

学 位 論 文 題 名

線維化肺の再生上皮に発現する EMMPRIN 及び
Caveolin-1 蛋白に関する研究

学位論文内容の要旨

【背景】

間質性肺炎(interstitial pneumonia: IP)は、肺胞間質の炎症性肺障害の修復過程として線維化の異常を来す疾患で、再生上皮が過剰に形成される。蛋白分解酵素である matrix metalloproteinases (MMPs)がこの再生上皮に発現し、線維化の病態へ関与することが報告されているが、その役割や出現の機序に関してはまだ十分理解されていない。

Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN)は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属する膜貫通型糖蛋白で、糖鎖修飾を受けることで分子の機能が発揮される。EMMPRIN は正常成人肺を含めほとんどの成人組織では出現せず、胎児期肺や癌を含めた様々な疾患で高発現することが報告されている。また間葉系細胞に働き MMP-1、-2、-3、-9、membrane type 1-MMP (MMP-14)の産生を誘導する。

Caveolin-1 は caveolae に存在する膜内在性蛋白で、細胞内外の物質輸送やシグナル伝達などに関与する。正常成人肺では血管内皮細胞、肺胞 1 型上皮細胞、平滑筋細胞、線維芽細胞、細気管支上皮に存在する。Caveolin-1 KO マウスや動物肺線維化モデル、特発性肺線維症(idiopathic pulmonary fibrosis:IPF)患者の肺組織の検討では、肺胞上皮や線維芽細胞において caveolin-1 の発現が低下することが線維化の病態に関与すると示唆されている。

近年 caveolin-1 が EMMPRIN の糖鎖修飾や、MMPs を誘導する構造である多量体の形成を抑制することが報告された。我々は、線維化肺における各種の再生上皮において、EMMPRIN、および MMPs が高発現し、さらに同細胞群には caveolin-1 の発現が低下しているという仮説をたてた。

【目的】

研究 1 ヒト IP の再生上皮における EMMPRIN 発現の有無、また MMPs 発現との関連を検討する。

研究 2 マウスブレオマイシン誘導肺線維化モデルとヒト IP の再生上皮において caveolin-1 の発現が低下しているか否かを検討する。

【対象と方法】

研究 1 では、臨床病理学的に診断された計 22 人の IP 患者肺組織を用いて EMMPRIN、MMP-2、MMP-7、MMP-9 の免疫染色を施行した。また、IP 患者に気管支肺胞洗浄(bronchoalveolar lavage ; BAL)を行い、可溶性 EMMPRIN を定量した。研究 2 では、C57BL/6J マウスを用いてブレオマイシン誘導線維化モデルを作成し、全肺組織での caveolin-1 発現を RT-PCR やウエスタンブロッティングで検討し、また laser

capture microdissection (LCM)を用いて細気管支上皮での caveolin-1 mRNA 発現を検討した。ヒト IP 全肺組織における caveolin-1 発現を RT-PCR とウエスタンブロッティングで検討し、研究1の対象(UIPとNSIP計18人)に5人加えた23人で免疫染色を施行した。健常コントロール数名を各検討で対照群として用いた。

【結果】

研究1 EMMPRINは正常肺組織の気道や肺胞上皮にはほとんど発現を認めなかった。IP肺組織では、EMMPRINは再生上皮(肺胞2型上皮過形成、扁平上皮化生、bronchiolization)や肺胞マクロファージに高発現していた。しかし、fibroblastic fociや線維芽細胞にはほとんど発現しなかった。すべての再生上皮のEMMPRIN発現スコアは高値を示したが、特にbronchiolizationに比較し肺胞2型上皮過形成に高発現していた。MMP-2は肺胞2型上皮過形成に強く、MMP-9は扁平上皮化生やbronchiolizationに強く、MMP-7はすべての上皮に高発現していた。健常コントロールに比べてIP患者のBAL液中のEMMPRINは有意に増加していた。

研究2 免疫染色にて、コントロールマウス肺にはcaveolin-1は肺胞1型上皮や血管内皮細胞に発現し、また細気管支上皮に発現を認めたが、曝露後7日及び14日後には、線維化領域にある細気管支上皮、bronchiolization、fibroblastic fociでcaveolin-1発現は低下していた。曝露7日及び14日後の全肺ホモジネートで、caveolin-1 mRNAと蛋白発現は低下していた。LCMを用いて選択的に採取した曝露後の細気管支上皮でのcaveolin-1 mRNA発現は正常細気管支上皮に比べ有意に低下していた。IP患者の全肺におけるcaveolin-1 mRNAと蛋白発現は健常コントロール肺に比べて低下していた。免疫染色では、コントロール肺の細気管支上皮の管腔側に認められたcaveolin-1発現は、IP患者肺組織のbronchiolization、扁平上皮化生、線維化領域の細気管支上皮で低下していた。

