

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09655

研究課題名(和文) 型肺胞上皮由来物質RAGEを用いた特発性肺線維症の病態解明の試み

研究課題名(英文) An attempt to elucidate the pathophysiology of idiopathic pulmonary fibrosis using type I alveolar epithelium-derived substance RAGE

研究代表者

岩本 博志 (Iwamoto, Hiroshi)

広島大学・医系科学研究科(医)・講師

研究者番号：60457398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：HMGB1(high mobility group box-1 protein)という細胞がダメージを受けた時に細胞外に分泌される物質が、特発性肺線維症という難病患者の血液中で上昇しており、特に高値の患者では増悪するリスクが高いことを発見した。更にこのHMGB1に結合して影響を抑制するesRAGE(endogenous secretory receptor for advanced glycation end product)は特発性肺線維症患者では低値であり、特に低値の患者では予後不良であることを発見した。RAGE阻害薬が特発性肺線維症の治療に応用できることをマウス実験で確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究結果から、難病である特発性肺線維症患者の血中HMGB1、esRAGEを測定することにより、患者の予後や急性増悪の予測、急性増悪を起こした際の予後予測など、治療の適応を判断する上で重要な疾患進行の予測出来たことから、新規の血液検査としての可能性が示された。また動物実験の結果からはこのHMGB1、RAGEが関わる分子機構が特発性肺線維症の治療にも応用できる可能性が示され、新規治療薬の開発の一步を示した。

研究成果の概要(英文)：HMGB1 (high mobility group box-1 protein), which is secreted extracellularly when cells are damaged, is elevated in the blood of patients with intractable disease called idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). Moreover, IPF patients with higher HMGB1 had higher risk of acute exacerbation. esRAGE (endogenous secretory receptor for advanced glycation end product), which binds to HMGB1 and suppress its effect, is decreased in patients with IPF. Moreover, IPF patients with lower esRAGE levels had poorer survival. In mouse pneumonitis model experiment, it was found that RAGE inhibitor can be applied to the treatment of pneumonitis.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：特発性肺線維症 間質性肺炎 急性増悪 バイオマーカー 治療薬

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

RAGE (receptor for advanced glycation endproducts) は肺でのみ生理的に高発現している膜型受容体蛋白であり、肺胞構造の維持に関与していると考えられている。申請者の研究グループはヘルシンキ大学との共同研究により、RAGE の functional SNP が特発性肺線維症の発症に関連し、血中の可溶性 RAGE 低値は特発性肺線維症の予後不良因子であることなど、RAGE が特発性肺線維症の発症と進展に関与していることを示す結果を得ていた。しかしながら RAGE および RAGE リガンドをバイオマーカーとしてどのようにして臨床応用していくか明らかではなく、また RAGE 経路を治療標的とした薬剤の可能性についても研究が必要と考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は(1)RAGE および RAGE リガンドを用いた特発性肺線維症のバイオマーカーの開発をすること、(2)RAGE/RAGE リガンド経路を標的とした創薬の試みをするることである。

## 3. 研究の方法

(1) 当院に受診歴のある間質性肺炎患者、COPD 患者から informed consent を取得したうえで血清検体を採取し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。また一部の患者からは気管支肺胞洗浄液も採取した。気管支肺胞洗浄液は、中葉・舌区のうち CT で病変が強い部分を選択し、生理食塩水 150ml を 3 回に分けて注入後、回収した。さらにガーゼで濾過し、遠心後に上清を $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。コントロールとして健診目的に受診した健常者の血清検体も用いた。

安定期 IPF 患者の血中 HMGB1 を急性増悪期の IPF 患者、COPD 患者、健常者と比較し、急性増悪リスクおよび予後との相関を解析した (Human HMGB1 ELISA Kit, シノテスト)。さらに急性増悪期の IPF 患者の血中 HMGB1 値と予後との関連について検討した。

