

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591150

研究課題名(和文) 間質性肺炎・肺線維症における細気管支と肺胞上皮間のクロストークの解明と制御

研究課題名(英文) The role of Clara cell in pulmonary fibrosis in mice

研究代表者

浜田 直樹 (Hamada, Naoki)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00423567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：肺胞上皮細胞の傷害は肺線維化の初期事象の一つと考えられており、高度な傷害が起きれば肺胞上皮は正常に修復できず、線維化に至る。一方、肺線維化における細気管支上皮細胞の役割については不明である。クララ細胞は末梢細気管支に存在する気道上皮細胞である。ナフタレン投与マウスモデルを使用し、クララ細胞が脱落した状態のマウスに、ブレオマイシン(BLM)を投与し、投与14日後の気管支肺胞洗浄液の解析、組織学的評価を施行したところBLM肺臓炎が抑制されていた。マウスBLM肺臓炎を増悪させる役割をクララ細胞は役割を担っており、クララ細胞と肺胞上皮細胞間には何らかのクロストークが存在すると思われた。

研究成果の概要(英文)：Alveolar epithelial cell damage is an initial event in pulmonary fibrosis. When the lung injury is mild, damaged tissue will normally be repaired, whereas excess cell death may lead to irreparable lung damage and fibrosis. Meanwhile, the role of bronchiolar epithelial cells in pulmonary fibrosis has not been addressed. Clara cells are bronchiolar epithelial cells in small airways, play progenitor roles and express various cytokines. The aim of this study was to elucidate the role of Clara cells in the development of pulmonary fibrosis. Mice were received naphthalene intraperitoneally at day -2 to deplete Clara cells, and were given bleomycin or vehicle at day 0. Bronchoalveolar lavage fluids and lung tissues were obtained at day 14. Naphthalene-induced Clara cell depletion protected mice from bleomycin-induced lung injury and fibrosis. We conclude that Clara cells may play exaggerated roles through producing potent profibrotic cytokines in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：呼吸器内科学

キーワード：間質性肺炎 肺線維症 細気管支上皮細胞

1. 研究開始当初の背景

肺線維症は肺胞上皮傷害を契機とする、不適切な修復の繰り返しの結果生じると考えられている。そのため肺線維症の病態解明に関する研究は、肺胞上皮細胞に着目したものが主であり、我々も肺胞上皮細胞の過剰なアポトーシスが肺線維症の原因のひとつであることを明らかにしてきた(Hagimoto N, *et al. Am J Respir Cell and Mol Biol.* 1997, Hagimoto N, *et al. Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997. Kuwano K, *et al. J Clin Invest.* 1999.)。その過程において、敗血症や急性肺傷害における遅発性メディエーターとして重要な High Mobility Group Box 1 (HMGB1) の間質性肺炎・肺線維症における役割に注目し、急性期において重要と考えられていた HMGB1 が慢性肺疾患においても重要な役割を担っていることを明らかにした(Hamada N, *et al. Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008)。その研究において、マウスブレオマイシン (BLM) 肺臓炎モデルでは、BLM 投与初期には細気管支上皮細胞で HMGB1 の発現が亢進しているが、肺胞上皮細胞では高発現は認められず、投与 3, 5 日後になって、肺胞上皮細胞での発現が亢進しはじめ、その後線維化に進行していくこと、またこれらの病変は、抗 HMGB1 中和抗体投与により抑制されることを示した。肺胞上皮だけではなく、細気管支上皮も間質性肺炎・肺線維症において重要な役割を担っていると考えられ、更に、BLM 投与初期に細気管支上皮が傷害を受け、その後、肺胞上皮細胞に傷害が進んでいくことから、細気管支上皮と肺胞上皮間にクロストークが存在し、その破綻が肺線維化の一因になるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

