

令和元年6月18日現在

機関番号：32660

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19546

研究課題名(和文)肺傷害に伴う線維芽細胞の場の記憶に関する研究

研究課題名(英文)Analysis of fibroblast imprinting in lung injury

研究代表者

松島 綱治(Matsushima, Kouji)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・教授

研究者番号：50222427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：肺線維症は、線維芽細胞により主に産生される、細胞外基質の過剰沈着により重篤な肺機能障害に至る病態である。肺線維症はしばしば慢性炎症を伴うが、それらは細胞に遺伝子発現やゲノムの変化など場の記憶をもたらす、機能変化に繋がる。しかしながら、線維芽細胞における特異的介入手段の不足のため、それら機能変化の実態は未だ不明である。本研究では、由来の異なる間葉系細胞の線維芽細胞移行系を用い、肺傷害に伴う線維芽細胞intrinsicに生じる場の記憶を解析した。その結果、Dcn遺伝子が肺傷害収束後も発現低下が維持され、Dcn遺伝子を高発現している脂肪組織由来間葉系細胞は、炎症収束能があることが見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、傷害された肺環境下に置かれた場合の線維芽細胞における遺伝子発現変動のなかで、組織の由来の違いによらず発現変動する遺伝子群、また由来組織の特徴が保持されている遺伝子群があることが明らかとなった。線維芽細胞の一種である間葉系幹細胞は様々な部位より採取されて、移植による疾患治療応用が試みられているが、本研究よりその部位の違いによりその効果が異なる可能性が想定されるので、間葉系幹細胞の社会応用のためにはその由来の考慮もまた必要な可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary fibrosis (PF) has a poor-prognosis, which characterized by the excess deposition of extracellular matrix produced mainly by activated lung fibroblasts. PF is often associated with chronic inflammation, which alters lung cell phenotype. However, how activated fibroblasts changes their phenotype through the course of lung injury is poorly known because limited options to assess fibroblast phenotype in vivo. By using intratracheal transfer method, we investigated the effect of origin of fibroblasts in their activation pattern and fibrosis pathology in bleomycin-induced lung injury. We found that the expression of Dcn was continuously downregulated after acute inflammation independently on fibroblast origin. In addition, adipose tissue-derived fibroblasts more strongly expressed Dcn, and both adipose tissue-derived and Dcn-overexpressed lung fibroblast exert anti-inflammatory effect in bleomycin-induced lung injury.

研究分野：炎症・免疫・がん

キーワード：病理学 免疫学 遺伝子 情報工学

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

1. 研究開始当初の背景

肺線維症を始めとする臓器線維化は、線維芽細胞により主に産生される、細胞外基質の過剰沈着により重篤な臓器障害に至る病態である。臓器線維化は慢性炎症疾患に伴い幅広く認められ、個体の老化に伴い発症頻度が上昇することが知られている。慢性炎症や老化は、DNA メチル化変化などの cell-intrinsic な変化、細胞外基質の構築変化、組織内微小環境の変化などの、『場の記憶』をもたらし、細胞や臓器レベルの機能変化に繋がる。しかしながら、線維芽細胞における特異的介入手段の不足のため、炎症に伴い線維芽細胞に刻まれる『場の記憶』、およびそれに伴う機能変化の実態は未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究では、提案者らの新たな線維芽細胞特異的介入手段に基づき、肺傷害に伴い肺線維芽細胞 intrinsic に生じる『場の記憶』の実態、その分子制御機構、肺炎症反応における意義を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CAG-EGFP マウスの全肺および鼠径部脂肪組織をコラゲナーゼで酵素消化した後、CD45, CD146, EpCAM, Ter119 陽性細胞を磁器細胞分離により除去することで線維芽細胞を分離した。プレオマイシン(BLM)モデルマウスに BLM 投与 1 日後に分離した由来の異なる線維芽細胞をそれぞれ経気道的に養子移入した。細胞移入 3 日後に、同様の方法で線維芽細胞を分離した後、セルソーターにより移入した線維芽細胞を純化した。移入前後の肺由来線維芽細胞及び脂肪組織由来間葉系細胞を用いてトランスクリプトーム解析を行った。

