



Inhibiting Skp2 E3 ligase suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2018-05-08 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 美甘, 真史 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/3343

博士(医学) 美甘 真史

論文題目

Inhibiting Skp2 E3 ligase suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis

(E3リガーゼ Skp2 の阻害はブレオマイシン誘導性肺線維症を抑制する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

間質性肺炎、特に特発性肺線維症 (IPF) は肺胞上皮障害、肺線維芽細胞の増殖と進行性の線維化を伴う予後不良な疾患である。ユビキチンシステムはタンパク質の細胞内安定性を制御する重要な細胞内メカニズムであるが、間質性肺炎の発症との関係は不明の点が多い。我々のグループは同じ線維化疾患である腎障害の発症と上皮間葉転換 (EMT) に Skp2 というユビキチンリガーゼ (E3) が重要であることを報告している。

この知見を基に、ブレオマイシン (BLM) 誘導性肺線維症モデルを用いて Skp2 の関与を解析し、IPF の誘導/進行に関与するか検証した。

[材料ならびに方法]

C57B6/J Skp2^{+/+} (WT), Skp2^{+/-}, Skp2^{-/-} マウスを用いて BLM 誘導性肺線維症モデルを作成した。経気道的に BLM を投与し、2 週間後に屠殺、気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い、肺を採取した。得られた肺切片のマッソン・トリクローム染色および線維化マーカーである type1 collagen1 (COL1A1)、fibronectin に対する免疫組織化学的解析 (IHC) により、Skp2 欠損により線維化が抑制されるかを判定した。また、Skp2 の標的タンパク質である p27 および細胞増殖マーカーである Ki67 の IHC 染色像を解析し、Skp2 欠損の効果を評価した。またこの影響が及んでいる細胞種を、2 型肺胞上皮細胞のマーカー surfactant protein C (SFTPC)、線維芽細胞のマーカー (Vimentin) を用いた二重染色により特定した。さらに、Skp2 阻害薬 (SZ-P1-41) の治療効果を検証するため、C57B6/J wild type (WT) 10 週齢雄マウスへ SZ-P1-41 (80 mg/kg) を腹腔内投与した後、経気道的に BLM を投与し、BLM 誘導性肺線維症モデルを作成した。連日 SZ-P1-41 を腹腔内投与し、BLM 投与 2 週間後に屠殺し、肺を採取した。上記と同様に IHC、二重染色を行い、Skp2 阻害薬の肺線維化抑制効果を解析した。さらに、SZ-P1-41、BLM を投与し、投与後 1、3、7 日目に屠殺し、SZ-P1-41 による Skp2 の阻害が肺の線維化の早期である炎症期におこるアポトーシスを抑制するか検討した。アポトーシス細胞の同定はミラー切片を用いた TUNEL 法と SFTPC の IHC により解析した。本研究は組換え DNA 実験安全委員会、動物実験委員会に承認済みである (承認番号 2016019)。

[結果]

BLM 誘導性肺線維症モデルにおける肺の線維化は、WT と比較し、Skp2 欠損により有意に抑制されていた。また、肺への線維化マーカー (COL1A1、fibronectin) の蓄

積は有意に減少し、BAL 回収液では炎症細胞が有意に減少していた。生食コントロールと比較し、BLM 投与により p27 の蓄積は有意に減少したが、Skp2 ^{-/-} マウスでは、BLM を投与しても減少は見られなかった。BLM 投与 WT マウスでは、Vimentin 陽性細胞のうち、p27 陽性細胞が減少し、Ki67 陽性細胞が増加していることが二重染色による解析で明らかになった。一方、Skp2 ^{-/-} マウスではこの変化が抑制されていた。

さらに、Skp2 阻害剤 SZL-P1-41 投与マウスにおいても、線維化は抑制され、p27 の蓄積は増量していた。SZL-P1-41 投与マウスにおいても、Vimentin 陽性細胞のうち、p27 陽性細胞が増加し、Ki67 陽性細胞が減少していることが判明した。初期のアポトーシスは、BLM 投与後 3 日目に最も増加したが、SZL-P1-41 投与マウスではこの増加は有意に抑制された。ミラー切片を用いた解析では、SFTPC 陽性の 2 型肺胞上皮細胞および 1 型肺胞上皮細胞と判断できる細胞等のアポトーシスが確認された。

[考察]

Skp2 欠損により、肺の線維化が抑制され、COL1A1 や fibronectin が減少していることから、Skp2 が肺線維化の進行に関与していることが示唆された。さらに、Skp2 阻害剤 SZL-P1-41 投与によっても線維化が抑制され、線維化マーカーが減少しており、Skp2 が IPF 治療において分子標的となりうることが示された。Skp2 の欠損や抑制により、特に線維芽細胞において p27 が蓄積し、線維芽細胞の増殖が抑制され、線維化タンパク質の産生が低下することが線維化抑制の原因と考えられる。つまり Skp2 の E3 リガーゼ作用による p27 の分解が線維芽細胞の増殖に必要で、肺線維化の進行に寄与していることが示唆される。しかしながら、Skp2 は p21、p57、p130、Foxp3 等のタンパク質も標的としているため、これらの関与を否定することはできない。p27 の分解が肺線維化の進行に必須であるか確認するには、さらなる研究が必要である。

一方で、Skp2 の抑制により早期のアポトーシスが抑制されることが示された。Skp2 の阻害により炎症細胞の増殖や肺への集積が抑制されることで、TNF α 等のアポトーシス誘導因子が減少し、肺胞上皮細胞がアポトーシスから逃れられる、という機序が予想される。しかしながらその実験的検証にはさらなる研究が必要である。

[結論]

Skp2 は肺線維化の進行に関与し、IPF 治療において分子標的となり得ることが示された。