ナフタレンを投与してクララ細胞を脱落させたマウスに BLM を投与し、炎症、線維化等に関する評価を、肺組織、気管支肺胞洗浄

(bronchoalveolar lavage: BAL) 液の解析によって明らかにする。

3. 研究の方法

C57BL/6 マウス、雌、8 週齢に、corn oil で溶解したナフタレンを、1 匹あたり 200mg 腹腔内投与 (intraperitoneal injection: ip) した。このモデルはナフタレン投与後 2-5 日後をピークにクララ細胞のほとんどが脱落し、14 日後にはほぼ自然再生するという広く使用されているモデルである (Stripp BR, *et al. Am J Physiol.* 1995, Harada C, *et al. Am J Respir Crit Care Med.* 2011)。今回我々は、ナフタレン投与 (day -2) 後、2 日後 (day 0) のクララ細胞が脱落した状態に BLM 2U/Kg を気管内投与 (intratracheal injection: it) し、BLM 投与 14 日後 (day 14) に BAL を施行し BAL 液の解析を行った。また肺を取り出して、HE 染色、Elastica van Gieson (EVG) 染色、免疫組織学的染色、TUNEL 染色にて評価した。これらの評価は コントロール群 [コーンオイル (ナフタレンの溶媒) ip+生理食塩水 (ブレオマイシンの溶媒) it 群]、ナフタレン単独群 [ナフタレン ip+生理食塩水 it 群]、BLM 単独群 [コーンオイル ip+ブレオマイシン it]、ナフタレン+BLM 投与群 [ナフタレン ip 群+ブレオマイシン it 群]、それぞれの群の比較にて行った。また、-

群について、day 14 に、マウス肺より細気管支上皮細胞をレーザーキャプチャーマイクロダイセクション法によって選択的に採取し、マイクロアレイにて網羅的に解析した。

(倫理面への配慮)

九州大学動物実験実施規則に従って実験を行った。

4. 研究成果

(1) クララ細胞傷害

クララ細胞の傷害に関しては、Clara cell

10-kD protein (CC-10)による肺組織の免疫組織学的染色と、ホモジネートした全肺のウェスタンブロット法にて評価した。組織学的には、day 14におけるCC-10陽性細胞数はナフタレン投与単独群、ナフタレン+BLM投与群ではコントロール群と比較して減少していた。プレオマイシン単独投与群では、CC-10陽性細胞数に変化を認めなかった。またナフタレン単独投与群とナフタレン+プレオマイシン投与群との比較では、CC-10陽性細胞数に有意な差を認めなかった。

次にウェスタンブロット法による全肺の解析では、CC-10陽性蛋白はコントロール群と比較してナフタレン単独群とナフタレン+BLM投与群で有意に減少していたが、ナフタレン単独群とナフタレン+BLM群との比較では有意な差を認めなかった。またBLM単独投与群ではコントロール群と比較して有意な差を認めなかった。

(2) ナフタレン投与によるBLM肺臓炎の抑制効果

BLMを投与して14日後に組織学評価とBAL液の解析を行った。組織学的には、BLM単独群と比較してナフタレン+BLM投与群では有意にプレオマイシン肺臓炎は抑制されていた。BAL液においては、コントロール群と比較してBLM単独群では有意にリンパ球数の増加と蛋白濃度の上昇が認められたが、これらはナフタレン+BLM群ではBLM単独群と比較して有意に抑制されていた。またBALF中のTGF- β 濃度はBLM単独群で有意に上昇を認め、ナフタレン+BLM群ではBLM単独群と比較して有意に抑制されていた。BALF中のHMGB1もナフタレン+BLM群ではBLM単独群と比較して有意に抑制されていた。また、アポトーシス陽性細胞に関しても、BLM単独群では有意に増加していたが、それはナフタレン+BLM群では有意に抑制されていた。

次に線維化に関して、EVG染色とホモジネート肺のコラーゲン量にて評価した。コント

ロール群と比較してBLM単独群では有意にコラーゲン量が増加していたが、これはナフタレン+BLM群では有意に抑制された。ナフタレン単独投与群ではコラーゲン量に変化を認めなかった。

(3) 細気管支上皮細胞のマイクロアレイ解析による遺伝子発現

マウスBLM肺臓炎における細気管支上皮細胞に対する影響を検討するために、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション法により細気管支上皮を選択的に採取し、マイクロアレイ法によって網羅的に遺伝子解析を行った。ナフタレン単独投与群とナフタレン+BLM投与群と比較して、5倍以上上昇していたのは11遺伝子、5倍以上低下していたのは14遺伝子であった。現在、更に詳細に解析中である。

