

令和元年6月17日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08736

研究課題名(和文)筋線維芽細胞へ分化する線維芽細胞の同定と臓器線維症の制御

研究課題名(英文) Identification of fibroblasts that differentiate into myofibroblasts and the control of organ fibrosis

研究代表者

岩下 寿秀 (Iwashita, Toshihide)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：00283432

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：肺線維症の病理の解明、診断および治療の改善のために、ヒト肺線維芽細胞の不均一性の解明とサブタイプ分類のためのマーカーの同定が必要である。我々は異なるマウス肺線維芽細胞を特徴付け、マーカーを同定するためにマイクロアレイを行った。マーカーの発現に基づいて、ヒトの正常肺および特発性肺線維症の肺において、2つの主要な線維芽細胞が同定された。CD248陽性線維芽細胞およびITGA8陽性線維芽細胞であり、それぞれ膠原繊維または弾性繊維が豊富な結合組織に存在していた。この分類は、肺線維芽細胞の機能の詳細な調査に役立ち、肺発生および線維性肺疾患の根底にある病理学的過程への新しい洞察を提供することができる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回明らかにしたヒト肺線維芽細胞の分類システム(CD248陽性線維芽細胞およびITGA8陽性線維芽細胞)を使用して、異なる線維芽細胞の機能のさらなる詳細な調査を行うことができる。それは肺発生や特発性肺線維症だけでなく、非特異的間質性肺炎およびpleuroparenchymal fibroelastosisなどの他の線維性肺疾患の根底にある病理学的過程に関する新たな洞察を得るのに役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To better understand the pathology and improve diagnosis and treatment of lung fibrosis, it is necessary to elucidate the nature of lung fibroblast heterogeneity and identify markers for the classification of human lung fibroblast subtypes. We characterized distinct mouse lung fibroblast subpopulations and performed microarray analysis to identify molecular markers. Based on the expression of these markers, in normal human lungs and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) lungs, two corresponding major fibroblast subtypes were identified: CD248-positive fibroblast and ITGA8-positive fibroblast, localized in the collagen fiber-rich connective tissue and in the elastic fiber-rich connective tissue, respectively. This human lung fibroblast classification may be helpful for further detailed investigations of the functions of lung fibroblast subtypes, which can provide new insights into lung development and the pathological processes underlying fibrotic lung diseases.

研究分野：実験病理学

キーワード：Fibroblast lung fibrosis pulmonary fibrosis

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

肺線維症 (IPF) は、不均一性と考えられる肺線維芽細胞の局在および特徴に従って変化する深刻な生命を脅かす病態であり、現時点では、完治する治療法は無い。したがって、肺線維症の病態をよりよく理解し、この疾患の診断および治療を改善するために、ヒト肺線維芽細胞の不均一性の性質を解明することが必要であるが、そのような研究はほとんどなかった。

## 2. 研究の目的

ヒト肺線維芽細胞の不均一性の性質を解明するためには、ヒト肺線維芽細胞サブタイプの正確な分類のためのマーカー (可能なら細胞表面マーカー) を同定することが必要である。これらのマーカーの発現に基づいて、我々は正常ヒト肺サンプルおよび特発性肺線維症 (IPF) 患者からの肺サンプルにおける線維芽細胞サブタイプ局在を評価することが必要であると考えた。

## 3. 研究の方法

蛍光活性化セルソーティング (FACS) によって分離された異なるマウス肺線維芽細胞群の性格をインビトロ (細胞増殖、細胞形態および細胞分化) において検討した。そして、ヒト肺線維芽細胞分類に有用であり得る分子マーカーを同定するために、その異なるマウス肺線維芽細胞群のマイクロアレイ分析を行った。さらにマイクロアレイ分析の結果に基づいて、quantitative RT-PCR とタンパク質発現の解析を行い、それぞれ Sca-1<sup>high</sup> 線維芽細胞および Sca-1<sup>low</sup> 線維芽細胞に特異的な細胞表面マーカーを見出した。マウス肺において、細胞表面マーカーに対する抗体を使って、免疫蛍光染色を行い、Sca-1<sup>high</sup> 線維芽細胞および Sca-1<sup>low</sup> 線維芽細胞のマウス肺における局在を検討した。また、ヒト正常肺および IPF 肺において、細胞表面マーカーに対する抗体を使って、免疫蛍光染色を行い、線維芽細胞サブタイプの局在を評価した。

