

令和元年6月2日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19550

研究課題名(和文)腎線維芽細胞の特殊性の解明

研究課題名(英文)Elucidation of unique characteristics of renal fibroblasts in fibrosis

研究代表者

倉島 洋介(Kurashima, Yosuke)

東京大学・医科学研究所・特任准教授

研究者番号：30729372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、急性炎症反応から組織線維化への移行プロセスにおける腎線維芽細胞の機能の変遷についての解析を進めた。

興味深いことに、「コラーゲン産生ミエロイド系細胞」の誘導という特殊な機能は、腎臓の線維芽細胞に特異的に備わっており、他の組織に存在する線維芽細胞には備わっていない免疫学的機能であることを新たに見出した。この腎臓線維芽細胞特異的な機能は、腎線維化促進機序の一つの経路であると考えられる。腎線維芽細胞の特殊性を理解し、この経路を効果的に遮断することで、腎線維化を抑える新規治療法の確立につながると期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題はこれまで申請者が取り組んできた、生体恒常性維持のための「線維芽細胞 免疫細胞相互作用」についての研究成果から着想を進めた研究課題である。本研究から、コラーゲンを選択的に産生し、線維化促進に働くミエロイド系細胞を見出し、この細胞の誘導プロセスから腎線維芽細胞の特殊性や新たな活性化機序が明らかになった新規性・独自性の高い研究として位置付けられる。

「組織特異的な病原性線維芽細胞による線維化誘導機構」という新しいコンセプトの立証に繋がると考えられ、病原性線維芽細胞を標的とした新規治療につながる成果である。

研究成果の概要(英文)：Excessive accumulation of extracellular matrix such as type I collagen induced fibrosis and eventually causing organ failure. In kidney, renal interstitial fibrosis is a common pathology when chronic kidney disease was aggravated. However, the underlined mechanisms of kidney fibrosis especially interstitial fibrosis have not been well elucidated. We newly found unique myeroid cell populations, which are capable of producing collagen, are increased in the fibrotic kidney. Those myeroid cell populations are induced by fibrogenic renal fibroblasts in vitro. Importantly, those fibrogenic fibroblasts are increased by activation of mast cells. Taken together, the triangular interaction of those cellular populations could be a major pathological event for renal fibrotic disease and considered as a new drug target.

研究分野：免疫学

キーワード：線維化 線維芽細胞 マスト細胞 コラーゲン マクロファージ 慢性炎症

挑戦的研究(萌芽)
「腎線維芽細胞の特殊性の解明」

1. 研究開始当初の背景

赤み、痛み、腫れ、熱を主徴とした炎症は、組織修復に必要な生理学的イベントである一方で、持続的且つ反復した刺激により、急性炎症から慢性炎症へと炎症の質的な変化が導かれる。急性炎症時において、コラーゲンをはじめとする細胞外マトリックスは組織修復のための細胞の足場として機能するが、慢性的且つ過剰な細胞外マトリックスの産生と蓄積は「組織線維化」を招く(White ES. et al., J Pathol. 2013)。線維化は、臓器の機能不全をもたらすため、線維化機序の解明による予防・治療法の開発は急務である。

腎臓においては、腎機能が低下した状態を示す慢性腎臓病が悪化すると、共通して尿細管間質の線維化(腎線維化)が見られ、最終的に腎不全となり人工透析あるいは腎移植が必要となる。これまでの基礎的研究から、腎線維化を引き起こす細胞として、組織内在性線維芽細胞、CD34⁺骨髄由来線維細胞(fibrocyte)、周皮細胞などが挙げられている(Falke LL. et al., Nat Rev Nephrol. 2015)。特に、筋線維芽細胞をはじめ活性化した線維芽細胞によるコラーゲン産生・沈着が線維化誘導に重要であることは古くから知られているものの、病態形成における免疫細胞などの他の細胞集団との関係性や線維芽細胞同士の相互作用については、その多くが不明である。つまり、これらについての詳細な解析によって標的細胞や標的分子を明確に定めることが線維化治療には急務である。

