

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16614

研究課題名(和文)マクロファージ活性化制御による肺線維化抑制の新規治療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of new treatment for suppression of lung fibrosis through regulating macrophage activation

研究代表者

戸田 道仁 (Michihito, Toda)

大阪市立大学・大学院医学研究科・登録医

研究者番号：70769835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：in vitroにおいてピルフェニドン(PFD)はM1マクロファージ(M<sub>1</sub>)分極に影響を及ぼさず、M2M<sub>2</sub> の分極及びM<sub>2</sub>からのTGF- $\beta$ 1産生を抑制する。PFDはM<sub>2</sub>培養上清の添加で線維芽細胞増殖・Col1A1, heat shock protein 47発現を抑制する。in vivoにおいてPFDはこの連日経口投与で肺組織中のM2M<sub>2</sub>分極を抑制する。

BleomycinとLipopolysaccharideを併用投与することで呼吸不全が惹起されていることが判明し、ラットにおける特発性間質性肺炎の急性増悪病態を模倣するモデルを確立させた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ピルフェニドンが慢性肺線維化に関わるM2マクロファージの分極抑制効果を持つことが判明した。一方で急性炎症病態に関わるM1マクロファージの分極抑制効果は認めず、今後急性炎症病態(間質性肺炎急性増悪)抑制のためにはM1マクロファージを抑制する他剤との併用を行う必要がある。ラットの間質性肺炎急性増悪モデルを確立したことで今後さらに有効な実験系を計画することが可能となった。また、M2マクロファージは肺組織における発癌とも関係があるとされ、ピルフェニドンのマクロファージ分極制御機構により線維化肺の発癌抑制効果についても期待できる。

研究成果の概要(英文)：In vitro, Pifenidone (PFD) significantly reduced the expression of M2 macrophage (M<sub>2</sub>) markers but had no effect on the expression of M1 M<sub>1</sub> markers. PFD significantly reduced TGF- $\beta$ 1 levels in M<sub>2</sub> culture supernatants. The expression of Col1a1 and heat shock protein 47 mRNAs was only significantly suppressed when rat lung fibroblasts were cultured with conditioned medium from M<sub>2</sub> cells treated with PFD. In vivo, PFD suppressed M2M<sub>2</sub> polarization in lung tissue by daily oral administration.

Respiratory failure was exacerbated in Bleomycin-treated rats by Lipopolysaccharide. This model could mimic the pathophysiological changes of acute exacerbation of pulmonary fibrosis in humans.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：マクロファージ分極制御

## 1. 研究開始当初の背景

肺線維症治療薬はピルフェニドンとニンデタニブが上市されているが、その作用機序には未だ不明な部分も多く、抗線維化機序の解明とともにさらなる臨床効果の高い治療薬の開発が急務である。慢性炎症、特に肺線維症においては組織が繰り返し損傷を受けたり、TGF- $\beta$  産生調節の欠如により、TGF- $\beta$  および細胞外基質の産生が継続して行われ、組織の線維化を招くことが報告されている(N Engl J Med 331:1286, 1994)。さらに、その産生源は肺胞マクロファージ(M $\phi$ )で高発現していることが判明している(PNAS 88:6642, 1991)。動物実験においても抗癌剤ブレオマイシン(BLM)による線維化モデルを作成すると、数日で血中のTGF- $\beta$  1は高値となり、肺においては肺胞M $\phi$ に高発現し、このM $\phi$ のTGF- $\beta$  高発現は、副腎皮質ステロイドでは抑制されない(J Clin Invest 92:1812, 1993)。従って、TGF- $\beta$  の過剰産生を抑制し、本サイトカインネットワークを断ち切る目的からM $\phi$ の活性化を制御することが重要である。M $\phi$ は急性炎症等に見られるM1型、組織修復、癌等に見られるM2型、さらに肺胞、肝、脾、脂肪組織等に常在する組織常在型等に分けられ、線維化病態はM2>M1に分極バランスが傾いていることが知られている(Hum.Mol.Genet. 20:790, 2011)。従って、肺線維症におけるM $\phi$ の活性化制御は有効な治療戦略となる可能性がある。