【考察】

研究1では、IPで出現する再生上皮にEMMPRINが高発現することが明らかとなった。これらの再生上皮にはMMPsも発現しており、連続切片の検討からEMMPRINとMMPsは共発現することを示した。EMMPRINは各再生上皮の種類に応じて様々なMMPsの発現を誘導することで、再生上皮の形成や線維化に寄与することが示唆される。さらに、IP患者のBAL液でEMMPRINが有意に高値を示すことを示した。IPの再生上皮に過剰発現したEMMPRINは細胞外に放出され気腔内に高濃度に存在する。今後、肺機能との関連や治療前後での変動を経時的に観察することで病勢を反映するマーカーとして臨床応用の可能性がある。また、EMMPRINのMMPs誘導と線維化における役割をさらに明らかにするためには、EMMPRINノックアウトマウスを用いた検討などを行う必要がある。研究2では、線維化の全肺組織で、caveolin-1はmRNAと蛋白レベルで発現が低下することと、線維化領域にある細気管支上皮や再生上皮で低下することが示された。研究1,2から、何らかの刺激で細気管支上皮のcaveolin-1発現が低下し、EMMPRIN発現、MMPs誘導が促進され再生上皮形成が促進された可能性が示唆される。Caveolin-1には、腫瘍増殖抑制蛋白としての機能もあり、EMMPRINを介した線維化への働きとは別に、細気管支上皮細胞内シグナル伝達の調節異常から異常な再生上皮化が促進される可能性も考えられた。

【結語】

線維化肺における再生上皮化生においてEMMPRINは高発現し、一方caveolin-1発現は低下することを明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 西 村 正 治
副 査 教 授 近 藤 哲
副 査 教 授 筒 井 裕 之
副 査 教 授 笠 原 正 典

学 位 論 文 題 名

線維化肺の再生上皮に発現する EMMPRIN 及び Caveolin-1 蛋白に関する研究

間質性肺炎(interstitial pneumonia: IP)は、肺の炎症の修復過程として間質に線維化の異常を来す疾患で、再生上皮が過剰に形成される。蛋白分解酵素である matrix metalloproteinases (MMPs)がこの再生上皮に発現し、線維化の病態へ関与することが報告されているが、その役割や出現の機序に関してはまだ十分理解されていない。Extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN)は、膜貫通型糖蛋白で成人組織にほとんど出現せず、胎児期肺や癌を含めた様々な疾患で高発現し、MMPs 産生を誘導することが知られている。Caveolin-1 は正常の肺胞 1 型上皮細胞や細気管支上皮細胞などに存在し、物質輸送やシグナル伝達などに関与する膜内在性蛋白で、近年 EMMPRIN の糖鎖修飾や、MMPs 誘導能を持つ多量体形成を抑制することが報告されている。また、ヒトや動物の線維化肺の肺胞 1 型上皮や線維芽細胞において caveolin-1 の発現が低下することが線維化の病態に関与すると示唆されている。そこで本研究では、IP の再生上皮における EMMPRIN 発現と MMPs 発現の関連を検討し、その再生上皮における caveolin-1 発現の有無を検討した。結果は、EMMPRIN は正常肺組織の細気管支上皮にほとんど発現を認めなかったが、IP 患者肺組織の再生上皮に高発現し、特に bronchiolization に比べ type II cell hyperplasia に高発現していた。MMP-2 は type II cell hyperplasia に強く、MMP-9 は squamous metaplasia と bronchiolization に強く、MMP-7 はすべての上皮に高発現していた。健常コントロールに比べ IP 患者の気管支肺胞洗浄液中 EMMPRIN は有意に増加していた。また、正常マウスの細気管支上皮に発現していた caveolin-1 は、ブレオマイシン曝露後に線維化領域にある細気管支上皮、bronchiolization で低下していた。また、曝露後の肺組織で、caveolin-1 mRNA と蛋白発現は低下していた。Laser capture microdissection を用いて選択的に採取した曝露後の細気管支上皮の caveolin-1 mRNA 発現は低下していた。IP 患者肺でも caveolin-1 mRNA と蛋白発現は低下し、免疫染色で IP 患者肺組織の bronchiolization、squamous metaplasia、線維化領域の細気管支上皮に低下していた。以上より、IP で出現する再生上皮に EMMPRIN は高発現し、また再生上皮の種類によってその発現程度は異なること、これらの再生上皮には MMPs も発現し、MMPs が発現する上皮のプロファイルは異なるが EMMPRIN と MMPs は共発現することを示した。また、ヒトやマウスの線維化肺組織で、caveolin-1 は mRNA と蛋白レベルで発現が低下し、線維化領域にある細気管支上

皮や再生上皮において低下することを示した。

審査にあたり、副査筒井教授から、1) 再生上皮と線維芽細胞、それぞれにおける caveolin-1 発現低下の線維化における相対的関与、2) 各再生上皮細胞の種類により発現する MMP が異なることとのメカニズムについて、質問があった。次いで副査近藤教授から1) 間質性肺炎で低酸素血症になる機序が再生上皮化と関連しているかどうか、2) 本研究が間質性肺炎の治療介入に応用できるか、3) 免疫染色の定量法について質問があった。また副査笠原教授から、1) caveolin-1 の細胞内局在と EMMPRIN 糖鎖修飾のメカニズムについて、2) 膜貫通型蛋白の EMMPRIN が気管支肺胞洗浄液中にでてくるメカニズムについて、3) caveolin-1 発現のある血管内皮細胞が間質性肺炎肺組織で増加しているかどうか、について質問があった。最後に主査西村教授から1) 間質性肺炎において再生上皮に注目した理由について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は自験データや過去の文献を引用し、概ね適切に解答した。質疑応答の時間は約 10 分であった。

この論文は、EMMPRIN が間質性肺炎に高発現することを初めて示し、また細気管支上皮における caveolin-1 発現の低下が、EMMPRIN の糖鎖修飾と EMMPRIN の MMPs 誘導、再生上皮形成に関与することを示唆した点で高く評価され、今後のさらなる病態解明や臨床応用への可能性が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。