2. 研究の目的

本研究は、我々がこれまで行ってきた「線維芽細胞 免疫細胞相互作用」の解析をもとに、腎線維芽細胞の特有の働きとして我々が新たに見出した「コラーゲン産生ミエロイド系細胞」の誘導機構の解明と、機能解析を中心に進める。本研究から、腎線維化関連因子群の同定を目指すと共に、慢性炎症移行プロセスを明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、下記2つの方法から研究目的の達成を目指した。

(1) 腎線維化におけるコラーゲン産生ミエロイド系細胞の誘導に関わる分子群の探索。

マウス片側尿管結紮により誘導された腎線維化マウスモデルの腎臓から、コラーゲンを産生する活性化線維芽細胞を単離し、網羅的遺伝子解析を行った。比較対象群として、コラーゲン産生ミエロイド系細胞の誘導能を持たない線維芽細胞(3T3線維芽細胞株、皮膚線維芽細胞、腸管線維芽細胞)や腎臓内在性の非活性化線維芽細胞の遺伝子情報と比較し、腎線維芽細胞特異的(もしくは強発現)に発現する遺伝子群を抽出し、誘導因子の候補の探索を行った。

(2) コラーゲン産生ミエロイド系細胞の除去方法の確立による機能解析。

マウス片側尿管結紮による腎線維化マウスモデルの腎臓から、コラーゲン産生ミエロイド系細胞ならびに非産生ミエロイド系細胞を単離し、網羅的遺伝子解析を行った。さらに、腎線維化マウスモデルの腎臓から、コラーゲン産生ミエロイド系細胞を単離精製し、WKYラットに腸骨免疫法で細胞免疫を行い、コラーゲン産生ミエロイド系細胞に対する抗体の作製を行う。細胞融合後に得られたハイブリドーマの培養上清を用いて、フローサイトメトリーによりコラーゲン産生ミエロイド系細胞に反応性を示すハイブリドーマのスクリーニングを行った。得られた抗体については、腎線維化マウスへの投与によって予防効果を精査した。

4. 研究成果

腎線維化におけるコラーゲン産生ミエロイド系細胞の誘導に関わる分子群の同定を目指した取り組みから、組織損傷時に線維芽細胞から放出される成分 (damage-associated molecular patterns: DAMPs) が関与することを見出した。線維芽細胞由来の DAMPs と線維化関連サイトカインの両方のシグナルを受けることで、骨髄から炎症部位の誘引された単球の形質が変化することを見出した。無菌マウスを用いた腎線維化解析からはコラーゲン産生ミエロイド細胞の誘導が見られなかったことから、菌体成分が関与しないことが明らかとなった。

コラーゲン産生ミエロイド系細胞の除去方法の確立のため、新たなコンディショナルマウスを導入し、ジフテリア毒素によって当該細胞を除去するマウスモデルを構築した。腎線維化の誘導過程でジフテリア毒素を投与しコラーゲン産生ミエロイド細胞数を減少させたマウスでは、活性化線維芽細胞数も減少することが示された。さらに、コラーゲン産生ミエロイド細胞が線維芽細胞様に形質転換させることが *in vivo* 解析から新たに見出された。

また、新たに作製した標的抗体を用いたスクリーニングから線維化を抑制する抗体が得られ、実際に活性化線維芽細胞やコラーゲン産生ミエロイド系細胞を標的とするものであることを見出している。

以上のことから、我々が新たに見出した線維化を導くコラーゲンを選択的に産生するミエロイド系細胞は、「病原性線維芽細胞」との相互作用によって線維芽細胞様に自身の形質を転換させながら線維化を促進することが明らかになった。この腎線維芽細胞特異的な機能は、腎線維化促進機序の一つの経路であると考えられ、腎線維芽細胞の特殊性をさらに理解し、この経路を効果的に遮断することで、腎線維化を抑える新規治療法の確立につながると期待できる。よって、コラーゲン産生ミエロイド細胞 病原性線維芽細胞を起点とした新規治療につながる成果が得られた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