## 2. 研究の目的

(1)すでに実臨床において抗線維化薬の一種であるピルフェニドン(PFD)は実際の臨床量での血漿中濃度 Vitro の報告での有効濃度の間には乖離があり、PFDは線維芽細胞に直接作用するのではなく、他の機序を介して効果を示すのではないかと考えられた。我々は線維化との関係が報告されているM $\phi$ に注目し、線維化が起こる過程の中でPFDはM1M $\phi$ への分極を制御することで炎症そのものを抑制したり、あるいはM2M $\phi$ への分極を制御し線維化病態を抑制するのではないかと推測した。またその作用が生体内の代謝を介したものの否かを検討するため、ラット肺胞M $\phi$ 細胞株であるNR8383を用いてサイトカインの刺激によりM1, M2に活性化したM $\phi$ に対するPFDの作用とその機序を検討した。

(2)また、その際のM $\phi$ を介した線維化制御に関しても検討した。M2M $\phi$ から産生される培養上清中のTGF- $\beta$  1や、その培養上清を添加した際の線維芽細胞の増殖能・mRNA発現に対する影響を検討し、さらに線維芽細胞から産生されるコラーゲン蛋白・HSP47蛋白発現への影響も検討した。

(3)vivoでもBLM誘発肺線維化モデルを用いてPFDの肺組織中M $\phi$ への影響を検討した。本研究室ではラットを用いたBLM気管内注入による肺線維化モデルを確立している。本モデルにおいて既存の肺線維症治療薬であるピルフェニドンによるラット肺線維化及び肺組織中のM $\phi$ 分極に与える影響について検討した。

(4)さらに上記の肺線維化モデルにおいて、すでに臨床で使用されているPFDとM $\phi$ 抑制効果が報告されているLiposome clodronate(CLO)(AJRCCM. 184(5): 569-81. June 2011.)を併用投与することで、それぞれM2M $\phi$ 及び肺線維化抑制が増強されるかどうかを検討し、治療の相乗効果を提唱することができるかどうかを検討した。

(5)BLM気管内注入肺線維化モデルに対して間質性肺炎急性増悪を模倣するモデルを作成した。間質性肺炎急性増悪は原因が未だ不明であるが、なんらかの刺激(感染、手術など)を契機におこることが知られており、肺炎の原因となるendotoxinはその原因のひとつであると考えられている。そのため、Lipopolysaccharide (LPS)を追加投与することで間質性肺炎急性増悪の模倣ができるかを検討した。

### 3. 研究の方法

(1) NR8383 細胞株 12well プレートに播種し、その 24 時間後に PFD の有機溶媒である DMSO もしくは DMSO に溶解させた PFD をそれぞれ濃度毎(1,10,100 µg/ml)に添加した。そのさらに 24 時間後にサイトカイン刺激(Control には PBS を、M1 型を増加させるのに LPS および IFN-γ を、M2 型を増加させるのに IL-4・IL-13 をそれぞれ添加した。細胞・上清を継時的に回収し Western blot(WB) 法にて M1 マーカー蛋白の発現を検討した。NR8383 に PFD を各濃度 (0.1,1,10,100 µg/ml) で添加、24 時間後に IL-4+IL13 刺激により M2M に分極させ、24 時間後に WB 法にて M2 マーカー蛋白の発現を検討した。このときのマクロファージ培養上清中の TGF-β1 産生を ELISA 法にて評価した。

(2)(1)の conditioned medium を線維芽細胞に添加した影響を検討することとした。ラット肺線維芽細胞株を播種し 24 時間後に M1 の 10%の Conditioned medium、および元々の Medium 内のサイトカインをキャンセルアウトする目的で Cell free medium にも同様の刺激・PFD それぞれ加えたものを線維芽細胞に添加し 24 時間後に細胞増殖試験を行った。

(3) 7 週 Winstar ラットを用いて sham 群には気管内に Saline を投与し、BLM および PFD 投与群には 3 mg/kg で BLM 気管内投与を行い、肺線維化モデルを作成した。Sham, BLM 群は連日 0.5% calboxymethyl cellulose(CMC)を経口投与、PFD 群では各濃度(10 or 100 mg/kg/day)で経口投与した。14 日後に Sacrifice し、肺組織を摘出し肺組織中の Hydroxyproline 量及び M2M マーカーの発現を検討した。