(2) トランスクリプトーム解析の結果から着目された Decorin (Dcn) を過剰発現させるウイルスを作製し、前述と同じ方法で肺から分離した線維芽細胞に感染させ、Dcn 過剰発現線維芽細胞を作製した。非感染細胞は磁器細胞分離により除去し、感染効率が 95% 以上の線維芽細胞集団を実験に用いた。BLM モデルマウスに BLM 投与 1 日後に Dcn 過剰発現線維芽細胞を経気道的に養子移入した。細胞移入 21 日後に、ヒドロキシプロリンアッセイ及び HE 染色により肺の状態を解析した。

(3) CRISPR-Cas システムを用いて、Dcn の発現依存的に GFP を発現する Dcn-GFP-Cre ノックインマウスを作成し、正常状態での局在及び BLM モデルでの変化を解析した。

4. 研究成果

(1) 養子移入前後の肺由来線維芽細胞及び脂肪組織由来間葉系細胞(線維芽細胞)を用いてトランスクリプトーム解析の結果、発現変動している 3418 個の遺伝子が抽出され、その発現パターンから 12 の遺伝子モジュールに区別された(図 1A、B)。線維芽細胞の由来(脂肪組織あるいは肺)に依存して変動する遺伝子群については、元の組織の『場の記憶』が強く反映された結果であると考えられる。どちらの線維芽細胞でも移入前後で同じように発現量が低下する遺伝子は、線維芽細胞特有の遺伝子であると考えられる。そこで、線維芽細胞の由来(脂肪組織あるいは肺)に依存せず、プレオマイシン誘導肺線維症の進行に伴い共通して発現低下する遺伝子群から遺伝子を抽出した。さらに、gene ontology 解析及び発現量解析を行い、移入前

には発現量が線維芽細胞の中で最も高い遺伝子として Dcn(Decorin)が見出された(図 1C)。Dcn の発現量は抽出された遺伝子の中で最も高く、下位の遺伝子よりも 20 倍以上高かった。Dcn の発現細胞特異性を ImmGen (Immunological Genome Project) の geneset よりデータを V1 datasets を取得し解析を行ったところ、Dcn は間葉系の細胞で特異的に発現している遺伝子であることが明らかとなった(図 1D)。また、線維芽細胞の養子移入において肺由来、脂肪由来のように由来の異なる線維芽細胞の移入では BLM モデルマウスに及ぼす影響は異なっていたが、これは、細胞を分取した組織での場の記憶が、移入後は炎症が起きた肺で educate されるものと、そうでなくももとの由来の違いの signature で残っているものがあり、線維化に及ぼす違いにつながって

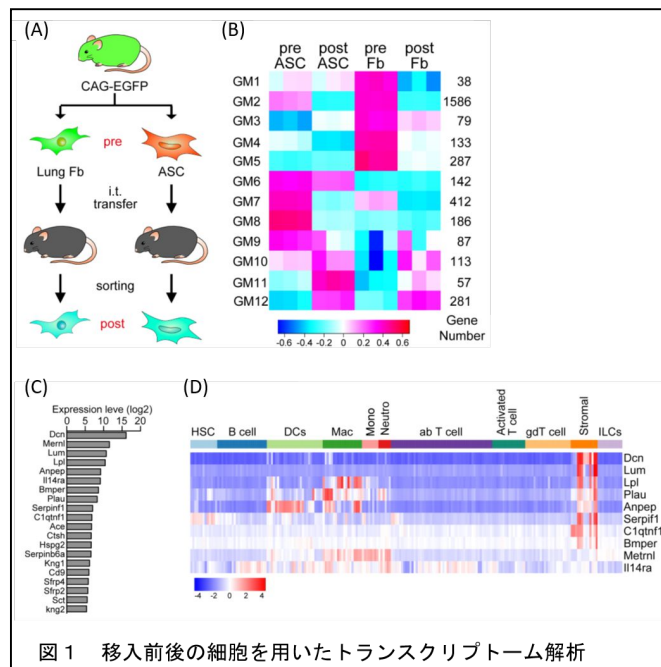


図 1 移入前後の細胞を用いたトランスクリプトーム解析

いる可能性がある。これまで一般的に行われてきたような、移入前後の同一の細胞での遺伝子発現の比較では、細胞の「場の記憶」を意味する遺伝子は抽出されなかった。今回、由来の異なる移入前後線維芽細胞での比較を行うことで、「場の記憶」に特徴的な遺伝子の抽出が可能となった。本研究においては肺と脂肪組織由来の線維芽細胞を用いたが、今後、腎臓や肝臓の線維芽細胞も同様に解析を行うことで、「場の記憶」に特徴的な遺伝子の詳細が可能であると考えられる。

