

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16251

研究課題名(和文) 移植後特発性肺炎症候群の解明：アンジオテンシン2が肺胞マクロファージを活性化する

研究課題名(英文) Elucidation of idiopathic pneumonia syndrome: Angiotensin 2 activates alveolar macrophages

研究代表者

原 隆二郎 (Hara, Ryujiro)

東海大学・医学部・助教

研究者番号：90750026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：肝臓特異的アンジオテンシノゲンノックアウトマウスに対する移植後肺で、インフラマソームであるNLRP3や、NLRP3によって活性化が調節されているカスパーゼ1やIL-1 の発現を野生型と比較した結果は同等であり、本実験モデルにおけるレニン・アンジオテンシン系とインフラマソームの相関関係は見出されなかった。

In vitroでNR8383にブレオマイシンを反応させたところアンジオテンシノゲンの発現亢進を認めた。この発現亢進はアンジオテンシンIIやアンジオテンシン受容体阻害薬による影響を受けなかった。一方アンジオテンシノゲンを追加したところブレオマイシンによるアンジオテンシノゲン発現がさらに亢進した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺全体でのアンジオテンシノゲンの発現は肝臓での発現がノックアウトしていると亢進し、一方で肺胞マクロファージではアンジオテンシノゲンによるポジティブフィードバック反応を認めた。この結果より、肺胞マクロファージ以外の細胞によるネガティブフィードバック機構の存在と、肺胞マクロファージにおけるアンジオテンシノゲン受容体の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Expression of the inflammasome NLRP3 and of caspase-1 and IL-1, whose activation is regulated by NLRP3, was comparable to wild-type in post-transplantation lungs of liver-specific angiotensinogen knockout mice. Therefore, no correlation was found between the renin-angiotensin system and the inflammasome expression in this experimental model.

When NR8383 was stimulated with bleomycin in vitro, angiotensinogen expression was enhanced. This upregulation of angiotensinogen was not affected by angiotensin II or angiotensin receptor inhibitors. On the other hand, the addition of angiotensinogen further enhanced the induction of angiotensinogen expression by bleomycin.

研究分野：血液内科学

キーワード：特発性肺炎症候群 肺胞マクロファージ インフラマソーム

1. 研究開始当初の背景

白血病などの血液悪性疾患の一部は抗がん剤治療に抵抗性で、そのような場合、同種造血幹細胞移植が唯一の根治療法となる。しかしながら、同種免疫反応に起因する合併症である移植片対宿主病(Graft versus host disease=GVHD)は重篤化すると致死的であり、そのため造血幹細胞移植を安全に施行するためにはGVHDの予防・治療が重要である。移植後早期に発症する非感染性肺合併症のうち、特発性肺炎症候群(Idiopathic pneumonia syndrome =IPS)は同種造血幹細胞移植症例の5~10%程度に起こるまれな合併症であるが、発症すると有効な治療法がなく致死率が70~100%と極めて高い。そのため、同種造血幹細胞移植の安全性を高めるためにはIPSのリスク因子の同定や予防法の確立が急務である。

移植前処置である高用量の放射線照射や大量抗がん剤治療、そして肺以外の臓器の急性GVHDの発症がIPS発症のリスク因子となることが知られている。さらに感染源が同定されない事がIPSの定義であるが、細菌や真菌、ウイルスが病態に関与している事も分かっている。しかし感染症に対する治療は無効であるため、これらの要因によって活性化される因子(Factor X)の存在が想定される。このFactor Xの同定がIPSの機序解明、予防法や治療法の確立に必須である。

2. 研究の目的

本研究の目的は致死率が非常に高いIPSに関して、病態の核となる因子を明らかにし予防や治療に結び付く機序を解明する事である。

我々はIPSの発症予測因子を同定するため、患者の一塩基多型(Single nucleotide polymorphism=SNP)を解析した。IPSを含む様々な肺疾患の病態に関わる既知の因子のSNPをピックアップし、それらとIPS発症との相関を症例対照研究にて解析した。すると唯一アンジオテンシノゲン遺伝子のSNPのみがIPSの発症と相関することを我々は世界で初めて見出した(not published)。肝臓で産生されるアンジオテンシノゲンは腎臓のレニン、そして肺のアンジオテンシン変換酵素により分解され生理活性を持つアンジオテンシンIIとなる(Renin-angiotensin system=RAS)。アンジオテンシンIIは本来の血圧調節以外にも、様々な炎症性疾患や線維化疾患の増悪因子として働いている。IPSにおいても病態にRAS系が関わっていることが前述のSNP研究や、その後のマウス実験により示唆されたため、このRASがIPSを増悪させている機序を明らかにしたい。