クララ細胞が脱落した状態のマウスにBLMを経気管投与するとBLM肺臓炎・肺線維症が抑制されたことにより、初期に損傷されるクララ細胞がそもそも存在しない状態では、クララ細胞から肺胞上皮細胞への負のメッセージが伝達されず、肺臓炎・線維化の発症が抑えられたのではないかと考えた。これは細気管支上皮と肺胞上皮間にクロストークが存在するという我々の推測を裏付ける結果と考えられた。ただ、一般にクララ細胞は、COPDや気管支拡張症などでは発現が低下したり(Gray RD, *et al. Am J Respir Crit Care Med.* 2008)、炎症性サイトカインやケモカインの産生や活性化を制御したり(Broeckaert F, *et al. Clin Exp Allergy.* 2000)と、生体にとって有益な働きをしており、その機能低下は疾病に繋がると考えられている。実際、我々はマウスナフタレン肺傷害モデルにゲフィチニブの内服を併用することにより、急性肺傷害が遷延することを報告し(Harada C, *et al. Am J Respir Crit Care Med.* 2011)、クララ細胞の機能が低下した状態ではゲフ

イチニブによる急性肺傷害が増悪することを明らかにした。しかし、今回の我々の研究結果は、クララ細胞が存在するとブレオマイシン肺臓炎が増悪するとも言え換えられるため、疾患によってはクララ細胞は病態を増悪させる因子としての働きも併せもつ可能性を示しており、実に興味深い研究結果であると考えている。

また、クララ細胞はクララ細胞自身への再生能のみならず肺胞上皮細胞への再生能ももつと報告されており注目されているが (Reynolds SD, *et al. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004), その stem cell や progenitor cell としての働きの面から、肺線維化の成因を検討することも重要である。クララ細胞もしくは同じく細気管支に存在すると報告されている細気管支肺胞上皮幹細胞 (Kim CF, *et al. Cell.* 2005) から、クララ細胞や肺胞上皮細胞が再生してくる過程における異常が、肺線維化の原因となっている可能性は十分に考えられる。また、ブレオマイシン肺臓炎はブレオマイシン投与後、day7 辺りまでの炎症期、それ以降の線維化期が存在するが、今回の我々の実験系においては、炎症期においても線維化期においても、ナフタレンにより脱落したクララ細胞の再生過程が重なるため、クララ細胞の再生過程において重要な働きをもつと考えられる成長因子、サイトカイン、その他未知の重要な物質が、炎症期のみか線維化期のみか、その両方の期に渡ってか、肺臓炎・線維化を制御している可能性も推察される。現時点における今後の検討課題と考え研究を進めていく方針である。

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1件)

横山哲也 他, 特集 呼吸器疾患の診断と治療 (III) 急性呼吸促拍症候群, 医学と薬学, 自然科学社, 査読無, 69 巻, 349-356, 2013,

〔学会発表〕(計4件)

(1) 横山哲也, 緒方彩子, 濱田直樹, 鈴木邦裕, 前山隆茂, 三雲大功, 原田英治, 中西洋一. マウスブレオマイシン肺線維症モデルにおけるクララ細胞の役割 第52回日本呼吸器学会学術講演会 2012.4.20-22 兵庫県神戸市

(2) Tetsuya Yokoyama, Saiko Ogata, Naoki Hamada, Kunihiro Suzuki, Takashige Maeyama, Daiko Mikumo, Eiji Harada, Yoichi Nakanishi. The role of clara cell in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. American Thoracic Society 2012 International Conference. 18-23 May 2012. San Francisco, USA.

(3) 横山哲也, 濱田直樹, 緒方彩子, 前山隆茂, 鈴木邦裕, 三雲大功, 猪島一朗, 中西洋一. 間質性肺炎・肺線維症における細気管支上皮細胞の役割. 第53回日本呼吸器学会学術講演会. 2013.4.19-21. 東京都千代田区

(4) Tetsuya Yokoyama, Naoki Hamada, Saiko Suetsugu-Ogata, Kunihiro Suzuki, Kazuyoshi Kuwano, Yoichi Nakanishi. Depletion of Clara cells attenuates lung injury and fibrosis induced by bleomycin in mice. 18th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology. 11-14 November 2013. Yokohama Japan

〔図書〕(計1件)

濱田直樹, 間質性肺炎・肺線維症の病態解明と新たな治療法の開発を目指して 最新医学 133-7, 2012

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

濱田 直樹 (HAMADA NAOKI)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00423567

(2) 研究分担者

前山 隆茂 (MAEYAMA TAKASHIGE)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：40380456

(3) 連携研究者

()

研究者番号：