

博士論文

肺上皮細胞における mTOR 活性化が肺線維症の病態に及ぼす影響についての解析

齋藤 美奈子

論文のタイトル：

肺上皮細胞における mTOR 活性化が肺線維症の病態に及ぼす影響についての解析

所属：医学系研究科内科学専攻

指導教員名：長瀬 隆英 教授

申請者名：齋藤 美奈子

目次

要旨	3
序文	4
目的	17
方法	18
結果	35
考察	67
結論	79
謝辭	80
引用文献	81

要旨

本研究では、肺上皮細胞特異的活性型 mTOR マウスを用いて、肺上皮細胞における mTOR 経路の役割を直接的に解析した。その結果、活性型 mTOR マウスはブレオマイシンマウスモデルにおいて肺線維化の増悪をきたすことが判明した。さらに網羅的発現解析により mTOR 経路下流に位置する ANGPTL4 を見出し、*in vitro* での解析結果から、mTOR の活性化及び ANGPTL4 がタイトジャンクション脆弱化及び EMT 促進に関与することが示唆された。以上より、肺上皮細胞における mTOR 経路の活性化は肺線維化を促進する因子であり、また ANGPTL4 は肺線維症の治療ターゲットになり得る可能性が示唆された。

序文

1. 特発性肺線維症

特発性肺線維症 (IPF) は原因不明で慢性かつ進行性の経過をたどり、最終的に不可逆的な線維性病変を形成し高度の拘束性換気障害を呈する極めて予後不良な疾患である[1]。本邦での有病率は10万人あたり10人、罹患率は10万人あたり2.23人と報告されている[2]。IPFの薬物治療として知られるピルフェニドンやニンテダニブエタンスルホン酸塩は、2015年国際治療ガイドラインで”条件付き推奨”の位置づけとなっており[3]、努力肺活量の低下抑制効果や急性増悪抑制効果が認められている[4, 5]が、完治は期待できない。生存期間中央値は35か月と非常に予後不良であり[2]、IPFの病態のさらなる解明と、治療薬の早期開発が望まれている。IPFの病態として、様々な慢性刺激による肺胞上皮細胞の傷害と異常修復の進行、II型肺胞上皮細胞から産生されるサイトカイン・ケモカインや増殖因子による上皮間葉転換 (EMT) の進行および線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化・増殖、そしてI型コラーゲンなどの細胞外基質の過剰な沈着によって線維化が形成されると考えられている[6, 7]が、十分に解明されていない点も多い。

1.1 肺胞上皮傷害と肺線維症

肺胞上皮傷害は、タバコ煙・ウイルス感染・大気中の微粒子などの環境因子による慢性刺激や、小胞体ストレス、ミトコンドリア機能異常、テロメア短縮などにより引き起こされる。近年、上皮障害によって生じる II 型肺胞上皮細胞のアポトーシスや integrity の破壊が線維化の起点となることが、明らかとなってきた[8]。肺胞上皮が傷害を受けて細胞間接着が脆弱化することで、毛細管の透過性が亢進してフィブリノーゲンやフィブロネクチンなどのタンパクが間質や肺胞腔に漏出し、Wnt[9]、Sonic hedgehog (Shh) [10]経路の亢進などを介して II 型肺胞上皮細胞が増殖する。さらに線維芽細胞や筋線維芽細胞から分泌亢進された matrix metalloproteinase (MMP) 1 や MMP7 などによって II 型肺胞上皮細胞の遊走が促進され、微小環境で肺胞上皮細胞の異常修復が進行していく[11]。そして II 型肺胞上皮細胞から産生される transforming growth factor (TGF) β 1 や platelet-derived growth factor (PDGF)、tumor necrosis factor (TNF α)、chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL) 12 などの増殖因子やサイトカイン・ケモカインによって線維芽細胞などの間葉系細胞が病巣へ遊走し、増殖・分化が促進すると考えられている[11, 12]。IPF 患者においては、肺胞表面の 90%以上を覆い毛細管と接して主にガス交換を担う I 型肺胞上皮細胞は発現が低下しており、細胞外基質の異常増殖や上皮基底膜の損傷によって、正常肺で見られる II 型肺胞上皮細胞から I 型肺胞上皮細胞への分化も抑制されている[11]。その原因としては、正常な I 型肺胞上

皮細胞に高度に発現している細胞表面受容体であるイムノグロブリンスーパーファミリーである receptor for advanced glycation end products (RAGE) が IPF 患者では低下している[13]ことから、この受容体の欠損によって I 型肺胞上皮細胞と基底膜との結合が脆弱となり、肺胞上皮再生が妨げられている可能性が示唆されている[14]。

肺胞上皮細胞の integrity は、側面はタイトジャンクション、アドヘレンスジャンクション及びデスモソームの 3 種類の細胞間接着装置によって、底面は基底膜により保たれている[15]。タイトジャンクションを構成するタンパクの中で、特に zonula-occludens (ZO-1)、Occludin 及び Claudin-4 は肺上皮細胞に存在し、そのバリア機能や透過性の制御に関与している[16]。ZO-1 は、上皮細胞及び内皮細胞の両方のタイトジャンクションに発現する周辺膜リンタンパク質であり[17]、膜貫通タンパク質である Occludin 及び Claudin に結合して細胞骨格のアクチンに連結させ、これらを架橋している[18]。Vitamin D は肺胞上皮細胞のバリア機能の維持に関与することが示唆されているが、Vitamin D 欠損マウスにおいて lipopolysaccharide (LPS) 刺激により、肺胞上皮間のタイトジャンクションが破壊され上皮透過性が亢進して急性肺障害が増悪したことが報告されており[19]、肺胞上皮間のタイトジャンクションが肺胞上皮細胞の透過性の維持に重要であると考えられる。また、肺上皮特異的 phosphatase and tensin homolog deleted

from chromosome 10 (PTEN) 欠損マウスにおいて、ブレオマイシン刺激によってタイトジャンクション機能が低下し線維化が増悪したと報告されており[20]、肺胞上皮細胞間のタイトジャンクションの脆弱化が肺胞上皮傷害による線維化の増強を促進することが示唆される。また上述の報告では、PTEN がタイトジャンクション機能の維持に関与することが示唆されているが、肺上皮での PTEN の阻害が上皮傷害後の肺胞上皮細胞の修復を促すとの報告もあり[21]、PTEN のタイトジャンクション機能への役割については十分に明らかにはなっていない。

IPF 患者から単離した II 型肺胞上皮細胞のシングルセルシーケンスの結果から、phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K)/Akt や Hippo/Yes-associated protein (YAP)、Wnt、p53、TGF β 経路が活性化していることが報告されており[22]、肺線維化の起点となる肺胞上皮傷害によるエピジェネティックな変化が肺線維化の病態に関与することが示唆されている。

1.2 EMT と肺線維症

肺線維化の病態に深く関与している線維芽細胞や、線維芽細胞が分化した筋線維芽細胞の起源としては、もともと肺間質に存在している間葉系細胞の他に、循環血液中に存在する線維細胞や肺胞上皮細胞からの EMT が挙げられる[23]。これらが IPF の発症、進行、持続にどの程度の割合で関与しているかは不明であ

るが、マウスの肺線維症の実験において、線維芽細胞の約 33%が EMT 由来であるとの報告がある[24]。EMT は、上皮細胞が、細胞接着分子により細胞同士が接着し基底膜との相互作用を保ち細胞極性を持つという上皮細胞の性質を失い、遊走能、浸潤能、アポトーシス抵抗性、細胞外基質の産生増加という間葉系細胞の性質を獲得する生物学的変化である[25]。IPF 患者の肺胞上皮細胞では上皮成分と、 α -smooth muscle actin (α SMA) や N-cadherin などの間葉系マーカーの両者が陽性となっていること[26]、IPF 患者の線維芽細胞で keratin18 などの上皮系マーカーの発現がみられた[27]ことなどから、肺胞上皮細胞が EMT を介して線維芽細胞や筋線維芽細胞の増加に関与し肺線維症の発症に関係していることが示唆されている[11, 28]。また、傷害を受けた上皮細胞の他にも病巣に遊走したマクロファージや活性化された線維芽細胞から分泌される TGF β 、PDGF、Epidermal growth factor (EGF)、Fibroblast growth factors (FGF) -2 や MMP などによっても EMT は促進することが知られている[29]。

一方、EMT を抑制し細胞外基質の沈着や線維芽細胞増殖を抑制する作用をもつタンパクとして Caveolin-1 (Cav-1) が知られている[30]。Cav-1 はカベオラに存在する膜タンパクであり、肺においては上皮細胞・血管内皮細胞・線維芽細胞・平滑筋細胞に存在している[31]。線維芽細胞における mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK/ERK) 経路や c-Jun N-

terminal kinase 1 (JNK) 経路などの細胞内シグナル伝達、signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)の制御や、炎症細胞における C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4)/CXCL12 経路の制御により炎症細胞の肺への遊走を調整するほか、TGF β 受容体のエンドサイトーシスなどにより線維化の抑制に寄与すると報告されている[32]。Cav-1 と PTEN/Akt 経路の関係については、IPF 患者肺の線維芽細胞巣 (fibroblast foci) 内の筋線維芽細胞の細胞膜において Cav-1 の発現低下により PTEN の活性が抑制され、PI3K/Akt 経路が活性化することでコラーゲン重合の負の制御が破綻して、線維芽細胞の増殖が促進することが報告されている[33]。一方で PTEN/Akt 経路が IPF 患者の肺線維芽細胞において Cav-1 の発現を抑制し、線維芽細胞のアポトーシス抵抗性を誘導するという報告[34]もあり、線維芽細胞における Cav-1 の発現と PI3K/Akt 経路の関係については明確ではない。また、生後早期のラットに対する高濃度酸素投与によって引き起こされる肺傷害の病態に、II 型肺胞上皮細胞における Cav-1 が、MMPs や Src チロシンキナーゼを制御することで、タイトジャンクションを構成するタンパクの発現を調整する機序が関与する可能性も示唆されている[35]。IPF 患者の線維性肺組織の線維芽細胞において Cav-1 の発現の著明な低下を認め、ブレオマイシン刺激マウスモデルでカベオリンペプチドの腹腔内投与により肺線維化が抑制されたという報告[31]から、Cav-1 の発現低下は EMT の促進及び肺線維化の進

展に重要であると推察される。

1.3 線維芽細胞と肺線維症

活性化した筋線維芽細胞は、過剰に細胞外基質を産生するだけでなく、angiotensinogen や H_2O_2 などを分泌し肺胞上皮細胞死を起こし、さらに MMP2 や MMP9 などを産生して上皮基底膜を破壊する[36, 37]。正常な創傷治癒過程においては、過剰な筋線維芽細胞はアポトーシスによって除去されるが、IPF の線維芽細胞巢ではこのプロセスが起こらず、IPF 患者の肺胞上皮細胞で主に合成される TGF β 1 や endothelin1 などによって、線維芽細胞のアポトーシス抵抗性が誘導されるとされている[38]。

2. 肺線維症マウスモデル

肺線維症のマウスモデルとしては、ブレオマイシンの他にシリカ、アスベストや放射線などを用いたモデルが確立している。しかし、これらのモデルは、肺線維化が完成するまでの期間や、エアロゾル化する装置の費用、また線維化の分布が典型的な IPF の画像所見である usual interstitial pneumonia (UIP) パターンと異なるなど問題点が多い。一方でブレオマイシン刺激マウスモデルは、肺線維化が永続的ではなく刺激後約 6 週間で組織修復をきたす[39]ものの、安価で簡便であ

り、後述するように線維化が完成するまで 2 週間と短期であり、さらに刺激後早期での分子学的メカニズムが IPF の急性期と最も類似している点などから、IPF の病態、予後、治療などの研究において頻用されてきた。線維化形成のメカニズムとしては、ブレオマイシン刺激後第 1~3 日で上皮細胞傷害が起こり、その後第 3~9 日にかけて炎症細胞浸潤が起こり、線維芽細胞の活性化、細胞外マトリックスの沈着が進み、第 14 日目頃をピークに分子・病理レベルで線維化が完成するとされている[40]。

3. mTOR の機能

肺線維化の過程に関与する因子は前述の様に多岐にわたっているが、近年 IPF 患者のゲノムワイド関連解析 (GWAS) において、mechanistic target of rapamycin (mTOR) の構成タンパク質で mTOR 結合阻害タンパク質である DEP domain-containing mTOR-interacting protein (DEPTOR) が新たな IPF 発症の原因遺伝子の一つである可能性が報告され[41]、mTOR 経路の活性化が肺線維症の病態に寄与することが示唆されてきている。また mTOR 経路は、肺胞上皮傷害をきたすブレオマイシン刺激により線維芽細胞において活性化が報告されている[42]ほか、大気中の微粒子であり慢性的な吸入により肺線維化をきたすカーボンブラックにより気道上皮細胞において mTOR 経路が活性化することも報告されており

[43]、IPF 患者肺においては、細胞傷害によって肺胞上皮細胞においても mTOR 経路が活性化され、線維化を促進していると推察される。

TOR は、免疫抑制剤・抗腫瘍薬として知られていたラパマイシンが細胞内で 12kDa FK506 binding protein (FKBP12) と結合して複合体を形成し、この複合体が結合する細胞内標的タンパク質として、1991 年に酵母で、1994 年に哺乳類で同定された[44]。mechanistic TOR (mTOR) は PI3-kinase related kinase (PIKK) ファミリーに属するセリン・スレオニンキナーゼであり、サブユニット構成の異なる mTOR complex1 (mTORC1) と mTORC2 の独立したタンパク複合体を構成し (Figure 1A)、シグナル経路は非常に複雑である (Figure 1B) [45, 46]。mTORC1 は TNF α などの増殖因子やアミノ酸などの栄養源により正に、低酸素、DNA 損傷などの環境ストレス条件により負に制御される。そして、mTORC1 の代表的な基質である翻訳開始因子 eIF4E-binding protein 1 (4E-BP1) や S6 kinase 1 (S6K1) のリン酸化を介して、mRNA 翻訳の調整や、リソソームの生合成、脂質・核酸・糖代謝、オートファジーの制御に関与している[45]。一方で、増殖因子刺激などにより receptor tyrosine kinases (RTKs : 受容体型チロシンキナーゼ) が活性化されると、PI3K が細胞膜直下にリクルートされ、触媒サブユニットの p110 α を介して膜に存在する phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) が PIP3 にリン酸化されることで、mTORC2 の主な基質である Akt、serum and glucocorticoid induced

protein kinase 1 (SGK1)、protein kinase C- α (PKC- α) がリン酸化され活性化されて、細胞生存・代謝や細胞骨格の制御に関わる[46]。mTOR 阻害薬であるラパマイシンは、mTORC1 の mLST8 と FKBP12-rapamycin binding (FRB) ドメインで形成される触媒クレフトに位置する活性部位を阻害することで、主に mTORC1 を阻害する[45]。

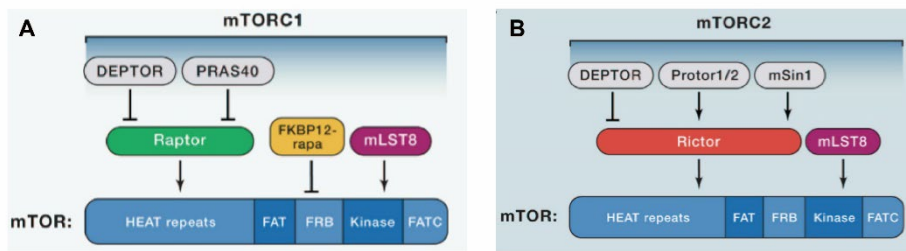


Figure 1: mTORC1 の構造 (A), mTORC2 の構造 (B) ([45]より引用)

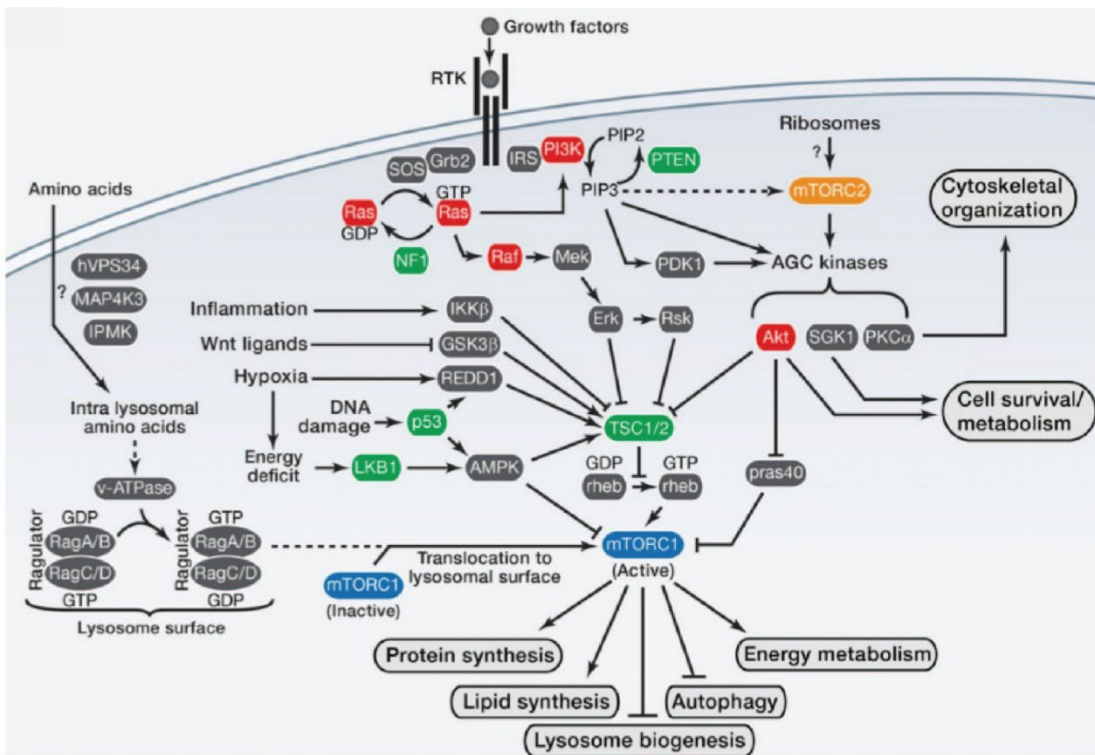


Figure 2: mTOR 経路の概略図 ([46]より引用)

