

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16055

研究課題名(和文)新規間質性肺炎モデルの確立と治療薬ニンテダニブを用いた実証試験

研究課題名(英文) Study of suppressing effect to interstitial pneumonitis by nintedanib in a novel mouse model

研究代表者

三浦 陽子 (Miura, Yoko)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員

研究者番号：60563517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新規の間質性肺炎誘導モデル(induced usual interstitial pneumonia (iUIP) model)を用いて組織学的特徴(線維化率、炎症率)および、抗線維化剤ニンテダニブの連続経口投与による治療効果を検討した。本方法での誘導により、2週目にNon-specific interstitial pneumonia (NSIP)の後、6-8週にかけて緩解し、14週でUIP様の症状を示した。ニンテダニブ投与は緩解期である投与後6週目より14週まで連続投与を行った。ニンテダニブ投与はiUIPモデルに対し、抗線維能を示すことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間質性肺炎の中でも特発性肺線維症(IPF/UIP)は重篤な肺疾患であるが、その作用機序等は不明点が多い。本研究で確立した新規のIP誘導モデルは、プレオマイシンの気管支投与法を改良した方法で、肺炎誘導後に二峰性の線維化を示した。特に後期の線維化では、UIP様の症状を呈することを明らかにした。このようなUIP様の症状を示すモデルは他になく、今後UIP発症の詳細な解析が可能となる。ニンテダニブ投与による抗線維化能も明らかになったことから、新規の抗線維化剤のスクリーニングとしても活用できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Idiopathic pulmonary fibrosis is pathologically classified by usual interstitial pneumonia (UIP). In this study, I established a novel chronic induced-UIP (iUIP) model. D1CC×D1BC transgenic mice was induced fibrosis by intratracheal bleomycin mixed with microbubbles followed by sonoporation. Infiltrated lymphoid cells were observed in acute phase, but not in chronic phase. A bimodal fibrotic lung disease was observed in an acute phase similar to nonspecific interstitial pneumonia (NSIP) followed by chronic fibrotic phase with honeycombing similar to UIP. Next, we examined whether nintedanib treatment attenuate fibrosis in iUIP model, D1CC×D1BC mice were oral administrated nintedanib from week 6 to 14. Nintedanib treatment reduced type I collagen accumulation and attenuated fibrosis in the lung. This iUIP mouse model could provide a useful tool to elucidate mechanisms of progression to UIP, and to evaluate therapeutic interventions including nintedanib.

研究分野：分子医学

キーワード：間質性肺炎モデル 線維化 間質性肺炎

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

間質性肺炎 (IP) は肺の間質部における炎症を指し、その原因は薬剤性、膠原病性など多様である。特発性肺線維症 (IPF) は IP の中でも患者数が多く、また、その患者数は年々増加傾向にある。日本における IPF の有病率は 10 万人対 10.0 人とされている (北海道 study より)。このような状況から、線維化を伴う慢性肺炎のメカニズムの解明および、新しい治療法の開発が期待されている。

マウスを用いた既存の IP 誘導法は、Bleomycin や Silica 等を用いた誘導がなされている。中でも Bleomycin は副作用として薬剤性の間質性肺炎を示すため、非常に有用であるが、マウスに対して比較的高濃度で用いる必要があり、多くが誘導後 4 週間以内の急性肺炎を利用したモデルとなっている。そのため、既存の肺炎誘導法ではヒトの IPF 様の症状を示すモデルとは言い難い。本研究で用いた D1CC×D1BC マウスは、軟骨部に CIITA、B7.1 を発現するトランスジェニックマウスで、慢性進行性の関節炎を誘発する。D1CC×D1BC マウスは、生後 1 年を過ぎると 6 割のマウスで血清 SP-D 値の上昇がみられ、慢性肺炎が生じることを見出していることから、間質性肺炎に対し高感受性を示すことが明らかとなっている。

### 2. 研究の目的

間質性肺炎 (IP) に関する基礎的な研究は、急性肺炎を利用したモデル実験系に依存しており、線維化を伴う慢性肺炎発症の検討を進めにくい。我々は、D1CC×D1BC マウスが新規 IP 誘導法により、線維化を伴う慢性 IP を発症することを見出した。本研究では、1) 新規 IP 誘導法による血清学的変動 (SP-D 値) と組織学的特徴 (線維化率、炎症率、増殖率) の相関を明らかにする。2) 抗線維化剤ニンテダニブの連続経口投与を行い、治療効果を検討する。2) では、1) により得た各指標を検討し、抗線維化作用に加えて上皮細胞肥厚の減少等、薬剤による副次的効果の有無も明らかとする。本研究により新規 IP 誘導法を確立し、ニンテダニブを用いた実証試験を行うことで、IP 病態変動を多角的にとらえた治療薬開発システムを構築する。

