

肺線維症・上皮間葉転換を制御するマイクロRNAの探索と新規治療法の開拓



宮崎大学医学部内科学講座神経呼吸内分泌代謝学分野 助教 柳 重久

研究の背景

特発性肺線維症（IPF）は原因不明の肺線維増殖性疾患で、進行性の呼吸不全を来し、予後不良である。急性肺損傷（ALI）は、敗血症など種々の病態を誘因として発症し、急速に重篤な呼吸不全に陥る難治性疾患である。IPFとALIに対する既存の薬物療法に有効性はなく、いずれの疾患も高い致死率を呈することから、両病態の解明と有効な治療法の開発は喫緊の医療課題である。正常肺では、肺胞上皮細胞（AEC）が互いにタイトに結合した強固なバリアーとして存在し、液性成分や蛋白質が肺胞腔内に滲みださないように隔てている。AECの損傷と修復異常がIPFとALIの発症および進展機構に重要とされている。しかしながら、AECバリアーの制御機構や制御分子については明らかにされていない。癌抑制遺伝子PtenはPI3K/Akt経路を負に制御する脂質ホスファターゼである。これまでに、上皮細胞Pten発現の臓器線維化における役割はわかっていない。本研究では、AEC特異的Pten欠損マウスを用いてALI/肺線維症モデルを作成し、ALI/肺線維症発症制御におけるAEC-Ptenの役割を解析した。

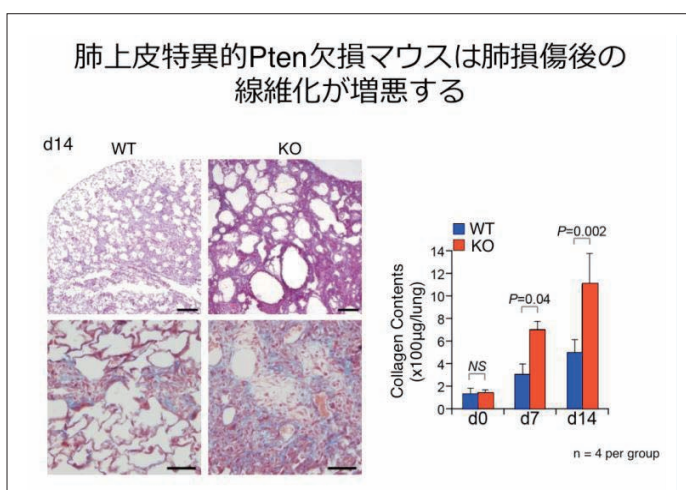
研究成果

1. AECでのPten発現はALIと肺線維症の発症制御に必須である。

AEC特異的Pten欠損マウスと野生型マウスにブレオマイシンを気管内投与した結果、AEC特異的Pten欠損マウスは野生型と比較して著明な低酸素血症により早期に死亡した。Pten欠損マウスの肺組織において広範な肺水腫と肺構築破壊を伴う線維化がみられた。

2. AECでのPten欠損は肺損傷後のAECタイトジャンクション破綻と基底膜破綻を増悪させる。

肺損傷後の肺組織において、アポトーシス細胞数は野生型とPten欠損マウスとで差が見られなかった。一方、電顕像にて肺損傷後Pten欠損マウスのAEC細胞間の解離がみられ、claudin-4, ZO-1, occludin等のタイトジャンクション構成蛋白の発現が低下していた。Pten欠損マウスでは野生型と比較して肺損傷後の基底膜断裂が増悪していた。In vitroの解析について、lentivirusで野生型Pten遺伝子、dominant-negative Pten遺伝子を導入したヒト肺上皮由来細胞BEAS-2Bを作成し、上皮バリアー統合性を経上皮電気抵抗並びにclaudin-4, ZO-1発現にて解析した。野生型Pten遺伝子導入BEAS-2Bはcontrol vectorと比較してTGF-beta処理後の上皮バリアー統合



性保持が増強していたのに対し、dominant-negative Pten遺伝子導入BEAS-2BではTGF-beta処理後上皮バリアー統合性保持が著しく損なわれていた。

3. 肺損傷後修復期でのPten欠失は肺線維化を増悪させる。

Dox誘導性に肺損傷後にAECでPtenを欠損させたマウスでは、肺損傷早期相での肺水腫の程度は野生型と比べて差が無かった一方、ALIの遷延と線維化の増悪がみられた。以上の結果から、急性期のみならず修復期におけるAECでのPten欠損も肺線維症の進展に重要と考えられた。

4. AECでのPten欠損は肺損傷後のAEC由来myofibroblast数を増加させる。

AEC特異的にGFPにて標識したlineage tracingマウスを用いた解析の結果、Pten欠損マウスにおいて肺損傷後にAEC由来myofibroblast数の増加がみられた。

5. AEC特異的Pten欠損マウスにおいて、AEC由来fibroblastsは非AEC由来fibroblastsと比較して増殖能、遊走能、アポトーシス抵抗性が亢進する。

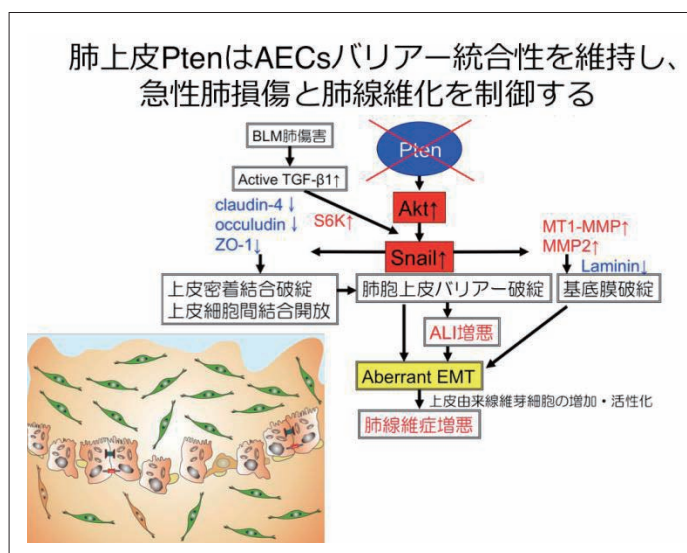
6. AEC特異的Pten欠損マウスにおけるAEC統合性関連分子の発現変化。

AEC特異的Pten欠損マウスの肺組織ならびに単離AECにおいて、AktとS6Kの活性化、SnailとMMP2とMT1-MMPの発現亢進がみられた。

7. Akt阻害剤投与によりAEC特異的Pten欠損マウスの肺損傷後のALIと肺線維化が軽減する。

ブレオマイシン気管内投与Pten欠損マウスに連日Akt阻害剤を腹腔内投与した結果、ALIと肺線維化が軽減し、生存率の改善がみられた。AECバリアー統合性も対照群と比較して保持されていた。

8. IPF患者肺組織のAECにおいてPten発現低下とAkt活性化がみられた。



結 語

AECバリアー統合性の保持、修復はALIやIPFの病態機構の理解にきわめて重要である。今回の我々の解析により、AECでのPten発現が上皮バリアー統合性・修復機構制御を介して、ALIや肺線維症の進展制御に重要な働きを有することが初めて明らかになった。AECでのPI3K/Pten/Akt経路はIPFやALIの治療標的になり得ることが示唆された (Yanagi, et al., *Am J Respir Crit Care Med* 187; 262-275, 2013)。本研究は、平成23年度医学研究奨励助成金のサポートで行うことができました。貴重な援助をいただきました公益財団法人 難病医学研究財団の関係者の皆様、ご寄付をいただいた方々に深く感謝を申し上げます。