

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	Senescence of alveolar epithelial cells impacts initiation and chronic phases of murine fibrosing interstitial lung disease
別タイトル	肺胞上皮細胞の老化がマウス線維性間質性肺疾患の進行に与える影響
作成者（著者）	山田, 善登
公開者	東邦大学
発行日	2024.03.13
掲載情報	東邦大学大学院医学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨.
資料種別	学位論文
内容記述	主査：亀田秀人 / タイトル：Senescence of alveolar epithelial cells impacts initiation and chronic phases of murine fibrosing interstitial lung disease / 著者：Zento Yamada, Junko Nishio, Kaori Motomura, Satoshi Mizutani, Soichi Yamada, Tetuo Mikami, Toshihiro Nanki / 掲載誌：Frontiers in Immunology / 巻号・発行年等：13: 935114, 2022
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲第1086号
学位記番号	甲第751号
学位授与年月日	2024.03.13
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD37058935

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

山田善登より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 751 号

学位申請者 : 山 田 善 登

学位論文 : Senescence of alveolar epithelial cells impacts initiation and chronic phases of murine fibrosing interstitial lung disease

(肺胞上皮細胞の老化がマウス線維性間質性肺疾患の進行に与える影響)

著 者 : Zento Yamada, Junko Nishio, Kaori Motomura, Satoshi Mizutani, Soichi Yamada, Tetuo Mikami, Toshihiro Nanki

公表誌 : Frontiers in Immunology 13: 935114, 2022
DOI: 10.3389/fimmu.2022.935114

論文内容の要旨 :

背景・目的: 間質性肺疾患 (Interstitial lung disease: ILD) は、肺組織の損傷が異常な修復を行う過程で発症する疾患である。環境要因や、遺伝的要因、自己免疫疾患が関与することが知られているにも関わらず、組織の損傷や結果として起こる線維化の分子機構は、十分に解明されていない。近年、ILD の損傷機構として、細胞老化の関与が報告されている。細胞老化とは、テロメア短縮などによる DNA 損傷、酸化ストレス、がん遺伝子の活性化などが誘因となり起こる永久的な細胞周期の停止状態である。老化細胞は加齢とともに臓器に蓄積し、老化関連分泌表現型 (Senescence-Associated Secretory Phenotype: SASP) を獲得し、サイトカインやケモカインなどを分泌する。ヒトの特発性間質性肺炎やマウスのブレオマイシン誘導間質性肺炎 (BLM-ILD) では、肺線維化の慢性期において SASP 関連メディエーターを発現する老化細胞を認め、ILD に関与することが報告されているが肺線維化初期の細胞老化の役割や、肺線維化の免疫細胞の浸潤や線維芽細胞の活性化などの既知の病態機構との関連は明らかではない。そこで本研究では、細胞老化と SASP が、肺線維化の初期から慢性期に至るまで、どのように関与しているかを検討することを目的とし研究を行った。

対象・方法: C57BL/6 マウスに、経気道的に BLM を投与して BLM-ILD を起こした。その肺組織を用いて、HE (Hematoxylin Eosin)

染色、Masson's trichrome 染色にて肺線維化を評価し、老化細胞を検出するために p21^{WAF1/CIP1} (p21)、p16^{INK4A} (p16) の免疫染色を行った。さらに、RNA (Ribonucleic acid) を抽出し p21、p16 の各遺伝子である *Cdkn1a*、*Cdkn2a*、線維芽細胞活性を示す *Acta2* (α -smooth muscle antigen 遺伝子)、*Col1a1* (I 型コラーゲンのプロ $\alpha 1$ 鎖遺伝子) の発現を qRT-PCR 法にて検討した。また、フローサイトメトリーにて肺組織に浸潤する単球・マクロファージを解析し、2 型肺胞上皮細胞 (Alveolar epithelial type 2 cells : AEC2) に相当する CD45⁺CD31⁻EpCAM^{hi} 細胞をセルソーターにて採取し、SASP 関連遺伝子発現を検討した。