4. mTOR と肺疾患

mTOR 経路の異常は神経変性疾患、2 型糖尿病・肥満などの代謝疾患、血液疾患、乳癌・肝細胞癌・腎癌・肺癌などの悪性疾患など全身疾患の発症との関連が指摘されている[47]。呼吸器疾患においては、代表的な疾患としてリンパ脈管筋腫症 (LAM) があり、癌抑制遺伝子である TSC1 または TSC2 の欠損により mTORC1 が活性化することで平滑筋細胞様の LAM 細胞が異常増殖することがその病態とされている[48]。また、肺癌においても、腫瘍細胞において PI3K/Akt/mTOR 経路が恒常的に活性化することで、腫瘍細胞の生存・分化・増殖の促進に寄与することが知られている[49]。さらに、酸化ストレスによる単球・マクロファージにおける PI3K/Akt/mTORC1 経路の活性化によって、COPD のステロイド抵抗性が促進する[50]ことなども知られている。

mTOR 経路の肺線維症への関与については、IPF 患者の肺線維芽細胞では正常肺と比較して、PI3K/Akt 経路に抑制的に作用する PTEN が抑制され Akt/mTOR 経路が活性化されることでオートファジーが抑制され、細胞外基質の重合で誘導される細胞死に対する感受性が低下し、線維芽細胞の増殖が促進されることが知られている[51]。また、mTORC1 の活性化によって線維芽細胞の増殖・成長が促され、mTORC2 の活性化によって抗アポトーシス遺伝子発現が抑制されて線維芽細胞のアポトーシス抵抗性に寄与するとの報告もある[52]。さらに、低酸

素や酸化ストレスなどの条件下にある線維芽細胞に、mTORC1 による代謝亢進によって合成されたタンパク・脂質・核酸などの代謝産物が補填されることで、線維芽細胞の生存に寄与することも示唆されている[53]。mTORC2 は、線維芽細胞において活性酸素種により引き起こされたオートファジーによって活性化され、筋線維芽細胞への分化に関与することも報告されている[54]。また、傷害を受けた II 型肺胞上皮細胞において細胞老化が促進することで、II 型肺胞上皮細胞から IL-1 β 、IL-6 などの炎症性サイトカイン・ケモカインや MMPs が分泌され筋線維芽細胞の分化が誘導されて肺線維化に寄与する senescence-associated secretory phenotype (SASP) という現象が報告されているが[55]、II 型肺胞上皮細胞における慢性的な mTOR の活性化が細胞老化を促進するとの報告[56]や、マウスの放射線肺臓炎モデルにおいて mTORC1 阻害薬であるラパマイシンの投与により II 型肺胞上皮細胞の細胞老化が抑制され、肺線維化が抑制されたとの報告がある[57]。これらの報告から、肺胞上皮細胞における mTOR の活性化が細胞老化を促進し肺線維症の形成に関与していることが示唆される。また、mTORC1 阻害薬であるラパマイシンが、酸化ストレスに防御的に作用する NF-E2-related factor 2 (Nrf2) 経路を活性化することで肺線維症を抑制するという報告[58]や、ラットの線維芽細胞において低酸素刺激によるコラーゲン沈着がラパマイシンの投与により減弱したとの報告がある[59]。

このように mTORC1/2 経路の活性化が間質性肺炎の病態に深く関与しているという研究が多数報告されているが、これらの報告は主に肺線維芽細胞での mTOR 経路の関与を示したものであり、上述のように肺線維化の起点とされる肺胞上皮傷害及び EMT と mTOR 経路の関連についての研究はほとんどなされていない。また、mTOR 経路の関与の証明においても、その殆どが mTOR 阻害薬であるラパマイシンを用いた間接的な mTOR 経路の関与の証明にとどまっております。mTOR の直接的な活性化が肺に及ぼす研究はこれまでにない。

目的

本研究では、恒常的にキナーゼ活性を示す変異型 mTOR を肺上皮特異的に発現するマウスを作出し、肺上皮における mTOR の働きを直接的に解析し、肺線維症マウスモデルを用いて mTOR 活性化が肺線維症の発症に及ぼす影響について検証することを目的とした。また、その分子生物学的機序についても、次世代シーケンスによる網羅的発現解析や細胞実験により検討した。

方法

・ mTOR 活性型変異体の単離

mTOR 活性型変異体は、本学疾患生命工学センター・動物資源学部門の葛西秀俊先生より譲渡を受けた[60]。単離方法の詳細は以下の通りである。Ohneらは、まず mTOR と酵母由来の Tor2 のキメラタンパク (Tor2-mTOR) (Figure 3A) に、ランダムに突然変異を導入したラットの mTOR のキナーゼドメインを挿入した。そして Tor2 の温度感受性株である *lst8^{ts}* 株の温度耐性獲得の性質を利用してスクリーニングした (Figure 3B) 最もキナーゼ活性が亢進する変異体 (Tor2-mTOR^{SL1}) (SL: Suppression of *lst8^{ts}*) と、既知の mTOR の FRB ドメイン部分の変異を導入した mTOR 変異体 (mTOR^{I2017T}) の組み合わせが最も mTOR キナーゼ活性を強く認めたため、mTOR^{SL1+IT} を活性型 mTOR 変異体とし、mTOR 変異体 (mTOR^{SL1+IT}) の N 末端に FLAG タグを付加して、pcDNA3.1-FLAG-mTOR^{SL1+IT} プラスミドが作出された。

Figure 3

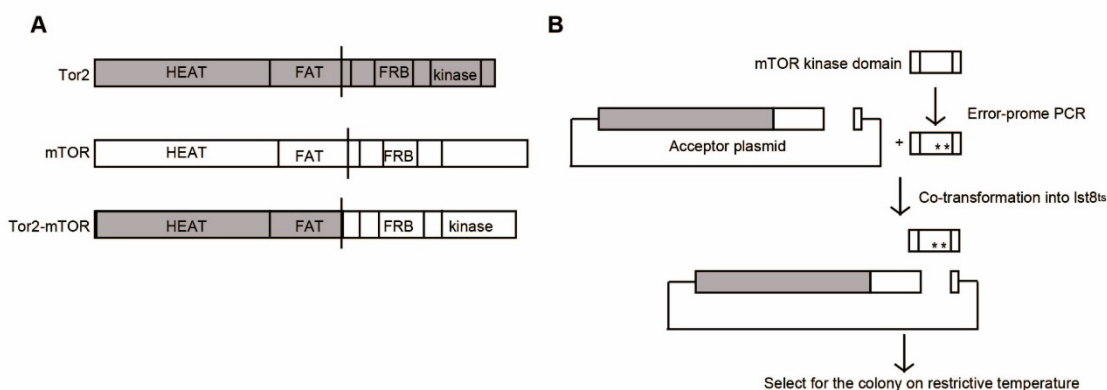


Figure 3. mTOR 活性化型変異体単離の概略図 ([60]より編集)

mTOR と酵母由来の Tor2 のキメラ (A) にランダムに突然変異を起こした mTOR のキナーゼドメインを挿入し、Tor2 の温度耐性を利用して mTOR 活性化型変異体は選択された (B)。

・遺伝子改変マウス

CAG プロモーター下に活性化型 mTOR 変異体 (mTOR^{SL1+IT}) を配置したトランスジェニックマウス (*CAG-mTOR^{SL1+IT}/+*) は本学疾患生命工学センター・動物資源学部門の饗場 篤教授より譲渡を受けた[61]。また Surfactant protein C (*Sftpc*) プロモーター下に Cre 遺伝子を配置したトランスジェニックマウス (*Sftpc^{cre/+}*) は熊本大学の尾池 雄一先生より譲渡を受けた[62]。これらを交配することで、肺上皮特異的に mTOR の活性化型変異体が発現するマウス (*CAG-mTOR^{SL1+IT}/+; Sftpc^{cre/+}*) を作製した。*CAG-mTOR^{SL1+IT}/+; Sftpc^{cre/+}* を *Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg* マウスと表記することとした。*CAG-mTOR^{SL1+IT}/+* マウス及び *Sftpc^{cre/+}* マウスをコントロールとした。マウスの genotyping は、尾の一部を proteinase K を用いてタンパク質を分解してフェノール・クロロホルム法にて genomic DNA を抽出した後、それぞれの遺伝子改変動物のアリル特異的なプライマーを用いて、PCR 法によって決定した。PCR は、95°C 4 min → (95°C 10 sec → 60°C 30 sec → 72°C 60 sec) x 30 cycles → 72°C 10 min の条件で行った。Genotyping に用いたプライマーは以下の通りである。

表 1. 遺伝子改変マウスの genotyping primer

FLAG-mTOR F	5'-CAAGGATGACGACGATAAGG-3'
FLAG-mTOR R	5'-TGCCATCTCCATGACAACACTG -3'
SFTPC-Cre F	5'-ACATGTTCAGGGATCGCCAG-3'
SFTPC-Cre R	5'-TAACCAGTGAAACAGCATTGC-3'

・マウス肺解析

マウスはソムノペンチル (共立製薬、Tokyo, Japan) 100 μ l を腹腔内投与し全身麻酔した上で、腹部大動脈を切断、放血により安楽死させた。マウスの胸壁と横隔膜を切開し、気管切開を行い、18G 針の先端を切断し作成した挿管チューブを気管内に挿入し気管とともに結紮して密閉系とした上で、flexiVent® ventilator (SCIREQ Scientific Respiratory Equipment, QC, Canada) に接続し説明書の通りに肺の生理学的機能を測定した。測定終了後、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 回収のため、挿管チューブを器械から外したうえで 1mL シリンジを用いて挿管チューブより生理食塩水 1mL を注入後回収し、これを 3 回繰り返して BALF サンプルとした。BALF を 450 g で 10 分間遠心し細胞分画を回収して PBS に懸濁、Luna 自動細胞計測装置 (Logos Biosystems, Tokyo, Japan) で細胞数の測定を行い、Cytospin3 (SHANDON) を用いてスライド上に塗抹、乾燥固定した後 Giemsa 染色を行い光学顕微鏡下で白血球分画を計数した。

BALF 回収後、ホルマリンを 25 cmH₂O の圧力で肺が膨張し肺内圧が一定にな

るまで気管内に注入した上で左肺門を結紮し、左肺を摘出して 4°C で数日間固定した。得られた標本はパラフィン包埋・薄切を行い、hematoxylin-eosin (HE) 染色及び Elastica van Gieson (EVG) 染色を行い光学顕微鏡で観察・撮影した。線維化の評価のために、EVG 染色を行った肺切片を用いて光学顕微鏡下で原法[63]に従って、線維化の程度を 0 (線維化なし) から 8 (完全な線維性組織) の範囲内で定量し、Ashcroftscore を定量した。

・ブレオマイシン刺激肺線維症マウスモデル

12 週齢雄マウスを 4%イソフルラン吸入麻酔液 (Pfizer, NY, USA) で吸入麻酔したうえで、18G 注射針の先端を切断し作成した挿管チューブを気管挿管し、ブレオマイシン刺激群は、100 µg ブレオマイシン (Nihon Kayaku, Tokyo, Japan) を 100 µL PBS 溶液 (Wako, Osaka, Japan) に懸濁し、スプレイヤーを使用して気管内投与した。コントロール群は同量の PBS 溶液を気管内投与した。刺激 14 日目にマウスを安楽死させ解析を行った。

・コラーゲンアッセイ

マウスの両肺を 3 mm 程度に細かくカットしビーズ式細胞破碎装置を用いて 0.5M 酢酸 1200 µL とペプシン 0.1 mg/mL の溶液中でホモジナイズし、4°C で一晩

振盪した。翌日 15000 g で 60 分間遠心して上清を回収し、Sircol soluble collagen assay kit (Biocolor Ltd, Antrium, UK) の標準プロトコール通りに、コラーゲン量を測定した。

・血管透過性アッセイ

0.5% エバンスブルー色素 (Wako) 200 μ L をマウスの尾静脈から投与し、2 時間後に安楽死させた。PBS 溶液 3 mL を右室から還流させ、心臓を摘出した後に両肺を摘出し重量を測定した。両肺を 3 mm 程度にカットし、N,N-ジメチルホルムアミド (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) 1mL 中において 56°C で一晩インキュベートした。翌日 12000 g で 20 分間遠心し、上清を回収して OD 630nm における吸光度を microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) で定量した。エバンスブルー試薬で検量線を作成し、漏出したエバンスブルー色素量を測定した。

・細胞株及び細胞培養

A549 細胞は 10% ウシ胎児血清 (FBS) (Biowest, France) 及び 1% ペニシリン ストレプトマイシン (Wako) を含有した D-MEM 培地 (Wako) 中で 37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。

初代ヒト肺胞上皮細胞 (Human Pulmonary Alveolar Epithelial Cells) は ScienCell

Reserch Laboratories 社 (Carlsbad, CA, USA) から購入し、2% FBS、1% epithelial cell growth supplement 及び 1% ペニシリンストレプトマイシンを含有した培地 (ScienCell Reserch Laboratories) 中で、2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ポリ-L-リシン (ScienCell Reserch Laboratories) でコーティングしたフラスコを使用して 37°C、5% CO₂ インキュベーター内で培養し、第一継代細胞を用いて実験を行った。

• Quantitative real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR)

培養細胞と肺組織からの total RNA 抽出は、TRIzol (invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて添付された標準プロトコール通りに行った。first-strand cDNA の合成は、SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用い、添付の標準プロトコール通りに行った。qRT-PCR は、Thermal Cycler Dice Real Time System III (Takara, Shiga, Japan) と TB Green Fast qPCR Mix (Takara) を用いて、標準プロトコール通りに測定した。各サンプルについて duplicate (technical replicate) して Ct 値を測定し、各 well で得られた Ct 値の平均をサンプルの Ct 値とした上で、GAPDH の mRNA 量を internal control として ΔCt 値を算出し、サンプル間の比較に用いた。用いたプライマーは以下の表の通りである。

表 2 qRT-PCR Primer

Human ANGPTL4 F	5'-CAAGGATGACGACGATAAGG-3'
Human ANGPTL4 R	5'-TGCCATCTCCATGACAACTG -3'
Mouse Cav-1 F	5'-ACATG TTCAGGGATCGCCAG-3'
Mouse Cav-1 R	5'-TAACCAGTGAAACAGCATTGC-3'
Mouse ZO-1 F	5'-GATGTTTATGCGGACGGTGG-3'
Mouse ZO-1 R	5'-CATTGCTGTGCTCTTAGCGG-3
Mouse Claudin-4 F	5'-AGCAACGACAAGCCCTACTC-3
Mouse Claudin-4 R	5'-GTCCCCAGCAAGCAGTTAGT-3
Mouse Occludin F	5'-TTGAACTGTGGATTGGCAGC-3
Mouse Occludin R	5'-CAAGATAAGCGAACCTTGGCG-3
Mouse IL-6 F	5'-CTCTGCAAGAGACTTCCATCCA-3
Mouse IL-6 R	5' -GACAGGTCTGTTGGGAGTGG-3
Mouse Vim F	5' -GCAGTCACTCACCTGTCAAG-3
Mouse Vim R	5'-GTATTCACGAAGGTGACGAG-3
Human GAPDH F	5' -TCCTGTTGACAGTCAGCCG-3
Human GAPDH R	5' -CCCCATGGTGTCTGAGCGAT-3
Mouse Gapdh F	5' -GGAGCGAGACCCCACTAACA-3
Mouse Gapdh R	5' -GCCTTCTCCATGGTGGTGAA-3
Mouse T1 α F	5' -GTTTGGTTCTGGGACTCTGC-3

Mouse T1 α R	5' -GTGCCTTGCCAGTAGATTCA-3
Mouse TTF1 F	5' -CCAGGACACCATGCGGAACA-3
Mouse TTF1 R	5' -GGCCATGTTCTTGCTCACGT-3
Mouse Col1 F	5' -GGACTTAAGACTCAGCCACC-3
Mouse Col1 R	5' -ATGAGTTCTTCGCTGGGGTG-3
Mouse MMP2 F	5' -CACCATCGCCCATCATCAAG-3
Mouse MMP2 R	5' -TCCTTGGGGCAGCCATAGAA-3
Mouse MMP9 F	5' -GTGGTCTTCCCCAAAGACCT-3
Mouse MMP9 R	5' -GCTTCTCCCATCATCTGG-3
Mouse VE-cad F	5' -GAATCGCTGCCCCACTATGT-3
Mouse VE-cad R	5' -TGCCAGCAAACCTCTCCTTGG-3
Mouse SPC F	5' -TTCCGAGTCCGATTCTTCCG-3
Mouse SPC R	5' -CGGTTTCTACCGACCCTGTG-3
Mouse CCSP F	5' -AGCTCAGCTTCTTCGGACATC-3
Mouse CCSP R	5' -GGGTTGAAAGGTTTCAGGGA-3

・ウェスタンブロッティング

タンパク質の抽出においては、培養細胞は培養液を除去し、氷冷 PBS で洗浄したのち、RIPA バッファー (20 mM Tris-Hcl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA,

1% NP-40, 0.1% Na-deoxycholate, and 0.1% SDS) 100 μ L、 Halt Protease Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 1 μ L 及び Halt phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific) 1 μ L で直接溶解し 1.5cc tube に移した。

マウス肺はビーズ式細胞破碎装置を用いて RIPA バッファー、 Halt Protease Inhibitor Cocktail、 Halt phosphatase inhibitor cocktail 中でホモジェナイズした。得られたタンパク質抽出液は、遠心により不溶性分画を除いたうえで、Bradford 法でタンパク質濃度を定量し、15 μ g を泳動サンプルとして用いた。SDS/メルカプトエタノール中で加熱し SDS 化された泳動サンプルを、SDS-PAGE 法で分画した上で PVDF メンブレンに転写、一時間 2% skim milk/TBST 中で室温にてブロッキングした上で、一次抗体を加えた 2% skim milk/TBST 中において 4°C で一晩浸透し標識した。一次抗体は、P70 S6 Kinase (1:1000, Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)、S6 Kinase (1:1000, Cell Signaling Technology)、pAkt (1:1000, Cell Signaling Technology)、Akt (1:1000, Cell Signaling Technology)、Vimentin (1:1000, Cell Signaling Technology)、E-cadherin (1:1000, Cell Signaling Technology)、CDKN2A/p16INK4a (1:1000, Abcam, , Cambridge, MA, USA)、 β -actin (1:1000, Abcam) を用いた。二次抗体はそれぞれの動物種に対応した horse raddish peroxidase (HRP) 抗体を用い、室温にて 60 分間標識した。二次抗体で標識されたメンブレンは、ECL Prime (GE healthcare, Little Chalfont, UK) を使用して発光

させ、Ez-Capture MG (ATTO) を使用し撮影を行った。

・ANGPTL4 過剰発現ベクターの作成

A549 細胞から抽出した total RNA より合成した first-strand cDNA を、PrimSTAR Max DNA Polymerase (Takara) を付属のプロトコールに従い使用して、制限酵素 KpnI 及び XhoI の切断部位を取り入れた forward primer (5'-AAGGTACCGCCACCATGAGCGGTGCTCCGACG-3')、reverse primer (5'-AAACTCGAGCTAGGAGGCTGCCTCTGCTG-3') を用いて下記の条件で PCR を行い ANGPTL4 の open reading frame を増幅した。

98°C 1 min → (98°C 10 sec → 57°C 15 sec → 72°C 30 sec) x 35 cycles → 72°C 7 min

PCR 産物をエタノール沈殿により精製し、KpnI 及び XhoI を用いて 37°C、1 時間反応させ切断した。同様に pcDNA3 ベクターも KpnI 及び XhoI で切断した。両者を 1% アガロースゲル (Wako) で 25 分間、135V で泳動して、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) をプロトコール通りに使用してそれぞれ DNA を抽出した。Ligation high Ver.2 (Toyobo, Hokkaido, Japan) を標準プロトコール通りに使用して、16°C、30 分で反応させライゲーションを行った。作製したプラスミド DNA を大腸菌に形質転換し、アンピシリン含有 LB 固定培地に播種し 37°C で一晩培養した。コロニーをピックアップし、LB 液体培地中

