

機関番号：32651

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790924

研究課題名（和文）Toll-like receptor シグナルによる肺傷害に対するインクレチン関連薬の治療効果

研究課題名（英文）The inhibitory role of incretin mimetics against lung injury-induced by Toll-like receptor-mediated signaling.

研究代表者

沼田 尊功 (Numata Takanori)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：30366257

研究成果の概要（和文）：インクレチンホルモンとして、GLP-1 と GIP が存在する。インクレチン関連薬の肺傷害における有効性を明らかにするため、培養細胞や、肺組織を用いて GLP-1 及び GIP 受容体の発現、GLP-1 受容体アゴニストである exendin-4 の効果を検討した。培養細胞ではインクレチン受容体の発現は認めず、exendin-4 の有効性も確認できなかった。しかしながら肺組織の II 型肺胞上皮細胞では GLP-1 受容体の発現を認め、特に肺線維症患者の肺胞上皮細胞では高度に発現していた。インクレチンの肺線維症病態への関与が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and gastric inhibitory peptide (GIP) are known incretin hormones. To elucidate the potential role of incretins in prevention of lung injury, we analyzed the expression of incretin receptors and effect of exendin-4, a GLP-1 receptor agonist. Although neither expression of incretin receptors nor effect of exendin-4 was demonstrated in cell culturing models, type II pneumocytes in lung tissue expressed GLP-1 receptor. GLP-1 receptor expression in type II pneumocyte was especially increased in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), suggesting the potential involvement of incretin in IPF pathogenesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,600,000	780,000	3,380,000

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：肺線維症、肺傷害、インクレチン

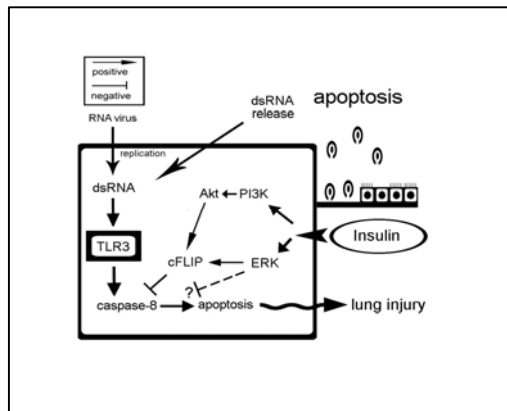
1. 研究開始当初の背景

糖尿病患者であることは集中治療室における予後不良因子である。強化インスリン療法による血糖コントロールが予後を改善させる可能性が報告されているが、インスリンが持つ抗アポトーシス作用など、血糖コントロール以外の細胞保護作用も重要であると考えられている。我々は、インスリンが phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase) / Akt と mitogen-activated protein kinases (MAPKs) シグナル系を活性化し、ウイルス感染モデルである poly I:C

(double-stranded RNA アナログ) による TLR3 を介したヒト気道上皮細胞のアポトーシスを抑制する事を見出した (図 1)。

しかし一方、強化インスリン療法の弊害として過度の低血糖やそれがもたらす予後への悪影響も報告されている。そこで我々は、近年糖尿病治療薬として広く使用されているインクレチン関連薬に着目した。インクレチンは、基本的に低血糖を誘発せずにインスリン分泌を誘導し、さらにインスリンと同様な細胞保護作用を併せ持つ可能性がある。そしてインクレチンの膵・細胞や心筋細胞に対するアポトーシスの抑制作用は、インスリ

ンと同様に PI3-kinase と MAPKs シグナル系の活性化によるとされている。しかしながら呼吸器疾患におけるインクレチンの役割に関しては、その受容体の発現や作用を含めこれまでほとんど検討されていない。



(図1) Numata T et al. J Immunol. 2011.

