

令和 3 年 4 月 23 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K09609

研究課題名(和文) 肺障害・肺線維化における血管内皮細胞と線維芽細胞の相互作用

研究課題名(英文) Changes in pulmonary endothelial cell and fibroblast properties during bleomycin-induced pulmonary fibrosis

研究代表者

乾 直輝 (Inui, Naoki)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：80402254

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：肺線維症は肺の線維化を主体とする難治性、進行性の致死的疾患で、発症や進展機序の更なる解明が望まれている。何らかの刺激によって上皮障害が惹起され、続いて線維芽細胞が活性化して異常な組織修復として線維化が進展すると考えられている。本研究では、肺線維化形成過程における内皮細胞の機能に着目し、プレオマイシンの経気管投与により肺線維症モデルマウスを作成した。肺血管内皮細胞では内皮障害が生じ、障害された内皮細胞は自らも線維化メディエーターを放出し、肺の線維化に関与することが示された。TGF- β 1の存在下ではこれらの血管内皮機能はより低下し、線維化メディエーターの放出もより顕著となっていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺線維化は上皮細胞の障害によって生じると考えられている。今回の研究によって、プレオマイシンによる肺障害では、内皮細胞もダメージを受けており、この障害された肺血管内皮細胞は、内皮機能の低下していること、TGF- β など種々の刺激への感受性が高く、血管内皮細胞が肺の線維化が進行していく一因となっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary fibrosis is a progressive and lethal disease characterized by damage to the lung parenchyma with excess extracellular matrix deposition. Levels of von Willebrand factor, plasminogen activator inhibitor-1 and matrix metalloproteinase-12 were elevated in lung endothelial cells isolated from bleomycin-treated mice, which indicated that intratracheal bleomycin administration induced endothelium injury. Expression of fibrogenic mediators was elevated in the cells from bleomycin-treated. When endothelial cells were treated with TGF- β , α -smooth muscle actin expression and collagen production were increased.

研究分野：肺線維化

キーワード：間質性肺炎 肺線維症 線維化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺線維症は肺の線維化を主体とする難治性、進行性の致死性疾患で、発症や進展機序の更なる解明が望まれている。現在のところ、何らかの刺激によって上皮障害が惹起され、続いて線維芽細胞が活性化して異常な組織修復として線維化が進展すると考えられている。間質性肺炎や肺線維症患者では線維化肺そのものに加え、悪性腫瘍を併発した場合の対応が臨床上的大きな問題となっている。抗癌剤は様々な副作用を起こしうる。特に抗癌剤誘発性の肺障害は重篤な有害事象であり、日本人においてその発症頻度が著しく高いことが報告されている。内皮細胞は血管機能を司る中枢として、組織因子やプロスタノイドによる凝固線溶系調節に加え、増殖因子やメディエーター産生による増殖作用を持つ。既存の間質性変化がある場合に抗癌剤投与によって肺障害や線維化が進展する理由として、既に肺に生じている障害に薬剤による新たな刺激が加わることによって、より強い反応が惹起され重篤な肺障害が生じるメカニズムが推測される。その際、投与された薬剤は血液循環により生体各部に運搬され、血管壁を介して組織に分布・作用するため、薬剤が直接もしくはメディエーターを介して間接的に血管に作用し障害を起こすことがある。線維化過程で内皮機能や性質がどのように変化しているかについての検討はない。

2. 研究の目的

肺線維化形成過程における内皮細胞の機能に着目し、肺線維化モデルから単離回収した肺血管内皮細胞を対象として、線維化過程における各細胞の機能、分化能、線維化関連メディエーター産生能を評価し、線維化の機序を多面的に解明する。

3. 研究の方法

1. プレオマイシン (BLM) 誘導性肺線維症マウスモデルの作成

C57/BL6 マウスを用いて BLM 誘導性肺線維症モデルマウスを作成した。BLM を経気管的に両肺に散布し、一定期間後に気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い、肺を摘出した。摘出肺はヘマトキシリン・エオジン染色およびマッソン・トリクローム染色による病理学的検討を行った。

2. 肺血管内皮細胞の単離および培養

BLM 誘導性肺線維症モデルマウスから摘出した肺をコラゲナーゼ処理した後、磁気細胞分離法を用いて CD45(-)CD31(+)細胞集団を単離しこれを肺血管内皮細胞とした。FACS 解析によって純度が 90%以上あることを確認した。

3. 肺血管内皮細胞機能および性質変化の検討

肺血管内皮細胞の線維化メディエーターの発現を RT-PCR 法と培養上清を用いた ELISA 法で測定した。内皮機能の変化について、小胞体 Ca^{2+} -ATPase 阻害薬サプシガルギン刺激による NO, PGI_2 の産生を検討した。NO の産生は Diaminofluorescein-FM diacetate の細胞内取り込みによる蛍光強度を測定し、 PGI_2 の産生はその代謝産物である 6-keto Prostaglandin F_1 の濃度を ELISA 法で測定した。さらに、血管内皮細胞を Transforming growth factor (TGF)-1 で刺激し、mRNA 発現、NO, PGI_2 産生について調べた。TGF-1 で刺激した血管内皮細胞を間葉系マーカー - smooth muscle actin (-SMA), 血管内皮マーカー CD31 で蛍光染色し、その発現変化について調べた。血管内皮細胞のコラーゲン産生量を Collagen Assay kit で定量した。

