)やリン酸化Ark(pArk)の評価を行ったところ、Arl4cノックダウン株と非ノックダウン株の間でこれらのシグナルにおける差は認めなかった。このことから、Arl4cが線維芽細胞の増殖能に関わるメカニズムは他に存在しこれらを探索することが今後の課題であると考えられた。



(図3)収縮能評価

次に、線維芽細胞の機能において重要な役割を行う遊走能および収縮能に関して評価を行った。Si-RNAを用いてArl4cをノックダウンしたIPFにおいて、非ノックダウンのIPFと比較すると遊走能の低下を有意に認めた。さらに、マトリゲルを用いた収縮能アッセイではArl4cをノックダウンしたIPF(Si-Arl4c#1, #2)において、非ノックダウンのIPF(Scr)と比較すると有意に収縮能の低下を認めた(図3)。以上のことから、線維芽細胞に発現するArl4cは、線維芽細胞における増殖能や遊走能、さらには収縮能において、これらを制御する可能性があることが示唆された。

(3) 間質性肺炎由来線維芽細胞の生体におけるArl4cを評価するために、Arl4cノックアウトマウスを用いて、間質性肺炎発症マウスと非発症マウスの肺組織の表現型の比較を目標とした。その過程で間質性肺炎モデルマウスの樹立が必要であった。既知の報告であるように、C57BL/6マ

ウスにブレオマイシンを吸入することで間質性肺炎モデルマウス作製を試みたが、両肺組織に均一に間質性肺炎様の病態が発症することを確認することに難渋し、さらに COVID-19 による影響で実験の制限もあり進行に難渋した。(1)-(3)にあるような培養細胞を用いた In Vitro での実験結果を生体内(In Vivo)で示すことは今後の課題であると考えている。

(4) 間質性肺炎合併肺癌切除標本を用いて、Arl4c 抗体を用いて免疫染色を行ったところ、癌周囲の線維化に Arl4c は陽性となったものの、これらを正常肺や間質性肺炎の病変そのものにある線維化組織への染色と比較するにはある程度の症例数が必要であった。しかしながら、COVID-19 による影響で手術症例が制限される中、計画期間内で遂行することは難しかった。しかし臨床標本における評価は重要であり、今後の課題として挙げられる。

(5) 次に、(1)から得られた線維芽細胞が活性化された結果、Arl4c の発現が上昇する可能性があるため、Arl4c の発現するメカニズムについて評価してみた。間質性肺炎の異常活性化した線維芽細胞において関連があるとされる TGF- β シグナルや Wnt シグナルとの関係を見るために、TGF- β や、さらには Wnt シグナルを活性化する CHIR を培養液中に添加し IPF および NF を培養した。TGF- β による刺激は PAI-1 の発現上昇で、さらに CHIR での刺激は AXIN2 の発現上昇でこれらが線維芽細胞に作用していることは確認できた。この中で、IPF において、コントロールと比較し、CHIR で Arl4c の遺伝子発現は軽度上昇し、TGF- β での刺激ではさらに上昇を認めた。一方で、NF においてはこれらの現象は認めなかった。以上から、IPF における Arl4c の発現は、TGF- β や Wnt シグナルの発現により制御されている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------