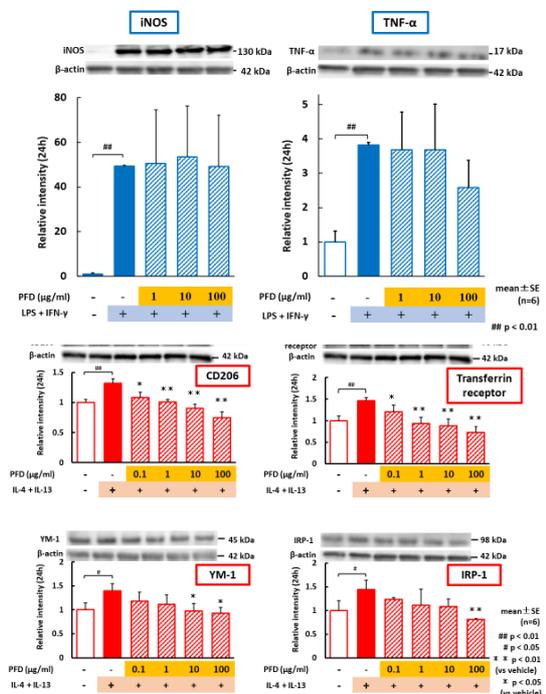
(4)(3)の肺線維化ラットモデルに対して Sham, Vehicle 群は連日 0.5% CMC を経口投与、PFD, PFD+CL0 群では 100 mg/kg/day で経口投与した。さらに CL0, PFD+CL0 群では 7 日後に CL0 28mg/kg を経静脈投与を行った。14 日後に Sacrifice し、肺組織を摘出し肺組織中の Hydroxyproline 量及び M2M マーカーの発現を検討した。

(5) BLM を気管内投与し、肺線維症をおこしたラットに 7 日目に LPS を設定量(BLM 投与群では 0.3mg 以上の LPS を投与した群で高度に生存率が低下したため本研究で使用する LPS の濃度は 0.05 と 0.15 とした)気管内投与、その 24 時間後、7 日後、14 日後に Sacrifice し、肺の組織学的線維化及び血液ガス、血漿中 NOx 発現を確認した。

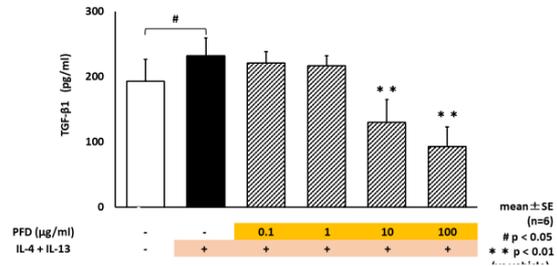
### 4. 研究成果

(1) LPS + IFN-γ 刺激により有意に M1 marker 蛋白の発現が増加した。PFD を各濃度で添加したが、Vehicle 群と比較して M1 marker 発現は有意差を認めず、PFD は急性炎症病態の M1M の分極に影響を及ぼさないことが分かった。

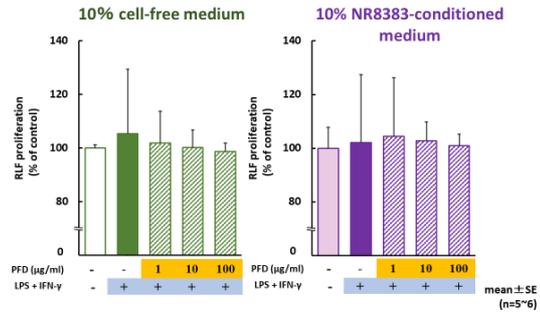
IL-4・IL-13 による刺激により、各 M2 マーカー発現蛋白が増強した。PFD を添加することで濃度依存的に M2 マーカー発現は抑制され、特に CD206 や Transferrin receptor では低濃度から有意に抑制した。PFD は線維化病態の M2M の分極に低濃度から制御することが分かった。



