

論 文 要 旨

IL-13 enhances mesenchymal transition of pulmonary artery endothelial cells via down-regulation of miR-424/503 *in vitro*

〔 IL-13 は培養肺血管内皮細胞の miR-424 と miR-503 の発現を抑制し、遊走能を亢進させる 〕

【序論及び目的】

肺動脈性肺高血圧症は肺血管を構成する細胞の異常増殖により肺血管のリモデリングや血管内腔の狭窄を起こす難治性疾患である。その発症機序には肺血管内皮細胞、肺動脈平滑筋細胞、線維芽細胞などにおける増殖因子やサイトカインの関与が指摘されており、血管内皮細胞の間葉系細胞形質転換によるものとした報告もある。近年の報告では、特発性肺動脈性肺高血圧症や膠原病性肺動脈性肺高血圧症と類似した病態をとる住血吸虫による肺高血圧症と IL-13 の関連について報告がなされている。

IL-13 は Th2 系サイトカインであり、主にアレルギー疾患への関与が知られている。その他に、IL-13 は創傷治癒や細胞増殖に関与しているとする報告もある。肺高血圧症と IL-13 との関連については、これまでに住血吸虫症における肺高血圧について報告がなされており、その機序については IL-13 による細胞増殖シグナルが関与していることが指摘されているが、その詳細な機序については明らかになっていない。

microRNA (miRNA) は 21~25 塩基程度の一本鎖 RNA であり、細胞内に存在して蛋白質をコードする遺伝子のうち 30% 以上のもに対して発現調節を行っている。miRNA は癌や感染症、アレルギー性疾患、生活習慣病など様々な疾患に関与していることが報告されており、肺高血圧との関連についても、肺血管内細胞における miR-424 及び miR-503 の発現低下が肺高血圧を誘導するとする報告がなされている。

今回の研究では、肺血管内皮の培養細胞を用いて、肺血管内皮細胞に対する IL-13 の影響を明らかにし、難治性疾患である肺動脈性肺高血圧症に対する新規治療の標的の検索を行った。

【材料及び方法】

正常のヒト肺から採取したヒト肺血管内皮細胞 (HPAECs) を、専用培地 (Endothelial cell growth medium) を用いて培養し、IL-13 を加え、細胞の増殖能及び遊走能、間葉系マーカーや細胞増殖に関与するとされる蛋白、遺伝子発現を測定した。細胞の機能解析について、増殖能は XTT assay にて、遊走能は scratch assay にてそれぞれ評価した。また、蛋白の発現は western blot 法を、遺伝子及び microRNA の発現については qRT-PCR を用いて評価した。IL-13 の刺激により発現の変化を認めた遺伝子や microRNA について、リポフェクタミンを使用し siRNA、miRNA mimics、miRNA inhibitor を細胞内導入し、IL-13 による血管内皮細胞の変化に対する影響を調べた。

【結 果】

HPAECsにおいて、IL-13 刺激により、内皮系マーカー (CD31、VE-cadherin) 発現の減弱と間葉系マーカー (α SMA、N-cadherin、Collagen1、Collagen3) 発現の亢進を認めた。また、IL-13 刺激により、HPAECs の増殖能及び遊走能の亢進を認めた。IL-13 による間葉系マーカー発現と増殖能、遊走能の亢進の機序について、既報にて血管内皮細胞の増殖能への関与が報告されている mTORC2 の主要構成蛋白である Rictor との関連について確認を行った。IL-13 刺激により、HPAECs の Rictor の発現亢進を認め、siRNA を用いて Rictor の発現を減弱させた HPAECs では、IL-13 による間葉系マーカー発現の亢進や遊走能の亢進は抑制された。また、IL-13 受容体のシグナル分子である STAT6 の発現を減弱させることで、IL-13 による Rictor の発現亢進は抑制された。次に、肺動脈性肺高血圧症への関与が報告されている miRNA である miR-424 と miR-503 について、IL-13 刺激による変化について確認を行った。miR-424 と miR-503 は配列上 Rictor を標的としており、肺血管内皮細胞においても、Rictor を制御していることを確認した。IL-13 刺激により、HPAECs の miR-424 と miR-503 の発現は共に抑制された。また、HPAECs の miR-424 及び miR-503 を過剰発現することで IL-13 による遊走能亢進も抑制され、miR-424 の発現を減弱することで間葉系マーカーの発現は亢進を認めた。miR-424 と miR-503 の発現は Histone deacetylase (HDAC) class2 (HDAC4 及び HDAC5) により抑制されることが既報で示されており、IL-13 と HDAC class2 との関連についても確認を行った。IL-13 刺激により HDAC 4 及び HDAC5 のリン酸化は抑制された。HDAC はリン酸化されることにより不活化されることが示されており、IL-13 刺激により HDAC 4 及び HDAC5 の活性が亢進し、miR-424 及び miR-503 の発現は抑制されることが示された。siRNA や HDAC inhibitor (TSA、LMK235) を用いて、HDAC4 及び HDAC5 の発現を減弱させた HPAECs では、miR-424 及び miR-503 の発現は亢進し、遊走能や間葉系マーカーの発現の減弱を認め、また、IL-13 による miR-424 及び miR-503 に対する抑制効果も減弱を認めた。

【結論及び考察】

今回の研究において、肺血管内皮細胞の培養細胞を IL-13 で刺激することで、HDAC4 及び HDAC5 のリン酸化が抑制され、miR-424 及び miR-503 の発現が低下し、その標的である Rictor の発現が亢進し、肺血管内皮細胞の間葉系マーカー及び遊走能が亢進することが明らかになった。近年の報告で、肺動脈性肺高血圧症において、血管内皮細胞の障害により内皮細胞が内皮-間葉移行 (EndoMT) をきたすことで、間葉系細胞に変化し、中膜肥厚をきたすことで肺高血圧となることが提唱されており、肺血管内皮細胞の形質変換は、肺高血圧発症に強い関連があると考えられる。また、細胞増殖をつかさどる mTORC2 の主要蛋白である Rictor は肺動脈性肺高血圧症の患者肺において肺血管のリモデリングに関与することも示されており、本研究で証明された IL-13 - miR-424/miR-503 - Rictor の経路が新規の肺動脈性肺高血圧症の治療標的になりうる可能性が示唆された。本研究は、ヒト肺血管内皮の培養細胞のみ使用して行ったものであり、今回証明された IL-13 の経路が生体内でも同様に認められるかを証明するために、肺高血圧モデルの動物を用いた *in vivo* での実験や、実際の肺動脈性肺高血圧症患者からの血液検体および肺検体での解析などが今後の研究課題となると思われる。