

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 4 日現在

機関番号：82504

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25860636

研究課題名(和文)特発性肺線維症の原因としての抗V型コラーゲン自己免疫および胃食道逆流症の関与

研究課題名(英文)The role of auto-immune antibody for collagen type V with gastroesophageal reflux disease for the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis

研究代表者

岩田 剛和 (Takekazu, Iwata)

千葉県がんセンター(研究所)・呼吸器外科・主任医長

研究者番号：30586681

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではIPFは逆流性食道炎が原因で発生した肺間質傷害の修復過程で露出したcol(V)に対し自己免疫が生じることで発症する」との仮定の下、疫学調査や動物GERDモデルでのIPF発症を明らかにし、根治療法を開発することを目的とした。当院で手術を施行した肺癌患者のデータから、GERDの有病率は間質性肺炎を有さない肺癌患者ではIPF合併肺癌患者ではGERDの有病率が4倍以上と有意に高い事が分かった。またヒトIPF肺における解析ではcol(V)、IL17Aの発現上昇は認めなかったが、マイクロアレイ解析では、GERD合併IPF症例に発現上昇を認めたものとして、TNF関連のサイトカインが抽出された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to investigate the correlation of idiopathic pulmonary fibrosis(IPF) and auto-immune antibody for collagen type V (col(V)) with gastroesophageal reflux disease(GERD). We hypothesized that IPF was correlated to the auto-immune antibody for col(V) driven by lung stromal tissue damage and remodeling caused by GERD. The analysis of the patients who undertaken lung cancer surgery in our institution revealed that the IPF patients have four times more GERD than non-IPF patients (Fisher exact test  $p=0.013$ ). The col(V) and IL17A does not overexpressed in the lung of IPF in mRNA expression levels. The DNA microarray analysis proven TNF signaling pathway including CXCL1, CXCL2, CXCL3 in IPF with GERD specifically.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：特発性肺線維症 逆流性食道炎 GERD

### 1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) は年々増加する予後不良の難治性疾患であり、その原因は不明で胃食道逆流症 (GERD) による微量誤嚥 (micro aspiration) の関与が疑われている。根治療法はなく、抗線維化作用を有する pirfenidone が進行を遅らせる唯一の治療薬である。一方、IPF の肺線維化過程で増生する肺内 extracellular matrix 中の V 型コラーゲン (col(V)) は、肺移植での知見から自己免疫抗原となることが示唆されている。

### 2. 研究の目的

本研究では「IPF は GERD が原因で発生した肺間質傷害の修復過程で露出した col(V) に対し自己免疫が生じることで発症する」との仮定の下、動物 GERD モデルでの IPF 発症を明らかにし、col(V) に対する自己抗体の産生や pirfenidone の作用機序を明らかにして根治療法を開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### ①疫学調査：

当院のデータベースを用いて 2008 年から 2016 年の間に手術を施行した肺癌患者において、IPF 合併肺癌 82 例と間質性肺炎を有さない肺癌患者 1183 例の GERD の有病率を比較した。

#### ② 検体を用いた検査：

##### 1.動物モデルでのIPF発症の有無

近交系マウス(C57BL/6, 7~10 週齢)を用いて逆流性食道炎のモデルの作成を試みた。以

前より使用している実験機器を用い

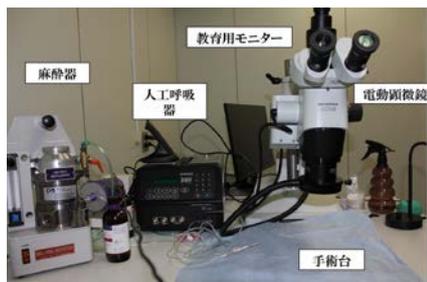


図 1.実験機器

て(図 1)、エラストー針を用いた気管挿管によ

り、セボフルレンによる麻酔維持を行いながら、開腹、また既存の報告を参考に食道と空腸の吻合を試みた。吻合は 10-0 ナイロンによる消化管吻合を行った。また肺の評価は CT(ラシータ LCT200)にて行う予定とした。

##### 2.ヒト、動物検体での自己抗原 (col(V)) 発現量 (Real time-PCR法, microarrayによる遺伝子発現解析)

当院にて手術を施行した肺癌患者の凍結肺検体(非癌部肺組織)を用いて、IPF肺(n=6)、非 IPF肺(n=7)に対し、RT-PCR法による col(V)(COL5A1),IL17に対する遺伝子発現解析を行った。またGERD合併IPF症例における特異的に発現している遺伝子を探索するため、網羅的遺伝子解析を目的としてGERD合併IPF肺(n=2)、GERD非合併IPF肺(n=1)、controlとして非喫煙者健常肺(n=1)に対し、Agilent Gene Expression Array®を用いた遺伝子発現解析を行った。