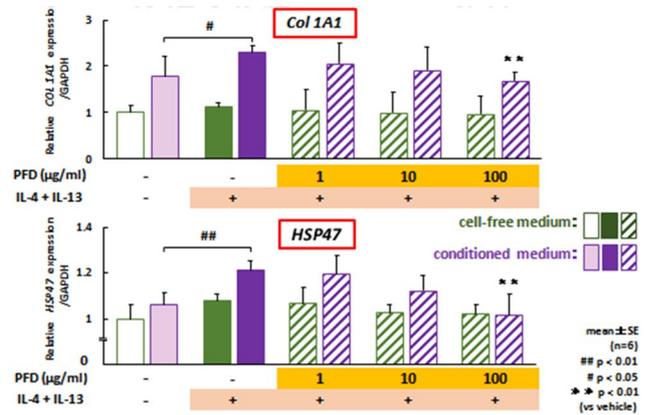
Control 群と比較して IL4/13 単独群で有意に TGF- $\beta$  1 産生が上昇し、PFD10, 100 $\mu$ g/ml を添加した群では有意に TGF- $\beta$  1 産生を抑制した。



(2) LPS+IFN- $\gamma$  刺激下では線維芽細胞に Cell free medium でも NR833 conditioned medium を添加しても増殖能に影響を及ぼさなかった。PFD が M1M の分極に影響を与えなかった結果と一致した。IL4+IL13 刺激下では線維芽細胞は Cell free medium を添加すると増殖能が増強する。これは既知の報告でも確認されているがそこに PFD を添加しても増殖能は抑制されなかった。

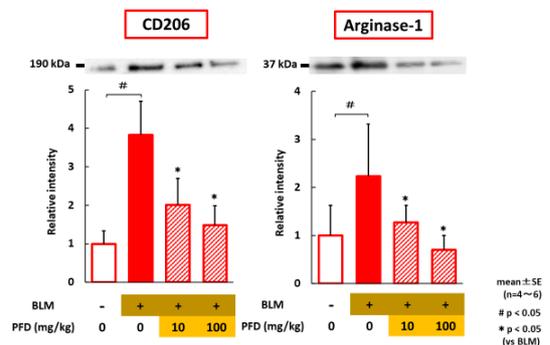


conditioned medium を添加するとやはり IL4+IL13 刺激群で増殖能は増強した。PFD10, 100 $\mu$ g/ml 上清群を添加すると増殖能が有意に抑制された。さらにこのときの線維芽細胞での mRNA 発現を検討すると、cell free medium 中に PFD を加えて添加してもこれまでの報告通りこの濃度では mRNA 発現に有意な影響は見られない。conditioned medium を添加すると、Control 群と比較して IL-4+IL13 群では有意に mRNA 発現が増強し、PFD100 上清群

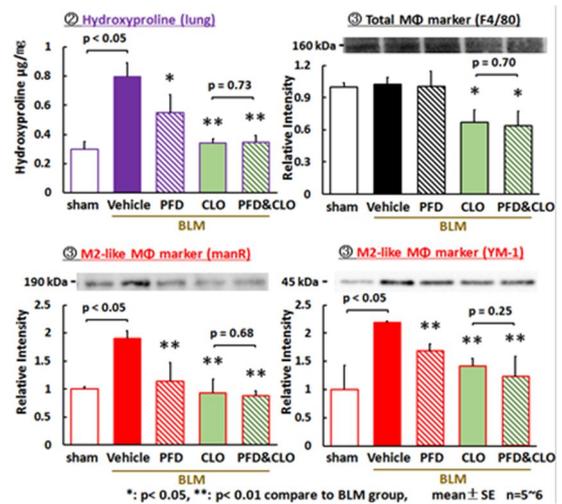


で Col1A1 も HSP47 もともに発現が抑制されていた。HSP47 蛋白マーカー発現でも同様で、cell free medium 中に PFD を加えて添加しても有意な影響は見られなかったが、conditioned medium を添加すると、Control 群と比較して IL-4+IL13 群では有意に HSP47 蛋白マーカー発現が増強し、PFD10 以上の上清群で発現が抑制された。線維芽細胞から産生されるコラーゲン関連蛋白発現への影響も検討した。cell free medium 中に PFD を加えて添加してもこの濃度では Collagen type1 蛋白マーカー発現に有意な影響は見られない。conditioned medium を添加すると、Control 群と比較して IL-4+IL13 群では有意に Collagen type1 蛋白マーカー発現が増強し、PFD10 以上の上清群で発現が抑制された。

