

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08175

研究課題名(和文)肺線維症とマイクロビオームの関連に関する研究

研究課題名(英文)Evaluating the role of the lung microbiome in pulmonary fibrosis

研究代表者

中原 博紀 (NAKAHARA, Hiroki)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30757092

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではヒトTGF- β 1の全長cDNAをマウスの肺のみに発現させたTransgenic mouse (TGマウス)を用いて肺線維症モデルを作製し、肺の線維化とmicrobiomeの関係を検討した。線維化を有するTGマウスの肺組織は高塩環境となっており、線維性肺組織を高塩環境で培養するとブドウ球菌属の細菌の増殖が確認された。この菌の上清で肺胞上皮細胞を培養するとアポトーシスが誘導され、アポトーシス誘導因子はブドウ球菌から分泌されるペプチドであると判明した。以上の結果より、肺組織で増殖した細菌叢がアポトーシスを誘導するペプチドを分泌していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

呼吸器疾患に関する細菌叢の検討は報告数も少なく、研究は始まったばかりである。呼吸器疾患の中で特発性肺線維症は悪性腫瘍と比較しても予後不良な難治性肺疾患である。本研究は肺の線維化の発症および進展を含めた病態への細菌叢の役割を明らかにするものであり、その機構が明らかになれば臨床応用にも期待がもてる画期的な研究である。今回の研究で同定されたブドウ球菌から分泌されるペプチドは肺線維症におけるアポトーシスに関与している可能性があり、新たなバイオマーカーの開発や治療標的となりうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In the present investigation we developed a genetically engineered mouse model that expresses specifically in the lung the full-length of the human TGF- β 1 gene. The mouse model spontaneously develops chronic pulmonary fibrosis. We evaluated the role of the lung microbiome in pulmonary fibrosis using this mouse model. We discovered that the fibrotic lung tissue has high concentration of salt and that bacteria of the Staphylococcus genera that grow when the fibrotic lung tissue is cultured under hypersaline conditions secrete a pro-apoptotic peptide. This peptide induces apoptosis of alveolar epithelial cell lines in vitro and promotes the death of alveolar epithelial cells in the transgenic mouse of pulmonary fibrosis. Overall, the results of this investigation showed that a bacterium from the lung microbiome secretes a deadly peptide that causes apoptosis of lung alveolar cells. This novel peptide may be a good target for the development of a novel therapy for pulmonary fibrosis.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：IPF fibrosis microbiome

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

人体には、一過性に体に侵入し病気を引き起こす病原菌とは別に、常在している多くの細菌が存在し、その細菌叢の変化によって病気が引き起こされたり、病気から体を防御することがわかってきた。腸内細菌叢と炎症性疾患や大腸癌との関連など腸疾患は研究が進んでいるが、呼吸器疾患と細菌叢に関する検討は報告が少ない。

特発性肺線維症は悪性腫瘍と比較しても予後不良な難治性肺疾患であり、治療薬として抗線維化薬が用いられるが、十分な治療効果は得られず、新たな治療法の開発が急務である。肺線維症では肺におけるブドウ球菌や連鎖球菌が予後に関係するとの報告がある。しかしながら、肺線維症に関する microbiome の報告は少なく、その病態における関連性は不明である。そこで本研究では肺の線維化の発症および進展を含めた病態への細菌叢の関与を検討する。

2. 研究の目的

本研究の目的は肺の線維化と microbiome の関係を検討するものである。以前の研究において、ヒト TGF- β の全長 cDNA をマウスの肺のみに発現させた Transgenic mouse を用いた自然発症肺線維症マウスモデルの下気道の細菌叢が野生型と異なっていたことから、今回、この TG マウスを用いて細菌叢の肺線維症の病態形成への関与について検討を行う。

3. 研究の方法

ヒト TGF- β の全長 cDNA を C57/BL6J マウスの肺のみに発現させた Transgenic mouse (TG マウス) を用いて肺線維症モデルを作製し、マイクロ CT 撮影や血液、BALF、肺組織を採取する。炎症性サイトカインの測定、肺線維症の評価、細菌叢の解析などを行う。細菌叢のメタゲノム解析は NGS を用い 16SrRNA 解析を行い、oligo-typing によって菌種の同定を試みる。次に同定された細菌叢の存在下で肺胞上皮細胞を培養し、コントロールマウスと比較し検討を行う。有意な所見があれば、病態の再現性についても検討する。