(2) Dcn が実際に肺線維症病態に対して寄与しているか否かを検証するため、レトロウイルスを用いて Dcn を過剰発現させた肺線維芽細胞(図2A)をプレオマイシン傷害肺に対してプレオマイシン投与1日後に養子移入した。その後、細胞移入21日目にヒドロキシプロリンアッセイによるコラーゲンの定量及びHE染色による線維化部位の観察を行った。その結果、dcn 過剰発現線維芽細胞移入ではコラーゲン沈着の減少がみられ、HE染色でも線維化部位が減少していることが明らかとなった。Dcn は、細胞が接着する際の基質の集合や調節、細胞遊走、増殖、分化に関与している様々なタンパク質と相互作用している。さらに、VEGF や TGF β 、PDGF-BB 等の様々な成長因子の働きを抑制することで血管新生や線維化形成を調節していることやコラーゲンに結合し、その分解に関与していることが報告されている。そのため、線維芽細胞の2つの由来に共通して、傷害肺という炎症の場に起因した変化が生じていること、またその生じている変化の一つ Dcn の発現低下が肺線維症病態を悪化させていることが示唆された。

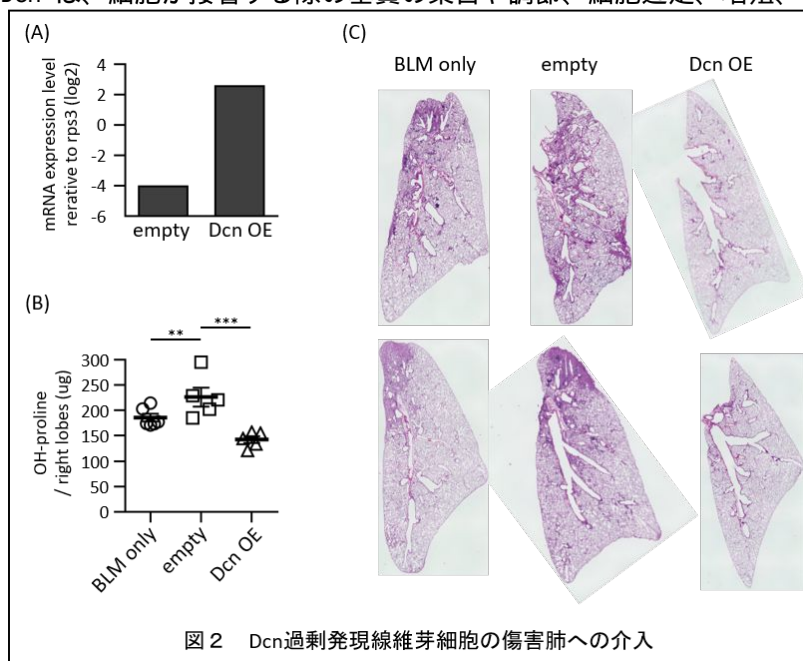


図2 Dcn過剰発現線維芽細胞の傷害肺への介入

(3) Dcn-GFP-P2A-Cre ノックインマウスを作成し、Dcn 陽性細胞の空間的分布・プレオマイシン傷害に伴う変化を解析した。その結果、Dcn は気道・気管支周囲の線維芽細胞特異的に発現し、肺胞腔の線維芽細胞での発現は稀であることが明らかとなった(図3A)。また、Dcn を特異的に発現する線維芽細胞は、プレオマイシン傷害に伴いその数が減少することが見出された(図3B)。さらに、プレオマイシン傷害肺のシングルセルトランスクリプトーム解析により、Dcn 陽性・陰性線維芽細胞の両者ともに、炎症収束後の day21 においても発現変動している遺伝子群が、炎症収束後も保持される線維芽細胞の変化として見出された。