結果 : BLM 投与後 3 日目頃より細胞浸潤と肺線維化が観察され、10 日目以降は線維化病巣を形成する慢性期の肺線維化像を認めた。p21 陽性細胞は 3 日目には肺全体に散在し、その後増加し、慢性期には線維化病巣に集中していた。*Cdkn1a* は BLM 投与後 1 日目より発現し、3 日目のピーク以降は一定のレベルで発現が持続した。蛍光免疫染色法にて、AEC2 に p21 が染色され、p21⁺細胞が AEC2 であることが示された。AEC2 は p16 も発現しており、BLM 投与後緩徐に増加した。p21 と p16 の発現は線維化初期から慢性期まで持続しており、両経路に依存性の細胞老化の BLM-ILD への関与が考えられた。線維化初期の AEC2 に γ H2AX が発現していたことから、BLM による DNA 損傷が AEC2 の細胞老化を起こしたと考えられたが、14 日目では γ H2AX 陽性細胞は減少し DNA 損傷以外の要因による老化細胞の蓄積が示唆された。セルソーターにて AEC2 を採取し SASP 関連因子の発現を検討したところ、線維化初期および慢性期で異なるレベルで *Il6* (炎症性サイトカイン)、*Serp1n1* (炎症を制御するセリン蛋白分解酵素インヒビターの一つ)、*Tnfa* (炎症性サイトカイン)、*Ccl2* (炎症に関与するケモカイン)、*Tgfb* (細胞増殖、分化を制御するサイトカイン)、*Pdgfa* (線維芽細胞のマーカー) が発現していた。フローサイトメトリー解析では、BLM 投与直後から Ly6C⁺単球が増加し、3 日目以降では間質マクロファージ(IM-Mph)の増加を認めた。CCL2 のレセプターである Ccr2 を発現する Ly6C⁺単球が、AEC2 が産生する Ccl2 依存的に肺組織に浸潤し、AEC2 由来の TNF α が関与してさらに IM-Mph に分化した可能性があった。また、BLM 投与 3 日目から *Acta2* や *Col1a1* の発現が上昇し、AEC2 の細胞老化により産生された *TGfb* や *PDGFa* による早期の線維芽細胞の活性化が示唆された。

考察 : 本研究では、マウスの BLM-ILD において、肺線維化の初期から AEC2 の細胞老化が出現し、進行とともに蓄積すること、SASP を獲得して様々な炎症性メディエーターを産生することを示した。また、SASP による炎症性メディエーターが、初期の単球の浸潤や IM-Mph への分化、早期の線維芽細胞の活性化に関与することを示唆する結果であった。さらに、BLM 投与初期から *Il6*、*Serp1n1*、*Tgfb* が持続的に発現しており、オートクライン、パラクライン的に、AEC2 自身の細胞老化を維持し周囲に細胞老化を誘導し、慢性期の老化細胞の蓄積に関与することを示唆した。

結論 : ILD における細胞老化の関与機関の一端を明らかにした。本研究は、ILD の病態の理解を深め、老化細胞や SASP 分子を標的とした新しい治療法の開発につながる知見を提供するものであると思われる。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 751 号	氏 名	山 田 善 登
学位審査担当者	主 査	亀 田 秀 人
	副 査	岸 一 馬
	副 査	近 藤 元 就
	副 査	船 戸 弘 正
	副 査	伊 豫 田 明

学位論文の審査結果の要旨 :

膠原病の臨床において間質性肺疾患 (ILD) は膠原病自体の活動性病変や薬剤性肺障害として生じ、しばしば難治性で生命予後を大きく作用する病態であり、その発症機序や病態の解明に基づく新たな治療法が期待されている。本論文は ILD の病態を初期から慢性期にかけて経時的に検討する目的で、ブレオマイシン (BLM) 誘発マウスモデルを用いて、特に自己複製能や分化能、そして肺泡サーファクタントの産生能を有する II 型肺泡上皮細胞 (AEC2) の細胞老化の意義に焦点を当てて行った研究成果を報告したものである。BLM の気管内噴霧後に炎症や線維化の病変としての細胞浸潤やコラーゲンの増加が見られ、さらに早期から AEC2 を含めた細胞における p21 発現細胞の増加を認めた。p16 陽性細胞も p21 にやや遅れて出現・経時的に増加しており、一部の細胞では早期に DNA 断裂・アポトーシスが生じていたが、これらはその後の経過では概ね消退していた。老化した AEC2 では senescence-associated secretory phenotype (SASP) 分子であるサイトカイン、ケモカイン、増殖因子などの発現が増強しており、病変部位へのマクロファージ集積に寄与していると考えられた。以上の結果から、BLM 誘発 ILD モデルにおいて、AEC2 の細胞老化がさまざまなエフェクター-SASP 分子を分泌することで炎症や線維化の病態に初期段階から寄与していることが示された。

2023 年 8 月 22 日に行われた学位審査会においては、BLM の詳細な作用機序、細胞による反応の相違とその要因としての BLM 暴露濃度や細胞自体の多様性、細胞の老化やアポトーシスの決定要因、細胞老化と炎症の因果関係、p21 と p16 の発現の程度の意義や相互関連性、p21 を発現している AEC2 以外の細胞、臨床応用への展望などについて質疑があり、申請者はすべての質疑に対して丁寧に回答した。

以上より、本論文は膠原病の重要な予後決定要因である ILD の発症機序や病態の解明に有用なデータと視点を提供し、今後の ILD 治療・管理の向上に寄与しうる有意義な研究であると評価され、学位審査委員全員の合意により学位授与に値すると判断された。