(3) 肺組織中の M2 マーカー (manR) 発現を検討すると sham と比較して BLM 群で有意に M2 マーカー発現が増加したが、PFD10 mg/kg ~ (Cmax 3 $\mu$ g/ml) の群では増加を抑制することが分かった。

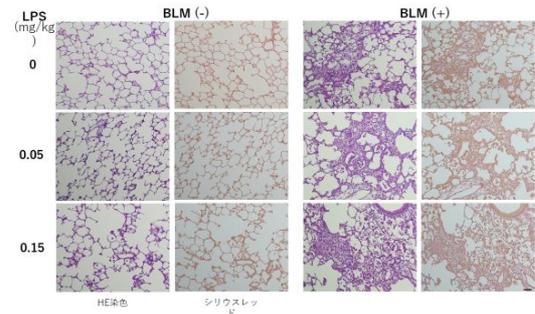


(4) BLM 投与によってラット肺組織中の線維化及び M2M のマーカー発現が上昇した。PFD 投与群, CLO 投与群, PFD+CLO 用群とも Hydroxyproline 及び Total M、M2M マーカー発現を抑制したが、PFD と CLO 併用による相乗効果は認められなかった。



(5) LPS 投与 24 時間後の肺組織像では BLM 投与群では顕著な線維化の進展を認めた。

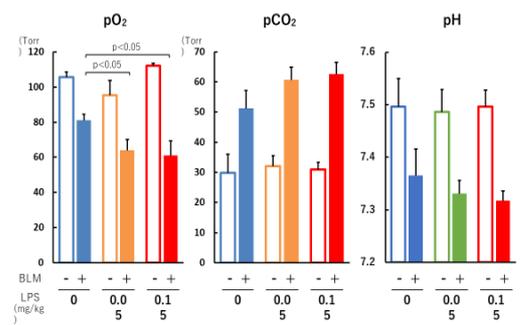
LPS 単独投与では若干の炎症細胞の浸潤がみられるのみであった。BLM、LPS 併用群では同量の LPS でも著大な炎症細胞の浸潤と肺胞間距離の拡大が認められた。



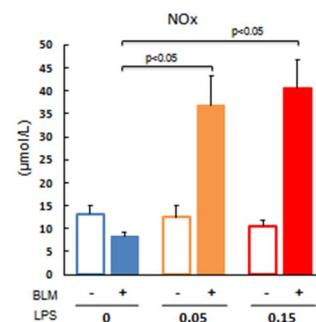
血液ガスは BLM を投与していない群では本モデルの LPS の濃度ではほぼ変化がみられなかった。

BLM 投与群では総じて pO<sub>2</sub> が低く pCO<sub>2</sub> が高く、pH が低くアシドーシスとなっており、BLM 単独群より BLM/LPS 併用群でさらに pO<sub>2</sub> の増悪を認めた。

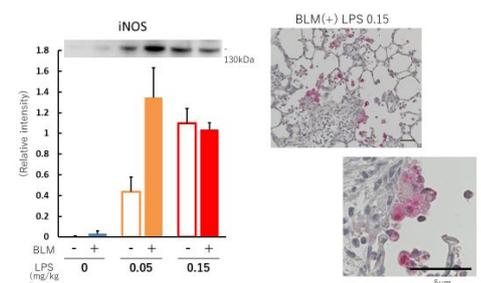
血漿中の Nox の量は BLM を投与していない群では変化なく、BLM と LPS を併用した群で有意に上昇していた。



血漿中の Nox の発生源を検索するため肺の iNOS を測定したところ、24 時間後では BLM のみでは上昇していないが、LPS 投与群では高度に上昇を認めた。LPS 単独群でも上昇が認められた。



