

間質性肺炎の病態形成におけるネクロプトーシスの役割

水村賢司¹⁾, 権 寧博¹⁾, 黒田和道²⁾

The role of necroptosis in the pathogenesis of interstitial pneumonia

Kenji MIZUMURA¹⁾, Yasuhiro GON¹⁾, Kazumichi KURODA²⁾

要旨

間質性肺炎の本体は胞隔炎であり、胞隔炎が線維化に至る過程は細胞死を主体とする肺上皮細胞の損傷に始まると考えられている。しかし、間質性肺炎の病態生理は不明な点が多く、治療効果は不十分である。今回、我々は、ネクロプトーシスという新規プログラム細胞死の間質性肺炎への関与を検討した。間質性肺炎を引き起こす要因の一つは喫煙と考えられているが、タバコ煙抽出液による肺上皮細胞死は、ネクロプトーシス阻害薬で抑制され、タバコ煙による肺上皮細胞死はネクロプトーシスで制御されている可能性が示唆された。また、タバコ煙暴露を行ったマウスの肺では、ネクロプトーシス関連蛋白である Receptor-interacting protein kinase 3 (RIP3) の発現増強が観察され、生体内でもタバコ煙によるネクロプトーシスの活性化の可能性が示された。本研究により、新規プログラム細胞死であるネクロプトーシスが、間質性肺炎の病態形成に関与していることが示唆された。今後は、ネクロプトーシスの肺線維化への影響についても検討していく予定である。

1. はじめに

間質性肺炎の本体は胞隔炎であり、胞隔炎が線維化に至る過程は細胞死を主体とする肺上皮細胞の損傷に始まると考えられている。しかし、間質性肺炎の病態生理は不明な点が多く、また、治療効果は不十分である。間質性肺炎の発端となる肺上皮細胞の細胞死は、アポトーシスについての検討は行われているが、他の新規プログラム細胞死については十分な検討が行われていない。

ネクロトーシスは長い間、「偶発的な細胞死」とされ、特異的な分子細胞学的イベントは必要ないと考えられてきた。しかし、最近となり RIP1 と RIP3 とよばれるキナーゼの活性依存的に誘導されるカスパーゼ非依存性のプログラムネクロトーシス（以降、ネクロプトーシス）が報告され、心筋梗塞や炎症性腸疾患など様々な病気の病態生理に関与していることが明らかとなってきた¹⁾。間質性肺炎は、肺の慢

性炎症を特徴としているが、アポトーシスは DAMPs (damage-associated molecular patterns) を放出しない、非炎症性の細胞死である。一方、ネクロプトーシスは、DAMPs を放出する炎症性の細胞死であることが知られている²⁾。今回、我々は炎症性プログラム細胞死であるネクロプトーシスに着目し、間質性肺炎の病態形成への関与について検討を行った。

2. 対象および方法

1) 細胞死実験

肺上皮細胞株 (BEAS-2B) をネクロトーシス阻害薬である Necrox-5 (Nex-5; Enzo Life Sciences) とネクロプトーシス阻害薬である Necrostatin-1 (Nec-1; Enzo Life Sciences) で1時間前処理後、タバコ煙抽出液処理を行った。生細胞と死細胞の決定は、LIVE/DEAD Viability/Cytotoxicity Kit (Molecular

1) 日本大学医学部内科学系呼吸器内科学分野

2) 日本大学医学部病態病理学系微生物学分野

水村賢司: mizumura.kenji@nihon-u.ac.jp

Probes) を用いた。生細胞の染色は、生細胞の細胞膜を透過し、生細胞が持つ細胞内エステラーゼによって加水分解され、細胞膜不透過性の緑色蛍光物質カルセイン(最大蛍光波長: 515 nm)を生じるカルセイン-AMで、死細胞の染色は、死細胞の膜損傷部分から透過し、核内のDNAに入り込んで赤色蛍光(620 nm)を発するエチジウムホモダイマーで行った。フローサイトメトリーは、FACS Canto II (BD Biosciences) で測定し、FlowJo analytical software (Tree Star Inc.) で解析を行った。

2) タバコ煙暴露マウス

12-15 週齢の C57BL/6J マウスを用いた。全身タバコ煙暴露装置を用い、1日2時間、週5日、それぞれ3週間、3ヶ月間、6ヶ月間暴露を行った。肺組織を採取し、組織抽出液をウェスタンブロット法で解析した。抗体は、rabbit antibody against mouse RIP3 (AHP1797; AbD Serotec) を使用した。

