

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461202

研究課題名(和文) 肺線維化病態におけるmTOR-SPARC経路の解明と新規バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) The role of mTORC2-SPARC pathway in the pathogenesis of pulmonary fibrosis

研究代表者

吾妻 安良太 (Azuma, Arata)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：10184194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はmTORC2シグナルの肺線維化病態における関与について検討した。内因性のmTORC2抑制ペプチドであるXPLNに着目し、その下流にある線維化のメディエーターであるSPARC発現への関与を検討したが、siRNAによるXPLNのノックダウンでmTORC2が活性化し、SPARCの発現は増加した。HDAC inhibitor (HDACi)はXPLNのup-regulationを通じてmTORC2を抑制し、TGF- $\beta$ 1誘導のSPARC発現を抑制した。以上よりXPLN-mTORC2経路の肺線維化病態への関与が明らかになり、HDACiによる同経路の抑制が有効な治療戦略になる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) remains unclear. SPARC is a matricellular protein, whose expression is regulated by TGF- $\beta$ 1 through activation of mTORC2. Exchange factor found in platelets, leukemic, and neuronal tissues (XPLN) is an endogenous inhibitor of mTORC2. Herein, we investigated the regulatory mechanisms of XPLN in human lung fibroblasts. XPLN depletion stimulated SPARC expression and Akt phosphorylation on Ser473. TGF- $\beta$ 1 treatment down-regulated XPLN via Smad 2/3. XPLN mRNA expression was up-regulated upon treatment with HDAC inhibitors in a concentration-dependent manner, and TGF- $\beta$ 1-induced SPARC expression was reversed by entinostat treatment. mTORC1 inhibition by rapamycin and Raptor depletion stimulated SPARC expression. These findings may help uncover the regulatory mechanisms of the mTORC2-SPARC axis. The up-regulation of XPLN by HDAC inhibitors may be a novel therapeutic approach in patients with IPF.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：mTORC2 XPLN SPARC IPF HDAC inhibitor

1. 研究開始当初の背景

(1) 特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis; IPF) は肺間質の線維化と共に進行性に呼吸機能の低下を来す呼吸器難病であり、診断からの生存期間の中央値は 2.5~3.5 年である。IPF の病態には不明な部分が多いが、様々な要因による肺胞上皮細胞の障害に引き続いて起こる組織修復不全が想定され、筋線維芽細胞の異常な増殖から細胞外基質の過剰な沈着が起こり、線維化が進行するものと推定されている。現在作用機序の異なる 2 つの抗線維化薬 (ピルフェニドン、ニンテダニブ) が使用可能となったが、いずれも肺活量の低下抑制が主たる作用であり、疾患の進行を完全に停止せしめるものではないのが現状である。このため肺線維化病態の解明のための基礎研究と、さらなる薬剤の開発は喫緊の課題である。

(2) Mammalian target of rapamycin (mTOR) はセリン/スレオニン キナーゼであり、細胞の生存、増殖、代謝などに関与する重要な因子である。mTOR の機能不全は、癌や糖尿病などの様々な疾患に関与することが報告されている。哺乳類では、mTOR は構成要素の違いにより、mTORC1 と mTORC2 の二つがある。mTORC1 はラパマイシンにより抑制されるが、近年 mTORC2 も同時に抑制する MLN0128 や pp242 などの dual mTOR inhibitors が開発された。これらの化合物が、mTORC2 の下流にある線維化のメディエーターを抑制し、抗線維化作用を有する可能性が Chang らにより報告されている<sup>1)</sup>。

Secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC) は線維化のメディエーターとして働いており、SPARC の抑制は線維化を軽減させることが知られている。Chang らは IPF 患者由来の肺線維芽細胞において、SPARC が過剰発現している事を報告している<sup>2)</sup>。しかしながら mTORC2 を特異的に抑制する物質は現在利用することができないため、下流に存在する因子との関連を直接検討する事ができない。

Exchange factor found in platelets, leukemic, and neuronal tissues (XPLN) は mTORC2 を特異的に抑制する内因性のペプチドとして最近報告された<sup>3)</sup>。mTORC2 に特異的な阻害剤が無い現状では、XPLN の様な内因性の阻害因子を利用することによって mTORC2 の働きを検討することは有用な手段と考えられる。

2. 研究の目的

(1) XPLN の作用を通じて mTORC2 と肺線維化病態との関連を明らかにし、IPF の新たな治療戦略を模索することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 肺線維芽細胞として、human fetal lung fibroblast (HFL-1 cell) を使用。XPLN に対