2. 研究の目的

各種呼吸器疾患において、インクレチン関連薬の有効性を明らかにすることが最終的な目標である。そのために、まず培養細胞と肺組織を用いてインクレチン受容体の発現を明らかにし、さらにアポトーシスや炎症の制御の点からインクレチンの作用機序を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞を用いた検討：分離培養ヒト気道上皮細胞及び線維芽細胞、さらにヒト肺腺癌由来の継代細胞 A549、気管支上皮細胞由来の不死化細胞 Beas2B を用いた。各培養細胞より RNA を抽出し、RT-PCR 法により GLP-1 受容体および GIP 受容体の mRNA 発現を比較検討した。さらにウェスタンブロッティング法により、GLP-1 受容体および GIP 受容体の蛋白発現を検討した。

(2) 分離培養ヒト気道上皮細胞アポトーシスの検討：poly I:C によるアポトーシス誘導は DNA laddering、DAPI 各染色により評価した。その際に GLP-1 受容体アゴニストである exendin-4 の効果を検討した。

(3) 肺組織のホルマリン固定標本を用いて、免疫組織学的染色により GLP-1 受容体および GIP 受容体の発現を検討した。正常肺組織、慢性閉塞性肺疾患、特発性肺線維症の肺組織をそれぞれ検討評価した。

4. 研究成果

(1) 各種培養細胞でのインクレチン受容体の発現検討：

各種培養細胞において、GLP-1 受容体および GIP 受容体が発現しているか否かについての詳細な検討を行った。ヒト肺腺癌由来の継代細胞 A549 (II 型肺胞上皮細胞のモデル)、気管支上皮由来の不死化細胞 Beas2B、および手術検体より得た正常ヒト気管支上皮細胞と肺線維芽細胞を用いた。各培養細胞より RNA を抽出し、RNA 量を測定した。RT-PCR 法によりそれぞれの mRNA 発現を検討した。GAPDH 発現をコントロールとして用い、RNA 抽出に問題がないことを確認した。その後、GLP-1 受容体および GIP 受容体にそれぞれ特異的なプライマーを用いて発現を検討した。結果として、GLP-1 受容体および GIP 受容体ともに明らかな mRNA 発現は認められなかった。さらに同時に行ったウェスタンブロッティングによるタンパク質レベルでの検討でも、明らかな発現を証明できなかった。

(2) インクレチン関連薬の効果の検討：

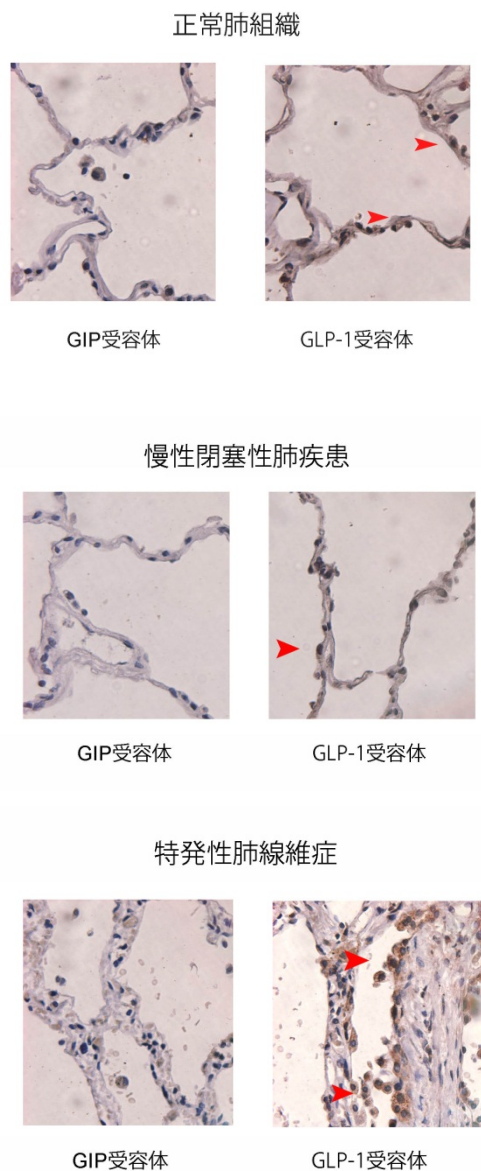
我々は、TLR3 を介したヒト気道上皮細胞のアポトーシスを、インスリンが抑制する事を見出している (Numata T et al. J Immunol. 2011.)。そこで、受容体の発現は明らかでなかったが、インクレチンが気道上皮細胞に対する作用を持ち、インスリンと同様に抗アポトーシス活性を示す可能性を考えて検討を行った。そこで GLP-1 受容体アゴニストである exendin-4 を使用した。分離培養した気道上皮細胞をインスリン非存在下で poly I:C により刺激した。Poly I:C は著明にアポトーシスを誘導したが、exendin-4 にその抑制効果は認められなかった。