において 37°Cで一晩培養した後に QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) を付属の
プロトコールに従って用いてミニプレップを行った。得られたプラスミドを
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いて下記の
サイクルシーケンス反応を行った。

94°C 3 min→ (94°C 30 sec→55°C 15 sec→60°C 4 min) x 25 cycles

シーケンス用 primer1 : CACCTGCGAATTCAGCAT

シーケンス用 primer2 : GAGAAGGTGCATAGCATCAC

NucleoSEQ (Takara)をプロトコール通りに使用し反応物を精製後、ABI PRISM
310 GeneticAnalyzer により塩基配列を解析し、正しい塩基配列であることを確
認した。

上記の通りピックアップしたコロニーを LB 液体培地中において 37°Cで一晩
培養した後に、NucleoBond Xtra Midi (Takara) を標準プロトコール通りに用いて
ミディプレップを行い、ANGPTL4 発現ベクターを得た。

・トランスフェクション

A549 細胞を 12 ウェル細胞培養プレートに 1×10^5 cells/mL で播種し、24 時間
後に 0.02 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ に調整したプラスミド DNA を Opti-MEM medium (Thermo Fisher
Scientific) に添加し、FuGENE HD reagent (Promega, Madison, WI, USA) を標準プ

ロトコール通りに添加し、24 時間後に解析した。

コトランスフェクションは、プラスミド DNA 2 μg と siRNA (最終濃度 20 nM) を Opti-MEM medium に添加し、Lipofectamine™ 3000 Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いて標準プロトコール通りにトランスフェクションした。

• siRNA knockdown

培養細胞に発現する ANGPTL4、PPAR γ 、HIF1 α 、FOXO1 の knockdown に、small interfering RNA (siRNA) を用いた。siRNA は Invitrogen より購入した stealth siRNA® を用いた (siANGPTL4: HSS181879, siHIF1 α :HSS104775, siFOXO1: HSS177165, si PPAR γ : HSS108295)。コントロールには siRNA Negative Control Hi GC (Invitrogen) を用いた (siNC)。siRNA の導入には、Lipofectamine® RNAiMAX (Invitrogen) を用い、標準プロトコール通りに siRNA の最終濃度が 20 nM となるように調整した。

• MTT assay

A549 細胞を 24 ウェル細胞培養プレートに 1×10^4 cells/mL で播種し、24 時間後に活性型 mTOR ベクター (mTOR^{SL1 + IT}) またはをコントロールベクターを上記の通りトランスフェクションした。それぞれ 24 時間、48 時間、72 時間の時点で

培養液を Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 溶液に置換し、2 時間 37°C でインキュベートした。その後 MTT 溶液を廃棄し、250 μ L の DMSO で産生された不溶性ホルマザン色素を溶解し、それらの 540 nm における吸光度を microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) で定量した。

・ EMT (上皮間葉転換) の誘導

A549 細胞を 6 ウェルプレートに 1×10^5 cells/well で播種し 24 時間後に活性型 mTOR ベクター (mTOR^{SL1+IT}; pcDNA3.1-FLAG-mTOR^{SL1+IT})、ANGPTL4 過剰発現ベクター (ANGPTL4-OE)、またはコントロールベクター (NC; pcDNA3) をトランスフェクションして、24 時間後に 0.5% FBS、1% ペニシリンストレプトマイシン含有 DMEM 培地に置換し細胞の starvation を行い、4 時間後に TGF β 1 (Peprotech, NJ, USA) を最終濃度が 5 ng/mL となるように添加した。

・ 免疫蛍光染色

イメージング用チャンバー (Zell-kontakt GmbH, Norten-Hardenberg, Germany) に A549 細胞を 2×10^4 cells/well で播種し 24 時間後に上述のようにトランスフェクションを行い、24 時間培養後に上清を吸引除去し接着細胞を 4% ホルマリン

液 (Wako) で 15 分間固定し PBS 溶液で洗浄後にブロッキングワン (Nacalai Tesque) で 1 時間ブロッキングした。一次抗体として Caveolin-1 (1:400, Cell Signaling Technology) または ZO-1 (1:100, Invitrogen) を加えたブロッキングワン®中で 4°Cにて一晩振盪し一次抗体を標識した。翌日、それぞれの動物種に対応した二次抗体 anti-rabbit fluorescent secondary antibody (1:300, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) または anti-mouse fluorescent secondary antibody (1:200, Invitrogen) を添加したブロッキングワン®中で室温にて 60 分間標識した。PBS 溶液で洗浄後に、A549 細胞は VECTASHIELD mounting medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて核染色し、初代ヒト肺胞上皮細胞は TO-PRO-3 (Thermo Fisher Scientific) を用いて核染色し、蛍光顕微鏡で同一条件下において露光撮影し観察した。蛍光強度は画像解析ソフト Image J を用いて細胞毎に定量した。

・マウス II 型肺胞上皮細胞の単離

マウスの気管切開を行い挿管チューブより 3 mL のディスパーゼ (Corning, NY, USA) を注入後に 0.3 mL の low-melting-point agarose (Sigma-Aldrich) を注入し栓をしたうえで気管を結紮した。両肺を摘出しディスパーゼ中で室温にて 30 分間インキュベートした後にメスで気管及び気管支を除去し、細かく剪断した肺葉

を 0.5% BSA (Sigma-Aldrich) と 0.01% DNaseI (Roche, Basel, Switzerland) を含む PBS 溶液 20 mL 内でホモジェナイズした。4°C にて 1000 rpm、5 分間遠心した後上清を吸引除去し、細胞ペレットを 0.5% BSA と 0.5M EDTA (Wako) を含む PBS 溶液 500 μ L で再懸濁し、biotinylated anti-CD45 (Miltenyi Biotec, Gladbach, Germany) を添加しインキュベートし、QuadroMACSTM (Miltenyi Biotec) を用いてまずマクロファージを選別除去した。その後、biotinylated anti-CD326 antibodies (Miltenyi Biotec) 及び anti-biotin microbeads (Miltenyi Biotec) を用いて MACS で II 型肺胞上皮細胞を選別した[64]。回収した II 型肺胞上皮細胞の一部を Cytospin3 を用いてスライド上に塗抹し、4% ホルマリン液 (Wako) で 15 分間固定し PBS 溶液で洗浄後にブロッキングワン (Nacalai Tesque) で 1 時間ブロッキングした。一次抗体として、Anti-proSP-C (1:400, Seven Hills Bioreagents) を 4°C にて一晩振盪し標識し、翌日に二次抗体 Alexa Fluor 594 goat anti-rabbit IgG (H+L) (1:300, abcam) を 1 時間、室温で標識し、VECTASHIELD mounting medium with DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用いて封入、核染色し、蛍光顕微鏡で観察した。

・ RNA シークエンス解析

上記の通り単離したマウスの II 型肺胞上皮細胞より total RNA 抽出を RNeasy

Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて添付された標準プロトコール通りに行った。データは CLC Genomics workbench software 11 (Qiagen) ソフトウェアの Illumina HiSeq2500 (Illumina) を用いて解析し、全リード数を算出した。アダプター配列の除去、マッピングは以下の条件に従って行われた (mismatch cost, 2; insertion cost, 3; deletion cost, 3; length fraction, 0.5; similarity fraction, 0.8; maximum number of hits for a read set, 30)。R ソフトウェアを用いて統計解析を行い、edgeR パッケージ[65]を用いて発現変動遺伝子を検出した。log₂ (FC) fold change > 1 または < 1 かつ FDR (false discovery rate) q-value < 0.05 を満たす遺伝子群を発現変動遺伝子と定義した。Gene ontology 解析は Enrichr[66]を用いて行った。本 RNA シークエンス解析のデータセットは、Gene Expression Omnibus データベース (GSE132675) に登録した。

・アポトーシスアッセイ

A549 細胞を 6 ウェル細胞培養プレートに 3×10^5 cells/mL で播種し、24 時間後に活性型 mTOR ベクター (mTOR^{SL1 + IT}; pcDNA3.1-FLAG- mTOR^{SL1 + IT}) またはをコントロールベクター (NC; pcDNA3) をトランスフェクションした。24 時間後にブレオマイシン 50 µg/mL (Nihon Kayaku) または PBS 溶液 100 µL を添加し、翌日に培地を吸引除去して 0.5% FBS、1% ペニシリンストレプトマイシン含有

DMEM 培地に置換し細胞の starvation を行った。48 時間後に回収した A549 細胞を、Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BioVision, Milpitas, CA, USA) を標準プロトコール通りに使用して FITC 標識 Annexin 及び Propidium iodide (PI) と結合させ、BD FACSAria™ III (BD Bioscience, NJ, USA) を用いて標準プロトコール通りに解析した。

・倫理的配慮

本研究で行う動物実験は、東京大学医学部および医科学研究所動物実験実施規程に基づき動物審査委員会の審査および承認を得た (承認番号：医-P14-135)。

・統計解析

データは平均±標準誤差 (SEM) で示した。統計学的有意差の検定には、Unpaired *t*-test を用い、 $P < 0.05$ の場合を有意とした。統計学的解析は、すべて GraphPad Prism version 5.0a を用いた。

結果

肺上皮特異的 mTOR 活性型変異マウス (Sftpc-mTOR^{SL1+IT}Tg) のキナーゼ活性

CAG-mTOR^{SL1+IT}/+マウスと *Sftpc-Cre* ノックインマウス (*Sftpc*^{cre/+}) を交配し、肺上皮細胞特異的に活性型 mTOR が発現する、CAG-mTOR^{SL1+IT}/+; *Sftpc*^{cre/+} マウス (Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウス) を作出した (Figure 4A)。

活性型 mTOR のキナーゼ活性を確認するために、14 週齢の Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウスとコントロールマウスの全肺ホモジェネートからタンパク質を抽出し、ウェスタンブロッティングで mTORC1 及び mTORC2 の主な基質である S6K1 と AKT のリン酸化の発現を比較した。その結果、コントロールマウスと比較して Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウスでは、pS6K1 及び pAKT の有意な発現増強を認めた (Figure 4B)。以上の結果から、Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウスにおいて、mTORC1 及び mTORC2 の活性化を確認できた。

Figure 4

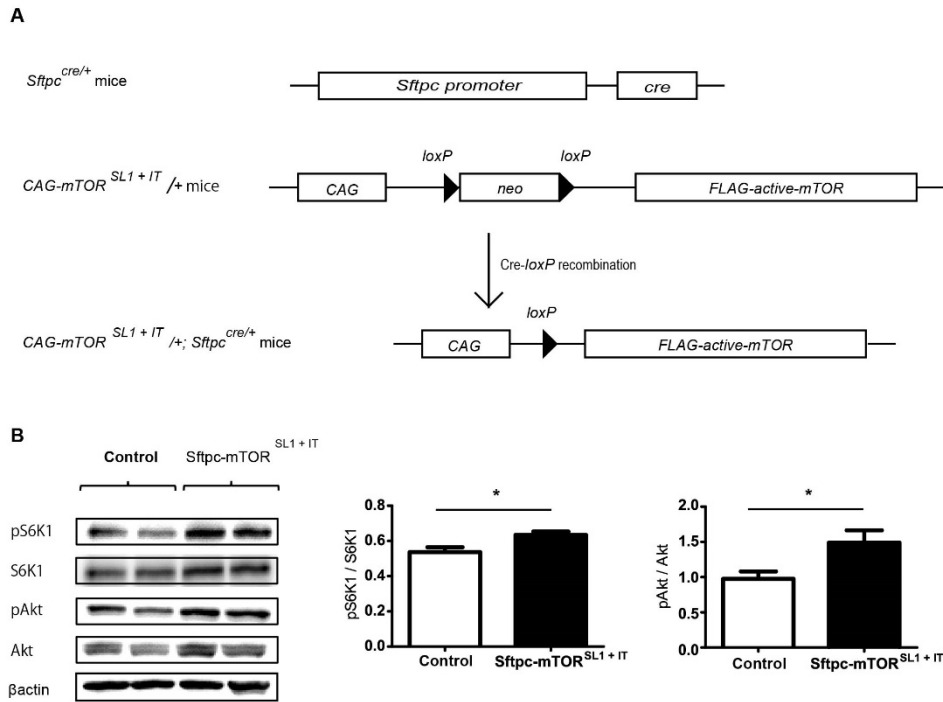


Figure 4. 肺上皮特異的 mTOR 活性型変異マウス (*Sftpc-mTOR*^{SL1+IT} Tg) のキナーゼ活性

A) Cre-loxP 部位特異的組換えを利用して *CAG-mTOR*^{SL1+IT/+} マウスと *Sftpc-Cre* ノックインマウス (*Sftpc*^{cre/+}) を交配して、肺上皮細胞特異的に活性型 mTOR が発現する、*CAG-mTOR*^{SL1+IT/+}; *Sftpc*^{cre/+} マウスを作出した。

B) 14 週齢の *Sftpc-mTOR*^{SL1+IT} Tg マウス (n=4) とコントロールマウス (n=4) の全肺から抽出したタンパク質でのウェスタンブロッティングを示す。デンストメトリーの測定は、pS6K1 は S6K1 を、pAKT は AKT をコントロールとした。エラーバーは標準誤差を示す。*p < 0.05。

肺上皮特異的 mTOR 活性化型変異マウス (Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg) 肺の表現型の

解析

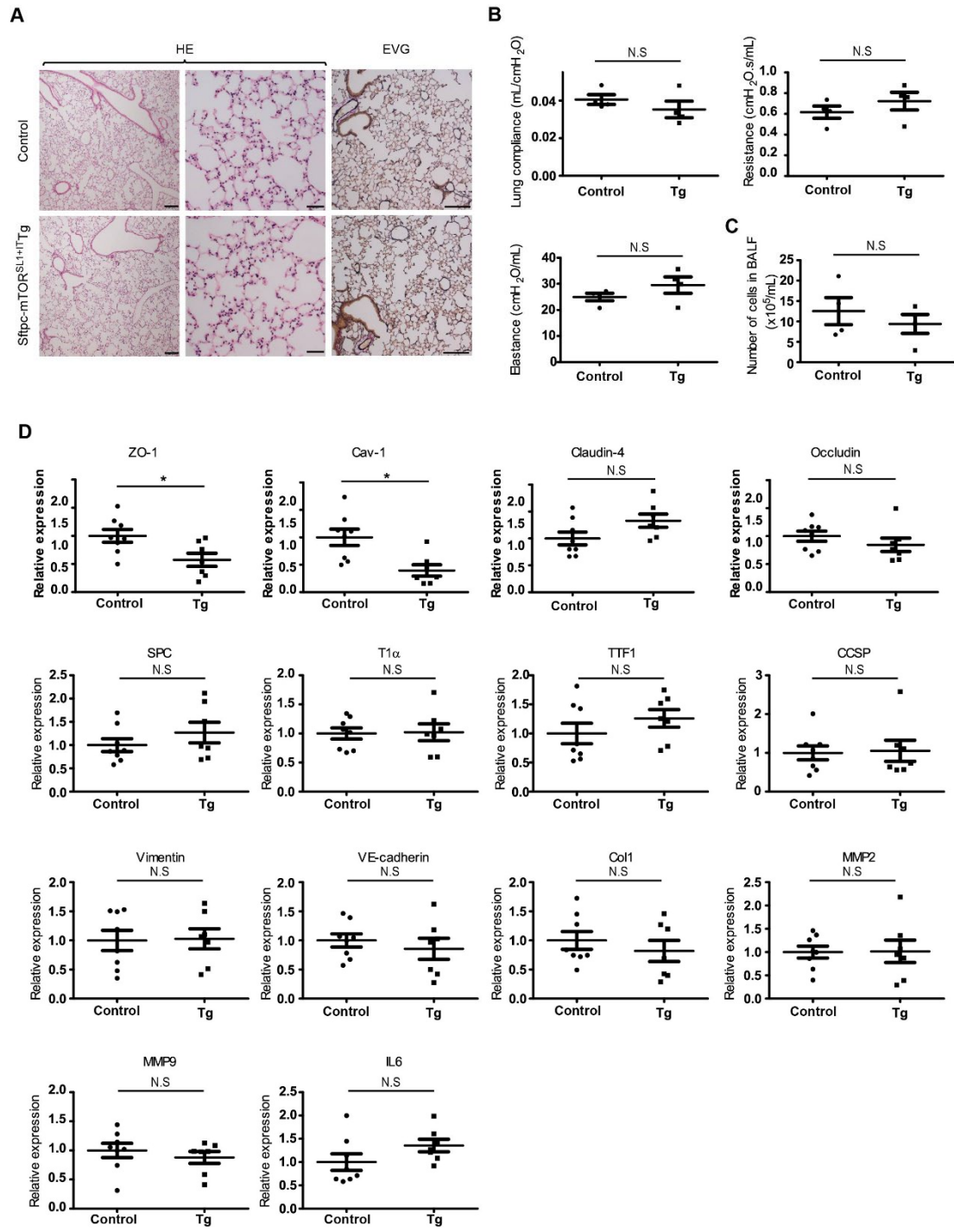
次に、作出した 14 週齢の Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウスの表現型をコントロールマウスと比較した。まず、両マウスから左肺を摘出し病理標本を作製し、HE 染色及び EVG 染色を施行したが、明らかな病理学的所見の差異は認めなかった (Figure 5A)。次に、flexiVent® ventilator を用いて肺生理学的解析を行ったが、肺コンプライアンス、抵抗、エラスタンスのいずれにおいても両者で有意な差異は認めなかった (Figure 5B)。また、肺内の炎症細胞の変化を確認するため、気管支肺胞洗浄を行ったが、BALF 中の総細胞数においても、両者で有意な差は認めなかった (Figure 5C)。BALF 中の細胞分画は全ての個体において 95%以上はマクロファージが占めていた。

次に、線維化には上皮、間葉系細胞など様々な細胞の相互作用が関与しており、mTOR の作用は多岐にわたるため、肺上皮特異的な mTOR 活性化が肺組織を構成する細胞の構成や性質にどのように影響を与えるかをスクリーニングするために、14 週齢の Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウスの全肺ホモジェネートから抽出した mRNA 発現量を qRT-PCR でコントロールマウスと比較した。病理学的所見の結果と同様に、上皮系マーカーである SPC、T1 α 、TTFI や、CCSP の発現や、間葉系マーカーである Vimentin や Collagen I (Col I)、血管内皮細胞マーカーである VE-

cadherin、また炎症マーカーである IL-6、MMP-2、MMP9 の発現量はいずれも、両者で有意差は認めなかった (Figure 5D)。しかし、タイトジャンクションを構成するタンパクである ZO-1 と上皮間葉転換に抑制的に作用する Caveolin-1 (Cav-1)の発現は、Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウスで有意に低下していた (Figure 5D)。他のタイトジャンクションを構成するタンパクである Claudin-4 と Occludin の発現は両者で有意差は認めなかった。さらに Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウスで ZO-1 の発現低下を認めたため、タイトジャンクション構造の形態を調べるためにマウスの左肺の一部分を電子顕微鏡で観察した。コントロールマウスと比較して、肺上皮細胞のタイトジャンクションを含めた細胞間接着装置の破壊や I 型肺胞上皮細胞の形態の変化は認めなかった (Figure 5E)。また、タイトジャンクションの脆弱化による血管透過性への影響を調べるために、エバンスブルー色素をマウスの尾静脈から注入し、肺から漏出したエバンスブルー色素量を定量した。その結果、Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウスではコントロールマウスと比較して、肺外へ漏出したエバンスブルー色素量の有意な増加は認めなかった (Figure 5F)。