BLM 投与、LPS 0.15 のラットの肺を免疫染色で検索すると、iNOS はマクロファージに染色され、肺組織中の iNOS の発生源は主に肺胞マクロファージ であることが推察された。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Toda Michihito, Mizuguchi Shinjiro, Minamiyama Yukiko, Yamamoto-Oka Hiroko, Aota Takanori, Kubo Shoji, Nishiyama Noritoshi, Shibata Toshihiko, Takemura Shigekazu	4. 巻 63
2. 論文標題 Pirfenidone suppresses polarization to M2 phenotype macrophages and the fibrogenic activity of rat lung fibroblasts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition	6. 最初と最後の頁 58 ~ 65
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3164/jcbn.17-111	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 Toda Michihito, Mizuguchi Shinjiro, Minamiyama Yukiko, Takemura Shigekazu, Oka-Yamamoto Hiroko, Aota Takanori, Miyamoto Hikaru, Nishiyama Noritoshi	4. 巻 120
2. 論文標題 Suppressive effects on lung fibrosis and the polarization and populations of macrophages by liposomal clodronate combined with pirfenidone	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 S102 ~ S102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.338	査読の有無 無
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 Minamiyama Yukiko, Takemura Shigekazu, Azuma Hideki, Osada-Oka Mayuko, Toda Michihito, Kobayashi Hikaru Keiko, Miyamoto, Ichikawa Hiroshi, Kubo Shoji	4. 巻 120
2. 論文標題 S-allyl-glutathione suppresses liver fibrosis by inhibition of excess skewing polarization of macrophages in rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 S133 ~ S133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.439	査読の有無 無
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 Miyamoto Hikaru, Tsukioka Takuma, Mizuguchi Shinjiro, Minamiyama Yukiko, Takemura Shigekazu, Toda Michihito, Nishiyama Noritoshi	4. 巻 120
2. 論文標題 Effects of pirfenidone on rat alveolar macrophage skewing and macrophage-fibroblast interactions	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Free Radical Biology and Medicine	6. 最初と最後の頁 S114 ~ S114
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.freeradbiomed.2018.04.376	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Michihito Toda
2. 発表標題 Suppressive effects on lung fibrosis and the polarization and populations of macrophages by liposomal clodronate combined with pirfenidone
3. 学会等名 May 2018 Free Radical Biology and Medicine (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yukiko Minamiyama, Michihito Toda
2. 発表標題 S-allyl-glutathione suppresses liver fibrosis by inhibition of excess skewing polarization of macrophages in rats
3. 学会等名 May 2018 Free Radical Biology and Medicine (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hikaru Miyamoto, Michihito Toda
2. 発表標題 Effects of pirfenidone on rat alveolar macrophage skewing and macrophage-fibroblast interactions
3. 学会等名 May 2018 Free Radical Biology and Medicine (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 戸田道仁 水口真二郎 南山幸子 竹村茂一 山本寛子 青田尚哲 西山典利
2. 発表標題 抗線維化薬ピルフェニドンの肺胞マクロファージ分極制御を介した線維化抑制効果の検討
3. 学会等名 第70回日本酸化ストレス学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Michihito Toda, Shinjiro Mizuguchi, Yukiko Minamiyama, Shigekazu Takemura, Hiroko Oka-Yamamoto, Takanori Aota, Hikaru Miyamoto, Noritoshi Nishiyama
2. 発表標題 Suppressive effects on lung fibrosis and the polarization and populations of macrophages by liposomal clodronate combined with pirfenidone
3. 学会等名 19th Biennial Meeting Society for Free Radical Research International (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
研究協力者	水口 真二郎 (Mizuguchi Shinjiro)	大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師  (24402)	
研究協力者	南山 幸子 (Minamiyama Yukiko)	京都府立大学・生命環境学部・教授  (24302)	
研究協力者	竹村 茂一 (Takemura Shigekazu)	大阪市立大学・大学院医学研究科・講師  (24402)	
研究協力者	月岡 卓馬 (Tsukioka Takuma)	大阪市立大学・大学院医学研究科・講師  (24402)	
研究協力者	宮本 光 (Miyamoto Hikaru)	大阪市立大学・大学院医学研究科・医員  (24402)	