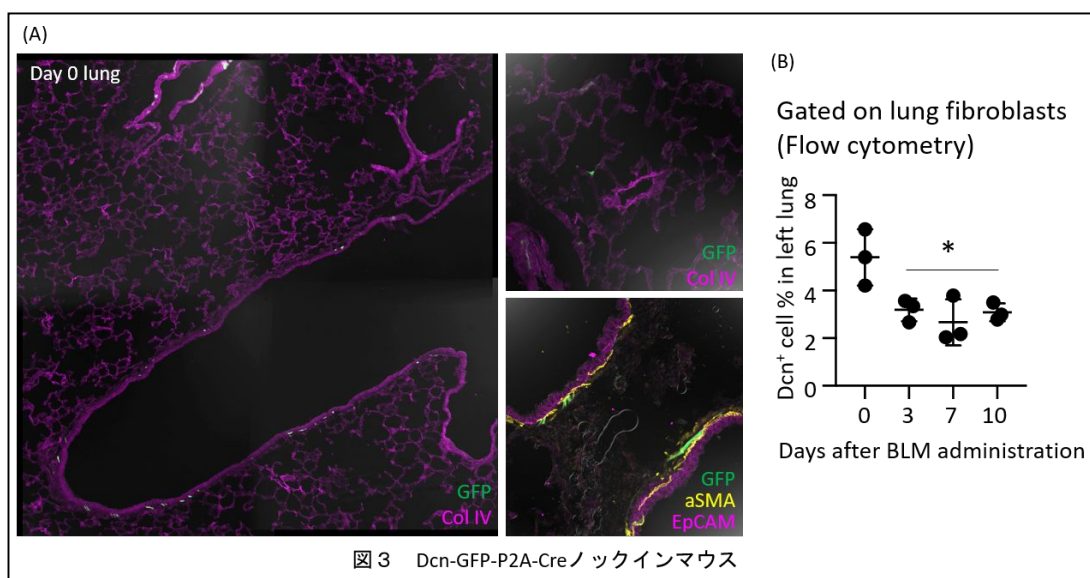


図3 Dcn-GFP-P2A-Creノックインマウス

今回の研究において、同系列の細胞でも由来が異なることで「場の記憶」に由来する遺伝子の発現変動がみられたことは、今後、iPS細胞移植や細胞治療等の細胞ベースでの研究において、

細胞を採取する場所を選択することがより良い output につながる可能性があると考える。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Reduction of Proliferating Olfactory Cells and Low Expression of Extracellular Matrix Genes Are Hallmarks of the Aged Olfactory Mucosa. Ueha R, Shichino S, Ueha S, Kondo K, Kikuta S, Nishijima H, Matsushima K, Yamasoba T. Front Aging Neurosci. 10:86, 2018. (査読あり)

2. Single blood transfusion induces the production of donor-specific alloantibodies and regulatory T cells mainly in the spleen. Ueta H, Kitazawa Y, Sawanobori Y, Ueno T, Ueha S, Matsushima K, Matsuno K. Int Immunol. 30:53-57, 2018. (査読あり)

3. Increased diversity with reduced "diversity evenness" of tumor infiltrating T-cells for the successful cancer immunotherapy. Hosoi A, Takeda K, Nagaoka K, Iino T, Matsushita H, Ueha S, Aoki S, Matsushima K, Kubo M, Morikawa T, Kitaura K, Suzuki R, Kakimi K. Sci Rep. 8:1058, 2018. (査読あり)

4. The HIV co-receptor CCR5 regulates osteoclast function. Lee JW, Hoshino A, Inoue K, Saitou T, Uehara S, Kobayashi Y, Ueha S, Matsushima K, Yamaguchi A, Imai Y, Iimura T. Nat Commun. 8:2226, 2017. (査読あり)

5. Long-Lasting Graft-Derived Donor T Cells Contribute to the Pathogenesis of Chronic Graft-versus-Host Disease in Mice. Kosugi-Kanaya M, Ueha S, Abe J, Shichino S, Shand FHW, Morikawa T, Kurachi M, Shono Y, Sudo N, Yamashita A, Suenaga F, Yokoyama A, Yong W, Imamura M, Teshima T, Matsushima K. Front Immunol. 8:1842, 2017 (査読あり)