また、II 型肺胞上皮細胞での慢性的な mTOR 活性化が細胞老化に関与し気腫性変化をきたすとの報告[56, 67]があるが、本実験では Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウスにおいて細胞老化マーカーである p16 の有意な上昇は認めなかった (Figure 5G)。

Figure 5



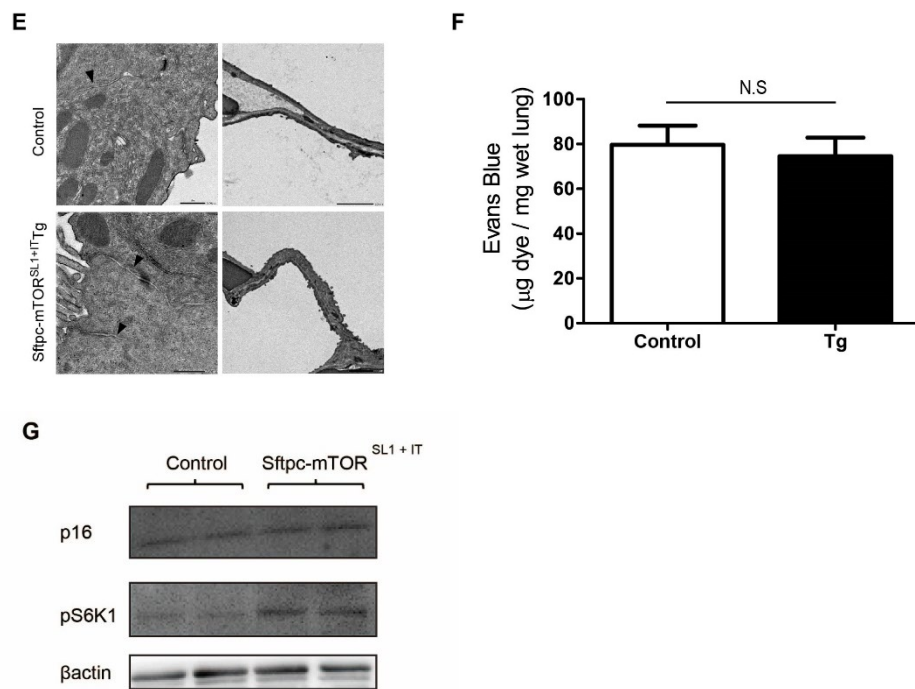


Figure 5. 肺上皮特異的 mTOR 活性化型変異マウス (Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg) 肺の表現型

- A) マウスの左肺の HE 染色像及び EVG 染色像を示す。スケールバーは左側が 200 μm 、中央が 50 μm 、右側が 200 μm を示す。
- B) Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウス (n = 4) とコントロールマウス (n = 4) の肺生理学的検査 (肺コンプライアンス、抵抗、エラスタンス) の結果を示す。
- C) Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウス (n = 4) とコントロールマウス (n = 4) から回収した BALF 中の総細胞数を示す。
- D) Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウス (n = 7) とコントロールマウス (n = 8) から回収した mRNA を qRT-PCR で測定した。
- E) マウスの左肺の電子顕微鏡像を示す。矢印は肺上皮細胞の細胞間接着装置を示す。スケールバーは左側が 500 μm 、右側が 2 μm を示す。
- F) Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウス (n = 3) とコントロールマウス (n = 3) の肺外へ漏出したエバンスブルー色素量を示す。

G) Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウス (n = 2) とコントロールマウス (n = 2) の全肺から抽出したタンパク質でのウェスタンブロッティングを示す。

エラーバーは標準誤差を示す。N.S; not significant. *p < 0.05。

肺胞上皮細胞における活性型 mTOR の特性の解析

マウス肺の解析において、Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウスの肺で ZO-1 及び Cav-1 の有意な低下を認めたため、まず肺胞上皮癌細胞株である A549 細胞を用いて *in vitro* 実験でも検証することとした。A549 細胞に活性型 mTOR 発現ベクター (mTOR^{SL1 + IT}; pcDNA3.1-FLAG- mTOR^{SL1 + IT}) または、mTOR 発現ベクター (mTOR; pcDNA3.1-FLAG- mTOR)、コントロールベクター (NC; pcDNA3) をそれぞれトランスフェクションして、48 時間後に回収したタンパク質でウェスタンブロッティングを行い、活性型 mTOR 発現ベクターのキナーゼ活性を確認した。その結果、活性型 mTOR 過剰発現 A549 細胞では、mTOR 発現ベクター やコントロールベクターと比較して S6K1 及び AKT のリン酸化の増強を認め、mTORC1 及び mTORC2 の活性化を確認できたため (Figure 6A)、以後は活性型 mTOR 発現ベクターとコントロールベクターで比較することとした。また、mTORC1 を阻害するラパマイシン (5nM) の投与により pS6K1 の著明な発現低下、pAkt の発現亢進を認めた (Figure 6B)。

次に、活性型 mTOR 過剰発現 A549 細胞における ZO-1 及び Cav-1 の発現を、蛍光免疫染色によってコントロールベクターと比較した。その結果、活性型 mTOR 過剰発現 A549 細胞では有意に ZO-1 及び Cav-1 の蛍光強度の低下が認められた (Figure 6C, D)。さらに、初代ヒト肺胞上皮細胞においても mTOR 活性化

による ZO-1 及び Cav-1 の発現への影響を確認した。その結果、免疫蛍光染色において活性型 mTOR ベクターのトランスフェクションにより ZO-1 及び Cav-1 の発現低下を確認認めた (Figure 6E, F)。

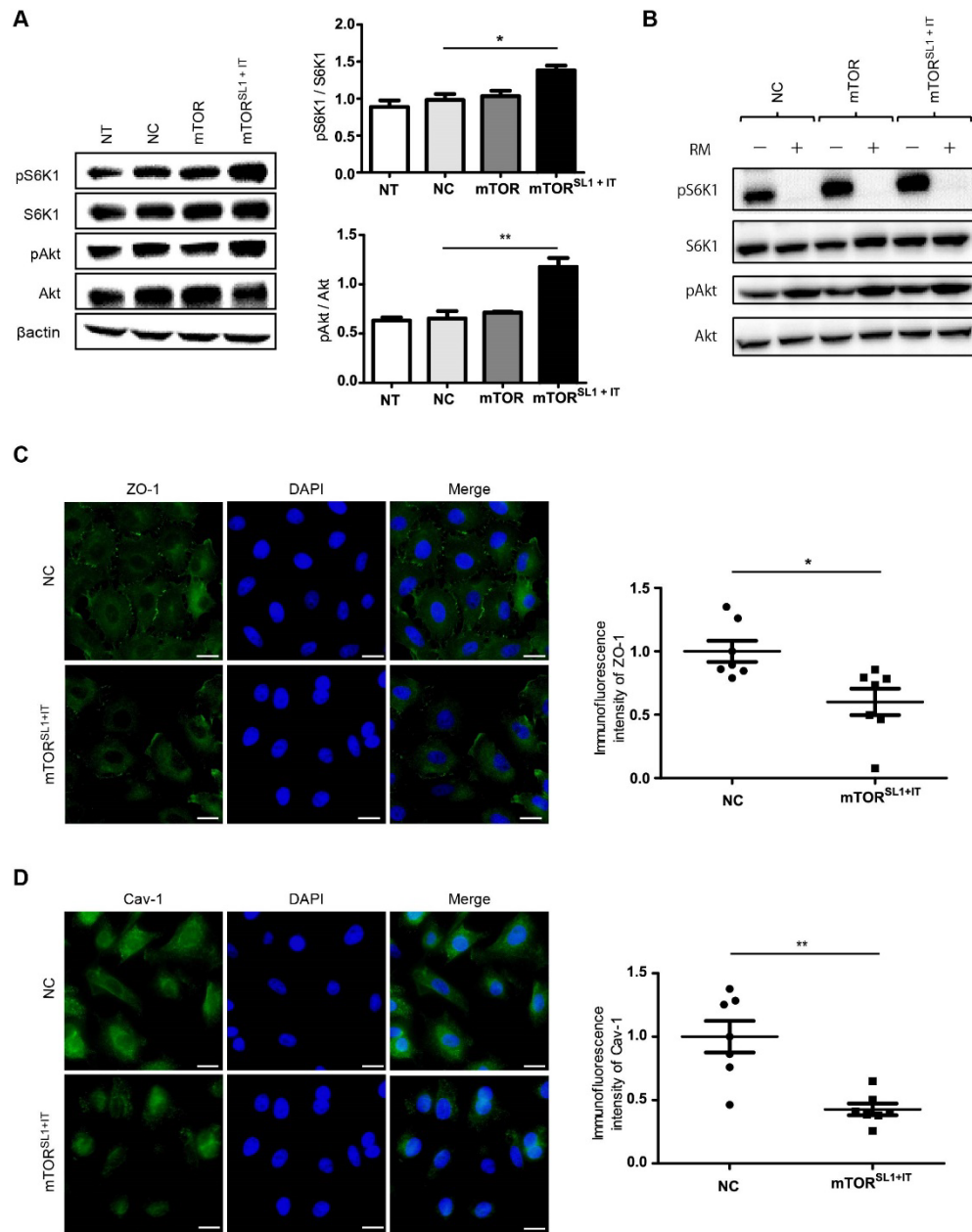
In vitro 実験においても mTOR 活性化がタイトジャンクションを構成する ZO-1 の発現を低下させ、EMT の制御を抑制する可能性が示唆されたことから、A549 細胞において、EMT を誘導する TGF β 1 刺激によって、活性型 mTOR がさらに EMT を促進するかを検証することとした。その結果、活性型 mTOR 過剰発現 A549 細胞では、TGF β 1 (5 μ g/mL) 刺激後に、間葉系マーカーである vimentin の発現が増強することをウェスタンブロッティングで確認し、EMT を増強することが示唆された (Figure 6G)。他の間葉系マーカーである α SMA や Col I の発現に関しては、一定の傾向を認めなかった。

また、mTOR 活性化が細胞増殖に関与することが知られている(44)ため、A549 細胞に活性型 mTOR ベクターをトランスフェクションし、MTT assay によって細胞増殖能を検証した。活性型 mTOR 過剰発現 A549 細胞ではコントロールと比較して細胞増殖能において有意差はなかったが、上昇傾向であった (Figure 6H)。

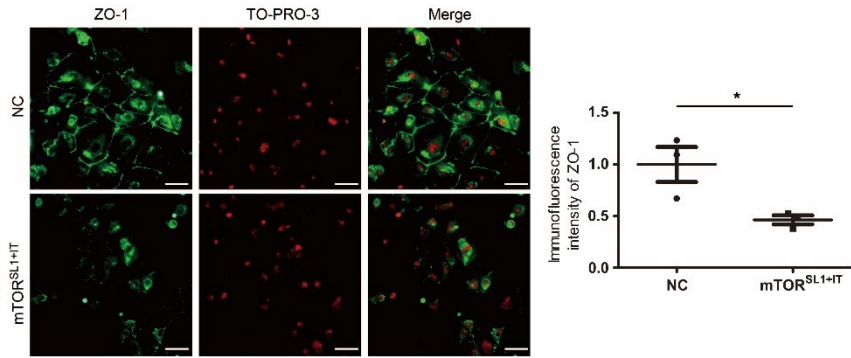
次に、mTOR 活性化により、A549 細胞においてアポトーシスが誘導されるかについて、定常状態及び、肺胞上皮傷害を引き起こすブレオマイシン刺激下にお

いて解析した。A549 細胞に活性型 mTOR ベクターをトランスフェクションし、ブレオマイシン (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加して誘導されるアポトーシス細胞をフローサイトメトリーにて測定した。活性型 mTOR 発現 A549 細胞はコントロールと比較してアポトーシスは促進しておらず、ブレオマイシン刺激によるアポトーシスの誘導の増悪も認めなかった (Figure 6I)。

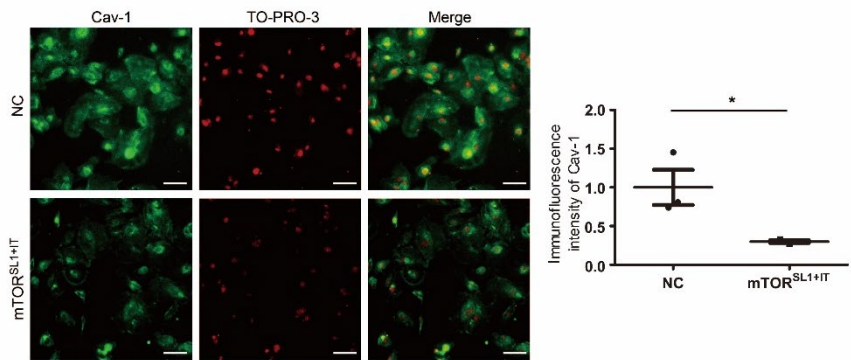
Figure 6



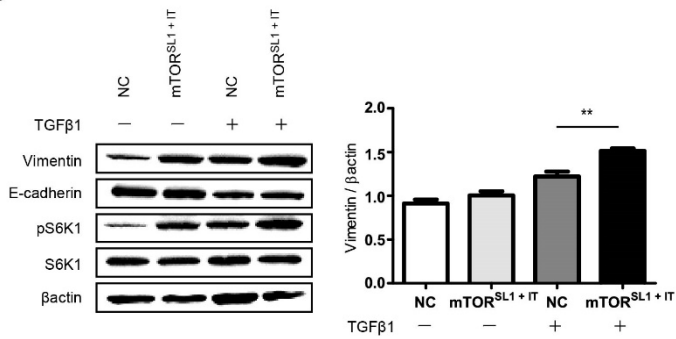
E



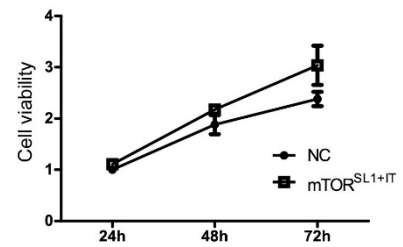
F



G



H



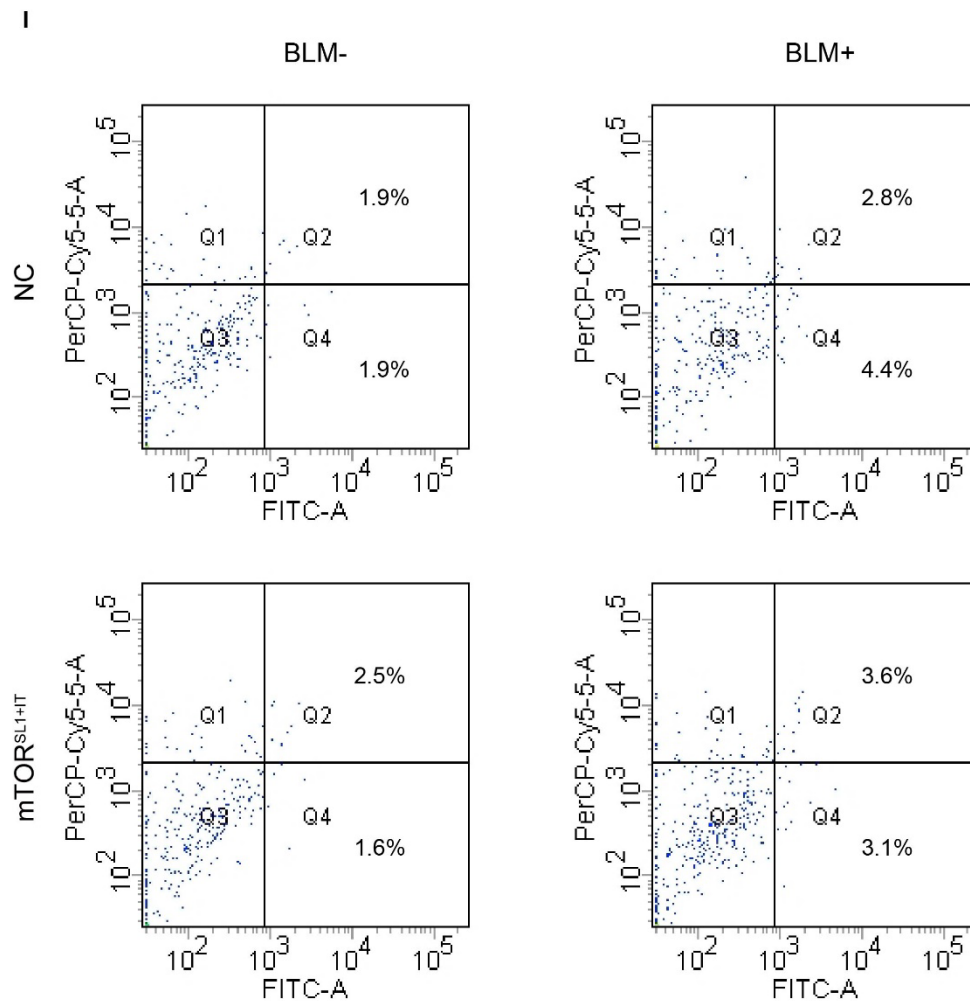


Figure 6. 肺胞上皮細胞における活性型 mTOR の特性の解析

- A) A549 細胞に活性型 mTOR 発現ベクター (mTOR^{SL1+IT}; pcDNA3.1-FLAG-mTOR^{SL1+IT}) または、mTOR 発現ベクター (mTOR; pcDNA3.1-FLAG-mTOR)、コントロールベクター (NC; pcDNA3) をトランスフェクションし、48 時間後に回収したタンパク質をウェスタンブロッティングで解析した (n=3)。デンストメトリーの測定は pS6K1 は S6K1 を、pAKT は AKT をコントロールとした。
- B) A549 細胞に各ベクターをトランスフェクションし、ラパマイシン (RM) 5nM を投与した 24 時間後にタンパク質を回収しウェスタンブロッティングで解析した。

- C) A549 細胞に各ベクターをトランスフェクションし、一次抗体 ZO-1 で標識し免疫蛍光染色を行った。
- D) C と同様に一次抗体 Cav-1 で標識し免疫蛍光染色を行った。
スケールバーは 20 μm を示す。7 視野の蛍光強度を Image J で測定した。
- E) 初代ヒト肺胞上皮細胞に各ベクターをトランスフェクションし、一次抗体 ZO-1 で標識し免疫蛍光染色を行った。
- F) E と同様に一次抗体 Cav-1 で標識し免疫蛍光染色を行った。
スケールバーは 20 μm を示す。3 視野の蛍光強度を Image J で測定した。
- G) A549 細胞に各ベクターをトランスフェクション後に EMT を誘導し、回収したタンパク質でウェスタンブロッティングを行った (n = 3)。デンシトメトリーの測定は β アクチンをコントロールとした。
- H) A549 細胞に各ベクターをトランスフェクションし、24 時間、48 時間、72 時間後での細胞増殖活性を測定した (n = 3)。
- I) A549 細胞に各ベクターをトランスフェクションし、ブレオマイシン刺激後にフローサイトメトリーで、Annexin V-FITC 及び PI 標識細胞を測定した。