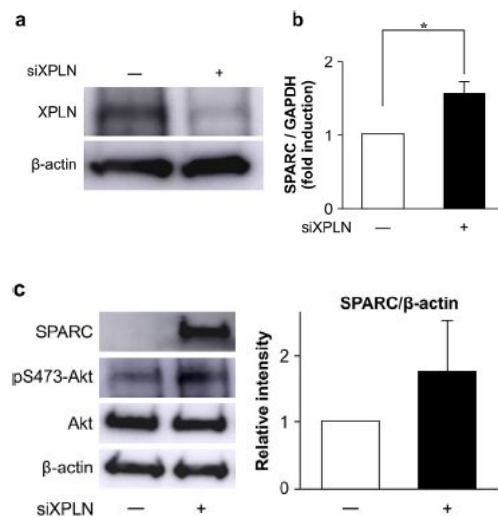
する small interfering RNA (siRNA) を用いてこれらをノックダウンし、下流に発現する分子への影響を検討した。分子の発現の変化は Real-time PCR と western blotting を用いて mRNA と蛋白のレベルで確認した。また SPARC の蛍光免疫染色も行った。Hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) は ADHP を用いて測定した。さらに TGF-β1 や histone deacetylase (HDAC) inhibitors の XPLN 発現への影響を検討した。また rapamycin や Raptor に対する siRNA を用いて mTORC1 を抑制する事により、mTORC2 活性化への影響を検討した。

4. 研究成果

(1) XPLN のノックダウンによる下流のメディエーターへの影響

まず初めに siRNA を用いて XPLN をノックダウンした (図 1a)。XPLN のノックダウンにより、SPARC の発現は mRNA レベルで有意に増加し (図 1b)、蛋白レベルでも増加が確認された (図 1c)。さらに Akt の S473 におけるリン酸化も確認された (図 1c)。

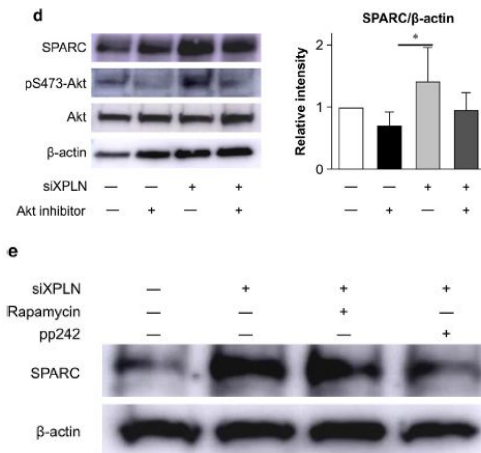
図 1 a-c XPLN のノックダウン



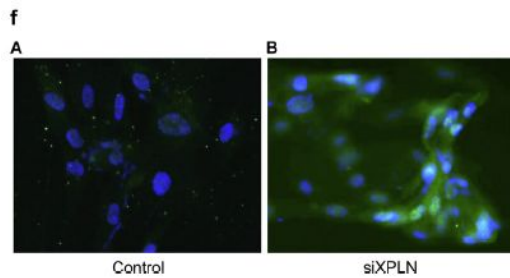
次に本作用が mTORC2 の活性化により起こっているのかを確認するために、HFL-1 細胞を Akt 阻害剤で前処理した。Akt 阻害剤により、Akt のリン酸化は抑制され、SPARC の発現も低下した (図 1d)。さらに siXPLN の作用は rapamycin では抑制されず、dual mTOR inhibitor である pp242 で抑制が確認されたため、mTORC2 の関与が示唆された (図 1e)。SPARC の蛍光免疫染色でも siXPLN による発現の増加が確認された (図 1f)。

また SPARC の下流には H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> があるが、siXPLN により増加した (図 2a)。XPLN のノックダウンによる mTORC2 活性化の効果を模式図に示す (図 2b)。

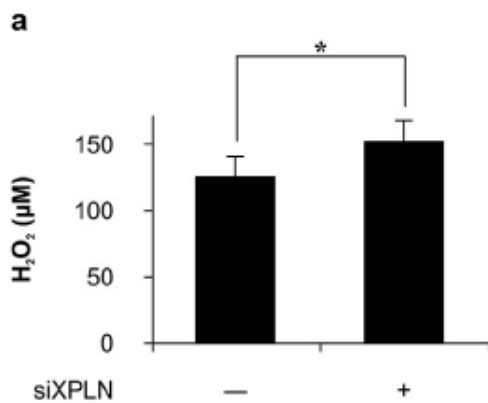
**図1 d-e mTORC2 活性化に対する Akt 阻害剤と dual mTORC2 inhibitor の効果**