### 3. 研究の方法

#### 1) IP 発症過程の組織学手特徴を可視化し、数値化する

D1CC×D1BC マウスを用いて、bleomycin と microbubble を混合し、直接胸腔内に投与した。その後、体外からの超音波処理により、bleomycin 曝露効果を高め、より強い IP 誘導を行った。2 週おきに血清中の SP-D 値を測定し、病態進行をモニタリングした。肺の採取は誘導後 2 週 (急性期)、8 週 (移行期)、14 週 (慢性期) で行い、4% paraformaldehyde で固定後、パラフィンブロックおよび、病理切片を作成した。

作製した病理切片を用いて、以下の検討を行った。Masson's trichrome 染色を行い、線維化率の計算および、Ashcroft score の計算を行った。リンパ球 (T 細胞、B 細胞、マクロファージ) の浸潤率の計算を行う。細胞の増殖率を検討した。

#### 2) 抗線維化剤ニンテダニブの連続経口投与による治療効果の検討

マウスの肺炎誘導は上記の bleomycin を用いた方法で行い、誘導後 2 週目で血清 SP-D を測定し、肺炎誘導ができたことを確認した。血清 SP-D 値が 100ng/ml 以上の値を示したマウスを用いて、誘導後 6 週目よりニンテダニブの経口投与を 8 週間行った。ニンテダニブの濃度は 90 mg/kg/日で行った。肺の採取は誘導後 14 週目で行い、組織学的検討を行った。

### 4. 研究成果

#### 1) IP 発症過程の組織学手特徴を可視化し、数値化する

##### 新規 IP 誘導法による肺炎の誘導

新規の IP 誘導法により、D1CC×D1BC マウスは誘導後 2 週目で最も高い SP-D 値を示した。その後 6 週にかけて SP-D 値は減少を示した。14 週にかけてカットオフ値 (53.9 ng/ml) を下回らず、慢性的に炎症状態を示すことを見出した。

##### Masson's trichrome 染色による線維化率の測定および、Ashcroft score の計算

新規 IP 誘導により肺炎を誘導したマウスの 2、8、14 週の肺および、未誘導の 0 週の肺は、病理切片を作製し、Masson's trichrome 染色を行った。線維化率の算出は ImageJ Fiji を用いて、青色に染色される膠原繊維の面積を肺の総面積で割って算出した。肺の線維化率は、誘導後 2 週で未誘導と比べて有意に高値を示した。その後、8 週の移行期にかけて線維化率の減少がみられたが、14 週の慢性期に再び 2 週と同じ程度線維化を示した (図 1 A)。

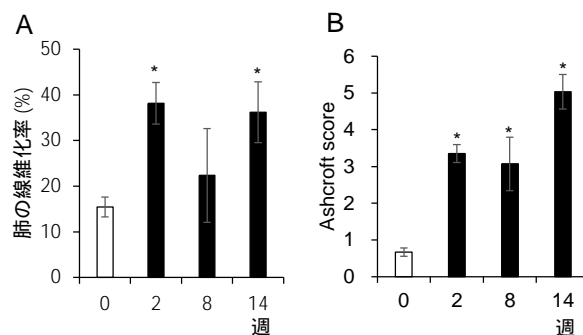


図1. 肺炎誘導後の線維化の変動

肺炎未誘導 (0週) および、肺炎誘導後、2、8、14週の病理切片を作製し、Masson's trichrome染色を行った。肺線維化率 (A)、Ashcroft score (B) を算出した。値は平均値 ± 標準誤差を示す。アスタリスクは肺炎未誘導 (0週) との有意差を示す ( $P < 0.05$ )。

Ashcroft score も Masson's trichrome 染色の切片を用いて算出した。未誘導と比べて、2 週目で線維化を示したことから、Ashcroft score においても高値を示した。8 週では線維化率ほど明確な低値を示さず、14 週で最も高い値を示した (図 1 B)。以上の結果から、D1CC×D1BC マウスを用いた新規 IP 誘導での肺炎誘導による線維化の変動は、急性期と慢性期に高値を示す二峰性の線維化を示す可能性が示唆された。

#### リンパ球 (T 細胞、B 細胞、好中球、マクロファージ) の浸潤率の計算

新規 IP 誘導により肺炎を誘導したマウスの 2、8、14 週の肺および、未誘導の 0 週の肺は、病理切片を作製し、T 細胞、B 細胞、好中球、マクロファージの免疫染色を行った。核細胞の浸潤率は、各陽性細胞数を切片の総細胞数で割って算出した。T 細胞および、マクロファージの浸潤率は 2 週で高値を示したが、その後 14 週にかけて未誘導とほぼ同じ程度まで減少がみられた。B 細胞、好中球では、肺炎誘導による浸潤率の上昇は確認できなかった。以上の結果から、14 週 (慢性期) でみられる線維化の上昇は、リンパ球の浸潤による炎症がほとんど見られない状況で生じている可能性が示唆された。