## 4. 研究成果

我々は FACS と細胞培養系を用いることによって、lineage マーカー陽性細胞群 (CD31 陽性血管内皮細胞、CD45 陽性血液細胞、CD146 陽性周皮細胞・平滑筋細胞、E-cadherin 陽性上皮細胞、LYVE-1 陽性リンパ管内皮細胞、TER119 陽性赤血球) をマウス肺の細胞群から除いた細胞群 (lin<sup>neg</sup>) のうち、PDGFRA 陽性細胞群 (lin<sup>neg</sup>PDGFRA<sup>high</sup>) に線維芽細胞が豊富に存在することを証明した。そして、Sca1 細胞表面マーカーを用い、かつ培養細胞の増殖速度、脂肪細胞分化およびマイクロアレイの結果から、マウス肺線維芽細胞は lin<sup>neg</sup>PDGFRA<sup>high</sup>Sca1<sup>high</sup> (以下 Sca1<sup>high</sup>) および lin<sup>neg</sup>PDGFRA<sup>high</sup>Sca1<sup>low</sup> (以下 Sca1<sup>low</sup>) の 2 種類に分類されることを明らかにした。さらに、quantitative RT-PCR の結果から、Sca1<sup>high</sup> 線維芽細胞が collagen 1a1 を、Sca1<sup>low</sup> 線維芽細胞が elastin をより多く発現することを明らかにした。

免疫蛍光染色では、マウス正常肺において、Sca1<sup>high</sup> 線維芽細胞と Sca1<sup>low</sup> 線維芽細胞は、それぞれ膠原線維が豊富な結合組織と弾性線維が豊富な結合組織に存在することが証明した。ヒトの Sca1 homolog は無いので、他の細胞表面マーカー (FACS 用の抗体が入手できる) を見つける必要がある。マイクロアレイ、quantitative RT-PCR および FACS の結果から、マウスの肺では、Sca1<sup>high</sup> 線維芽細胞は CD248<sup>high</sup> integrin alpha 8 (ITGA8)<sup>low</sup> 線維芽細胞、Sca1<sup>low</sup> 線維芽細胞は CD248<sup>low</sup> ITGA8<sup>high</sup> 線維芽細胞に相当することを明らかにした。

抗 CD248 抗体と抗 ITGA8 抗体を用いて、ヒトの正常肺に対する通常の免疫染色と免疫蛍光染色を行った。すると、興味あることに、ヒト肺の線維芽細胞は大きく CD248<sup>high</sup> ITGA8<sup>low</sup> 線維芽細胞と CD248<sup>low</sup> ITGA8<sup>high</sup> 線維芽細胞の 2 種類の線維芽細胞に分類され、それらの線維芽細胞の局在

は異なること(ほぼ排他的である)が明らかになった。CD248<sup>high</sup>ITGA8<sup>low</sup>線維芽細胞は、ヒト正常肺の動脈周囲、胸膜、小葉間隔壁および気管支壁に分布しており、概ね膠原線維が豊富な結合組織に存在していた。一方、CD248<sup>low</sup>ITGA8<sup>high</sup>線維芽細胞は、ヒト正常肺の静脈周囲、肺胞隔壁および細気管支壁に分布しており、概ね弾性線維が豊富な結合組織に存在していた。また、特発性肺線維症の肺でのCD248<sup>high</sup>ITGA8<sup>low</sup>線維芽細胞は、膠原線維が豊富な結合組織と弾性線維が豊富な結合組織に存在し、CD248<sup>low</sup>ITGA8<sup>high</sup>線維芽細胞は、弾性線維が豊富な結合組織に存在することを証明し、正常の場合とあまり変化はないことを確認した。

結論として、正常ヒト肺およびIPF肺において、2つの主要な線維芽細胞サブタイプが同定された。CD248<sup>high</sup>ITGA8<sup>low</sup>線維芽細胞およびCD248<sup>low</sup>ITGA8<sup>high</sup>線維芽細胞であり、それぞれ膠原線維に富む結合組織および弾性線維に富む結合組織に局在する。2つの細胞表面マーカーを用いたこのヒト肺線維芽細胞分類は、肺線維芽細胞の機能のさらなる詳細な調査に役立つ可能性があり、それは肺発生および線維性肺疾患の根底にある病理学的過程に対する新しい洞察を提供し得る。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1, Enomoto Y, Matsushima S, Shibata K, Aoshima Y, Yagi H, Meguro S, Kawasaki H, Kosugi I, Fujisawa T, Enomoto N, Inui N, Nakamura Y, Suda T, Iwashita T. LTBP2 is secreted from lung myofibroblasts and is a potential biomarker for idiopathic pulmonary fibrosis. Clin Sci (Lond). 2018 132:1565-1580. doi: 10.1042/CS20180435.

2, Enomoto Y, Matsushima S, Meguro S, Kawasaki H, Kosugi I, Fujisawa T, Enomoto N, Inui N, Nakamura Y, Suda T, Iwashita T. Podoplanin-positive myofibroblasts: a pathological hallmark of pleuroparenchymal fibroelastosis. Histopathology. 2018 72:1209-1215. doi: 10.1111/his.13494.

〔学会発表〕(計1件)

1, 松島紗代実、岩下寿秀 肺線維芽細胞の新しい分類法とその応用 日本病理学会 2017

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：目黒史織  
ローマ字氏名：Meguro Shiori  
所属研究機関名：浜松医科大学  
部局名：医学部  
職名：助教  
研究者番号(8桁): 40724290

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。