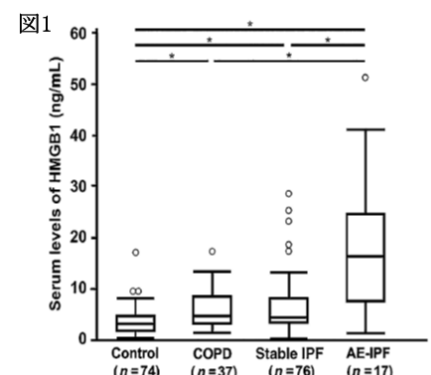
安定期 IPF 患者の血中および気管支肺胞洗浄液中の esRAGE を測定し、血中 esRAGE についてはこれを健常者と比較した。血中、気管支肺胞洗浄液中の esRAGE と IPF 患者の予後および呼吸機能との関連について検討した。RAGE 遺伝子の SNP とこれらの esRAGE との関連についても合わせて検討した。

(2) 10 週齢 C57BL/6J 雌マウスに Day0 にプレオマイシン持続注入ポンプ (BLM 100mg/kg/saline 200 $\mu\text{l}$ ) を埋め込み肺線維症マウスを作成し、RAGE 阻害剤を連日腹腔内投与 (FPS-ZM1 1mg/kg) し、効果について気管支肺胞洗浄液中の細胞や組織における線維化の検討をおこなった。

## 4. 研究成果

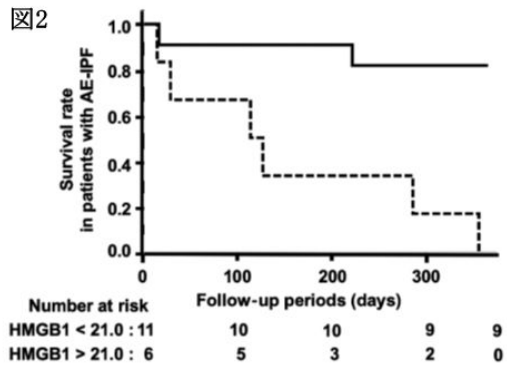
(1)安定期 IPF 患者の血中 HMGB1 は健常者と比較して有意に高値であり、急性増悪期の IPF 患者ではさらに両者と比較して有意に高値であった ( $6.26 \pm 5.27 \text{ ng/mL}$ ,  $3.42 \pm 2.69 \text{ ng/mL}$ ,  $19.20 \pm 16.76 \text{ ng/mL}$ ) (図 1)。血中 HMGB1 は DLCO と有意な負の相関を認めた (DLCO;  $r_s^2 = 0.062$ ,  $P = 0.039$ )

安定期 IPF 患者の血中 HMGB1 高値は増悪リスクと有意に相関していた (カットオフ値 =  $8.40 \text{ ng/mL}$ , ROCAUC = 0.57, 感度 41%, 特異度 83%)。多変量解析にて HMGB1 高値は将来の増悪の独立した

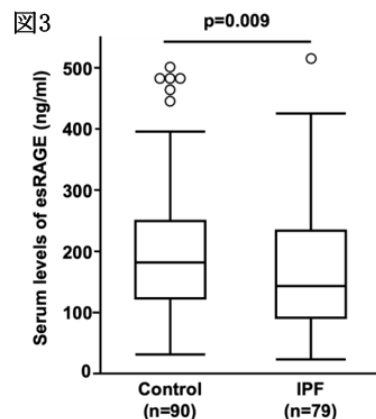


予測因子であることが判明した。

さらに急性増悪期の血中 HMGB1 高値とその後の予後について検討したところ、血中 HMGB1 値は有意な予後不良因子であることが分かった（カットオフ値= 21.0 ng/mL, ROCAUC=0.86, 感度 75%, 特異度 100%）（図 2）。HMGB1 高値の IPF 急性増悪患者は有意に生存率が低く、生存期間中央値は 121 日と極めて予後不良であった。



次に血中、気管支肺胞洗浄液中の esRAGE を測定し（Human esRAGE ELISA Kit, B-Bridge International, Inc）、血中 esRAGE について健常者と比較したところ IPF 患者において有意に低値であった（ $200.7 \pm 107.3$  ng/ml,  $162.0 \pm 102.4$  ng/ml）（図 3）。気管支肺胞洗浄液中の esRAGE は血中 esRAGE 値、肺拡散能有意な正の相関を示した。また気管支肺胞洗浄液中の esRAGE は DLCO と正の相関を示した。（ $r_s=0.406$ ,  $p=0.002$ ）