### 4. 研究成果

#### ①疫学調査

GERD の有病率は間質性肺炎を有さない肺癌患者では 11 例/1182 例(0.9%)に対し、IPF 合併肺癌患者では 4 例/82 例(4.9%)であり、IPF 合併肺癌患者では GERD の有病率が 4 倍以上と有意に高い結果であった。(Fisher exact test p=0.013)

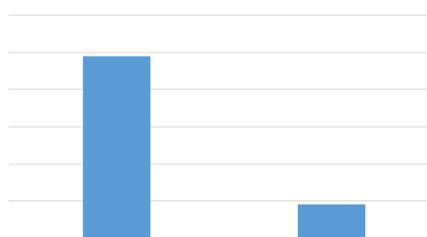


図 2. IP 合併肺癌症例の GERD 有病率

## ②検体を用いた検査

### 1.動物モデルでの IPF 発症の有無

消化管吻合に関しては成功し(図 2)、抜管までは可能であったが、結果的に2日以上長期生存を得ることができなかった。食道空腸吻

合ではなく、胃の噴門部を切除、食道胃吻合を行った

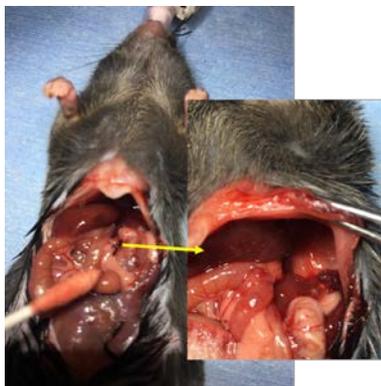


図 3. 食道空腸吻合

GERD モデルの作成も試みたが、結果は同様であった。死因の原因は明らかではないが、既存の報告でも生存率は2,3割との事であり、死因は開腹に侵襲によるものと考えられた。ラシータ LCT200 を用いた CT 撮影はコントロールの sham に対しては肺野を明瞭に描出

する事が出来たが(図 3)、GERD モデルに関しては長期生存が得られず、撮影が不可能であった。



図 4. マウス胸部 CT 像

### 2.ヒト、動物検体での自己抗原 (col(V)) 発現量 (Real time-PCR法, microarrayによる遺伝子発現解析)

a) IPF 肺における col(V), IL17A の Real time=PCR 法による発現解析

IPF 肺(n=6), 非 IPF 肺(n=7)における COL5A1, IL17A の発現に関しては有意差を認めなかった。COL5A1に関しては IPF 肺において高発現を認める症例もあったが、IL17Aに関しては発

現自体を確認する事ができなかった。

b) IPF 肺検体を用いた microarray 解析

microarray 解析にて、IPF 症例において発現上昇(controlを1とした signal 比2以上)していたものは Gene Ontology(GO) 解析では immune response の他、endothelial cell proliferation, cellular response to interleukin-1, cellular response to tumor necrosis factor などの GO term を持つ遺伝子群が抽出され、KEGG 解析では Cytokine-cytokine receptor interaction の pathway にある遺伝子群が抽出された。さらに GERD 合併症例のみで発現上昇を認めた遺伝子群の解析では GO term では response to lipopolysaccharide, positive regulation of smooth muscle cell proliferation などが抽出され、KEGG 解析では TNF signaling pathway の遺伝子群が抽出され(図 5)、具体的には CXCL1, CXCL2, CXCL3等が抽出された。

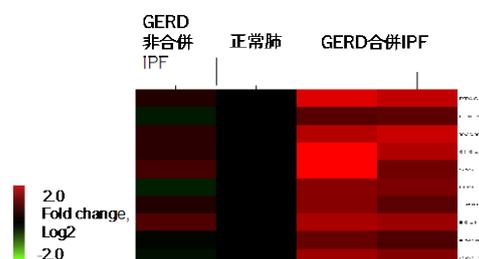


図 5. TNF signaling pathway

(今後の展望)

疫学調査では IPF 症例では有意に GERD の有病率が高かった。臨床検体からは仮説のように、Col(v)の発現率に差は生じなかったが、網羅的解析にて GERD 合併 IPF 症例では複数のサイトカインやケモカインの特異的上昇を認め、これらの遺伝子群が IPF 発症に関連している可能性が示唆された。発現解析では RNA 品質が保たれている事が重要であり、過去の大半の症例では RNA の分解が進んでしまっており、ピルフェニドンの効果に関しては遺伝子学的に検討する事ができなかった。今後は

前向きな症例収集による解析が重要と考えられた。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩田剛和 (Takekazu Iwata)

千葉県がんセンター(研究所)

呼吸器外科・主任医長

研究者番号: 30586681

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

( )