6. Comprehensive single-cell transcriptome analysis reveals heterogeneity in endometrioid adenocarcinoma tissues. Hashimoto S, Tabuchi Y, Yurino H, Hirohashi Y, Deshimaru S, Asano T, Mariya T, Oshima K, Takamura Y, Ukita Y, Ametani A, Kondo N, Monma N, Takeda T, Misu S, Okayama T, Ikeo K, Saito T, Kaneko S, Suzuki Y, Hattori M, Matsushima K. Sci Rep. 7:14225, 2017 (査読あり)

7. Combination of anti-CD4 antibody treatment and donor lymphocyte infusion ameliorates graft-versus-host disease while preserving graft-versus-tumor effects in murine allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Ueha S, Yokochi S, Ishiwata Y, Kosugi-Kanaya M, Shono Y, Shibayama S, Ito S, Matsushima K. 108:1967-1973, 2017. (査読あり)

8. Simian Immunodeficiency Virus Targeting of CXCR3(+) CD4(+) T Cells in Secondary Lymphoid Organs Is Associated with Robust CXCL10 Expression in Monocyte/Macrophage Subsets. Fujino M, Sato H, Okamura T, Uda A, Takeda S, Ahmed N, Shichino S, Shiino T, Saito Y, Watanabe S, Sugimoto C, Kuroda MJ, Ato M, Nagai Y, Izumo S, Matsushima K, Miyazawa M, Ansari AA, Villinger F, Mori K. J Virol 91, e00439-17 (2017). (査読あり)

〔学会発表〕(計 19 件)

1. 中島拓弥・七野成之・上羽悟史・松島綱治 マウス肺線維症モデルへの間葉系幹細胞の移入ルートおよびドナーによる移入効率と治療効果の解析 第 39 回日本炎症・再生医学会 2018

2. 中島拓弥・七野成之・上羽悟史・松島綱治 マウス肺線維症モデルへの移入ルートおよびドナーによる移入効率と治療効果の解析 第 18 回分子予防環境医学研究会大会 2019

3. 七野 成之, 橋本 真一, 上羽 悟志, 松島 綱治 プレオマイシン誘導マウス肺線維症 モデルにおける経時的 1 細胞 トランスクリプトーム解析 第 18 回分子予防環境医学研究会大会 2019

4. Satoshi Ueha, Aoki Hiroyasu, Shigeyuki Shichino, Ogiwara Haru, Shinichi Hashimoto, Kazuhiro Kakimi, Kouji Matsushima TCR sequencing reveals the generation and expansion of tumor-specific CD8+T cell clones after anti-CD4 antibody treatment in tumor-bearing mice Keystone Symposia 2018.

5. Satoshi Ueha, Yasuhiro Aoki, Shigeyuki Shichino, Haru Ogiwara, Shinichi Hashimoto, Kazuhiro Kakimi, Satoru Ito, Kouji Matsushima. TCR sequencing reveals the generation and expansion of tumor-specific CD8+ T cell clones after anti-CD4 antibody treatment in tumor-bearing mice 第 21 回日本がん免疫学会総会 2017.

6. Satoshi Ueha, Yasuhiro Aoki, Shigeyuki Shichino, Haru Ogiwara, Shinichi Hashimoto, Kazuhiro Kakimi, Satoru Ito, Kouji Matsushima TCR sequencing reveals the generation

and expansion of tumor-specific CD8+ T cell clones after anti-CD4 antibody treatment in tumor-bearing mice 第 76 回日本癌学会学術総会 2017.