#### 細胞の増殖率

細胞の増殖率は Ki67 陽性細胞数を肺の総細胞数で割って算出した。肺炎未誘導の肺および、肺炎誘導後 2、8、14 週の肺の増殖率は、肺炎未誘導と比べて 2、14 週でともに分裂細胞数が低値を示した。

#### 2) 抗線維化剤ニンテダニブの連続経口投与による治療効果の検討

ニンテダニブの投与による検討は、1)の検討において UIP 様の症状を示した、誘導後 14 週の肺を用いて解析した。14 週の肺ではニンテダニブ投与においても線維化が依然認められた。しかし、ハニカム構造は Vehicle 群と比べて抑制傾向がみられた。リンパ球の浸潤等は 1)の検討においても 14 週の肺では殆ど確認できなかったことと同様に、確認されず、ニンテダニブ投与によるリンパ球浸潤の増加も確認されなかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Miura Y., Ota S., Peterlin M., McDevitt G., Kanazawa S.	4. 巻 3
2. 論文標題 A subpopulation of synovial fibroblasts in a mouse model of chronic inflammatory rheumatoid arthritis toward osteochondrogenic lineage	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JBMR plus	6. 最初と最後の頁 e10132
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jbm4.10132	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 Terasaki Y., Terasaki M., Kanazawa S., Kokuho M., Urushiyama H., Kajimoto Y., Kunugi S., Maruyama M., Akimoto T., Miura Y., Igarashi T., Ohsawa I., Shimizu A.	4. 巻 23
2. 論文標題 Effect of H2 treatment in a mouse model of rheumatoid arthritis-associated interstitial lung disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cellular and Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 7043-7053
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jcmm.14603	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 Miura Y., Kanazawa S.	4. 巻 40
2. 論文標題 Osteochondrogenesis derived from synovial fibroblasts in inflammatory arthritis model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-020-00115-w	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 三浦陽子 金澤智	4. 巻 24
2. 論文標題 間質性肺炎モデルマウスの構築	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 分子呼吸器病	6. 最初と最後の頁 16-19
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 無
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 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 三浦陽子 金澤智 大久保仁嗣 新実彰男
2. 発表標題 慢性間質性肺炎を呈する関節リウマチモデルにおけるニンテダニブの治療効果の検討
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

1. 発表者名 三浦陽子 金澤智
2. 発表標題 間質性肺炎モデルマウスにおける急性期、慢性期炎症における線維芽細胞の解析およびDNA障害関連マーカーの検討
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

1. 発表者名 Yoko Miura, Satoshi Kanazawa, Hirotsugu Ohkubo, Akio Niimi
2. 発表標題 Nintedanib attenuates histopathology of interstitial pneumonia in a transgenic mouse model of arthritis.
3. 学会等名 ATS conference 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金澤智 三浦陽子
2. 発表標題 急性期における自己免疫、慢性期における増殖性上皮細胞以上を特徴とする2相性間質性肺
3. 学会等名 第39回日本炎症・再生医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoko Miura, Satoshi Kanazawa
2. 発表標題 The fate of synovial fibroblasts in a mouse model of chronic inflammatory rheumatoid arthritis
3. 学会等名 JCR international school 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoko Miura, Satoshi Kanazawa
2. 発表標題 Ectopic expression of B7.1 (CD80) in chondrocytes leads to chronic inflammatory arthritis in mice
3. 学会等名 第19回武田科学振興財団生命科学シンポジウム (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三浦陽子 金澤智
2. 発表標題 慢性関節炎炎症時における滑膜線維芽細胞は全肥大化軟骨細胞の表現型を有する
3. 学会等名 JCR第4回ベーシックリサーチカンファレンス
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yoko Miura, Satoshi Kanazawa
2. 発表標題 Synovial fibroblasts has a potential ability as pre-hypertrophic chondrocytes in chronic inflammation of rheumatoid arthritis model, D1BC mouse
3. 学会等名 第40回日本分子生物学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 三浦陽子 金澤智
2. 発表標題 慢性関節炎炎症時における滑膜線維芽細胞は全肥大化軟骨細胞の表現型を有し骨分化する
3. 学会等名 第68回名古屋市立大学医学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Satoshi Kanazawa, Yoko Miura
2. 発表標題 A novel interstitial pneumonitis mouse model, D1CC x D1BC mouse shows chronic inflammation with severe fibrosis in lung
3. 学会等名 Keystone symposia
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 金澤智 三浦陽子
2. 発表標題 二峰性線維化状態を示す間質性肺炎モデルマウス (induced-UIP model) における組織学的な解析
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 三浦陽子 金澤智
2. 発表標題 Runx2+, Sox9+陽性滑膜線維芽細胞は肥大化軟骨細胞へ分化し骨性強直の原因となる
3. 学会等名 第61回日本リウマチ学会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三浦陽子 金澤智
2. 発表標題 関節炎症時における一部の滑膜線維芽細胞は骨・軟骨前駆細胞の性質を有し、異所性の骨分化へと進む
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
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