

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860665

研究課題名(和文)特発性肺線維症におけるwnt/ cateninの関与の解明

研究課題名(英文)Elucidating WNT/Bcatenin in idiopathic pulmonary fibrosis

研究代表者

小田 桂士(Oda, Keishi)

産業医科大学・医学部・修練指導医

研究者番号：00625527

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々はブレオマイシンマウスを用いてWNT10AとTGF- β の発現を評価し、細胞実験ではTGF- β あるいはブレオマイシンとWNT10Aの相互関係を評価した。さらに外科的肺生検が実施されたIPF患者におけるWNT10A発現と予後の検討を行った。

ブレオマイシンマウスではWNT10AとTGF- β の発現は亢進していた。リアルタイムPCRおよびルシフェラーゼレポーターアッセイではTGF- β によるWNT10AとTGF- β の発現を確認した。WNT10A陽性のIPF患者では予後不良であり、急性増悪発症予測因子であった。

WNT10AはTGF- β を介した線維化に重要な役割を担っており、急性増悪の予測因子になり得る。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the expression of WNT10A and TGF- β in bleomycin (BLM)-treated mice and the interactions between TGF- β or BLM and WNT10A in vitro. Additionally, we investigated IPF patients who underwent video-assisted thoracoscopic surgery to determine whether the WNT10A expression is related to the survival.

Increased WNT10A and TGF- β expressions were noted in the BLM-treated mice. Real-time PCR and luciferase reporter assays demonstrated the levels of WNT10A and collagen in the fibroblasts cells to increase after TGF- β administration. A Kaplan-Meier survival analysis demonstrated a tendency toward a poor survival among the IPF patients with a WNT10A-positive expression compared to those with a negative expression. An overexpression of WNT10A was found to be significantly predictive of an acute exacerbation of IPF (AE-IPF).

WNT10A plays an important role in the pathogenesis of IPF via TGF- β activation and it may also be a sensitive predictor for the onset of an AE-IPF.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：特発性肺線維症 線維芽細胞 WNT/ β -catenin signaling 急性増悪

1. 研究開始当初の背景

特発性間質性肺炎は厚生労働省が実施する難治性疾患克服研究事業の対象指定疾患であり，その中でも特発性肺線維症(IPF)は最も頻度が高く，平均不良疾患である。死亡原因は急性増悪が最も多く，国際的にその存在が認知されている。しかし，急性増悪の病態は複雑であり，今なお治療に難渋する。そのため，メカニズムの解明やバイオマーカーの開発が期待されていた。WNT/ β -catenin シグナルは 1980 年代に乳癌の癌遺伝子としてクローニングされて以降，癌や線維化などの病態において関与していることが次々に判明し，WNT 遺伝子に注目とした難治性疾患の病態解明が期待されている。

2. 研究の目的

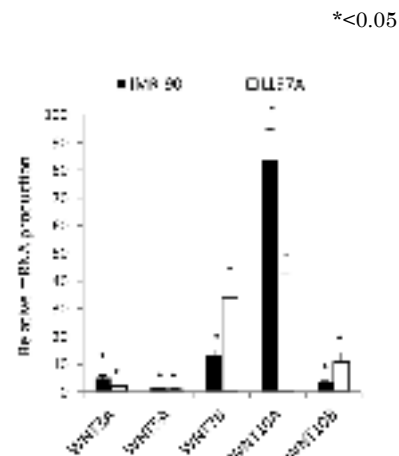
我々は，細胞の分化・増殖という観点で WNT/ β -catenin シグナルに注目し，IPF における線維化の機序ならびに急性増悪における WNT/ β -catenin シグナルの関与について解明することを目的とした。

3. 研究の方法

まず C57BL/6 を用いて，ブレオマイシン肺臓炎モデルマウスを作成し，肺内における WNT 遺伝子の発現ならびに局在について調べた。さらに，ヒト線維芽細胞(LL97A, IMR-90)を用いて，線維化を促進させるサイトカインである TGF- β 1 と WNT/ β -catenin シグナルの関連について検討を行った。また，外科的肺生検によって UIP (Usual Interstitial Pneumonia)の組織診断が得られた IPF 患者 30 名を対象とし，WNT/ β -catenin シグナルに関連したタンパク質の免疫染色を行うことで，発現程度と予後の関連について検討を行った(倫理委員会番号：H26-004)。

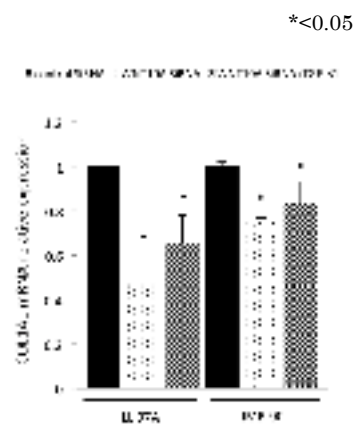
4. 研究成果

C57BL/6 を用いたブレオマイシン肺臓炎モデルマウスでは，線維芽細胞の細胞質に WNT10A が発現していることを確認した。また，ヒト線維芽細胞(LL97A, IMR-90)に対し TGF- β 1(5ng/ml)で刺激を行ったところ，WNT ligands のうち WNT10A が最も強く誘導された(Fig.1)。また，ルシフェラーゼレポーターアッセイを用いて，転写調節領域での活性も確認した。