エラーバーは標準誤差を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ 。

Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウスのブレオマイシン誘導肺線維症モデルでの解析

肺胞上皮細胞において活性型 mTOR がタイトジャンクションを構成する ZO-1 の低下及び EMT の促進に関与することが示されたため、Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウスがブレオマイシン誘導肺線維症を増強するかを検証するために、12 週齢の Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウス及びコントロールマウスにブレオマイシンの気管内投与を行い、14 日後に安楽死させ解析した。摘出した左肺の病理学的解析では、Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウスにおいて、HE 染色ではより炎症細胞の浸潤を認め、EVG 染色ではびまん性に線維性病変の増強を認め (Figure 7A)、Aschcroft score[63]は Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウスにおいて有意に高値であった (Figure 7B)。また flexiVent® ventilator を用いた肺生理学的解析では、まずコントロールマウスにおいてブレオマイシン投与により有意に肺コンプライアンスの低下、抵抗の上昇を認め、ブレオマイシン刺激の影響を反映していると考えられた。その上で、ブレオマイシン投与群においてコントロールマウスと比較して Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウスで肺コンプライアンスの低下、抵抗の上昇を有意に認めた (Figure 7C)。また回収した BALF 中の総細胞数においても Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウスで有意に増加しており (Figure 7D)、細胞分画は 99%をマクロファージが占めていた。さらに、両肺のコラーゲン量においても、ブレオマイシン投与群で Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウスで有意にコラーゲン量が増加していた (Figure 7E)。

以上の結果から、Sftpc-mTOR^{SL1 + IT} Tg マウスは、ブレオマイシン投与による肺線維化がより増強されることが示唆された。

Figure 7

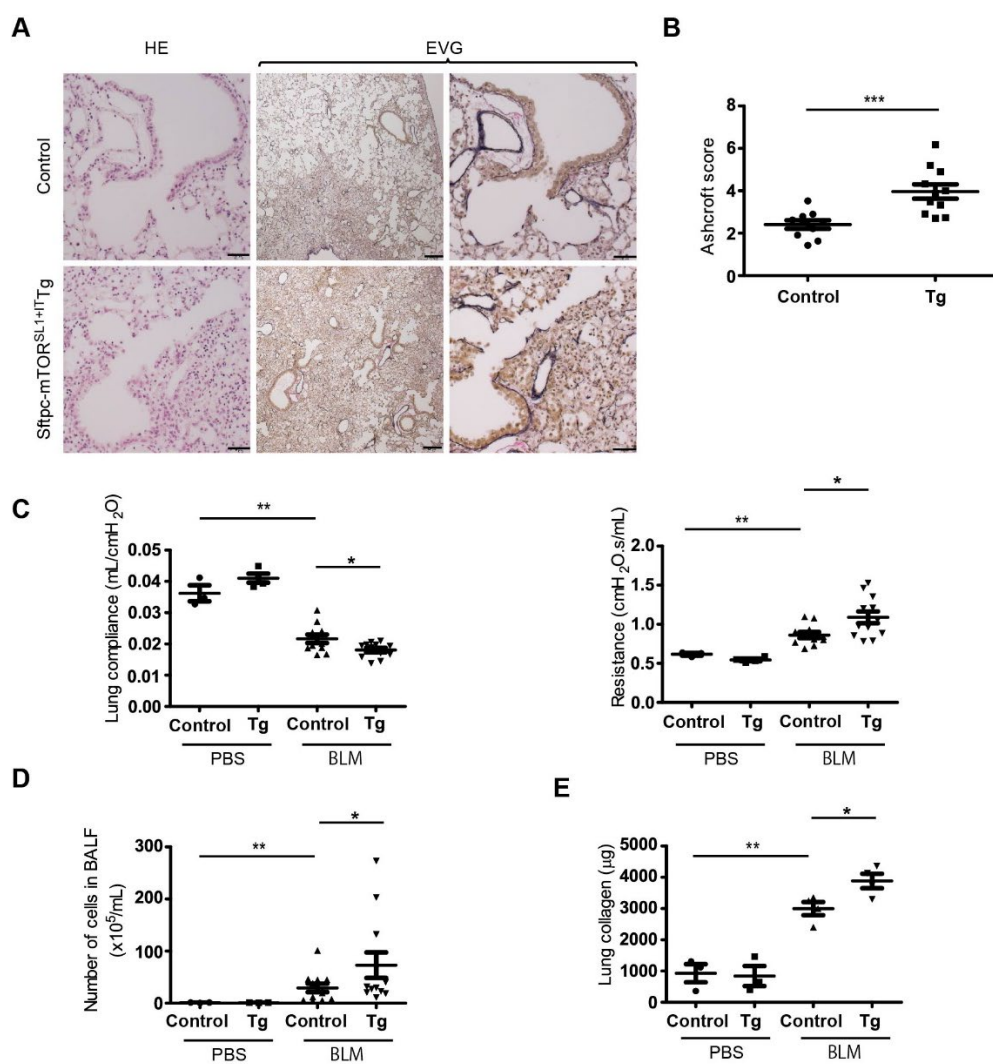


Figure 7. Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウスのブレオマイシン誘導肺線維症モデルでの解析

- A) 12 週齢の Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウスとコントロールマウスにブレオマイシン気管内投与し 14 日後に摘出した肺切片の HE 染色及び EVG 染色を示す。スケールバーは左側が 50μm、中央が 200μm、右側が 50μm を示す。
- B) ブレオマイシン投与群の Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウス (n = 11) とコントロールマウス (n = 10) の Ashcroft score を比較した。

C, D) PBS 投与群の $Sftpc\text{-}mTOR^{SL1+IT}$ Tg マウス (n=4) とコントロールマウス (n=3)、及びブレオマイシン投与群の $Sftpc\text{-}mTOR^{SL1+IT}$ Tg マウス (n=12) とコントロールマウス (n=11) の肺コンプライアンス及び抵抗 (C) と、BALF 中の総細胞数 (D) を示す。

E) PBS 投与群の $Sftpc\text{-}mTOR^{SL1+IT}$ Tg マウス (n=3) とコントロールマウス (n=3)、及びブレオマイシン投与群の $Sftpc\text{-}mTOR^{SL1+IT}$ Tg マウス (n=4) とコントロールマウス (n=4) の全肺から回収したコラーゲン量を測定し比較した。

エラーバーは標準誤差を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

II 型肺胞上皮細胞の RNA シーケンス解析

これまでの結果から、肺上皮特異的な mTOR の活性化が肺線維症の病態に関与していることが示されたため、さらにその分子生物学的機序を解明するために、RNA シーケンス解析による網羅的発現解析を行うこととした。まず 14 週齢の *Sftpc-mTOR^{SL1+IT}* Tg マウス及びコントロールマウスの肺から II 型肺胞上皮細胞を単離し、回収した一部の II 型肺胞上皮細胞を一次抗体 pro SP-C で標識し、II 型肺胞上皮細胞を 90% の純度で単離できていることを確認した (Figure 8A) 上で、RNA シーケンスによる網羅的発現解析を施行した。*Sftpc-mTOR^{SL1+IT}* Tg マウスで発現が亢進していた 815 遺伝子中 7 遺伝子、発現が低下していた 1034 遺伝子中 2 遺伝子を、発現変動遺伝子として同定した (表 3)。この中で *ANGPTL4* は *Sftpc-mTOR^{SL1+IT}* Tg マウスで大きく発現が亢進しており、既報でインフルエンザ感染マウスモデルにおいて II 型肺胞上皮細胞で発現が上昇し肺組織透過性を亢進することが示唆されていた[68]ことから、我々は *ANGPTL4* に注目してさらに検証することとした。MA プロットの結果からも、*ANGPTL4* は発現の絶対量が大きく、かつ *Sftpc-mTOR^{SL1+IT}* Tg マウスで発現変動が大きく亢進していることを確認した (Figure 8B)。さらに、これらの遺伝子群の Gene Ontology 解析では、骨髄性白血球誘導免疫応答や脂質代謝、血管新生などの機能に関与している遺伝子が抽出されていることがわかった (Figure 8C)。

表 3. Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウスで有意に発現変動を認めた遺伝子群

DEG	FDR q-value
Angptl4	3.03x10 ⁻⁶
Thbs2	3.96x10 ⁻⁵
Cxcl5	4.63x10 ⁻⁵
Plac9a	0.001842407
Plac9b	0.004385838
Cyp2a5	0.004385838
Mt2	0.034635277
Igflr1	0.046316554
Slc10a5	0.046316554

DEG; Differentially expressed gene

FDR; False discovery rate

Figure 8

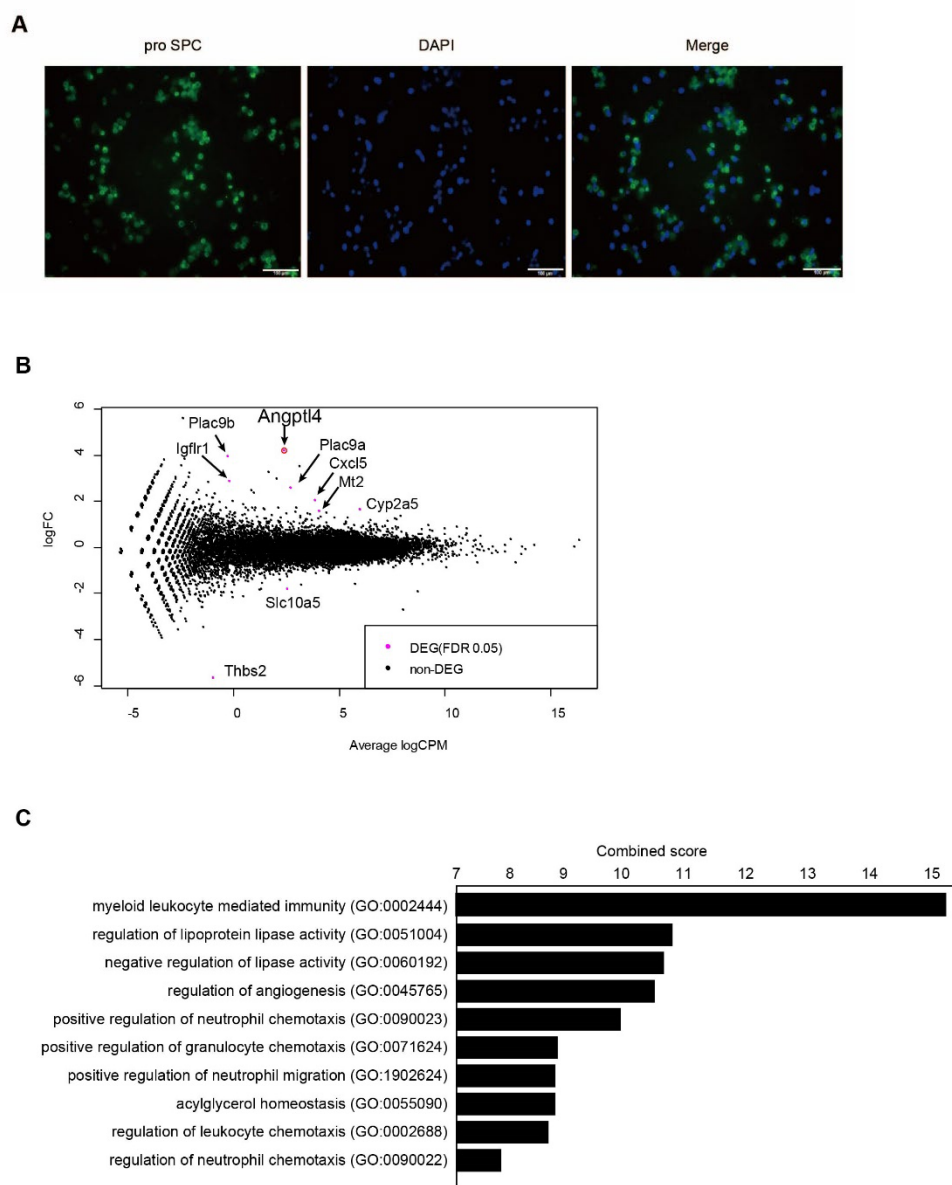


Figure 8. II 型肺胞上皮細胞の RNA シークエンス解析

A) 単離した II 型肺胞上皮細胞を一次抗体 pro SP-C で標識し免疫蛍光染色を行った。スケールバーは 100 μm を示す。

B) MA プロットを示す。発現変動遺伝子 (DEG) はマゼンタ色でマークした。FC; fold change, CPM; counts per million。

C) Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウス (n = 2) とコントロールマウス (n = 2) 間の発現変動遺伝子の Enrichr combined score でソートした Gene Ontology 解析の生物学的プロセスの上位 10 機能までを示す。

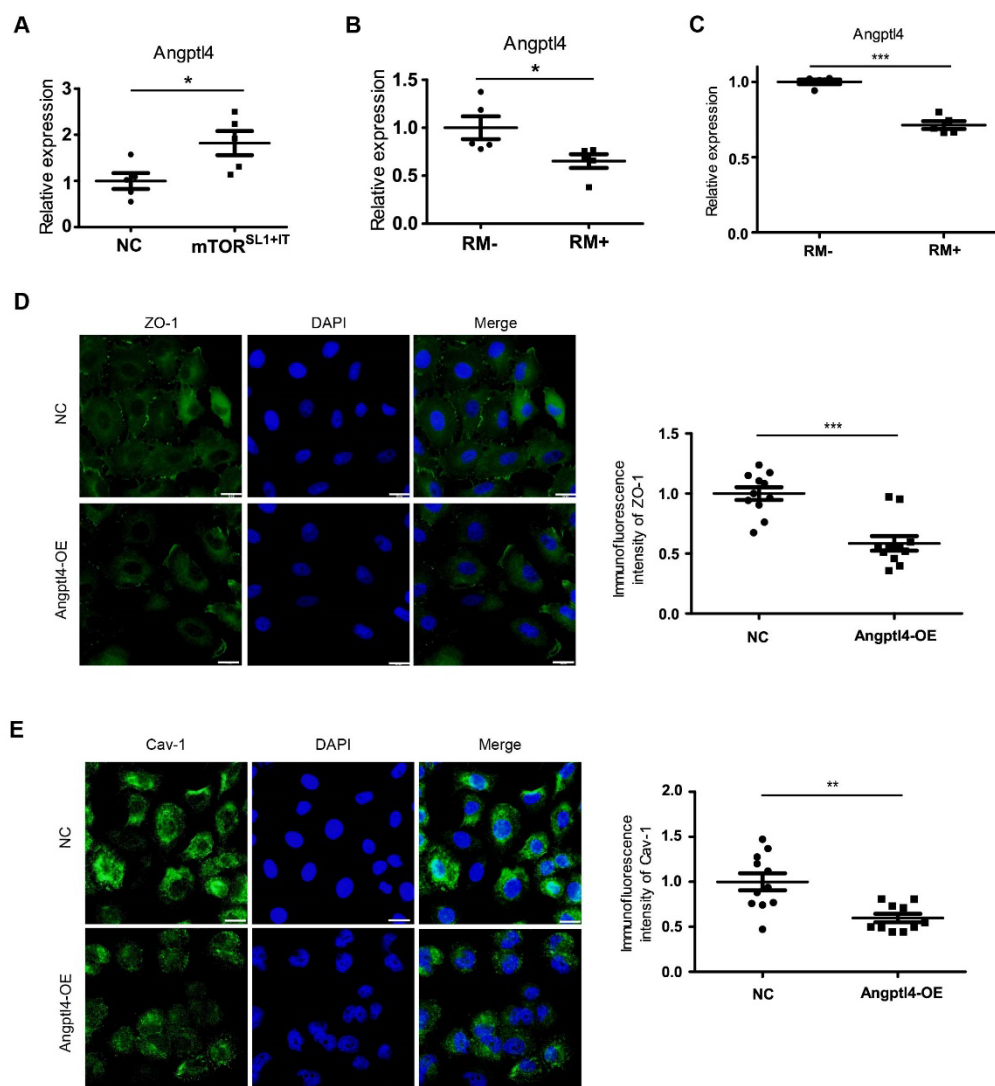
肺胞上皮細胞における ANGPTL4 の特性の解析

まず、ANGPTL4 が mTOR 経路下流に位置するかを *in vitro* 実験で確認するために、A549 細胞に活性型 mTOR 発現ベクター (mTOR^{SL1+IT}) をトランスフェクションし、ANGPTL4 mRNA 発現量を qRT-PCR で測定した。その結果、ANGPTL4 mRNA 発現量はコントロールと比較して有意に上昇した (Figure 9A)。一方でラパマイシン (5nM) の投与により A549 細胞及び初代ヒト肺胞上皮細胞においても ANGPTL4 mRNA 発現量の有意な低下を認めた (Figure 9B, C)。以上の結果から肺胞上皮細胞において ANGPTL4 が mTOR 経路の下流に位置し、特に mTORC1 下に制御されていることが確認できた。

次に、活性型 mTOR で発現低下がみられた ZO-1 及び Cav-1 の発現が mTOR 下流に位置する ANGPTL4 によって発現が制御されているかを検証するために、A549 細胞に ANGPTL4 過剰発現ベクターをトランスフェクションして、免疫蛍光染色で ZO-1 及び Cav-1 の発現を調べた。その結果、ANGPTL4 過剰発現 A549 細胞ではいずれの発現も有意に低下していた (Figure 9D, E)。さらに、初代ヒト肺胞上皮細胞においても ANGPTL4 の過剰発現により ZO-1 及び Cav-1 の発現が低下することが免疫蛍光染色で確認できた (Figure 9F, G)。このことから ANGPTL4 がタイトジャンクションを構成する ZO-1 の発現を低下させ、EMT の制御を抑制することが示唆されたため、EMT を促進するかを検証した。

ANGPTL4 過剰発現 A549 細胞に TGF β 1 (5 μ g/mL) 刺激をして回収したタンパク質をウェスタンブロッティングで解析した。その結果、ANGPTL4 過剰発現 A549 細胞で有意に E-cadherin の発現低下を認めた (Figure 9H)。