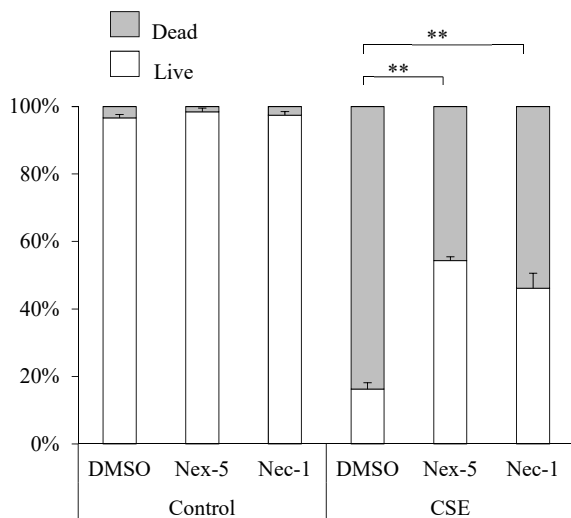


図1 タバコ煙抽出液による細胞死とネクロプトーシス

3. 結果

タバコ煙による肺上皮細胞死へのネクロプトーシスの関与を、ネクローシス阻害薬である Nex-5 とネクロプトーシス阻害薬である Nec-1 を用いて解析した。タバコ煙抽出液は肺上皮細胞死を有意に誘導した(図1)。また、タバコ煙抽出液による肺上皮細胞死は、ネクローシス阻害薬である Nex-5 とネクロプトーシス阻害薬である Nec-1 両剤ともで有意に抑制され(図1)、タバコ煙による肺上皮細胞死にネクロプトーシスが関与することが示唆された。

次に、肺へのタバコ煙暴露によるネクロプトーシス誘導を検討するために、全身タバコ煙暴露装置を用いマウスへのタバコ暴露を行い、ネクロプトーシス関連分子である RIP3 のマウス肺での発現を検討した。RIP3 発現はタバコ煙暴露3ヶ月をピークに上昇していた(図2)。

4. 考察

間質性肺炎の本体は胞隔炎であり、胞隔炎が線維化に至る過程は細胞死を主体とする肺上皮細胞の損傷に始まると考えられている。しかし、間質性肺炎の病態生理は不明な点が多く、また治療効果は不十分である。間質性肺炎の発端となる肺上皮細胞の細胞死はアポトーシスについての検討は行われているが、他のプログラム細胞死については十分な検討が行われていない。今回、我々は、新規プログラム細胞死であるネクロプトーシスの間質性肺炎への関与を検討した。間質性肺炎を引き起こす要因の一つは喫煙と考えられているが、本研究で、タバコ煙による肺上皮細胞死はネクロプトーシスで制御されている可能性が示唆された。また、タバコ煙暴露を行ったマウスの肺ではネクロプトーシス関連蛋白である

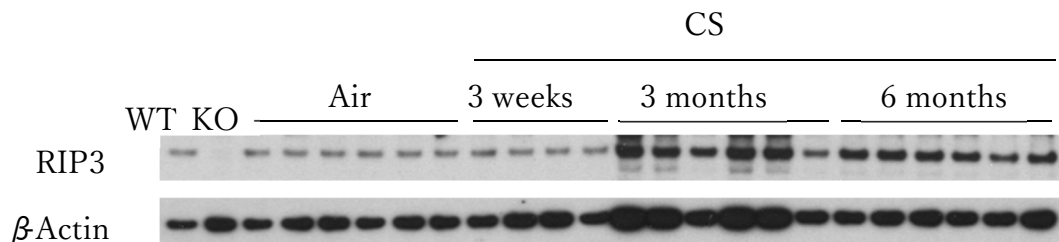


図2 タバコ煙全身暴露によるマウス肺におけるネクロプトーシス関連分子RIP3の発現

RIP3の発現増強が観察され、生体内でもタバコ煙は肺でネクロプトーシスを活性化することが示唆された。

しかし、間質性肺炎においては、肺上皮細胞の損傷の後に、異常な創傷治癒過程による線維化が起こることが知られているが、タバコ煙によるネクロプトーシスと線維化については明らかではない。ネクロプトーシスはアポトーシスとは違い、DAMPsを放出する炎症性の細胞死であることが知られており、持続喫煙によるネクロプトーシスが肺の慢性炎症を引き起こし、肺の線維化を誘導している可能性があり、今後検討を行う予定である。

5. 結 語

従来、間質性肺炎の病態形成にアポトーシスが関与していることが報告されていたが、本研究により、新規プログラム細胞死であるネクロプトーシスが、間質性肺炎の病態形成に関与していることが示唆された。間質性肺炎に対する新規バイオマーカーや治療ターゲットになる可能性があり、更なる検討が望まれる。

文 献

- 1) Linkermann A, Green DR. Necroptosis. N Engl J Med 2014; 370:455-65.
- 2) Pasparakis M, Vandenabeele P. Nature. 2015 Jan 15; 517 (7534): 311-20.