

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5 月 25 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21591004

研究課題名（和文） 肺損傷と修復における細胞老化の役割とその分子機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanisms and roles of cell senescence in lung injury and repair

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（和文）：特発性間質性肺炎における肺生検組織において肺胞上皮、細気管支上皮細胞に細胞老化を認めたが、これに対し線維芽細胞には老化の指標は認められず、同じ環境内での細胞ごとの反応性が線維化におけるリモデリングをきたしていると考えられた。ヒト primary culture 気道上皮細胞は、TGF を投与すると老化が誘導され、SIRT6 を強発現させると、老化は抑制された。気道上皮の老化を抑制することによって、線維化抑制につながると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We found bronchial and alveolar epithelial cell senescence in lung tissues from patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), but not fibroblast senescence. These results suggest that the difference of responsiveness to microenvironment in each type of cells leads to tissue remodeling and pulmonary fibrosis. TGF-beta induced cell senescence in human primary cultured bronchial epithelial cells and SIRT6 inhibited it. To inhibit epithelial cell senescence may leads to prevent pulmonary fibrosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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、細胞老化、アポトーシス、特発性肺線維症

1. 研究開始当初の背景

線維化の過程は、アポトーシスを中心とする肺上皮細胞損傷に始まり、不適切な修復の結果生じる。様々なストレスによる細胞死が明らかとなっている損傷と修復過程に

おいて細胞老化の役割と分子機構は不明である。線維芽細胞と肺上皮細胞の相互関係における細胞老化の役割とシグナル伝達は不明である。再生に関わる肺の前駆細胞や幹細胞において細胞老化が生じれば、再生

を妨げ、病態を悪化させると考えられる。本研究では、肺損傷・修復・再生・線維化の過程における細胞老化の役割と分子機構を解明する。

2. 研究の目的

背景に述べた明らかになっていない肺損傷と線維化における細胞老化の分子メカニズムと病態における意義の解明を目的とする。従って、ヒト肺線維症の肺組織、動物モデル、培養細胞を用いて以下の項目を明らかにする。

(1) 特発性間質性肺炎における細胞老化の存在と臨床及び病理学的指標との関連性

(2) 急性肺損傷モデルにおける細胞老化の存在と病態における意義

(3) 肺線維化モデルにおける細胞老化の存在とその意義

(4) 気道上皮傷害モデルにおける細胞老化とその意義

(5) 肺上皮細胞と線維芽細胞の相互作用における細胞老化の意義

(6) 肺前駆細胞・幹細胞老化の肺再生・線維化における意義

3. 研究の方法

(1) 特発性間質性肺炎における細胞老化の存在と臨床及び病理学的指標との関連性

肺生検および肺癌の手術によって得られた肺組織を用いて、細胞老化の指標となる SA- β -gal-staining, senescence-associated cyclin-dependent kinase inhibitors (p21, p16) に対する免疫染色を行う。

(2) 急性肺損傷モデルにおける細胞老化の存在と病態における意義

リポポリサッカライド (LPS) をマウスの腹腔内に投与すると肺血管内皮、肺上皮細胞にアポトーシスを生じ、急性肺損傷を惹起する。このモデルにおいて、ヒト肺線維症から得られた肺組織と同様の手法を用いて、経時的に細胞老化と細胞の増殖、アポトーシスとの関連性を検討する。さらに p16 欠損マウスを用いて細胞老化抑制による肺損傷に及ぼす影響を検討する。

(3) 肺線維化モデルにおける細胞老化の存在とその意義

ブレオマイシンをマウスの気管に注入することによって急性肺損傷と線維化を惹起する。このモデルにおいて早期の肺損傷、線維化形成、線維化の消退する各過程における細胞老化について検討する。方法は上

記と同様に行い、p16欠損マウスを用いて線維化への影響を検討する。

(4) 気道上皮傷害モデルにおける細胞老化とその意義

ナフタレンをマウスに投与すると1-3日にてクララ細胞の脱落が生じ、1-2週間で再生する。障害から再生に至る過程において、経時的に細胞死、細胞老化、細胞増殖のマーカーの発現を経時的に検討する。また、このモデルにおいて、酸化ストレスの影響を観察するために、細胞老化に対する高濃度酸素投与による影響、抗酸化剤投与による影響について検討する。

(1) 肺上皮細胞と線維芽細胞の相互作用における細胞老化の意義

培養細気管支上皮と線維芽細胞の共培養において、TGF- β によって刺激を受けた線維芽細胞は筋線維芽細胞へと分化し、H2O₂, アンジオテンシン II を分泌し、肺上皮細胞のアポトーシスを誘導するが、すべての細胞が細胞死に至るわけではない。生存した細胞は細胞老化によって細胞死を免れている可能性がある。肺気道上皮と線維芽細胞の primary culture を用いて、TGF- β によって刺激された筋線維芽細胞による肺上皮細胞のアポトーシスと老化、老化した細胞からの様々なサイトカイン産生 (uPA, tPA, MMPs, IL-6, IL-1, IL-8, MCP-1 など) 産生されたサイトカインによる線維芽細胞に対する影響を検討する。標的分子の抑制は siRNA を用いる。

4. 研究成果

1) 特発性間質性肺炎における細胞老化とリモデリング

肺生検組織において細胞老化の指標である SA- β -gal, p21 が IPF 肺胞上皮、細気管支上皮細胞に陽性であったが、これに対し線維芽細胞には老化の指標は認められず、同じ環境内での細胞ごとの反応性が線維化におけるリモデリングをきたしていると考えられた。線維芽細胞と上皮細胞は、アポトーシスに対する感受性も異なる。今後は、細胞老化と細胞増殖の違いについてさらに研究を進めている。