Figure 9



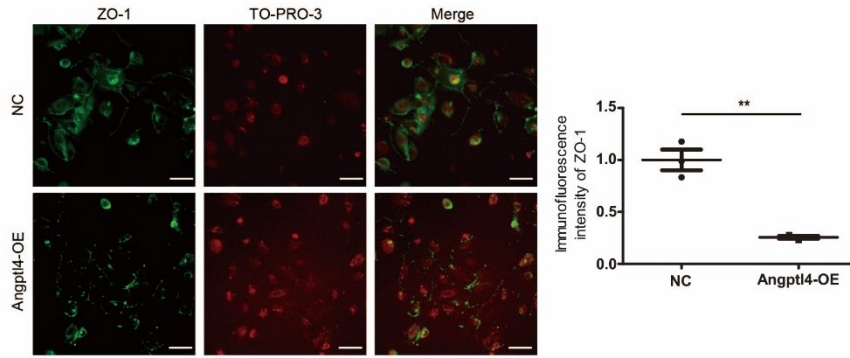
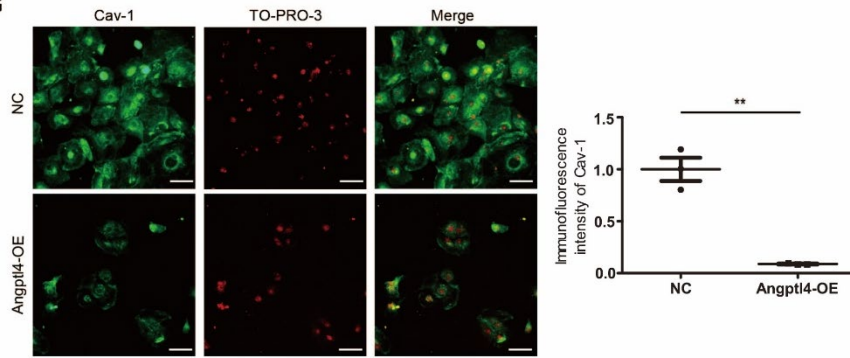
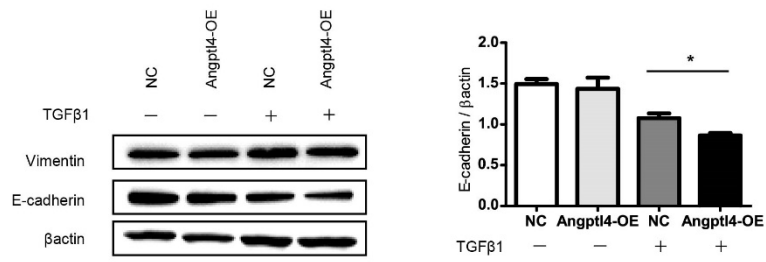
F**G****H**

Figure 9. 肺胞上皮細胞における ANGPTL4 の特性の解析

- A) A549 細胞に活性型 mTOR 発現ベクター (mTOR^{SL1+IT}; pcDNA3.1-FLAG-mTOR^{SL1+IT}) または、コントロールベクター (NC; pcDNA3) をトランスフェクションし、mRNA 発現量を qRT-PCR で測定した (n = 5)。
- B) A549 細胞に 5 nM ラパマイシンを添加し mRNA 発現量を qRT-PCR で測定した (n = 5)。
- C) 初代ヒト肺胞上皮細胞に 5 nM ラパマイシンを添加し mRNA 発現量を qRT-PCR で測定した (n = 3)。
- D) A549 細胞に ANGPTL4 過剰発現ベクター (ANGPTL4-OE) または、コントロールベクター (NC; pcDNA3) をトランスフェクションし、一次抗体 ZO-1 で標識し免疫蛍光染色を行った。
- E) D と同様に、一次抗体 Cav-1 で標識し免疫蛍光染色を行った。スケールバーは 20 μm を示す。11 視野の蛍光強度を Image J で測定した。
- F) 初代ヒト肺胞上皮細胞に ANGPTL4 過剰発現ベクター (ANGPTL4-OE) または、コントロールベクター (NC; pcDNA3) をトランスフェクションし、一次抗体 ZO-1 で標識し免疫蛍光染色を行った。
- G) F と同様に、一次抗体 Cav-1 で標識し免疫蛍光染色を行った。スケールバーは 20 μm を示す。3 視野の蛍光強度を Image J で測定した。
- H) A549 細胞に ANGPTL4 過剰発現ベクター (ANGPTL4-OE) または、コントロールベクター (NC; pcDNA3) をトランスフェクション後に EMT を誘導し、回収したタンパク質でウェスタンブロッティングを行った (n = 3)。デンシトメトリーの測定は β アクチンをコントロールとした。

エラーバーは標準誤差を示す。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

肺胞上皮細胞における ANGPTL4 の発現調節経路の解析

肺胞上皮細胞における ANGPTL4 の発現調節経路を解析するために、脂肪細胞や血管内皮細胞における ANGPTL4 の発現調節に転写因子である PPAR γ 、HIF1 α 、及び FOXO1 が関与していることが報告されている[69-71]ため、A549 細胞において、それらの siRNA を用いて各転写因子をノックダウンし、24 時間後に ANGPTL4 mRNA 発現量を解析した。各転写因子のノックダウン効率は、PPAR γ 82%、HIF1 α 94%、及び FOXO1 64%であった (Figure 10A)。ANGPTL4 mRNA 発現量は、siHIF1 α 、siFOXO1 において低下傾向であり、siPPAR γ によりコントロールと比較して有意に低下した (Figure 10B)。

さらに、活性型 mTOR による ANGPTL4 の発現調節に関与している経路を特定するために、A549 細胞に活性型 mTOR 発現ベクター (mTOR^{SL1 + IT}) 及び ANGPTL4 の転写因子である PPAR γ 、HIF1 α 、または FOXO1 の siRNA を用いてコトランスフェクションを行った。24 時間後に mRNA 発現量を qRT-PCR で測定したが各転写因子のノックダウンによる ANGPTL4 mRNA の有意な発現低下は認めなかった (Figure 10C)。しかし、この系では、活性型 mTOR による ANGPTL4 mRNA の発現上昇は認められず、コトランスフェクション試薬の毒性による影響などで実験系がうまく機能していない可能性が考えられた。

Figure 10

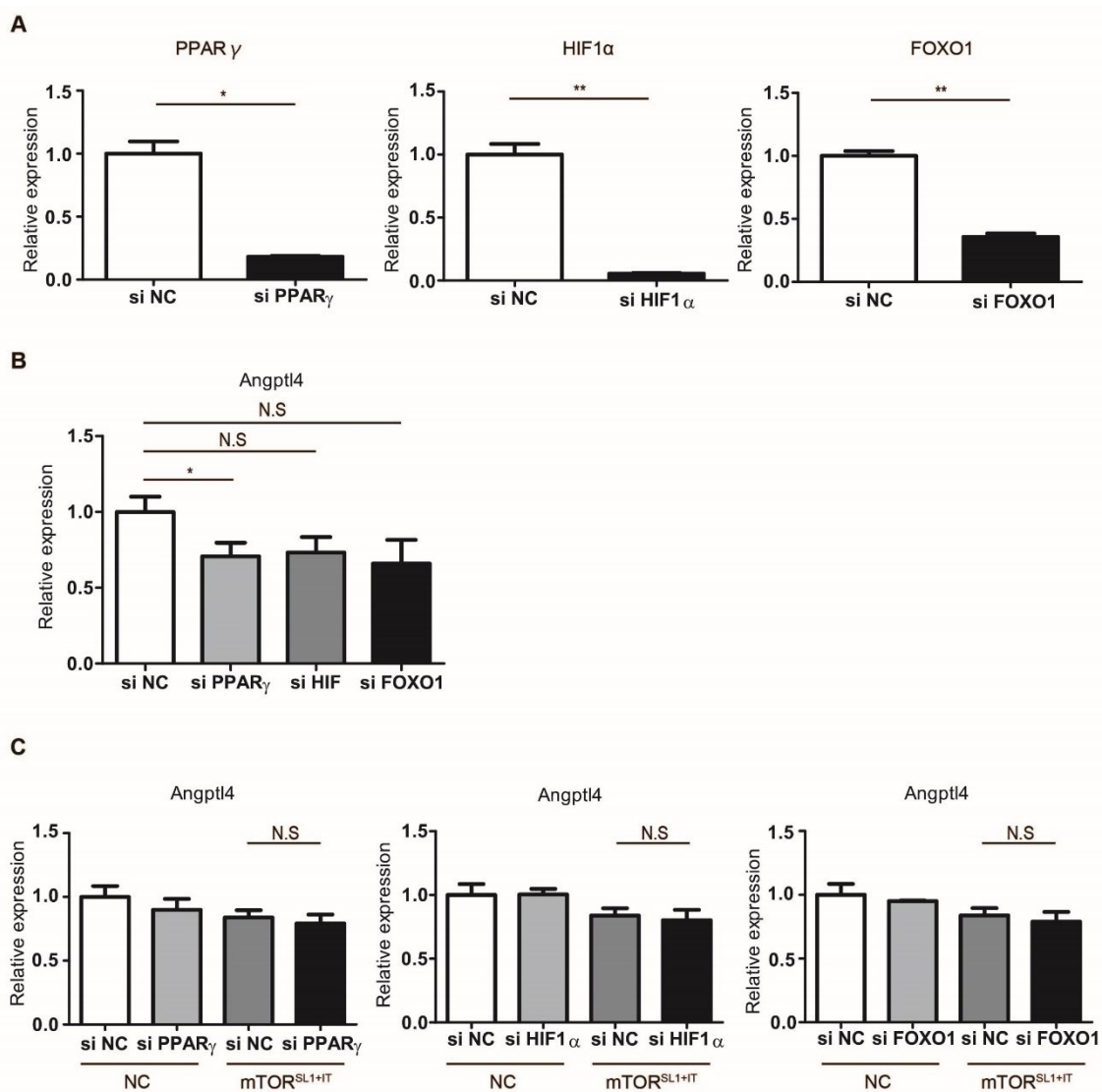


Figure 10. 肺胞上皮細胞における ANGPTL4 の発現調節経路の解析

- A) A549 細胞に siRNA で PPAR γ 、HIF1 α 、または FOXO1 をノックダウンし、それぞれの転写因子の mRNA 発現量を qRT-PCR で測定した (n = 3)。
- B) A549 細胞に siRNA で PPAR γ 、HIF1 α 、または FOXO1 をノックダウンし、ANGPTL4 mRNA 発現量を qRT-PCR で測定した (n = 3)。
- C) A549 細胞に活性型 mTOR 発現ベクター (mTOR^{SL1+IT}) または、コントロールベクター (NC; pcDNA3) 及び PPAR γ 、HIF1 α 、または FOXO1 の siRNA を

用いてコトランスフェクションを行い、mRNA 発現量を qRT-PCR で測定した (n = 4)。

エラーバーは標準誤差を示す。*p < 0.05, **p < 0.01。N.S; not significant。

ANGPTL4 ノックダウンによる機能の解析

次に ANGPTL4 のノックダウンによる機能を解析した。A549 細胞は肺腺癌細胞株であり正常肺上皮細胞と遺伝子発現プロファイルが異なり[72]、ANGPTL4 の発現プロファイルも正常肺上皮細胞と異なることが予想されるため、初代ヒト肺胞上皮細胞を培養し、ANGPTL4 ノックダウンによる ZO-1 及び Cav-1 の発現への影響を解析した。ANGPTL4 のノックダウン効率は 90%であった (Figure 11A)。ZO-1 の発現量は ANGPTL4 ノックダウンにより有意な上昇を認め、Cav-1 の発現量は有意な増加は認めなかったが、ANGPTL4 ノックダウンにより上昇傾向を認めた (Figure 11B)。

Figure 11

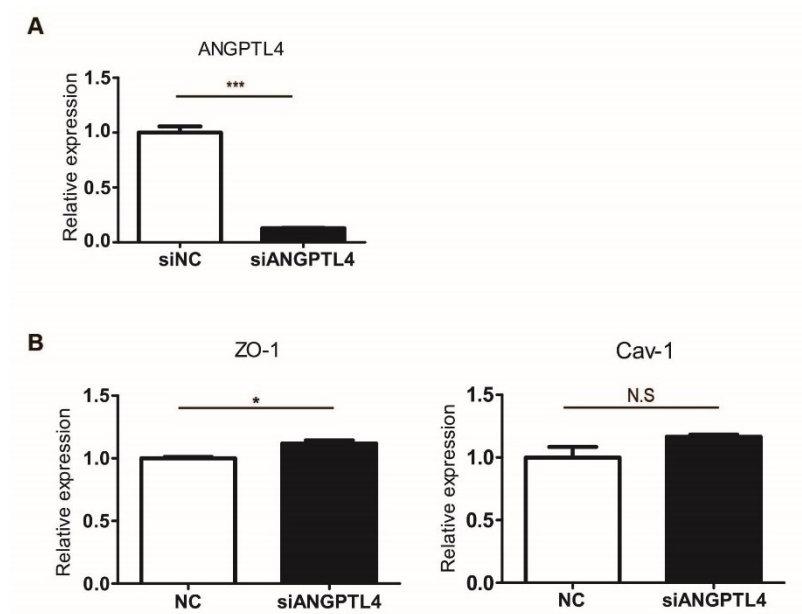


Figure 11. ANGPTL4 ノックダウンによる機能の解析

A) 初代ヒト肺胞上皮細胞に siANGPTL4 をトランスフェクションし、ANGPTL4 mRNA 発現量を qRT-PCR で解析した (n = 3)。

B) A と同様に ZO-1 または Cav-1 の mRNA 発現量を qRT-PCR で解析した (n = 3)。

エラーバーは標準誤差を示す。* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ 。N.S; not significant。

考察

本研究では、**Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg** マウスにおいて、ブレオマイシン肺線維症モデルにおいて肺線維化の増悪を認めた。その機序として、肺上皮特異的活性型 **mTOR** マウスでタイトジャンクションを構成するタンパクである **ZO-1** と、EMT に抑制的に作用する **Cav-1** の発現が低下していたことから、**mTOR** 経路の活性化により肺胞上皮細胞傷害及び EMT が促進されたことが示唆された。さらに、本研究では、網羅的発現解析によりアンジオポエチン様タンパク質 (**ANGPTL**) 4 が新たな **mTOR** の下流遺伝子であることを見出した。細胞実験の結果から、**ANGPTL4** は、**ZO-1** と **Cav-1** の発現調節に関与している可能性が示唆され、肺線維症の治療ターゲットとなり得ると考えられた。

・ **Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg** マウスの表現型の解析

Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウスは、肺上皮細胞においてタイトジャンクションを構成する **ZO-1** と、EMT に抑制的に作用する **Cav-1** の発現が有意に減少していた。一方で、**Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg** マウスは、光学顕微鏡及び電子顕微鏡による観察において構造上の明らかな違いは認めなかった。この結果は、両群の肺の生理学的検査や血管透過性の比較において有意差を認めず、摘出肺の **mRNA** 発現量の比較においても肺胞上皮細胞、気道上皮細胞、血管内皮細胞、間葉系細胞の

マーカーのいずれも有意差を認めなかったという結果からも裏付けられる。

この原因として次のことが考えられる。肺胞上皮細胞の正常な修復が進み、EMT の進行を抑制するには、肺胞上皮に存在するインテグリン $\alpha 3\beta 1$ と E-cadherin の結合及び、インテグリン $\alpha 3\beta 1$ と基底膜の主成分であるラミニン 5 の結合によって肺胞上皮細胞の integrity が保たれていることが重要であると報告されている[73, 74]。本研究では、上皮基底膜の破壊に寄与するとされる MMP2、MMP9(6)の発現は、Sftpc-mTOR^{SL1 + IT} Tg マウスにおいて有意な上昇を認めなかった。また、タイトジャンクションを構成するタンパクの一つである Claudin4 を II 型肺胞上皮細胞に過剰発現すると肺胞上皮細胞のバリア機能が増強され、Claudin4 阻害ペプチドをマウスに投与すると肺傷害後に上皮細胞の透過性が亢進して肺水腫が増強した[75, 76]と報告されていることから Claudin4 も肺胞上皮細胞の integrity の維持に重要なタンパクであることが示唆される。本研究では、ZO-1 の発現低下は見られたが、この Claudin4 の変動は認めなかった。したがって、これらの因子が正常であることにより、Sftpc-mTOR^{SL1 + IT} Tg マウスは肺胞上皮細胞の integrity が維持され、コントロールマウスと比較して表現型の違いを認めなかったと考えられる。また、Cav-1 ノックアウトマウスにおいて、II 型肺胞上皮細胞の構造や肺サーファクタントの恒常性に異常は認めなかったという報告[77]もあり、本研究の結果とも一致する。

さらに、IPF の病態に II 型肺胞上皮細胞の細胞老化が関与することが知られており[55]、Adnot らは、II 型肺胞上皮細胞における慢性的な mTOR 活性化は細胞老化を促進すると報告した[56]。しかし、本研究で用いた Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウスでは細胞老化マーカーの亢進は認めなかった。この原因としては、上述の報告では、タモキシフェン誘導型 Cre リコンビナーゼを利用した肺上皮特異的 TSC1 ノックアウトマウスを用いて解析しており、本研究で用いたトランスジェニックマウスと同様に pS6K1、pAkt^{Ser-473} の発現増強を認めているが、活性型 mTOR の発現時期や mTOR 活性化のメカニズムの違いを反映している可能性が考えられる。

・活性型 mTOR 過剰発現 A549 細胞の特性の解析

In vitro 実験においても、肺胞上皮細胞での mTOR 活性化により ZO-1 及び Cav-1 の発現低下を認め、マウス肺の解析と矛盾しない結果であった。さらに、活性型 mTOR 過剰発現 A549 細胞では TGFβ1 刺激によって vimentin の発現が上昇しており、より EMT が促進されることが示された。本研究では、EMT によって産生される間葉性成分を特徴づける重要なマーカーである αSMA や Col I の発現は、活性型 mTOR 過剰発現 A549 細胞において一定の結果を認めなかった。本研究で発現の上昇を認めた vimentin は、慢性炎症によって引き起こされる EMT

の過程にある上皮細胞の指標とされている[28]。また、IPF 患者肺から単離した II 型肺胞上皮細胞のシングルセルシーケンスの結果から、正常な II 型肺胞上皮細胞の細胞特性を持つ細胞集団で Vimentin の発現亢進を認め、IPF 患者肺の正常肺組織で Vimentin と E-cadherin を共発現する上皮細胞を免疫蛍光染色で認めた[22]ことから、Vimentin は EMT の比較的早期の指標であることが示唆され、EMT の進行時期や mTOR 活性化の程度、TGF β 1 刺激の程度などを反映している可能性が考えられたが、更なる検証が必要である。

また、上皮傷害により基底膜が破壊され極性を失った II 型肺胞上皮細胞はアポトーシスに陥るか EMT を経て間質に遊走する[28]が、活性型 mTOR 過剰発現 A549 細胞はブレオマイシン刺激でアポトーシスの誘導を認めなかった。この原因として、A549 細胞は癌細胞株であり正常の肺胞上皮細胞と異なる細胞特性を持つ影響も考えられる。

・ブレオマイシン刺激肺線維症モデルマウスでの肺上皮特異的 mTOR 活性化の役割の検討

次に、肺上皮特異的な mTOR 活性化が肺線維症の病態に及ぼす影響についてブレオマイシン刺激肺線維症モデルマウスを使って検証した。その結果、Sftpc-mTOR^{SL1+IT} Tg マウスは、ブレオマイシン刺激によって線維化の増悪を有意に認