**図1 f SPARC の蛍光免疫染色**



**図2 a siXPLN による H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の増加**



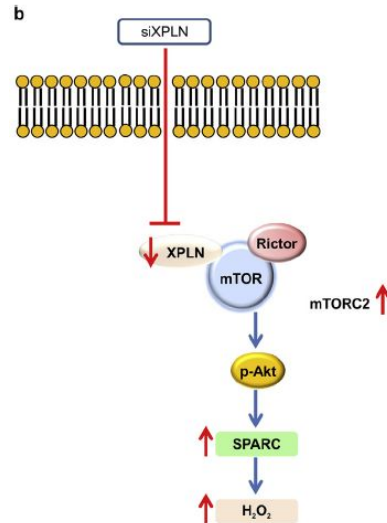
**(2) TGF-β1 による XPLN の発現抑制効果**

TGF-β1 により mTORC2 が活性化され下流にある SPARC の発現が増加する事から、TGF-β1 による XPLN の発現制御について検討した。TGF-β1 は mRNA と蛋白レベルで XPLN の発現を有意に抑制した (図3 ab)。さらにこの制御には Smad pathway が関与する事が確認された (図3 c)。

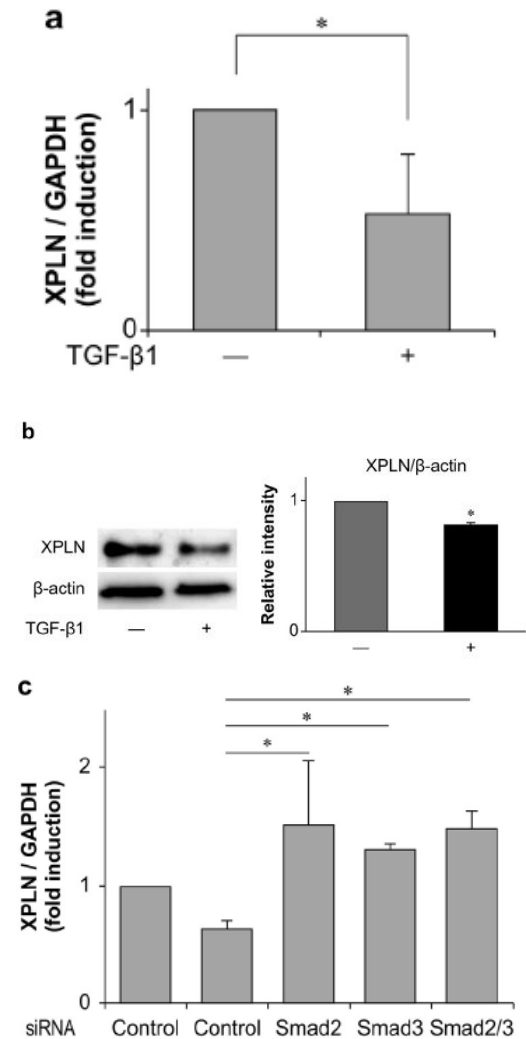
**(3) HDAC inhibitor (HDACi) による XPLN の発現制御に関する検討**

単球系の細胞株である U937 で、HDACi である MS275 で XPLN の発現が誘導される事が報告されている。われわれは HDACi である MS275 (entinostat) と SAHA

**図2 b siXPLN による mTORC2 活性 (図)**



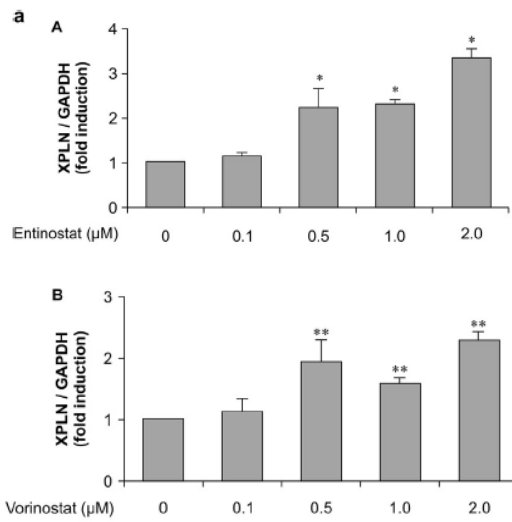
**図3 a-c TGF-β1 による XPLN の制御**



(vorinostat) を用いて HFL-1 細胞における XPLN の発現への影響を検討した。Entinostat と vorinostat は HFL-1 において濃度依存性に XPLN の発現を有意に増加さ