7. 上羽 悟史、石渡 義郎、横地祥司、伊藤哲、松島綱治 抗 CD4 抗体と DLI を併用した同種造血幹細胞移植による低免疫原性固形がん治療の可能性 第 26 回 日本癌病態治療研究会 2017.
8. 青木 寛泰、七野 成之、橋本 真一、上羽 悟史、松島 綱治 担がんマウスにおける CD8+ T 細胞レパトアの臓器別解析 第 3 回日本骨免疫学会 2017.
9. Shigeyuki Shichino, Satoshi Ueha, Naoto Sudo, Mizuha Kosugi-Kanaya, Francis HW Shand, Teppei Morikawa, Shin-ichi Hashimoto, Takanori Teshima, Kouji Matsushima. Transcriptome analysis reveals PDGF signaling-dependent regulation of myelofibrosis in murine chronic graft-versus-host diseases, 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society 2017.
10. Shigeyuki SHICHINO, Satoshi UEHA, Shin-ichi HASHIMOTO, Inagaki YUTAKA, Kouji MATSUSHIMA An organ-wide transcriptome of stromal cells identifies the core signature of steady-state murine fibroblasts, 4th Lymphoid tissue meeting, 2017.
11. 七野 成之, 津久井 達也, 橋本 真一, 大辻 幹哉, 上羽 悟史, 稲垣 豊, 島野 仁, 松島 綱治 細胞と分子の動きから観る臓器線維化 「炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出」研究開発領域公開シンポジウム 2018.
12. 松島 綱治 炎症の遷延化・不可逆化に伴う臓器線維症の細胞基盤 第 17 回分子予防環境医学研究会大会 2018.
13. 七野 成之, 青木 寛泰, 橋本 真一, 荻原 春, 上羽 悟史, 松島 綱治 担がんマウスにおける CD8+ T 細胞レパトアの臓器別解析 第 17 回分子予防環境医学研究会大会 2018.
14. 七野 成之, 上羽 悟史, 橋本 真一, 松島 綱治 肺線維症における活性化線維芽細胞の起源とその活性化制御機構 第 38 回日本炎症・再生医学会 2017.
15. 七野 成之, 上羽 悟史, 須藤 直人, 小杉 瑞葉, 松島 綱治 慢性 GVHD における骨髄線維化の分子メカニズムの検討 第 3 回日本骨免疫学会 2017.
16. Satoshi Ueha, Haru Ogiwara, Shoji Yokochi, Yoshiro Ishiwata, Francis Shand, Shohei Hori, Kazuhiro Kakimi, Satoru Ito, Kouji Matsushima. An anti-CD4 depleting antibody reverses regulatory T cell-induced suppression of dendritic cells while preventing nonspecific CD4+ T cell responses in tumor-bearing mice. 36th Sapporo International Cancer Symposium 2017.
17. Satoshi Ueha, Haru Ogiwara, Shoji Yokochi, Yoshiro Ishiwata, Francis Shand, Shohei Hori, Kazuhiro Kakimi, Satoru Ito, Kouji Matsushima. An anti-CD4 depleting antibody reverses regulatory T cell-induced suppression of dendritic cells while preventing nonspecific CD4+ T cell responses in tumor-bearing mice. AACR Annual Meeting 2017.
18. Satoshi Ueha, Haru Ogiwara, Shigeyuki Shichino, Jun Abe, Francis Shand, Shinichi Hashimoto, Kouji Matsushima. Identification of a functional and transcriptional signature for tumor-infiltrating dendritic cells in mouse. 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society 2017.
19. Satoshi Ueha, Aoki Hiroyasu, Shigeyuki Shichino, Ogiwara Haru, Shinichi Hashimoto, Kazuhiro Kakimi, Kouji Matsushima, TCR sequencing reveals the generation and expansion of tumor-specific CD8+T cell clones after anti-CD4 antibody treatment in tumor-bearing mice. The 46th Japanese Society for Immunology 2017.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://k-matsushimalab.org/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：上羽 悟史

ローマ字氏名：Ueha Satoshi

所属研究機関名：東京理科大学

部局名：生命医科学研究所

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：00447385

(2)研究協力者

研究協力者氏名：橋本 真一
ローマ字氏名：Hashimoto Shinichi

研究協力者氏名：島岡 猛士
ローマ字氏名：Shimaoka Takeshi

研究協力者氏名：七野 成之
ローマ字氏名：Shichino Shigeyuki

研究協力者氏名：中島 拓弥
ローマ字氏名：Nakajima Takuya

研究協力者氏名：青木 寛泰
ローマ字氏名：Aoki Hiroyasu

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。