めた。肺上皮細胞において mTOR 活性化により ZO-1 及び Cav-1 の発現が低下することで、タイトジャンクションが脆弱化し EMT 抑制作用が軽減しており、さらにブレオマイシンによる強い上皮傷害が起こると、上皮基底膜が破壊され、肺胞上皮細胞の異常修復が進み、再上皮化が機能せず、EMT が促進し線維化の増悪をきたしたと推察される。EMT によって増加した線維芽細胞の生存や増殖などに mTOR 活性化が影響を与えた可能性はあるが、ブレオマイシン刺激後の Sftpc-mTOR^{SL1 + IT} Tg マウスでは、肺組織の病理学的解析において局所の線維化病変の増悪だけではなく、線維化病変がより広範囲に出現していることが観察され、mTOR の活性化が EMT の作用そのものに影響した可能性が高いと考えられる。

ブレオマイシン誘導肺線維症における EMT の関与については、ZEG/SPC-rtTA/tetO-Cre マウスにおいて証明されている[78]が、本研究でのブレオマイシン誘導肺線維症マウスモデルにおいては、活性型 mTOR が発現した肺上皮由来の EMT の関与の証明はできていない。今後、Sftpc プロモーター下に GFP を共発現するトランスジェニックマウスを用いて EMT 由来の線維芽細胞の割合を検証する必要がある。さらに、Sftpc-mTOR^{SL1 + IT} Tg マウスにおいてブレオマイシン刺激によりタイトジャンクションの破壊がより促進したことを検証するために、電子顕微鏡でタイトジャンクションの形態を観察するほか、ZO-1 や他のタイト

ジャンクションを構成するタンパクの発現を免疫染色で確認する必要がある。

本研究では、*Sftpc-mTOR^{SL1 + IT}* Tg マウスはブレオマイシン刺激により BALF 中のマクロファージの有意な増加を認めた。ブレオマイシン刺激によって単球由来の肺胞マクロファージが肺に動員され、TNF α や IL-10、IL-1 β 、CCL18、などのサイトカインを分泌し、肺線維化の促進に寄与することが報告されている [79, 80]。さらに、上皮傷害により肺胞上皮細胞で mTOR 経路を介して C-C motif chemokine (CCL) 2 及び CCL12 の発現が上昇し骨髄からのマクロファージの動員が促進されることで線維化に寄与する可能性も報告されている [81]。本研究では RNA シークエンス解析により、肺上皮特異的活性型 mTOR マウスにおいて骨髄からの白血球の誘導に関与する CXCL5 遺伝子を発現変動遺伝子の一つとして検出した。*Sftpc-mTOR^{SL1 + IT}* Tg マウスではブレオマイシン刺激によりマクロファージの動員が促進され、線維化増悪に寄与した可能性はあるが、肺上皮特異的な mTOR 活性化によってマクロファージの活性化が促進するかについては更なる検証が必要である。今後ブレオマイシン誘導肺線維症マウスモデルにおいて BALF 中の CXCL5 の測定を検討している。

またブレオマイシン誘導肺線維症マウスモデルは、刺激後 6 週間程度で線維性病変の自然修復が報告されている [39]。本研究では、線維化の起点となる肺上皮細胞における活性型 mTOR の影響を解析するために線維化早期での解析を主

としたが、mTOR 活性化が組織修復に与える影響を検証するために、ブレオマイシン刺激の後期相での解析も検討されうる。

・ mTOR 経路と ANGPTL4

本研究では、肺上皮特異的な mTOR の活性化がブレオマイシン刺激マウスモデルにおいて肺線維化を増悪させたため、その分子生物学的機序を解明するために、マウスの II 型肺胞上皮細胞を単離し、RNA シークエンス解析による網羅的発現解析を行った。その結果、9 個の遺伝子を発現変動遺伝子として同定した。本研究ではこれらの遺伝子から、ANGPTL4 は *Sftpc*-mTOR^{SL1 + II} Tg マウスで大きく発現が亢進しており、またインフルエンザ感染マウスモデルにおいて II 型肺胞上皮細胞で ANGPTL4 の発現が上昇し、組織透過性の亢進に関与したことが報告されていた[68]ことから、肺上皮細胞に発現した ANGPTL4 が肺胞上皮傷害を促進する可能性についてさらに検証することとした。本研究で使用した活性化型 mTOR は mTORC1 及び mTORC2 を活性化させ、ラパマイシン投与により mTORC1 の発現が著明に抑制されることを示したが、A549 細胞においてラパマイシン投与により ANGPTL4 の発現が抑制されたことから、ANGPTL4 は mTORC1 の下流にあることが示唆された。

・ ANGPTL4 の機能

ANGPTL は血管新生因子であるアンジオポエチンに構造上類似する分泌型タンパク質で、これまでに ANGPTL1-8 の 8 種類が同定されている[82]。ANGPTL4 は肺の他には肝臓、脂肪組織、心臓、骨格筋に豊富に発現しており、肺においては II 型肺胞上皮細胞や血管内皮細胞、気道平滑筋細胞に発現が認められている[83-85]。低酸素や TGF β などの刺激や PPAR、HIF-1、FOXO-1 などの転写因子で発現が調節されている[71, 86]。全長の ANGPTL4 (full-length; flAngptl4) は 406 のアミノ酸から成り、主に肝臓から分泌され、プロタンパク質変換酵素によってタンパク質加水分解を受けて、N末端コイルドコイルドメイン (CCD; nAngptl) 、C末端フィブリノーゲン様ドメイン (FLD; cAngptl) に分解されると報告されている[87]が、詳細については知られていない。nAngptl4 は、lipoprotein lipases (LPL) に結合してその活性を阻害しトリグリセリドの上昇に関与することが報告されている[88]。一方、cAngptl4 は細胞接着分子である β 1 及び β 5 インテグリンに結合して、ケラチノサイトの遊走を促進し創傷治癒に関与する[89, 90]。また、腫瘍細胞においてインテグリンとの相互作用により Src/ERK/PKB α 経路を活性化して、腫瘍細胞の anoikis 抵抗性の獲得や成長に寄与する[91]。さらに、血管内皮細胞において Raf/MEK/ERK 経路を抑制し、血管新生を阻害することも知られている[92]。しかし、Angptl4 の肺上皮及び肺線維症における役割については十分

に知られていない。

本研究では、一時的に ANGPTL4 を過剰発現させた A549 細胞において、免疫蛍光染色で ZO-1 及び Cav-1 の発現低下を確認した。さらに、初代ヒト肺胞上皮細胞において ANGPTL4 ノックダウンにより ZO-1 の有意な上昇を認め、Cav-1 も上昇傾向であったことから、ANGPTL4 の新たな機能として ZO-1 及び Cav-1 の発現調節に関与している可能性が示唆された。また、A549 細胞において、ANGPTL4 が EMT を促進することも示唆された。ANGPTL4 と EMT の関係については、A549 細胞において ANGPTL4 が ERK 経路を介して EMT を促進したという報告[93]や、胃癌細胞において cAngptl4 が 14-3-3 γ タンパク質を活性化し、EMT に重要な転写因子 Snai1 と複合体を形成して E-cadherin のプロモーターと結合してその転写を抑制し、EMT を促進させたという報告[94]がある。本研究では、その分子学的機序については解明できていないが、ANGPTL4 が Cav-1 の発現を抑制することで、Cav-1 による EMT 抑制効果が減弱し EMT が促進したと推察される。本研究の細胞実験においては全長の ANGPTL4 の機能を解析しており、今後は cANGPTL4 や nANGPTL4 抗体を作成し、ブレオマイシン刺激マウスモデルにおいて ANGPTL4 の各フラグメントの機能の解析を検討している。

・ ANGPTL4 の発現調節機序の解析

A549 細胞における ANGPTL4 の発現調節経路を解明するために転写因子である PPAR γ 、HIF1 α 、FOXO1 のそれぞれのノックダウンで ANGPTL4 の発現量を解析し比較したが、各転写因子のノックダウン条件の違いや、各転写因子の相互作用などの影響が結果に及ぼしている可能性を考慮し、今後 Chromatin Immunoprecipitation Assay を用いて転写因子と DNA の結合相互作用を介した転写調節を解析し、ANGPTL4 の特異的な発現調節因子を検証する必要がある。

また、活性型 mTOR ベクターの存在下で、各転写因子 PPAR γ 、HIF1 α 、FOXO1 のそれぞれのノックダウンで ANGPTL4 の発現に有意な変化は認めなかった。この結果については、コトランスフェクション試薬による毒性の影響や、元々 A549 細胞における ANGPTL4 の発現が少ない影響が原因として考えられる。

・本研究の限界と今後の展望

今回、Sftpc-mTOR^{SL1 + IT} Tg マウスを使用することで、肺上皮細胞での慢性的な mTOR 活性化が及ぼす直接的な影響を初めて明らかとした。本研究の結果から、mTOR 経路の活性化が肺胞上皮のタイトジャンクションの脆弱化及び、EMT 促進に関与していることが示唆され、IPF の病態への関与を明らかにした。さらに mTOR 経路下流に位置する ANGPTL4 が、ZO-1 及び Cav-1 の発現調節に関与し、IPF 治療における新規ターゲットである可能性が示唆された (Figure 12)。

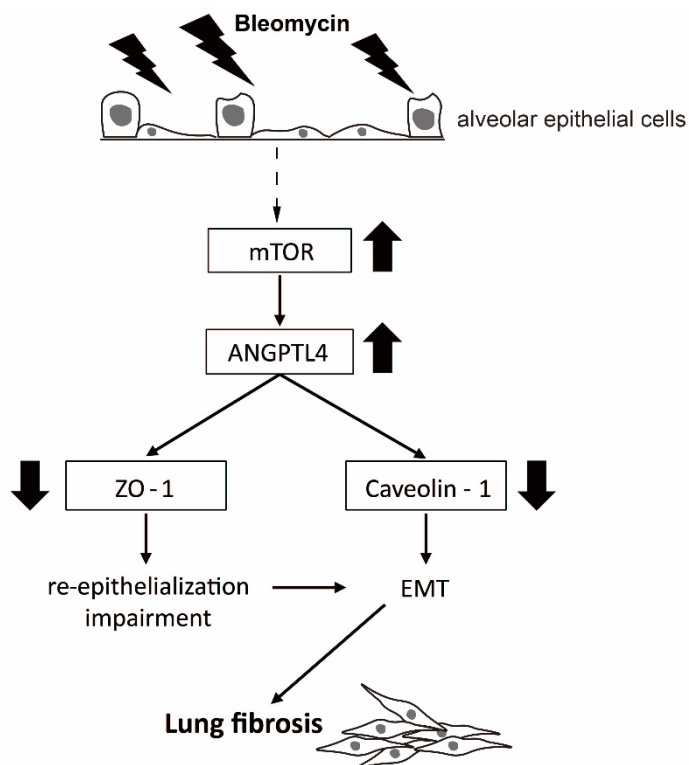


Figure 12. 本研究の結果が示す概略図 (仮説)

本研究の限界点としては、まず、マウスの全肺組織から抽出したタンパク質で活性型 mTOR マウスの mTOR 活性を確認しているため活性型 mTOR マウス由来の mTOR の肺上皮特異的な発現を確認できておらず、内因性 mTOR の影響を除外できていない点があげられる。今後マウス肺組織において FLAG タグの免疫染色により確認する必要がある。また本研究では、ブレオマイシン誘導肺線維症モデルマウスの肺上皮細胞で mTOR 活性が上昇していることを確認できていないため、今後マウスの II 型肺胞上皮細胞を単離してウェスタンブロッティングで mTOR 活性を確認するほか、免疫染色で pS6K1 や pAkt の発現の亢進を確

認する必要がある。さらにマウスのブレオマイシン誘導肺線維症の病態への ANGPTL4 の関与を直接証明できていない点があげられる。今後、ブレオマイシン刺激肺線維症マウスモデルを用いて、抗 ANGPTL4 中和抗体を投与した実験や、ANGPTL4 ノックアウトマウスの実験を検討したい。さらには、IPF 患者の血清で ANGPTL4 を測定し、IPF の重症度や病勢、治療効果などとの関係を明らかにし、ANGPTL4 が IPF のバイオマーカーとなり得る可能性を検証したいと考えている。

結論

肺上皮特異的活性型 mTOR マウスでは、タイトジャンクションタンパクである ZO-1 及び EMT に抑制的に作用する Cav-1 の発現が有意に低下しており、ブレオマイシン刺激による肺線維化の増強を認めた。その機序として、mTOR 経路が活性化することで、肺線維症の発症初期への関与が示唆されている肺上皮細胞の傷害と EMT が促進したことが考えられる。さらに、RNA シークエンス解析により mTOR 経路下流に位置する ANGPTL4 を見出した。ANGPTL4 が ZO-1 と Cav-1 の発現調節に関与している可能性が示唆され、肺線維症の治療ターゲットとなり得る可能性が示された。

謝辞

本論文の作成にあたり、終始多大なるご指導とご教示を賜りました、東京大学大学院 医学系研究科 器官病態内科学講座 呼吸器内科学 長瀬 隆英教授に厚く御礼申し上げます。

また、本研究遂行にあたりご指導・ご鞭撻を頂きました呼吸器内科 助教 三谷 明久先生に厚く御礼を申し上げます。

本研究の遂行にあたりご協力いただきました東京大学医学部・大学院 医学系研究科 疾患生命工学センター・動物資源学部門 饗庭 篤教授、東京大学医学部・大学院 医学系研究科 疾患生命工学センター・動物資源学部門 葛西 秀俊准教授、東京大学大学院 医学系研究科 病因・病理学専攻 分子病理学 森下 保幸氏に感謝いたします。

最後に、本研究遂行に当たり、貴重な討論とご助言を頂きました呼吸器内科 243 研究室並びに 517 研究室の先生方に厚く御礼申し上げます。

引用文献

1. Raghu G, Remy-Jardin M, Myers JL, Richeldi L, Ryerson CJ, Lederer DJ, Behr J, Cottin V, Danoff SK, Morell F, Flaherty KR, Wells A, Martinez FJ, Azuma A, Bice TJ, Bouros D, Brown KK, Collard HR, Duggal A, Galvin L, Inoue Y, Jenkins RG, Johkoh T, Kazerooni EA, Kitaichi M, Knight SL, Mansour G, Nicholson AG, Pipavath SNJ, Buendia-Roldan I, Selman M, Travis WD, Walsh S, Wilson KC. Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*; 198: e44-e68; 2018.
2. Natsuizaka M, Chiba H, Kuronuma K, Otsuka M, Kudo K, Mori M, Bando M, Sugiyama Y, Takahashi H. Epidemiologic survey of Japanese patients with idiopathic pulmonary fibrosis and investigation of ethnic differences. *Am J Respir Crit Care Med*; 190: 773-779; 2014.
3. Raghu G, Rochweg B, Zhang Y, Garcia CA, Azuma A, Behr J, Brozek JL, Collard HR, Cunningham W, Homma S, Johkoh T, Martinez FJ, Myers J, Protzko SL, Richeldi L, Rind D, Selman M, Theodore A, Wells AU, Hoogsteden H, Schunemann HJ. An Official ATS/ERS/JRS/ALAT Clinical Practice Guideline: Treatment of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. An Update of the 2011 Clinical Practice Guideline. *Am J Respir Crit Care Med*; 192: e3-19; 2015.
4. Brown KK, Flaherty KR, Cottin V, Raghu G, Inoue Y, Azuma A, Huggins JT, Richeldi

- L, Stowasser S, Stansen W, Schlenker-Herceg R, Maher TM, Wells AU. Lung function outcomes in the INPULSIS((R)) trials of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med*; 146: 42-48; 2019.
5. Zurkova M, Kriegova E, Kolek V, Lostakova V, Sterclova M, Bartos V, Doubkova M, Binkova I, Svoboda M, Strenkova J, Janotova M, Plackova M, Lacina L, Rihak V, Petrik F, Lisa P, Bittenglova R, Tyl R, Ondrejka G, Suldova H, Lnenicka J, Psikalova J, Snizek T, Homolka J, Kralova R, Kervitzer J, Vasakova M. Effect of pirfenidone on lung function decline and survival: 5-yr experience from a real-life IPF cohort from the Czech EMPIRE registry. *Respir Res*; 20: 16; 2019.
6. Selman M, Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: an epithelial/fibroblastic cross-talk disorder. *Respir Res*; 3: 3; 2002.
7. Selman M, Pardo A. The epithelial/fibroblastic pathway in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 29: S93-97; 2003.
8. Lederer DJ, Martinez FJ. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med*; 378: 1811-1823; 2018.
9. Konigshoff M, Balsara N, Pfaff EM, Kramer M, Chrobak I, Seeger W, Eickelberg O. Functional Wnt signaling is increased in idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS One*; 3: e2142; 2008.

10. Stewart GA, Hoyne GF, Ahmad SA, Jarman E, Wallace WA, Harrison DJ, Haslett C, Lamb JR, Howie SE. Expression of the developmental Sonic hedgehog (Shh) signalling pathway is up-regulated in chronic lung fibrosis and the Shh receptor patched 1 is present in circulating T lymphocytes. *J Pathol*; 199: 488-495; 2003.
11. King TE, Jr., Pardo A, Selman M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet*; 378: 1949-1961; 2011.
12. Selman M, Pardo A. Role of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis: from innocent targets to serial killers. *Proc Am Thorac Soc*; 3: 364-372; 2006.
13. Demling N, Ehrhardt C, Kasper M, Laue M, Knels L, Rieber EP. Promotion of cell adherence and spreading: a novel function of RAGE, the highly selective differentiation marker of human alveolar epithelial type I cells. *Cell Tissue Res*; 323: 475-488; 2006.
14. Queisser MA, Kouri FM, Konigshoff M, Wygrecka M, Schubert U, Eickelberg O, Preissner KT. Loss of RAGE in pulmonary fibrosis: molecular relations to functional changes in pulmonary cell types. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 39: 337-345; 2008.
15. Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2: 285-293; 2001.

16. Neuhaus W, Samwer F, Kunzmann S, Muellenbach RM, Wirth M, Speer CP, Roewer N, Forster CY. Lung endothelial cells strengthen, but brain endothelial cells weaken barrier properties of a human alveolar epithelium cell culture model. *Differentiation*; 84: 294-304; 2012.
17. Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA. Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol*; 103: 755-766; 1986.
18. Poritz LS, Garver KI, Green C, Fitzpatrick L, Ruggiero F, Koltun WA. Loss of the tight junction protein ZO-1 in dextran sulfate sodium induced colitis. *J Surg Res*; 140: 12-19; 2007.
19. Shi YY, Liu TJ, Fu JH, Xu W, Wu LL, Hou AN, Xue XD. Vitamin D/VDR signaling attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by maintaining the integrity of the pulmonary epithelial barrier. *Mol Med Rep*; 13: 1186-1194; 2016.
20. Miyoshi K, Yanagi S, Kawahara K, Nishio M, Tsubouchi H, Imazu Y, Koshida R, Matsumoto N, Taguchi A, Yamashita S, Suzuki A, Nakazato M. Epithelial Pten controls acute lung injury and fibrosis by regulating alveolar epithelial cell integrity. *Am J Respir Crit Care Med*; 187: 262-275; 2013.
21. Mihai C, Bao S, Lai JP, Ghadiali SN, Knoell DL. PTEN inhibition improves wound

- healing in lung epithelia through changes in cellular mechanics that enhance migration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 302: L287-299; 2012.
22. Xu Y, Mizuno T, Sridharan A, Du Y, Guo M, Tang J, Wikenheiser-Brokamp KA, Perl AT, Funari VA, Gokey JJ, Stripp BR, Whitsett JA. Single-cell RNA sequencing identifies diverse roles of epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *JCI Insight*; 1: e90558; 2016.
23. Hardie WD, Glasser SW, Hagood JS. Emerging concepts in the pathogenesis of lung fibrosis. *Am J Pathol*; 175: 3-16; 2009.
24. Tanjore H, Xu XC, Polosukhin VV, Degryse AL, Li B, Han W, Sherrill TP, Plieth D, Neilson EG, Blackwell TS, Lawson WE. Contribution of epithelial-derived fibroblasts to bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*; 180: 657-665; 2009.
25. Kalluri R, Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest*; 112: 1776-1784; 2003.
26. Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, Nicholson AG, Crandall ED, du Bois RM, Borok Z. Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*; 166: 1321-1332; 2005.

