

<助成研究経過・成果報告>

1. 概要

本財団からの助成を得て、南カリフォルニア大学、ZeaBorok 研究室に留学させていただき、Wnt/ β catenin シグナル系に属する転写調節、ヒストンアセチル基転移酵素 EP300 の肺胞上皮障害に対する役割について研究を行った。

EP300 は CBP と並び、 β catenin を含め様々な転写因子とともに働き、転写制御を行う酵素である。 β catenin と EP300 の結合阻害薬である IQ-1 を用いた *in vitro* での研究では、EP300 は肺胞の 2 型上皮細胞から 1 型上皮細胞への分化を促進することが同研究室により示されていた。

そこで、リン酸化部位であるセリン 89 に点突然変異を導入したトランスジェニックマウスを用いて、*in vivo* での研究を行うこととした。しかしながら特に刺激を行わない状態では、肺の組織・肺機能検査などの表現型では違いを認めなかった。そこでブレオマイシン(1.5U/kg, 経口気管内投与)による肺線維症モデルを用いたところ、EP300 の変異マウスでは 15 日目において生存率が高く、トライクロム染色を用いた組織学的半定量試験においても、SirCol アッセイによる肺内コラーゲン量測定においても線維化の抑制を認めた。

In vitro の系では肺胞上皮の分化の促進が認められていたことから、EP300 は肺胞障害に保護的に働くと考えられていたが、肺線維症モデルにおいては線維化を悪化し死亡率が上昇する結果となった。肺胞上皮のみならず線維芽細胞や各種免疫細胞における影響による修飾があったためと考えられ、今後各種細胞特異的な変異導入による検討が必要であると考ええる。

2. 背景

Wnt シグナルは細胞・組織の発達・分化に大きく関与しているシグナル伝達系の 1 つである。その下流に当たる β Catenin には転写に際し 2 つのヒストンアセチル基転移酵素活性をもった転写因子である CBP と EP300 が関与していることが知られており、その両者により発現する遺伝子に差があることが示されていた。また、EP300 のセリン 89 の点突然変異により転写活性が低下することが報告されていた。

肺胞上皮の分化に際しては 2 型上皮細胞の 1 型上皮細胞への分化の系において EP300 と β catenin の結合を阻害する低分子化合物 IQ-1 により、分化が抑制されることが我々の研究室にて示されていた。

しかしながら、*in vivo* での実験や各種肺障害モデルにおける分化の促進の意味づけについては研究されていなかった。

3. 目的

EP300 のリン酸化部位セリン 89 に点突然変異を導入したトランスジェニックマウスを用いて、EP300 の肺障害モデルにおける役割を *in vivo* の系で検討する。

4. 方法

10 世代以上 c57BL6 に back-cross された EP300S89A マウスを、c57/BL6 マウ

スをコントロールとして、非障害時および、肺線維症モデルによる実験を行った。

肺線維症モデルでは、ブレオマイシン(Teva)1.5U/kg を含むリン酸緩衝液 50 μ L をマイクロスプレイヤーを用いて微細霧状として、経口気管内投与した。投与 15 日後に FlexiVent(SCIREQ)を用いた肺機能検査ののち、リン酸緩衝液 1 mL を用いて気管支肺胞洗浄液を得て、その後右心室よりリン酸緩衝液を 20 mL 注入して肺内の血管内血液を除去したのち、右肺を SirCol 法によるコラーゲン定量用に、左肺を4%PFA 25cmH₂O 固定による組織学的検査用に摘出した。また、生存解析のため一部マウスは 21 日まで体重変化を観察した。なお、動物実験は学内審査委員会にて承認されたプロトコールにより行われ、障害前体重より25%以上の体重減少時には安楽死が行われた。

気管支肺胞洗浄液では 1200g 5min にて遠心分離後、上清を用いてたんぱく質濃度測定を行った。また細胞成分を用いて細胞数の測定およびメイギムザ染色による細胞分画の計数を行った。

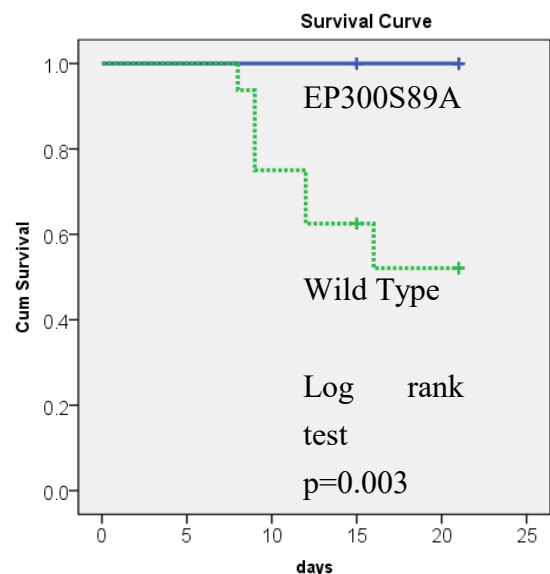
組織学的検査では、HE 染色を用いた外観評価のほか、トライクロム染色による Ashcroft score を用いてコラーゲン量の半定量を行った。

5. 結果

非障害時における、気管支肺胞洗浄液内のたんぱく質濃度、細胞数、細胞分画には差が認められなかった。また組織学的検討及び、肺機能検査による差も認められなかった。

肺線維症モデルにおいては右図に示す通り、EP300 変異マウスでは非変異マウスに比べ生存率が高かった。また、気管支肺胞洗浄液では細胞数に差はなかったものの、リンパ球の増加が認められ、たんぱく質濃度の上昇は改善していた。コラーゲンの定量ではコラーゲン量の増加の改善を認め (917 \pm 24 vs 1086 \pm 54 μ g/lung (EP300S89A vs Wild type, $p < 0.05$, $n = 6$))、組織学的検査でもコラーゲン量を反映する

Ashcroft score の上昇の改善を認めた。肺機能検査においては、最大吸気量および静的コンプライアンスの減少が改善していた。



6. 考察

Wnt- β catenin シグナルは発生・分化に関与しており、in vitro の系において EP300 と β catenin の結合の阻害は、2 型上皮細胞から 1 型上皮細胞への分化を阻害することが示されていたものの、EP300 の変異マウスは非障害時には正常マウスと特に差を認めなかった。肺線維症モデルにおいては、EP300 変異マウスのほうが障害が少ない結果となった。

EP300 は肺胞上皮の分化を促進する作用があることが示されており、変異マウ

スのほうが障害が大きくなると考えられたが、結果は逆となった。変異マウスでは、気管支肺胞洗浄液中のリンパ球の増加を認めた。また皮膚の線維芽細胞では EP300 の阻害は TGF β 1 によるコラーゲン Col1A2 の発現を阻害することが報告されている。肺胞上皮による影響のほか、炎症細胞や線維芽細胞における EP300 の作用がこの結果につながった原因であると示唆される結果であった。

今後、細胞特異的な EP300 の変異の導入やによる機序解析が期待されるとともに、EP300 の阻害薬の臨床導入を検討する際には上皮特異的なドラッグデリバリーシステムなどの工夫が必要であることが示唆された。

7. 結論

EP300S89A 変異を有したマウスは肺線維症モデルでの線維化の改善を認めた。

本内容は 2017 年度アメリカ胸部学会総会にての発表に採択されており、追加実験内容を加えて現在論文執筆中である。