国際誌

1. Kurashima Y, Tokuhara D, Kamioka M, Inagaki Y, Kiyono U. "Intrinsic control of surface immune and epithelial homeostasis by tissue-resident gut stromal cells", doi: 10.3389/fimmu.2019.01281, *Frontiers in immunology*, 査読有, 2019 in press
2. Hashizume-Takizawa T, Shibata N, Kurashima Y, Kiyono H, Kurita-Ochiai T, Fujihashi K, Distinct Roles for Peyer's Patch B Cells for Induction of Antigen-specific IgA Antibody Responses in Mice Administered Oral Recombinant, *International Immunology*, 査読有, 2019, doi: 10.1093/intimm/dxz029
3. Tokuhara D, Kurashima Y, Kamioka M, Nakayama T, Ernst P, Kiyono H, A comprehensive understanding of the gut mucosal immune system in allergic inflammation, *Allergol Int*, 査読有, 68(1), 2019, 17-25 doi:10.1016/j.alit.2018.09.004
4. Inami A, Kiyono H, Kurashima Y, ATP as a Pathophysiologic Mediator of Bacteria-Host Crosstalk in the Gastrointestinal Tract, *International journal of molecular sciences*, 査読有, 19(8), 2018, doi:10.3390/ijms19082371
5. Takemura N, Kurashima Y, Mori Y, Okada K, Ogino T, Osawa H, Matsuno H, Aayam L, Kaneto S, Park EJ, Sato S, Matsunaga K, Tamura Y, Ouchi Y, Kumagai Y, Kobayashi D, Suzuki Y, Yoshioka Y, Nishimura J, Mori M, Ishii KJ, Rothenberg ME, Kiyono H, Akira S, Uematsu S, Eosinophil depletion suppresses radiation-induced small intestinal fibrosis, *Science translational medicine*, 査読有, 10(429), 2018, doi:10.1126/scitranslmed.aan0333
6. Takahashi Y, Sato S, Kurashima Y, Yamamoto T, Kurokawa S, Yuki Y, Takemura N, Uematsu S, Lai CY, Otsu M, Matsuno H, Osawa H, Mizushima T, Nishimura J, Hayashi M, Yamaguchi T, Kiyono H, A Refined Culture System for Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Intestinal Epithelial Organoids, *Stem cell reports*, 査読有, 10(1), 2018, 314-328 doi: 10.1016/j.stemcr.2017.11.004
7. Kurashima Y, Yamamoto D, Nelson S, Uematsu S, Ernst PB, Nakayama T, Kiyono H,

Mucosal Mesenchymal Cells: Secondary Barrier and Peripheral Educator for the Gut Immune System, *Frontiers in immunology*, 査読有, 8, 2017, doi: 10.3389/fimmu.2017.01787

8. Takahashi Y, Sato S, Kurashima Y, Lai CY, Otsu M, Hayashi M, Yamaguchi T, Kiyono H, Reciprocal Inflammatory Signaling Between Intestinal Epithelial Cells and Adipocytes in the Absence of Immune Cells, *EBioMedicine*, 査読有, 23, 2017, 34-45 doi: 10.1016/j.ebiom.2017.07.027

国内誌

1. 名切 真里奈, 清野 宏, 倉島 洋介, 腸管粘膜免疫・保護の中軸を担う粘膜間葉系細胞, *リンパ学*, 査読無, 41(2), 2018, 96-101
2. 山本 智久, 清野 宏, 倉島 洋介, in vitro 腸管マルチエコシステム解析から見えてきた腸内細菌-上皮-免疫クロストークの多様性, *腎臓内科・泌尿器科*, 査読無, 7(6), 2018, 613-618
3. 倉島 洋介, 山本 大樹, 清野 宏, 粘膜間葉系細胞による免疫末梢教育と上皮細胞分化制御, *実験医学*, 査読無, 35(7), 2017, 1110-1116

〔学会発表〕(計 19 件)

・一般発表

国内 (7 件)

