

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 齋藤 美奈子

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。その病態については十分に解明されていない点が多いが、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、そして 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) の進行が IPF の重要な病態であるとされている。

近年、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。しかし、これまでは、主に線維芽細胞や筋線維芽細胞における mTOR 経路の役割を解明してきた研究がほとんどであり、肺線維症の発症への関与が示唆されてい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い。また、mTOR 経路の関与の証明においても、ほとんどが mTOR 阻害薬であるラパマイシンを用いた間接的な mTOR 経路の関与の証明であり、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。本研究では肺上皮特異的に恒常的にキナーゼ活性を示す変異型 mTOR マウスを作成し、ブレオマイシン刺激肺線維症モデルを用いて、mTOR の働きを直接的に解析し、IPF の病態及び、mTOR 及びその下流遺伝子が治療のターゲットになる可能性について検討することとした。

まず、14 週齢の活性型 mTOR マウスの表現型をコントロールマウスと比較した。病理学的、肺生理学的解析において明らかな違いは認めなかったが、活性型 mTOR マウス肺から抽出した mRNA 発現量では、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 Caveolin-1 (Cav-1) の発現が、有意に活性型 mTOR マウスで低下していることがわかった。

次に肺胞上皮癌細胞株である A549 細胞と初代ヒト肺胞上皮細胞を用いて *in vitro* 実験でも検証した。その結果、蛍光免疫染色において、活性型 mTOR ベクターのトランスフェクションにより有意に ZO-1 及び Cav-1 の発現低下が認められ、マウス肺の解析と矛盾しない結果であった。さらに、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、活性型 mTOR が A549 細胞において、EMT を誘導するかを検証したところ、活性型 mTOR 過剰発現 A549 細胞では、ウェスタンブロッティングにおいて、TGFβ1 刺激後に有意に vimentin の発現が増強しており、EMT を促進することが示唆された。

さらに、肺上皮特異的な mTOR 活性化が肺線維症を増強するかを検証するために、12 週齢の活性型 mTOR マウス及びコントロールマウスにブレオマイシンを気管内投与し、14 日後に解析した。その結果、ブレオマイシン投与により活性型 mTOR マウスはコントロール

マウスと比較して、病理学的解析ではびまん性に線維性病変の増強を認め、肺生理学的解析では、有意に肺コンプライアンスの低下及び抵抗の上昇を認め、両肺のコラーゲン量も有意に増加しており、ブレオマイシン気管内投与によって肺線維化がより増強されることが示唆された。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によって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た。

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、マウスの II 型肺胞上皮細胞を単離して 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、Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4) の発現が活性型 mTOR マウスにおいて大きく発現が亢進しており、インフルエンザ感染マウスモデルの先行研究において、ANGPTL4 が II 型肺胞上皮細胞に発現が上昇し、肺組織透過性を亢進することが示唆されていたことから、本研究では ANGPTL4 に注目してさらに解析を行った。

まず、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した。A549 細胞と初代ヒト肺胞上皮細胞において ANGPTL4 過剰発現ベクターをトランスフェクションしたところ、免疫蛍光染色において ZO-1 及び Cav-1 の発現が有意に低下していた。さらに、初代ヒト肺胞上皮細胞において ANGPTL4 をノックダウンすると、ZO-1 の発現量は有意な上昇を認め、Cav-1 は有意な増加は認めなかったが、上昇傾向を認めた。したがって、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。さらに、ANGPTL4 過剰発現 A549 細胞に TGFβ1 刺激をして EMT を誘導し、ウェスタンブロッティングで解析したところ、ANGPTL4 過剰発現 A549 細胞はコントロールと比較して有意に E-cadherin の発現低下を認め、ANGPTL4 が EMT を促進することが示唆された。

本研究の結果から、肺上皮細胞における 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 の病態に関与している可能性が示された。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。