2) 老化細胞と senescence associated secretory phenotype (SASP)

さらにヒト primary culture 気道上皮を用いて、喫煙暴露によって酸化ストレスによる老化、炎症性サイトカインである IL-1 産生を認めた。SIRT6 は、IL-1 の線維芽細胞増殖作用を抑制した。したがって、気道

上皮の老化を抑制することによって、サイトカインの産生即ち老化細胞の SASP を抑制することが線維化抑制につながると考えられる。インフラマソームは IL-1 の産生において主たる経路である。インフラマソームは SASP と関連することが予想される。SASP やインフラマソームのシグナル伝達経路と、感染による線維化の増悪、toll like receptor との関連性について今後研究を進めたい。

2) TGF- β による気道上皮細胞の老化と p21, SIRT6

ヒト primary culture 気道上皮細胞は、TGF を投与すると p21 の発現が亢進し、SA- β gal が陽性となった。SIRT6 を強発現させると、老化は抑制された。TGF は線維芽細胞の増殖や細胞外基質産生を促進するだけでなく、上皮細胞の老化を介して炎症性サイトカイン産生、線維化促進に働くと考えられた。TGF を治療標的にすることによって肺の抗老化作用も含めて効果が期待される。

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 10 件)

1. Fujii S, Hara H, Araya J, Takasaka N, Kojima J, Ito S, Minagawa S, Yumino Y, Ishikawa T, Kawaishi M, Kamiya K, Hirano J, Odaka M, Morikawa T, Stephen L Nishimura S, Nakayama K, Kuwano K. Insufficient autophagic clearance promotes bronchial epithelial cell senescence in chronic obstructive pulmonary disease. *Oncoimmunology* 査読あり 2012, in press.

2. Hara H, Araya J, Takasaka N, Fujii S, Kojima J, Yumino Y, Shimizu K, Ishikawa T, Numata T, Kawaishi M, Saito K, Hirano J, Odaka M, Morikawa T, Hano H, Nakayama K, Kuwano K. Involvement of creatine kinase B in cigarette smoke induced-bronchial epithelial cell senescence. *Am J Respir Cell Mol Biol* 査読あり 46:306-312, 2012.

3. Numata T, Araya J, Fujii S, Hara H, Takasaka N, Kojima J, Minagawa S, Yumino Y, Kawaishi M, Hirano J, Odaka M, Morikawa T, Nishimura SL, Nakayama K, Kuwano K. Insulin Dependent

Phosphatidylinositol 3-Kinase/Akt and ERK Signaling Pathways Inhibit TLR3-Mediated Human Bronchial Epithelial Cell Apoptosis. *J Immunol*. 査読あり 187:510-9, 2011.

4. Minagawa S, Araya J, Numata T, Nojiri S, Hara H, Yumino Y, Kawaishi M, Odaka M, Morikawa T, Nishimura SL, Nakayama K, Kuwano K. Accelerated Epithelial Cell Senescence in IPF and the Inhibitory Role of SIRT6 in TGF- β -induced Senescence of Human Bronchial Epithelial Cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 査読あり 300:L391-L401, 2011.

5. 桑野和善, 荒屋 潤, 原 弘道: エイジングと間質性肺炎 呼吸と循環 査読なし 59:577-585, 2011

6. 桑野和善, 荒屋 潤, 原 弘道: IPF に対する分子標的治療 呼吸と循環 査読なし 58:979-85, 2010

7. 桑野和善, 河石 真, 荒屋 潤: 間質性肺炎に対するステロイド薬の使い方 *Modern Physician* 査読なし 29:603-607, 2009

8. 桑野和善, 皆川俊介, 荒屋 潤: 特発性肺線維症の薬物療法 呼吸と循環 査読なし 57:575-580, 2009

9. 桑野和善, 木下 陽, 中山勝敏: 高齢者の間質性肺炎 *日本老年医学会雑誌* 査読なし 46:93-100, 2009

10. 桑野和善, 皆川俊介, 荒屋 潤: 分子病態から見た肺線維症 *日本内科学会雑誌* 査読なし 98:1134-1139, 2009

[学会発表] (計 5 件)

1. 桑野和善: 加齢と肺の線維化 第 13 回東海分子呼吸器研究会 2011 年 8 月 26 日 名古屋 (特別講演)

2. 桑野和善: 加齢と肺の線維化 第 18 回福岡びまん性肺疾患研究会 2011 年 5 月 28 日 福岡 (特別講演)

3. 桑野和善: 間質性肺炎と COPD 呼吸器疾患フォーラム in 福岡 2010 年 12 月 1 日 福岡 (特別講演)

4. 桑野和善: 間質性肺炎におけるアポトーシスと老化 第 49 回日本呼吸器学会総会

2009年6月12-14日 東京(シンポジウム)

5. 桑野和善: 間質性肺炎とCOPDにおけるリモデリング 第22回近畿呼吸器疾患談話会 2009年2月28日 大阪(特別講演)

[図書](計3件)

1. 桑野和善: 特発性肺線維症 今日の治療指針 2010年版—私はこう治療している 医学書院、東京、pp 256-257, 2010

2. 桑野和善: ARDSとアポトーシス 別冊・医学の歩み 最新ARDSのすべて 医歯薬出版株式会社、東京、pp38-44, 2010

3. Kuwano K, Nakayama K, Araya J: Apoptosis in lung diseases Modern Insights Into Disease: Apoptosis Science Publishers, New Hampshire, USA, pp 421-436, 2009

[産業財産権]

○出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[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

中山勝敏 (NAKAYAMA KATSUTOSHI)
東京慈恵会医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 40321989

荒屋 潤 (ARAYA JUN)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師
研究者番号: 90468679