



Title	Leucine-rich $\alpha$ -2 glycoprotein promotes lung fibrosis by modulating TGF- $\beta$ signaling in fibroblasts.
Author(s)	本田, 宏美
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/69461">https://hdl.handle.net/11094/69461</a>
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href=" <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> ">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)		本田 先美
論文審査担当者	主 査	(職) 大阪大学教授 氏 名 二 田 稔次
	副 査	大阪大学教授 竹 田 純
	副 査	大阪大学教授 佐々木 博 浩
論文審査の結果の要旨		
<p>Leucine-rich <math>\alpha</math>-2 glycoprotein (LRG)は、新規バイオマーカー探索を目的として行ったプロテオーム解析により、関節リウマチや潰瘍性大腸炎など様々な疾患の活動性マーカーとして、当研究室で同定された分子である。LRGの機能については、TGF-<math>\beta</math>シグナル調節因子の一つとして、腫瘍の増殖や血管新生、T細胞の分化に関与することを報告してきたが、肺線維症とLRGの関連については調べられていない。申請者は、LRGの肺線維症への関与を明らかにすることを目的として、肺線維症モデルマウスを用いた解析を行った。In vivoおよびin vitroの実験から、LRGは線維芽細胞のTGF-<math>\beta</math>-Smad2シグナルを増強することによって、肺の線維化を促進することが明らかになった。LRGは肺線維症の予後を規定する因子の一つである可能性があり、新たな治療標的となることが期待される。</p> <p>本研究は、学位の授与に値すると考えられる。</p>		

論 文 内 容 の 要 旨  
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	本田 宏美
論文題名 Title	Leucine-rich $\alpha$ -2 glycoprotein promotes lung fibrosis by modulating TGF- $\beta$ signaling in fibroblasts (Leucine-rich $\alpha$ -2 glycoproteinは線維芽細胞のTGF- $\beta$ シグナルを調節することによって肺線維症を促進する)
論文内容の要旨	
〔目的 (Purpose)〕	
<p>特発性肺線維症は難治性の疾患であり、病態の解明と新たな治療法の開発が望まれている。その主たるメカニズムは、TGF-<math>\beta</math>シグナルの異常による線維芽細胞の過剰な活性化であると考えられている。Leucine-rich <math>\alpha</math>-2 glycoprotein (LRG)は、新規バイオマーカー探索を目的として行ったプロテオーム解析により、関節リウマチや潰瘍性大腸炎など様々な疾患の活動性マーカーとして、当研究室で同定された分子である。LRGの機能については、TGF-<math>\beta</math>シグナル調節因子の一つとして、腫瘍の増殖や血管新生、T細胞の分化に関与することを報告してきたが、肺線維症とLRGの関連については調べられていない。本研究では、LRGの肺線維症への関与を明らかにすることを目的として、肺線維症モデルマウスを用いた解析を行った。</p>	
〔方法ならびに成績 (Methods/Results)〕	
<p>はじめに、1.5 mg/kgのブレオマイシンを野生型マウス(WT)の気管内に投与して肺線維症モデルマウスを作製し、肺におけるLRGの発現の変化を調べた。肺組織の免疫染色の結果、正常マウスの肺では、一部の肺胞上皮細胞や血管内皮細胞でLRGの発現を認め、ブレオマイシンを投与すると、気管支上皮細胞や炎症細胞もLRG陽性となった。ELISA法により、肺胞洗浄液(BALF)および血清のLRG濃度を測定したところ、BALF中LRGはブレオマイシン投与後に有意に上昇したのに対し、血清LRGの変化はわずかであった。このことから、病変組織周辺にLRGが高濃度に存在すると考えられた。次に、このモデルにおけるLRGの病態形成への関与を明らかにするために、WTとLRGノックアウトマウス(LRG KO)の比較を行った。BALF中総細胞数とタンパク質濃度はブレオマイシン投与後7日目に上昇し、WTとLRG KOのあいだに差は見られなかったことから、炎症の程度はLRGの有無によって影響を受けないと考えられた。ところが、ブレオマイシン投与後21日目の肺をH&amp;E染色とMasson's trichrome染色で評価すると、LRG KOでは線維化が軽度であり膠原線維の沈着が抑制されていた。さらに、肺コラーゲン含量の間接的な指標であるハイドロキシプロリンの定量を行うと、ブレオマイシン投与後のハイドロキシプロリンはLRG KOで有意に少なかった。肺組織におけるTGF-<math>\beta</math>シグナルを解析するために、BALF中のTGF-<math>\beta</math>濃度の測定と、リン酸化Smad2のウエスタンプロット、<math>\alpha</math>-SMAの免疫染色を行った。BALF中のTGF-<math>\beta</math>は、WT、LRG KOとともにブレオマイシン投与後に上昇し、群間の差はなかったが、それにもかかわらず、LRG KOではWTと比較して肺組織のリン酸化Smad2の発現が弱く、線維芽細胞の活性化の指標である<math>\alpha</math>-SMAの発現が減弱していた。すなわち、LRG KOではTGF-<math>\beta</math>-Smad2シグナルの過剰な活性化が制限された結果、線維化の進行が抑制されたと考えられた。続いて、組織の線維化において中心的な役割を担う線維芽細胞に着目して、LRGがTGF-<math>\beta</math>シグナルに与える影響を評価した。線維芽細胞株L929の培養液中にLRGを添加すると、TGF-<math>\beta</math>によって誘導されるSmad2のリン酸化が増強され、この効果はLRGの濃度依存的であった。また、L929にLRGを安定発現させた細胞では、コントロールベクターを導入した細胞と比較してTGF-<math>\beta</math>によるSmad2のリン酸化が増強された。さらにTGF-<math>\beta</math>-Smad2の下流遺伝子の発現を定量PCR法によって評価したところ、LRG発現細胞では、コントロール細胞と比較してSerpine1およびActa2の発現がより強く誘導された。続いて、LRGがTGF-<math>\beta</math>シグナルを調節するメカニズムを解析することとした。過去の報告では、LRGがTGF-<math>\beta</math>やその受容体と結合することによって、細胞内のシグナルを変化させると言われており、特に血管内皮細胞では、TGF-<math>\beta</math>受容体を構成するタンパク質の一つであるendoglinが、LRGの作用発現に必須であると考えられている。そこでL929のendoglinの発現をsiRNAによって抑制したところ、endoglinの有無に関わらず、LRGはTGF-<math>\beta</math>-Smad2シグナル増強効果を発揮した。最後に、LRGのTGF-<math>\beta</math>-Smad1/5/8シグナルに対する影響を評価した。Endoglin陽性のL929においては、TGF-<math>\beta</math>によるSmad1/5/8下流遺伝子のId-1の発現誘導は、LRG発現細胞で抑制された。</p>	
〔総 括 (Conclusion)〕	
<p>本研究では、LRGは線維芽細胞のTGF-<math>\beta</math>-Smad2シグナルを増強することによって、肺の線維化を促進することが明らかになった。LRGは肺線維症の予後を規定する因子の一つである可能性があり、新たな治療標的となることが期待される。</p>	