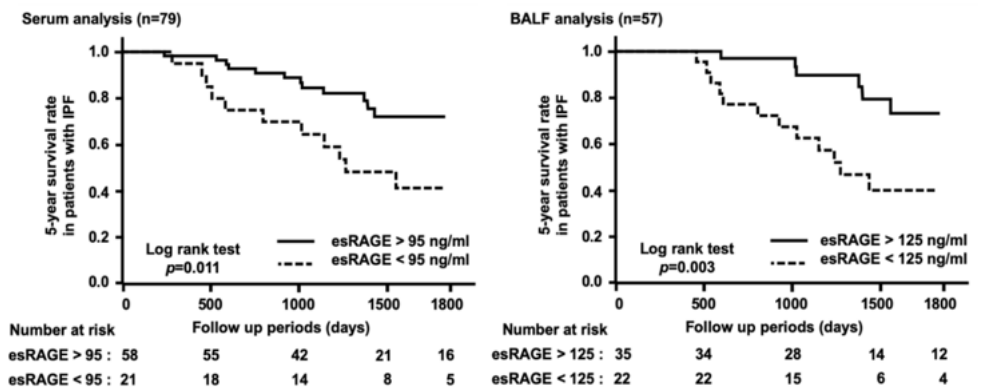


IPF 患者の 5 年生存率との関連について検討したところ血中 esRAGE、気管支肺胞洗浄液 esRAGE ともに有意に予後と関連していた（それぞれカットオフ値 95 ng/mL、ROCAUC=0.716、カットオフ値 125 ng/mL、ROCAUC=0.717）。多変量解析でも血中、気管支肺胞洗浄液中 esRAGE ともに有意な予後因子であり、

esRAGE が IPF の進展に  
関与していることが強く示唆された（図 4）。

esRAGE の分泌と遺伝子変異との関連を検討するために RAGE 遺伝子の SNP

図4



(rs1800624 and rs1800625)について検討したが esRAGE 値と相関を認めなかった。

マウスのプレオマイシン間質性肺炎マウスの実験においては、RAGE 阻害薬を投与したマウスでは肺の線維化の指標であるヒドロキシプロリンが有意に低値となっており、線維化が抑制されることが示された。気管支肺胞洗浄液の細胞の比較では RAGE 阻害薬投与マウスではリンパ球

の増加が抑制されていた。RAGE 阻害薬による肺の線維化抑制機序について現在さらに検討をおこなっている。

今回の検討により、まず RAGE リガンドの一つである HMGB1 が特発性肺線維症の急性増悪の予測および予後マーカーとして有用であることが示唆された。特に急性増悪期の HMGB1 値はその後の臨床転帰と明確な関連を認めており、特に急性増悪期のバイオマーカーとしての可能性を示す結果であった。さらに esRAGE が低値の特発性肺線維症の患者が予後不良であることも示され、RAGE/リガンド経路が本症の病態生理に関与していることを更に裏付けるエビデンスが得られた。動物実験では RAGE 阻害薬による肺の線維化抑制効果が示されており更に治療応用に向けた検討を継続していく予定である。