(Fig. 1: TGF- β 1 による WNT 10A 誘導)

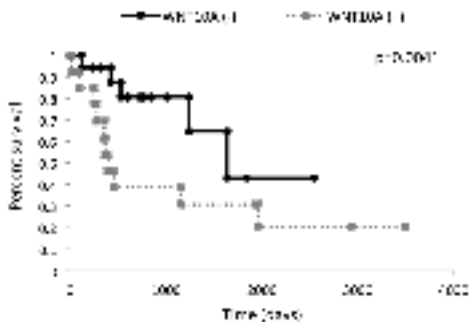
さらに，SiRNA で特異的に WNT10A の発現を阻害することで，細胞外基質の産生が抑制された(Fig.2)。



(Fig.2: WNT10A SiRNAによるCOL1A1抑制)

IPF 患者における肺内の WNT10A 発現は，*in vivo* の実験と同様に線維芽細胞で発現が確認されたが，染色程度は症例毎に異なっていた。そのため，染色程度によって

陽性群と陰性群の2群に分け、 Kaplan-Meier 生存曲線を示すと WNT10A 陽性群で明らかに予後不良であった(Hazard ratio 5.351, p=0.0041)(Fig.3)。



(Fig.3: WNT10A 発現と IPF の予後)

また、WNT10A 発現は急性増悪の発症と関連していることが判明した(Odds ratio 13.69, p=0.013)。

IPF では、上皮間葉系移行(epithelial mesenchymal transition: EMT)により活性化した線維芽細胞が細胞外基質を大量に産生することで最終的に呼吸不全に陥る。我々は、WNT ligands の中でも特に WNT10A が線維芽細胞に恒常的に発現していることを確認し、さらに TGF- β 1 の刺激によって細胞外基質の産生を調整していることを示した。このような結果は、EMT に重要な役割を担う TGF- β が Smad 依存性経路以外の線維化メカニズムの存在を示唆する。特に WNT10A は、これまでも細胞増殖を中心とした多くの機能を有していることが報告されていることから、WNT/ β -catenin シグナルの特異的な阻害は、IPF における創薬につながる可能性があるだけでなく、急性増悪の発症にも関与している可能性が示唆された。以上のことから本研究成果は、特発性肺線維症における新たなエビデンスの構築に貢献できるものと考えられる。

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 5 件)

Oda K, et al. Profibrotic role of WNT10A via TGF- signaling in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Research*. 2016 Apr 12;17:39. (10 人, 1 番目) (査読有)

Oda K, et al. Autopsy analyses in acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Research*. 2014 Sep 1;15:109. (16 人, 1 番目) (査読有)

Noguchi S, Yatera K, Wang KY, Oda K, et al. Nitric oxide exerts protective effects against bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Respiratory Research*. 2014 Aug 5;15:92. (13 人, 4 番目) (査読有)

Oda K, et al. High-resolution CT scoring system-based grading scale predicts the clinical outcomes in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respiratory Research*. 2014 Jan 30;15:10. (16 人, 1 番目) (査読有)

小田桂土, 他: 特発性肺線維症における WNT/ β -catenin シグナルの関与. 厚生労働科学研究委託業務 難治性疾患実用化研究事業 びまん性肺疾患に対するエビデンスを構築する新規戦略的研究 平成 26 年度研究報告書; 137-140, 2015. (5 人, 1 番目) (査読無)

[学会発表](計 4 件)

小田桂土, 他: 特発性肺線維症における WNT10A 発現とその意義 ~急性

増悪との関連～．第 112 回日本内科学
会講演会（2015.4.10-10，みやこめっ
せ，京都府京都市）

小田桂士，他：特発性肺線維症におけ
る WNT10A の関与 .第 18 回間質性肺
炎細胞分子病態研究会（2015.8.22，砂
防会館別館，東京都千代田区）

小田桂士，他：特発性肺線維症におけ
る WNT/ β -catenin シグナルの関与 .
厚生労働科学研究委託業務難治性疾
患実用化研究事業 びまん性肺疾患
に対するエビデンスを構築する新規
戦略的研究班 第 2 回班会議総会
（2014.12.13，大正製薬（株）本社ビ
ル，東京都豊島区）

小田桂士，他：特発性肺線維症(IPF)
の急性増悪における WNT/ β -catenin
signaling の関与 . 第 23 回
PneumoForum（2014.11.22，経団連
会館，東京都千代田区）

6．研究組織

(1)研究代表者

小田 桂士 (ODA, Keishi)

産業医科大学医学部 修練指導医

研究者番号：00625527