IPSでは、前処置の放射線や抗がん剤治療により患者の肺胞マクロファージが活性化し、ドナーリンパ球を活性化させ同種免疫に基づく肺障害に導く。マクロファージは細菌や真菌、ウイルスなど様々な病原体の特異分子パターンを感知するセンサーを有しており、インフラマソームと呼ばれるプラットフォームを介して炎症性サイトカインの産生・活性化等の免疫応答に結びつく。インフラマソームの活性化は2段階に分かれており、感染刺激がシグナル1として働くのだが、シグナル2については不明な点が多い。インフラマソームの代表的な分子であるNLR family pyrin domain containing 3 (NLRP3)は、肺胞マクロファージにおいてはまだ知られていないが腎臓ではRASにより活性化される事が報告されており、RASがシグナル2として作用する可能性を示唆している。肺においては、RAS系の律速因子と考えられるアンジオテンシノゲンは前処置の放射線や感染刺激によって気管支上皮細胞や筋線維芽細胞、肺胞マクロファージなどで産生されているため、移植前処置や感染刺激で活性化した肺胞マクロファージにおいて、アンジオテンシンIIによる共刺激も加わってインフラマソームの活性化が起こり、ドナーリンパ球を過剰に活性化してIPS発症に至るのではないかとこの仮説を考えた。

3. 研究の方法

本研究では、同種造血幹細胞移植によるマウスIPSモデルを用いてIPSと肺胞マクロファージ、そこに関わるRASとインフラマソームの関係を解析した。

(1) IPSモデルの確認、肺胞マクロファージについて

C57BL6マウス(H2b)に、B10.BRマウス(H2k)の骨髄細胞及び脾臓T細胞を移植する同種造血幹細胞移植モデルに、リポ多糖の経気道投与や真菌因子の腹腔内投与を加えたIPSモデルを確立する(いずれも既に報告されているモデルである)。移植3週間後の呼吸機能検査や肺組織評価(HE染色、CD3免疫染色)そして炎症性サイトカインやケモカインのRNA、蛋白発現を解析する。肺胞マクロファージがこの時点でレシピエント型であることをフローサイトメトリー法にて確認する。

(2) 肺組織や肺胞マクロファージにおける RAS 発現、インフラマソーム活性化について
肺組織で RAS 因子に関する免疫染色や qPCR を行い、RAS 因子の発現を調べる。肺胞洗浄液を回収し、上清の RAS 因子の発現を ELISA にて調べる。また肺胞マクロファージを単離し、このマクロファージでの RAS 因子の発現を qPCR にて調べる。
同様の解析を主要なインフラマソームである NLRP3 や、NLRP3 によって活性化が調節されているカスパーゼ 1 や IL-1 についても行う。

(3) In vitro での肺胞マクロファージの解析

ラットの肺胞マクロファージ細胞株 (NR8383) を用いて In vitro での解析を行う。細胞にプレオマイシンを添加して、RAS 因子やインフラマソームの発現を調べる。そこに RAS 因子や RAS 阻害薬を付加することによるアンジオテンシノゲンの発現変化を評価する。

4. 研究成果

アンジオテンシノゲンの血中濃度が低下する肝臓特異的アンジオテンシノゲンノックアウトマウスへの移植後 3 週間の時点で、ノックアウトマウスで肺機能検査や炎症性サイトカインの発現が増悪していた。野生型および肝臓でのアンジオテンシノゲンノックアウトマウスいずれも肺胞マクロファージでのアンジオテンシノゲンの産生が移植後で亢進していた。
肝臓特異的アンジオテンシノゲンノックアウトマウスに対する移植後肺で、インフラマソームである NLRP3 や、NLRP3 によって活性化が調節されているカスパーゼ 1 や IL-1 の発現を野生型と比較した結果は同等であり、本実験モデルにおけるレニン・アンジオテンシン系とインフラマソームの相関関係は見出されなかった。

In vitro で NR8383 にプレオマイシンを反応させたところ、アンジオテンシノゲンの発現亢進を認めた。このアンジオテンシノゲンの発現亢進はアンジオテンシン II やアンジオテンシン受容体阻害薬による影響を受けなかった。一方で、アンジオテンシノゲンを追加したところ、プレオマイシンによるアンジオテンシノゲン発現誘導がさらに亢進した。

以上より、肺全体でのアンジオテンシノゲンの発現は肝臓での発現がノックアウトしていると亢進し、一方で肺胞マクロファージではアンジオテンシノゲンによるポジティブフィードバック反応を認めた。この結果より、肺胞マクロファージ以外の細胞によるネガティブフィードバック機構の存在と、肺胞マクロファージにおけるアンジオテンシノゲン受容体の存在が示唆された。

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
---------	---------