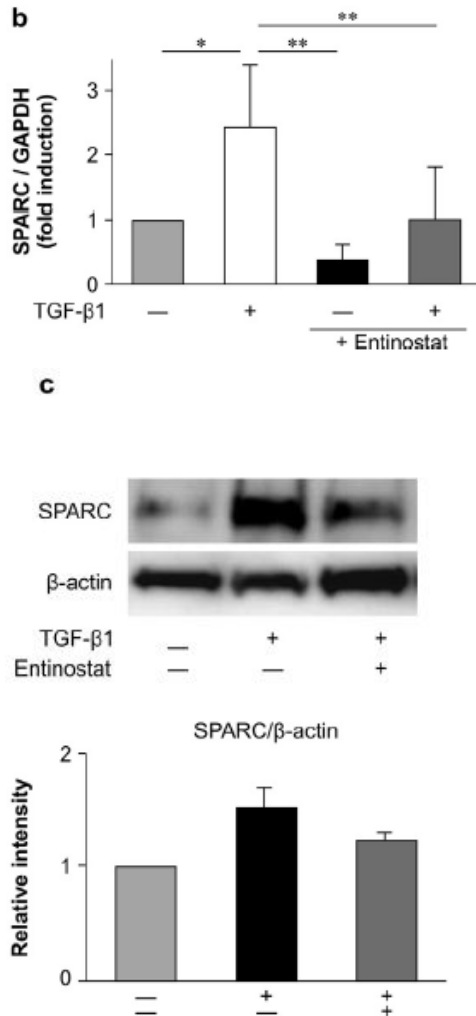
せた (図4a)。

**図4a HDAC i による XPLN の発現制御**



Entinostat で前処理した細胞に TGF-β1 を作用させた所、SPARC の mRNA の発現は無処理群に比べて有意に抑制された (図4b)。この傾向は蛋白レベルでも確認された (図4c)。

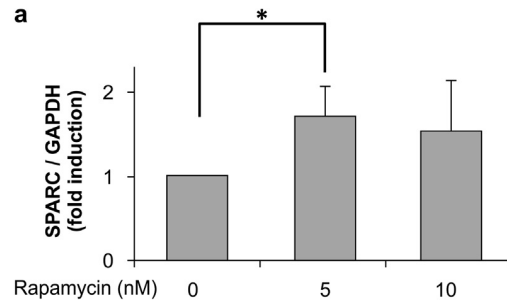
**図4b-c TGF-β1 誘発 SPARC 発現に対する HDACi の抑制効果**



**(4) mTORC1 と mTORC2 のクロストークの関係**

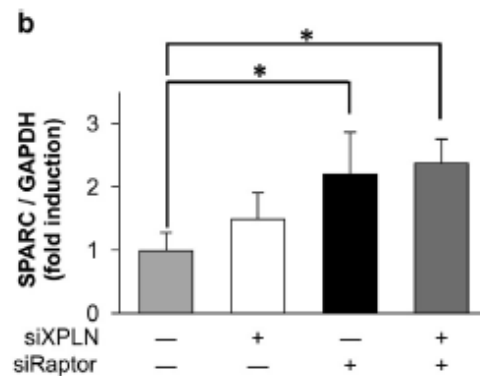
最後に mTORC1 の抑制が mTORC2 活性に及ぼす影響を検討した。定常状態においては mTORC1 は S6K1 を介して mTORC2 活性を抑制している (図5e 水色線)。Rapamycin で mTORC1 を抑制した所、このネガティブフィードバックループが抑制され、SPARC 発現が有意に上昇した (図5a)。

**図5a Rapamycin による SPARC 発現の増加**



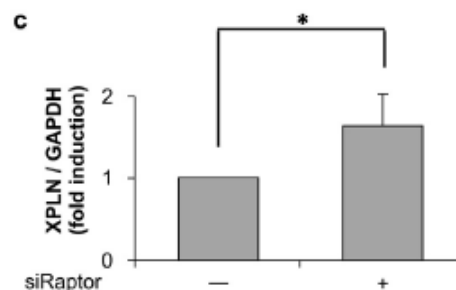
次に Raptor のノックダウンを試みた。siRaptor により SPARC の発現は有意に増加した (図5b)。Raptor と XPLN の co-knockdown では SPARC 発現に対する相乗効果が予想されたが、変化は見られなかった (図5b)。