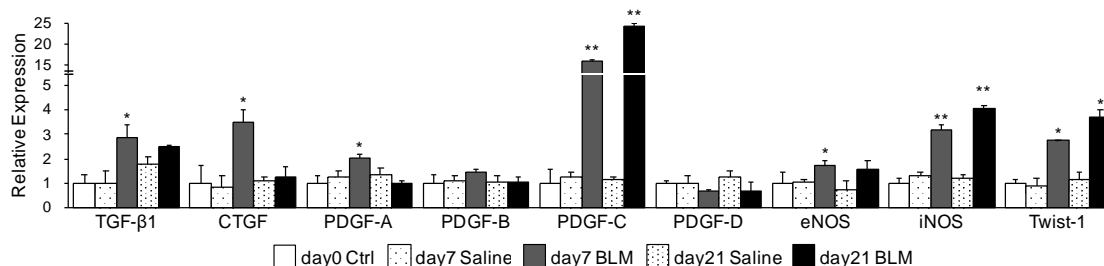
4. 研究成果

1. BLM 誘導性肺線維症モデルマウス

BAL を用いた検討の結果、BLM 投与から day21 にリンパ球数が最大値となった。BAL 中の TGF-1 濃度および肺組織のヒドロキシプロリン含有量は day21 に最大となった。病理学的検討では day7 の肺では炎症細胞浸潤が主体であり、day21 の肺ではコラーゲン沈着が最も多く確認された。

2. BLM 誘導性肺線維症マウスの肺血管内皮障害および線維化メディエーター発現

BLM 投与マウスでは day7, day21 の両時点で肺血管内皮細胞の von Willebrand factor, Plasminogen activator inhibitor-1, Matrix metalloproteinase-12 発現が亢進していた。線維化メディエーター TGF-1, Connective tissue growth factor (CTGF), Platelet-derived growth factor (PDGF) の発現は BLM 投与マウスの内皮において mRNA, タンパクレベルで有意に上昇していた。



肺血管内皮細胞にサブシガルギンを投与すると細胞質内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、血管内皮細胞の NO, PGI₂ の産生が増加したが、その増加率は BLM 誘導性肺線維症マウスの血管内皮細胞で有意に低下していた。

4 . TGF- β 1 刺激に対する反応

BLM 誘導性肺線維症マウス由来の血管内皮細胞で TGF- β 1 添加により α -SMA 発現、コラーゲン産生が有意に増加した。血管内皮細胞の線維化メディエーターCTGF, PDGF の発現は有意に増加した。内皮間葉転換マーカーTwist-1 は BLM 誘導性肺線維症マウスの血管内皮細胞で有意に上昇した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Akiyama N, Hozumi H, Isayama T, Okada J, Sugiura K, Yasui H, Suzuki Y, Kono M, Karayama M, Furuhashi K, Enomoto N, Fujisawa T, Inui N, Nakamura Y, Suda T.	4. 巻 0
2. 論文標題 Clinical significance of serum S100 calcium-binding protein A4 in idiopathic pulmonary fibrosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respirology	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/resp.13707.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Matsushima S, Aoshima Y, Akamatsu T, Enomoto Y, Meguro S, Kosugi I, Kawasaki H, Fujisawa T, Enomoto N, Nakamura Y, Inui N, Funai K, Suda T, Iwashita T	4. 巻 20
2. 論文標題 CD248 and integrin alpha-8 are candidate markers for differentiating lung fibroblast subtypes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Pulm Med	6. 最初と最後の頁 21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12890-020-1054-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kato S, Inui N, Hakamata A, Suzuki Y, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Watanabe H, Suda T.	4. 巻 19
2. 論文標題 Changes in pulmonary endothelial cell properties during bleomycin-induced pulmonary fibrosis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Respir Res.	6. 最初と最後の頁 127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12931-018-0831-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Kato S, Inui N, Hozumi H, Inoue Y, Yasui H, Karayama M, Kono M, Suzuki Y, Furuhashi K, Enomoto N, Fujisawa T, Nakamura Y, Watanabe H, Suda T	4. 巻 139
2. 論文標題 Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in patients with sarcoidosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Respir Med	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.rmed.2018.01.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Akiyama N, Hozumi H, Yasui H, Kono M, Suzuki Y, Karayama M, Furuhashi K, Enomoto N, Fujisawa T, Inui N, Nakamura Y, Suda T
2. 発表標題 Clinical Utility of Serum S100 Calcium Binding Protein A4 in Idiopathic Pulmonary Fibrosis
3. 学会等名 American Thoracic Society (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤 慎平、乾 直輝、袴田 晃央、鈴木 勇三、榎本 紀之、藤澤 朋幸、中村 祐太郎、渡邊 裕司、須田 隆文
2. 発表標題 ブレオマイシン誘発性肺線維症モデルマウスにおける肺血管内皮細胞の変化
3. 学会等名 日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 14.Kato S, Inui N, Yasui H, Enomoto N, Hozumi H, Karayama M, Suzuki Y, Furuhashi K, Fujisawa T, Nakamura Y, Inui N, Suda T
2. 発表標題 The Evaluation of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Patients with Pulmonary Sarcoidosis
3. 学会等名 American Thoracic Society (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	須田 隆文 (Takafumi Suda) (30291397)	浜松医科大学・医学部・教授 (13802)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------