1. Kurashima Y., Takasato Y., Kiuchi M., Hirahara K., Murasaki S., Kunisawa J., Kubo M., Uematsu S., Nakayama T., and Kiyono H. 「Orally-desensitized mast cells acquired regulatory characteristics for the control of food allergy」『第 47 回日本免疫学会学術集会』2018 年
2. Kurashima Y., Murasaki S., Morimoto M., Shimizu K., and Kiyono H. 「Mesenchymal-myeloid cell interactions in microenvironment for novel fibrogenic machinery in tissue fibrosis」『千葉大学 グローバルプロミネント研究基幹 シンポジウム (第 3 回)』2018 年
3. Kurashima Y. 「Mesenchymal cells: Secondary barrier and peripheral educator for the immune system」『第 20 回千葉大学デュアトラックセミナー』(千葉) 2018 年 11 月(Oral)
4. 倉島洋介, 松村成一, 村崎さゆり, 清野宏. 「間葉系細胞による免疫恒常性維持機構」『第 8 回オルソオルガノジェネシス検討会』2018 年
5. Kurashima Y., and Kiyono H. 「Mesenchymal-myeloid cell interactions in renal microenvironment for pathological fibrogenic machinery in kidney fibrosis」『第 46 回日本免疫学会学術集会』2017 年
6. Kogure Y., Kurashima Y., Kunisawa J., Arase H., and Kiyono H. 「Mesenchymal-mediated skin-specific regulatory system for the control of tissue resident mast cells」『第 46 回日本免疫学会学術集会』2017 年
7. Joo S., Suwanto A., Sato A., Sato S., Ouchida R., Yuki Y., Kurashima Y., Kawaguchi Y., Kiyono H. 「Critical role of the CCR5-CCL5 cascade for the preferential migration of HSV-2-specific effector cells to the vaginal mucosa upon intranasal immunization」『第 46 回日本免疫学会学術集会』2017 年

・特別講演・招待講演

国内 (9 件)

1. 倉島 洋介. 「腸管粘膜・皮膚などにおける上皮 - 間葉 - 神経系ネットワークによる末梢免疫教育機構」アステラス製薬株式会社 2018 年
2. Kurashima Y. 「Purinergic regulation of mast cells for symbiosis and elimination」『第 55 回日本消化器免疫学会』2018 年
3. Kurashima Y. 「Bringing mast cells over to our side to overcome allergy」『第 67 回日本アレルギー学会学術大会 シンポジウム 18』2018 年
4. 倉島 洋介. 「間葉系細胞による免疫末梢教育 Mesenchymal-myeloid cell interactions in renal microenvironment for novel fibrogenic machinery in kidney fibrosis」『第 42 回日本リンパ学会』2018 年
5. Kurashima Y. 「Mesenchymal cell-mediated local inflammatory loop in intestinal inflammation」『2nd Korea-Japan Joint Meeting on Mucosal Immunology 2018』2018 年
6. 倉島洋介. 「共生と排除を司る粘膜マスト細胞の研究」『第 22 回腸内細菌学会 (奨励賞受賞講演)』2018 年
7. Kurashima Y. 「The novel roles of mast cells as a form of regulatory cells in the anti-allergic therapy」『千葉大学-UCSD 共同シンポジウム “The 2nd cMAV Symposium Tokyo” Pioneering Sciences in Mucosal Immunology, Allergy and Vaccine Leading to the Creation of Novel Prevention and Treatment for Immunologic and Infectious Diseases』2018 年
8. 倉島 洋介. 「腸管粘膜免疫研究からみえてきた「多様性・派生」」『第 1 回最先端粘膜免疫

学シンポジウム』2017年

9. 倉島 洋介. 「炎症性腸疾患における細胞外 ATP の働き」『第 61 回日本薬学会関東支部大会』2017年

国外 (3件)

1. Kurashima Y. 「Orally-desensitized mast cells acquired regulatory characteristics for the control of allergy」『3rd Annual Symposium for the Center for Mucosal Immunology, Allergy and Vaccine Development』2019年
2. Kurashima Y. 「Mesenchymal cells as a peripheral educator for immunity and inflammation」『1st Gut Bio Society Workshop』2018年
3. Kurashima Y. 「Contribution of immune-mesenchymal interactions in the local intestinal inflammation」『Asan Medical Center Seminar』2018年

〔図書〕(計1件)

1. 籠谷 領二, 倉島 洋介, 清野 宏. 免疫生物学 (原書第9版), 南江堂, 2019年 p493-531

〔産業財産権〕

出願状況 (計0件)

〔その他〕

1. Kurashima Y. Establishing a novel and innovation treatment for allergic and inflammatory disease in mucosa, Impact, 2018(10), 2018, 63-65 doi: 10.21820/23987073.2018.10.63

6. 研究組織

分担者および協力者なし

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。