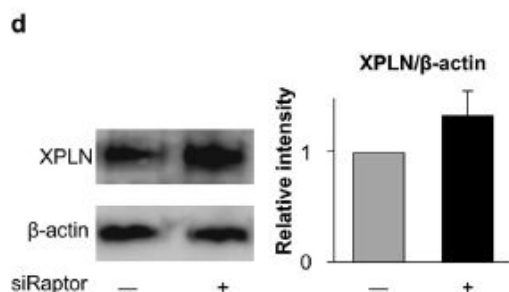
**図5b Raptor と XPLN の co-knockdown**



このため Raptor のノックダウンによる XPLN への影響を検討した所、XPLN は mRNA と蛋白レベルで増加が認められた。(図5c-d)。

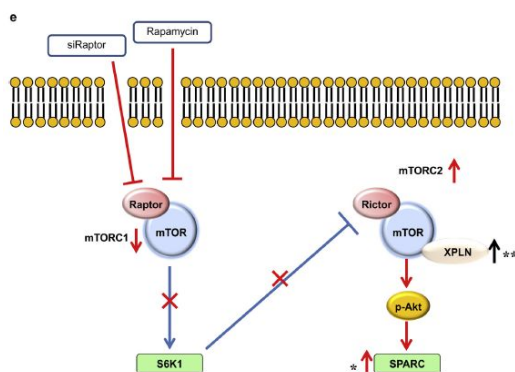
**図5c-d siRaptor による XPLN への影響**





siRaptor による XPLN の発現増強は、mTORC2 活性化に伴いそれを抑制しようとする調節機構と考えられた ( 図 5 \*\* )。

**図 5e** mTORC1 と mTORC2 のクロストーク



**( 5 ) 得られた成果の位置づけと今後の展望**

本研究では、内因性の mTORC2 inhibitor である XPLN を用いることにより、mTORC2 とその下流の SPARC との関連が示され、このシグナル経路が線維化に関与することが示された。さらに HDAC inhibitor による XPLN の up-regulation を通じて、mTORC2-SPARC 経路が制御され得ることが示された。

HDAC inhibitor は抗腫瘍薬として既に臨床応用されており、今回使用した濃度は経口投与された場合の血中濃度と同程度のものである。HDAC inhibitor はプレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスの線維化を抑制する事も示されているが<sup>4)</sup>、HDAC inhibitor による mTORC2 抑制が線維化抑制メカニズムの一つと考えられることより、IPF に対する臨床応用の可能性を模索したい。

尚、本研究は当初、新規の dual mTOR inhibitor の供与を受け、それを用いた研究を行う予定であったが、急きょ供与が受けられない事となり、内因性の mTORC2 inhibitor である XPLN の作用の解明に着目した研究に変更した。

< 引用文献 >

- 1) Chang W, Wei K, Ho L, Berry GJ, Jacobs SS, Chang CH, et al. A critical role for the mTORC2 pathway in lung fibrosis. *PLoS One* 2014;e106155.
- 2) Chang W, Wei K, Jacobs SS, Upadhyay

D, Weill D, Rosen GD. SPARC suppresses apoptosis of idiopathic pulmonary fibrosis fibroblasts through constitutive activation of beta-catenin. *J. Biol. Chem* 2010;285:8196–8206.

3) Khanna N, Fang Y, Yoon MS, Chen J. XPLN is an endogenous inhibitor of mTORC2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2013;110:15979–15984.

4) Sanders YY, Hagood JS, Liu H, Zhang W, Ambalavanan N, Thannickal VJ. Histone deacetylase inhibitor promotes fibroblast apoptosis and ameliorates pulmonary fibrosis in mice. *Eur Respir J* 2014;43:1448–1458.

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 )

Kamio K, Azuma A, Usuki J, Matsuda K, Inomata M, Nishijima N, Itakura S, Hayashi H, Kashiwada T, Kokuho N, Atsumi K, Yamaguchi T, Fujita K, Saito Y, Abe S, Kubota K, Gemma A. XPLN is modulated by HDAC inhibitors and negatively regulates SPARC expression by targeting mTORC2 in human lung fibroblasts. *Pulm Pharmacol Ther.* ( 査読有 ) 2017; 44:61-69.

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

Kamio K, Azuma A, Usuki J, Matsuda K, Inomata M, Nishijima N, Itakura S, Hayashi H, Kashiwada T, Kokuho N, Atsumi K, Yamaguchi T, Fujita K, Saito Y, Abe S, Kubota K, Gemma A. XPLN Negatively Regulates SPARC Expression by Targeting mTORC2 in Human Lung Fibroblasts. *American Thoracic Society.* 2016、米国サンフランシスコ

[ 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

吾妻安良太 (AZUMA, Arata)  
日本医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20465305

##### (2) 研究分担者

神尾孝一郎 (KAMIO, Koichiro)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号：20465305

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

松田久仁子 (MATSUDA, Kuniko)  
日本医科大学・実験助手