(3) 肺組織での検討：

今回の培養細胞の検討では、肺の重要な構成細胞である II 型肺胞上皮細胞に関する検討が十分に行えなかった。また培養系細胞は富栄養状態にあり、各種増殖因子の影響も強く受けている。つまりより生理的な環境下では、肺細胞もインクレチン受容体を発現している可能性を考えた。そこで、免疫組織学的な手法を用いて、肺組織におけるインクレチン受容体の発現を検討した。正常、慢性閉塞性肺疾患、及び特発性肺線維症のホルマリン固定標本を用いて検討を行い、結果 GIP 受容体に関しては、いずれの肺組織においても、また上皮細胞、線維芽細胞含めて明らかな発現を認めなかった。一方 GLP-1 受容体に関しては、正常の肺組織の II 型肺胞上皮細胞で軽度発現を認めた。さらに慢性閉塞性肺疾患の肺組織の II 型肺胞上皮細胞でも軽度発現を認めた。一方、興味深いことに特発性肺線

維症の肺組織では正常及び過形成を起こした II 型肺胞上皮細胞において GLP-1 受容体の高発現を認め、肺線維化進展病態における何らかの役割を示唆する所見と考えた(図 2)。以上検討より II 型肺胞上皮細胞においてのみインクレチン受容体 (GLP-1 受容体) が発現しており、そのことは今後肺におけるインクレチンの役割に関する検討を進める上での重要な知見と考えられた。

(図 2)免疫組織学的検討



(結論)

Toll-like receptor シグナルによる肺傷害に対するインクレチンの役割の解明が本来の検討課題であった。しかしながら今回使用した各種培養細胞ではインクレチン受容体の発現が十分に証明出来なかった。そのため細胞培養実験系では、インクレチン作用機序の検討が十分には行えなかった。実際、培養

気道上皮細胞を用いたアポトーシスの実験系では、GLP-1 受容体アゴニストの効果は全く認められなかった。一方肺の免疫組織学的検討の結果では、II 型肺胞上皮細胞においてのみ GLP-1 受容体が発現していた。このことは培養細胞系でも正常な II 型肺胞上皮細胞のみが GLP-1 受容体を発現する可能性を示唆する。つまり今後インクレチン作用機序を培養細胞系で検討するには、II 型肺胞上皮細胞を用いる必要があることが明らかになった。また肺線維症組織の II 型肺胞上皮細胞における GLP-1 受容体の高発現は、II 型肺胞上皮細胞の過形成や、さらには線維化進展の機序を解明する上で、インクレチンの関与を示唆する非常に興味深い知見であり、今後のさらなる検討が必要と思われた。

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 2 件)

- ① Fujii S, Hara H, Araya J, Takasaka N, Kojima J, Ito S, Minagawa S, Yumino Y, Ishikawa T, Numata T, Kawaishi M, Hirano J, Odaka M, Morikawa T, Nishimura SL, Nakayama K, Kuwano K. Insufficient autophagy promotes bronchial epithelial cell senescence in chronic obstructive pulmonary disease. *Oncoimmunology*. 2012 Aug 1;1(5):630-641. 査読あり
- ② Kojima J, Araya J, Hara H, Ito S, Takasaka N, Kobayashi K, Fujii S, Tsurushige C, Numata T, Ishikawa T, Shimizu K, Kawaishi M, Saito K, Kamiya N, Hirano J, Odaka M, Morikawa T, Hano H, Arai S, Miyazaki T, Kaneko Y, Nakayama K, Kuwano K. Apoptosis inhibitor of macrophage (AIM) expression in alveolar macrophages in COPD. *Respir Res* 2013, 14:30 査読あり
doi: 10.1186/1465-9921-14-30.

[学会発表] (計 3 件)

- ① 日本呼吸器学会学術講演会
2011 年 4 月 22-24 日
- ② European Respiratory Society. Annual Congress, *Amsterdam*. 2011.
- ③ American Thoracic Society International Conference. *San Francisco*. 2012.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沼田 尊功 (Numata Takanori)
東京慈恵会医科大学・医学部・助教
研究者番号：30366257

(2) 連携研究者

なし