27. Larsson O, Diebold D, Fan D, Peterson M, Nho RS, Bitterman PB, Henke CA. Fibrotic myofibroblasts manifest genome-wide derangements of translational control. *PLoS One*; 3: e3220; 2008.
28. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*; 119: 1420-1428; 2009.
29. Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh FN, Yang CQ, Kalluri R, Muller GA, Neilson EG. Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int*; 61: 1714-1728; 2002.
30. Tourkina E, Gooz P, Pannu J, Bonner M, Scholz D, Hacker S, Silver RM, Trojanowska M, Hoffman S. Opposing effects of protein kinase Calpha and protein kinase Cepsilon on collagen expression by human lung fibroblasts are mediated via MEK/ERK and caveolin-1 signaling. *J Biol Chem*; 280: 13879-13887; 2005.
31. Tourkina E, Hoffman S. Caveolin-1 signaling in lung fibrosis. *Open Rheumatol J*; 6: 116-122; 2012.
32. Kulshrestha R, Singh H, Pandey A, Mehta A, Bhardwaj S, Jaggi AS. Caveolin-1 as a critical component in the pathogenesis of lung fibrosis of different etiology: Evidences and mechanisms. *Exp Mol Pathol*; 111: 104315; 2019.
33. Xia H, Khalil W, Kahm J, Jessurun J, Kleidon J, Henke CA. Pathologic caveolin-1

- regulation of PTEN in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol*; 176: 2626-2637; 2010.
34. Nho RS, Peterson M, Hergert P, Henke CA. FoxO3a (Forkhead Box O3a) deficiency protects Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) fibroblasts from type I polymerized collagen matrix-induced apoptosis via caveolin-1 (cav-1) and Fas. *PLoS One*; 8: e61017; 2013.
35. Xu S, Xue X, You K, Fu J. Caveolin-1 regulates the expression of tight junction proteins during hyperoxia-induced pulmonary epithelial barrier breakdown. *Respir Res*; 17: 50; 2016.
36. Wang R, Ramos C, Joshi I, Zagariya A, Pardo A, Selman M, Uhal BD. Human lung myofibroblast-derived inducers of alveolar epithelial apoptosis identified as angiotensin peptides. *Am J Physiol*; 277: L1158-1164; 1999.
37. Waghray M, Cui Z, Horowitz JC, Subramanian IM, Martinez FJ, Toews GB, Thannickal VJ. Hydrogen peroxide is a diffusible paracrine signal for the induction of epithelial cell death by activated myofibroblasts. *Faseb j*; 19: 854-856; 2005.
38. Kulasekaran P, Scavone CA, Rogers DS, Arenberg DA, Thannickal VJ, Horowitz JC. Endothelin-1 and transforming growth factor-beta1 independently induce

- fibroblast resistance to apoptosis via AKT activation. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 41: 484-493; 2009.
39. Della Latta V, Cecchetti A, Del Ry S, Morales MA. Bleomycin in the setting of lung fibrosis induction: From biological mechanisms to counteractions. *Pharmacol Res*; 97: 122-130; 2015.
40. Tashiro J, Rubio GA, Limper AH, Williams K, Elliot SJ, Ninou I, Aidinis V, Tzouveleakis A, Glassberg MK. Exploring Animal Models That Resemble Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Front Med (Lausanne)*; 4: 118; 2017.
41. Allen RJ, Guillen-Guio B, Oldham JM, Ma SF, Dressen A, Paynton ML, Kraven LM, Obeidat M, Li X, Ng M, Braybrooke R, Molina-Molina M, Hobbs BD, Putman RK, Sakornsakolpat P, Booth HL, Fahy WA, Hart SP, Hill MR, Hirani N, Hubbard RB, McAnulty RJ, Millar AB, Navaratnam V, Oballa E, Parfrey H, Saini G, Whyte MKB, Zhang Y, Kaminski N, Adegunsoye A, Streck ME, Neighbors M, Sheng XR, Gudmundsson G, Gudnason V, Hatabu H, Lederer DJ, Manichaikul A, Newell JD, Jr., O'Connor GT, Ortega VE, Xu H, Fingerlin TE, Bosse Y, Hao K, Joubert P, Nickle DC, Sin DD, Timens W, Furniss D, Morris AP, Zondervan K, Hall IP, Sayers I, Tobin MD, Maher TM, Cho MH, Hunninghake GM, Schwartz DA, Yaspan BL, Molyneaux PL, Flores C, Noth I, Jenkins RG, Wain LV. Genome-

- Wide Association Study of Susceptibility to Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2019.
42. Goc A, Choudhary M, Byzova TV, Somanath PR. TGFbeta- and bleomycin-induced extracellular matrix synthesis is mediated through Akt and mammalian target of rapamycin (mTOR). *J Cell Physiol*; 226: 3004-3013; 2011.
43. Han B, Chu C, Su X, Zhang N, Zhou L, Zhang M, Yang S, Shi L, Zhao B, Niu Y, Zhang R. N(6)-methyladenosine-dependent primary microRNA-126 processing activated PI3K-AKT-mTOR pathway drove the development of pulmonary fibrosis induced by nanoscale carbon black particles in rats. *Nanotoxicology*: 1-20; 2019.
44. Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*; 78: 35-43; 1994.
45. Saxton RA, Sabatini DM. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*; 168: 960-976; 2017.
46. Laplante M, Sabatini DM. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*; 149: 274-293; 2012.
47. Dazert E, Hall MN. mTOR signaling in disease. *Curr Opin Cell Biol*; 23: 744-755;

- 2011.
48. Yates DH. mTOR treatment in lymphangioliomyomatosis: the role of everolimus. *Expert Rev Respir Med*; 10: 249-260; 2016.
49. Vicary GW, Roman J. Targeting the Mammalian Target of Rapamycin in Lung Cancer. *Am J Med Sci*; 352: 507-516; 2016.
50. Mitani A, Ito K, Vuppusetty C, Barnes PJ, Mercado N. Restoration of Corticosteroid Sensitivity in Chronic Obstructive Pulmonary Disease by Inhibition of Mammalian Target of Rapamycin. *Am J Respir Crit Care Med*; 193: 143-153; 2016.
51. Nho RS, Hergert P. IPF fibroblasts are desensitized to type I collagen matrix-induced cell death by suppressing low autophagy via aberrant Akt/mTOR kinases. *PLoS One*; 9: e94616; 2014.
52. Bai L, Bernard K, Tang X, Hu M, Horowitz JC, Thannickal VJ, Sanders YY. Glutaminolysis Epigenetically Regulates Antiapoptotic Gene Expression in Idiopathic Pulmonary Fibrosis Fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol*; 60: 49-57; 2019.
53. Lawrence J, Nho R. The Role of the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in Pulmonary Fibrosis. *Int J Mol Sci*; 19; 2018.

54. Bernard M, Yang B, Migneault F, Turgeon J, Dieude M, Olivier MA, Cardin GB, El-Diwany M, Underwood K, Rodier F, Hebert MJ. Autophagy drives fibroblast senescence through MTORC2 regulation. *Autophagy*: 1-13; 2020.
55. Kuwano K, Araya J, Hara H, Minagawa S, Takasaka N, Ito S, Kobayashi K, Nakayama K. Cellular senescence and autophagy in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). *Respir Investig*; 54: 397-406; 2016.
56. Houssaini A, Breau M, Kebe K, Abid S, Marcos E, Lipskaia L, Rideau D, Parpaleix A, Huang J, Amsellem V, Vienney N, Validire P, Maitre B, Attwe A, Lukas C, Vindrieux D, Boczkowski J, Derumeaux G, Pende M, Bernard D, Meiners S, Adnot S. mTOR pathway activation drives lung cell senescence and emphysema. *JCI Insight*; 3; 2018.
57. Chung EJ, Sowers A, Thetford A, McKay-Corkum G, Chung SI, Mitchell JB, Citrin DE. Mammalian Target of Rapamycin Inhibition With Rapamycin Mitigates Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis in a Murine Model. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*; 96: 857-866; 2016.
58. Xu Y, Tai W, Qu X, Wu W, Li Z, Deng S, Vongphoutha C, Dong Z. Rapamycin protects against paraquat-induced pulmonary fibrosis: Activation of Nrf2

- signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*; 490: 535-540; 2017.
59. Wang SH, Li LH, Zou DM, Zheng XM, Deng J. Roles of the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in the repair of hyperoxia-induced acute lung injury. *Adv Clin Exp Med* 2019.
60. Ohne Y, Takahara T, Hatakeyama R, Matsuzaki T, Noda M, Mizushima N, Maeda T. Isolation of hyperactive mutants of mammalian target of rapamycin. *J Biol Chem*; 283: 31861-31870; 2008.
61. Kassai H, Sugaya Y, Noda S, Nakao K, Maeda T, Kano M, Aiba A. Selective activation of mTORC1 signaling recapitulates microcephaly, tuberous sclerosis, and neurodegenerative diseases. *Cell Rep*; 7: 1626-1639; 2014.
62. Hato T, Kimura Y, Morisada T, Koh GY, Miyata K, Tabata M, Kadomatsu T, Endo M, Urano T, Arai F, Araki K, Suda T, Kobayashi K, Oike Y. Angiopoietins contribute to lung development by regulating pulmonary vascular network formation. *Biochem Biophys Res Commun*; 381: 218-223; 2009.
63. Ashcroft T, Simpson JM, Timbrell V. Simple method of estimating severity of pulmonary fibrosis on a numerical scale. *J Clin Pathol*; 41: 467-470; 1988.
64. Demaio L, Tseng W, Balverde Z, Alvarez JR, Kim KJ, Kelley DG, Senior RM, Crandall ED, Borok Z. Characterization of mouse alveolar epithelial cell

- monolayers. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 296: L1051-1058; 2009.
65. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*; 26: 139-140; 2010.
66. Chen EY, Tan CM, Kou Y, Duan Q, Wang Z, Meirelles GV, Clark NR, Ma'ayan A. Enrichr: interactive and collaborative HTML5 gene list enrichment analysis tool. *BMC Bioinformatics*; 14: 128; 2013.
67. Summer R, Shaghaghi H, Schriener D, Roque W, Sales D, Cuevas-Mora K, Desai V, Bhushan A, Ramirez MI, Romero F. Activation of the mTORC1/PGC-1 axis promotes mitochondrial biogenesis and induces cellular senescence in the lung epithelium. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 316: L1049-11060; 2019.
68. Li L, Chong HC, Ng SY, Kwok KW, Teo Z, Tan EH, Choo CC, Seet JE, Choi HW, Buist ML, Chow VT, Tan NS. Angiopoietin-like 4 Increases Pulmonary Tissue Leakiness and Damage during Influenza Pneumonia. *Cell Rep* 2015.
69. Hu K, Babapoor-Farrokhran S, Rodrigues M, Deshpande M, Puchner B, Kashiwabuchi F, Hassan SJ, Asnaghi L, Handa JT, Merbs S, Eberhart CG, Semenza GL, Montaner S, Sodhi A. Hypoxia-inducible factor 1 upregulation of both VEGF and ANGPTL4 is required to promote the angiogenic phenotype in

- uveal melanoma. *Oncotarget*; 7: 7816-7828; 2016.
70. La Paglia L, Listi A, Caruso S, Amodeo V, Passiglia F, Bazan V, Fanale D. Potential Role of ANGPTL4 in the Cross Talk between Metabolism and Cancer through PPAR Signaling Pathway. *PPAR Res*; 2017: 8187235; 2017.
71. Theofilatos D, Fotakis P, Valanti E, Sanoudou D, Zannis V, Kardassis D. HDL-apoA-I induces the expression of angiopoietin like 4 (ANGPTL4) in endothelial cells via a PI3K/AKT/FOXO1 signaling pathway. *Metabolism*; 87: 36-47; 2018.
72. Yu G, Xiao CL, Lu CH, Jia HT, Ge F, Wang W, Yin XF, Jia HL, He JX, He QY. Phosphoproteome profile of human lung cancer cell line A549. *Mol Biosyst*; 7: 472-479; 2011.
73. Chapman HA. Epithelial responses to lung injury: role of the extracellular matrix. *Proc Am Thorac Soc*; 9: 89-95; 2012.
74. Strieter RM, Mehrad B. New mechanisms of pulmonary fibrosis. *Chest*; 136: 1364-1370; 2009.
75. Mitchell LA, Overgaard CE, Ward C, Margulies SS, Koval M. Differential effects of claudin-3 and claudin-4 on alveolar epithelial barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 301: L40-49; 2011.
76. Wray C, Mao Y, Pan J, Chandrasena A, Piasta F, Frank JA. Claudin-4 augments

- alveolar epithelial barrier function and is induced in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*; 297: L219-227; 2009.
77. Jung K, Schlenz H, Krasteva G, Muhlfeld C. Alveolar epithelial type II cells and their microenvironment in the caveolin-1-deficient mouse. *Anat Rec (Hoboken)*; 295: 196-200; 2012.
78. Kim KK, Wei Y, Szekeres C, Kugler MC, Wolters PJ, Hill ML, Frank JA, Brumwell AN, Wheeler SE, Kreidberg JA, Chapman HA. Epithelial cell alpha3beta1 integrin links beta-catenin and Smad signaling to promote myofibroblast formation and pulmonary fibrosis. *J Clin Invest*; 119: 213-224; 2009.
79. Byrne AJ, Maher TM, Lloyd CM. Pulmonary Macrophages: A New Therapeutic Pathway in Fibrosing Lung Disease? *Trends Mol Med*; 22: 303-316; 2016.
80. Misharin AV, Morales-Nebreda L, Reyfman PA, Cuda CM, Walter JM, McQuattie-Pimentel AC, Chen CI, Anekalla KR, Joshi N, Williams KJN, Abdala-Valencia H, Yacoub TJ, Chi M, Chiu S, Gonzalez-Gonzalez FJ, Gates K, Lam AP, Nicholson TT, Homan PJ, Soberanes S, Dominguez S, Morgan VK, Saber R, Shaffer A, Hinchcliff M, Marshall SA, Bharat A, Berdnikovs S, Bhorade SM, Bartom ET, Morimoto RI, Balch WE, Sznajder JI, Chandel NS, Mutlu GM, Jain M, Gottardi CJ, Singer BD, Ridge KM, Bagheri N, Shilatifard A, Budinger GRS, Perlman H.

- Monocyte-derived alveolar macrophages drive lung fibrosis and persist in the lung over the life span. *J Exp Med*; 214: 2387-2404; 2017.
81. Yang J, Agarwal M, Ling S, Teitz-Tennenbaum S, Zemans RL, Osterholzer JJ, Sisson TH, Kim KK. Diverse Injury Pathways Induce Alveolar Epithelial Cell CCL2/12 Which Promotes Lung Fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2020.
82. Santulli G. Angiopoietin-like proteins: a comprehensive look. *Front Endocrinol (Lausanne)*; 5: 4; 2014.
83. Tan MJ, Teo Z, Sng MK, Zhu P, Tan NS. Emerging roles of angiopoietin-like 4 in human cancer. *Mol Cancer Res*; 10: 677-688; 2012.
84. Wang Y, Chen H, Li H, Zhang J, Gao Y. Effect of angiopoietin-like protein 4 on rat pulmonary microvascular endothelial cells exposed to LPS. *Int J Mol Med*; 32: 568-576; 2013.
85. Stapleton CM, Joo JH, Kim YS, Liao G, Panettieri RA, Jr., Jetten AM. Induction of ANGPTL4 expression in human airway smooth muscle cells by PMA through activation of PKC and MAPK pathways. *Exp Cell Res*; 316: 507-516; 2010.
86. Zhu P, Goh YY, Chin HF, Kersten S, Tan NS. Angiopoietin-like 4: a decade of research. *Biosci Rep*; 32: 211-219; 2012.
87. Zhu P, Tan MJ, Huang RL, Tan CK, Chong HC, Pal M, Lam CR, Boukamp P, Pan JY,

- Tan SH, Kersten S, Li HY, Ding JL, Tan NS. Angiopoietin-like 4 protein elevates the prosurvival intracellular O₂(-):H₂O₂ ratio and confers anoikis resistance to tumors. *Cancer Cell*; 19: 401-415; 2011.
88. Ge H, Yang G, Huang L, Motola DL, Pourbahrami T, Li C. Oligomerization and regulated proteolytic processing of angiopoietin-like protein 4. *J Biol Chem*; 279: 2038-2045; 2004.
89. Goh YY, Pal M, Chong HC, Zhu P, Tan MJ, Punugu L, Lam CR, Yau YH, Tan CK, Huang RL, Tan SM, Tang MB, Ding JL, Kersten S, Tan NS. Angiopoietin-like 4 interacts with integrins beta1 and beta5 to modulate keratinocyte migration. *Am J Pathol*; 177: 2791-2803; 2010.
90. Goh YY, Pal M, Chong HC, Zhu P, Tan MJ, Punugu L, Tan CK, Huang RL, Sze SK, Tang MB, Ding JL, Kersten S, Tan NS. Angiopoietin-like 4 interacts with matrix proteins to modulate wound healing. *J Biol Chem*; 285: 32999-33009; 2010.
91. Zhang Z, Cao L, Li J, Liang X, Liu Y, Liu H, Du J, Qu Z, Cui M, Liu S, Gao L, Ma C, Zhang L, Han L, Sun W. Acquisition of anoikis resistance reveals a synoikis-like survival style in BEL7402 hepatoma cells. *Cancer Lett*; 267: 106-115; 2008.
92. Yang YH, Wang Y, Lam KS, Yau MH, Cheng KK, Zhang J, Zhu W, Wu D, Xu A. Suppression of the Raf/MEK/ERK signaling cascade and inhibition of

angiogenesis by the carboxyl terminus of angiopoietin-like protein 4. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 28: 835-840; 2008.

93. Zhu X, Guo X, Wu S, Wei L. ANGPTL4 Correlates with NSCLC Progression and Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition via ERK Pathway. *Lung*; 194: 637-646; 2016.

94. Teo Z, Sng MK, Chan JSK, Lim MMK, Li Y, Li L, Phua T, Lee JYH, Tan ZW, Zhu P, Tan NS. Elevation of adenylate energy charge by angiopoietin-like 4 enhances epithelial-mesenchymal transition by inducing 14-3-3gamma expression. *Oncogene*; 36: 6408-6419; 2017.