#### 引用文献

- (1) Yamaguchi K., Iwamoto H., Horimasu Y., Ohshimo S., Fujitaka K., Hamada H., Mazur W., Kohno N. Hattori N. AGER gene polymorphisms and soluble receptor for advanced glycation end product in patients with idiopathic pulmonary fibrosis, *Respirology*. 2017, 22, 965-971.
- (2) Yamaguchi K., Iwamoto H., Sakamoto S., Horimasu Y., Masuda T., Miyamoto S., Nakashima T., Ohshimo S., Fujitaka K., Hamada H. Hattori N. Serum high-mobility group box 1 is associated with the onset and severity of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis, *Respirology* 2020. 25, 275-280.
- (3) Yamaguchi K., Iwamoto H., Mazur W., Miura S, Sakamoto S, Horimasu Y., Masuda T, Miyamoto S, Nakashima T, Ohshimo S., Fujitaka K., Hamada H., Hattori N. Reduced endogenous secretory RAGE in blood and bronchoalveolar lavage fluid is associated with poor prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis, *Respiratory Research*, *in press*.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 12件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Masuda Takeshi, Nakashima Taku, Namba Masashi, Yamaguchi Kakuhiro, Sakamoto Shinjiro, Horimasu Yasushi, Miyamoto Shintaro, Iwamoto Hiroshi, Fujitaka Kazunori, Miyata Yoshihiro, Hamada Hironobu, Okada Morihito, Hattori Noboru	4. 巻 23
2. 論文標題 Inhibition of PAI 1 limits chemotherapy resistance in lung cancer through suppressing myofibroblast characteristics of cancer associated fibroblasts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cellular and Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 2984 ~ 2994
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jcmm.14205	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 -

1. 著者名 Takao Shun, Masuda Takeshi, Yamaguchi Kakuhiro, Sakamoto Shinjiro, Horimasu Yasushi, Nakashima Taku, Miyamoto Shintaro, Iwamoto Hiroshi, Fujitaka Kazunori, Hamada Hironobu, Hattori Noboru	4. 巻 98
2. 論文標題 High preoperative C-reactive protein level is a risk factor for acute exacerbation of interstitial lung disease after non-pulmonary surgery	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e14296 ~ e14296
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.0000000000014296	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 -

1. 著者名 Miwata Kei, Masuda Takeshi, Yamaguchi Kakuhiro, Sakamoto Shinjiro, Horimasu Yasushi, Miyamoto Shintaro, Nakashima Taku, Iwamoto Hiroshi, Fujitaka Kazunori, Hamada Hironobu, Hattori Noboru	4. 巻 58
2. 論文標題 Performance Status Is a Risk Factor for Depression before the Diagnosis of Lung Cancer Patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 915 ~ 920
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.1812-18	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 -

1. 著者名 Yamaguchi Kakuhiro, Iwamoto Hiroshi, Sakamoto Shinjiro, Horimasu Yasushi, Masuda Takeshi, Miyamoto Shintaro, Nakashima Taku, Ohshimo Shinichiro, Fujitaka Kazunori, Hamada Hironobu, Kohno Nobuoki, Hattori Noboru	4. 巻 97
2. 論文標題 Serial measurements of KL-6 for monitoring activity and recurrence of interstitial pneumonia with anti-aminoacyl-tRNA synthetase antibody	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e13542 ~ e13542
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.0000000000013542	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 -

1. 著者名 Namba Masashi, Hattori Noboru, Hamada Hironobu, Yamaguchi Kakuhiro, Okamoto Yohei, Nakashima Taku, Masuda Takeshi, Sakamoto Shinjiro, Horimasu Yasushi, Miyamoto Shintaro, Iwamoto Hiroshi, Fujitaka Kazunori, Kohno Nobuoki	4. 巻 442
2. 論文標題 Anti-KL-6/MUC1 monoclonal antibody reverses resistance to trastuzumab-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity by capping MUC1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 31 ~ 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2018.10.037	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 -

1. 著者名 Yamaguchi K, Iwamoto H, Horimasu Y, Ohshimo S, Fujitaka K, Hamada H, Mazur W, Kohno N, Hattori N.	4. 巻 22
2. 論文標題 AGER gene polymorphisms and soluble receptor for advanced glycation end-product in patients with idiopathic pulmonary fibrosis.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Respirology	6. 最初と最後の頁 965-971
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/resp.12995	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 Yamaguchi, K., Iwamoto, H., Sakamoto, S., Horimasu, Y., Masuda, T., Miyamoto, S., Nakashima, T., Ohshimo, S., Fujitaka, K., Hamada, H., & Hattori, N.	4. 巻 8
2. 論文標題 AGER rs2070600 polymorphism elevates neutrophil-lymphocyte ratio and mortality in metastatic lung adenocarcinoma	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 94382-94392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.21764	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 -

1. 著者名 Horimasu, Y., Ishikawa, N., Taniwaki, M., Yamaguchi, K., Hamai, K., Iwamoto, H., Ohshimo, S., Hamada, H., Hattori, N., Okada, M., Arihiro, K., Ohtsuki, Y., Kohno, N.	4. 巻 18
2. 論文標題 Gene expression profiling of idiopathic interstitial pneumonias (IIPs): identification of potential diagnostic markers and therapeutic targets	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC medical genetics.	6. 最初と最後の頁 88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12881-017-0449-9.	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 -

1. 著者名 Masuda Takeshi, Hirano Chihiro, Horimasu Yasushi, Nakashima Taku, Miyamoto Shintarou, Iwamoto Hiroshi, Ohshimo Shinichiro, Fujitaka Kazunori, Hamada Hironobu, Hattori Noboru	4. 巻 81
2. 論文標題 The extent of ground-glass attenuation is a risk factor of chemotherapy-related exacerbation of interstitial lung disease in patients with non-small cell lung cancer	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Cancer Chemotherapy and Pharmacology	6. 最初と最後の頁 131 ~ 139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00280-017-3476-5	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 -

1. 著者名 Horimasu Yasushi, Ishikawa Nobuhisa, Tanaka Sonosuke, Hirano Chihiro, Iwamoto Hiroshi, Ohshimo Shinichiro, Fujitaka Kazunori, Hamada Hironobu, Hattori Noboru, Kohno Nobuoki	4. 巻 17
2. 論文標題 MUC1 in lung adenocarcinoma: cross-sectional genetic and serological study	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-017-3272-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 -

1. 著者名 Yamaguchi Kakuhiro, Iwamoto Hiroshi, Sakamoto Shinjiro, Horimasu Yasushi, Masuda Takeshi, Miyamoto Shintaro, Nakashima Taku, Ohshimo Shinichiro, Fujitaka Kazunori, Hamada Hironobu, Hattori Noboru	4. 巻 25
2. 論文標題 Serum high mobility group box 1 is associated with the onset and severity of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respirology	6. 最初と最後の頁 275 ~ 280
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/resp.13634	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 -

1. 著者名 Yamaguchi K., Iwamoto H., Mazur W., Miura S, Sakamoto S, Horimasu Y., Masuda T, Miyamoto S, Nakashima T, Ohshimo S., Fujitaka K., Hamada H., Hattori N.	4. 巻 -
2. 論文標題 Reduced endogenous secretory RAGE in blood and bronchoalveolar lavage fluid is associated with poor prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Respiratory Research	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) なし	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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 山口 覚博、岩本 博志、坂本 信二郎、堀益 靖、益田 武、中島 拓、宮本 真太郎、藤高 一慶、濱田 泰伸、服部 登
2. 発表標題 IPF患者における血中High mobility group box 1の検討
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三浦 慎一郎、山口 覚博、坂本 信二郎、堀益 靖、益田 武、宮本 真太郎、中島 拓、岩本 博志、藤高 一慶、濱田 泰伸、服部 登
2. 発表標題 IPF患者におけるBALF中endogenous secretory RAGEの検討
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口覚博, 岩本博志, 坂本信二郎, 堀益 靖, 益田 武, 宮本真太郎, 中島 拓, 藤高一慶, 濱田泰伸, 服部 登.
2. 発表標題 IPF患者における 血中endogenous secretory RAGEの検討
3. 学会等名 第 58 回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2018年~2019年



1. 発表者名 Kakuhiro Yamaguchi, Hiroshi Iwamoto, Shinjiro Sakamoto, Yasushi Horimasu, Takeshi Masuda, Shintaro Miyamoto, Taku Nakashima, Shinichiro Ohshimo, Kazunori Fujitaka, Hironobu Hamada, Noboru Hattori.
2. 発表標題 Serum high mobility group box 1 is associated with the onset and severity of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis
3. 学会等名 ERS international congress 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----