4. 研究成果

- (1) 肺線維症モデル：生後 10 週から肺線維症を発症する。
- (2) 線維化した肺組織中の Na 濃度：肺線維症を有する TG マウスの肺線維組織中の Na 含有量は、野生型および肺線維症を認めない TG マウスと比較して有意に高かった(図 1)。
- (3) 線維化した肺組織で増殖した細菌：TG マウスの肺組織を 8%NaCl を含む培地で培養するとブドウ球菌属と同様の菌形態が確認された。この細菌は *Staphylococcus spp.* と *Staphylococcus nepalensis* と非常に高い相同性を認めた(図 2)。
- (4) 菌の培養上清は肺胞上皮細胞のアポトーシスを誘導：A549 肺胞上皮細胞を *Staphylococcus spp.* と *Staphylococcus nepalensis* の上清で培養するとアポトーシスが誘導された(図 3)。
- (5) アポトーシスは培地の塩分濃度に依存：*Staphylococcus spp.* と *Staphylococcus nepalensis* を 0%、2%または 8%NaCl を含む培地で培養し、アポトーシスを評価すると、アポトーシス活性は培地の塩濃度に大きく依存した(図 4)。
- (6) アポトーシス誘導因子は熱安定性の低分子量蛋白質：*Staphylococcus spp.* と *Staphylococcus nepalensis* の培養上清のアポトーシス活性は加熱後も安定していた。培養上清の蛋白質のうち低分子量蛋白質(<10 kDa)は高分子量蛋白質(>10 kDa)と比較し有意なアポトーシス活性を有していた(図 5)。

- (7) プロアポトーシスペプチドの同定: *Staphylococcus spp.*と *Staphylococcus nepalensis* の培養上清を高性能液体クロマトグラフィー(HPLC)、ゲル電気泳動すると、2kDa の見かけの分子量を有するペプチドであった。ゲノム配列データに基づき、1.94kDa の分子質量に対応する 19 個のアミノ酸残基(IVMPESSGNPNAVNPAGYR)のペプチドを同定し、「コリシン」と名付けた。
- (8) TG マウスの肺組織中のコリシン濃度: 肺線維症のある TG マウスでは、線維化のない WT および TG マウスと比較して肺組織中のコリシン濃度が高値であった(図6)。
- (9) コリシンは TG マウスの肺線維症を悪化させる: TG マウスにコリシンを経気道投与すると、炎症細胞、炎症性サイトカイン、ケモカイン、コラーゲンの増加、線維化の悪化、肺胞上皮細胞のアポトーシスが誘導された(図7)。

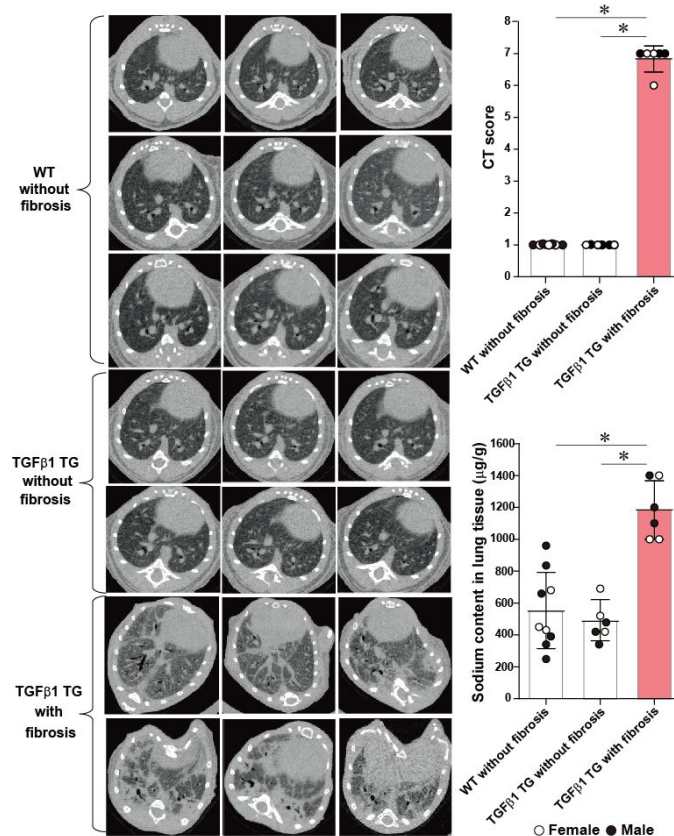


図1 線維化した肺組織中の Na 濃度

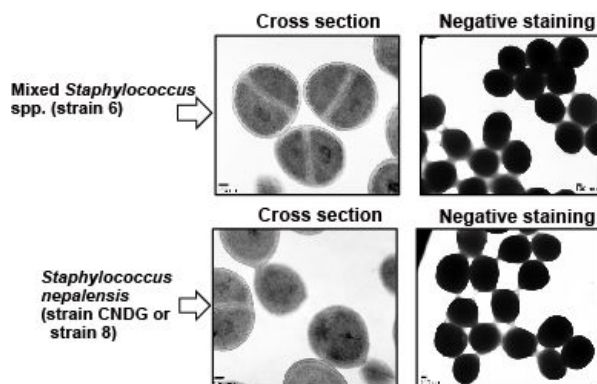


図2 線維化した肺組織で増殖した細菌

A549 alveolar epithelial cells

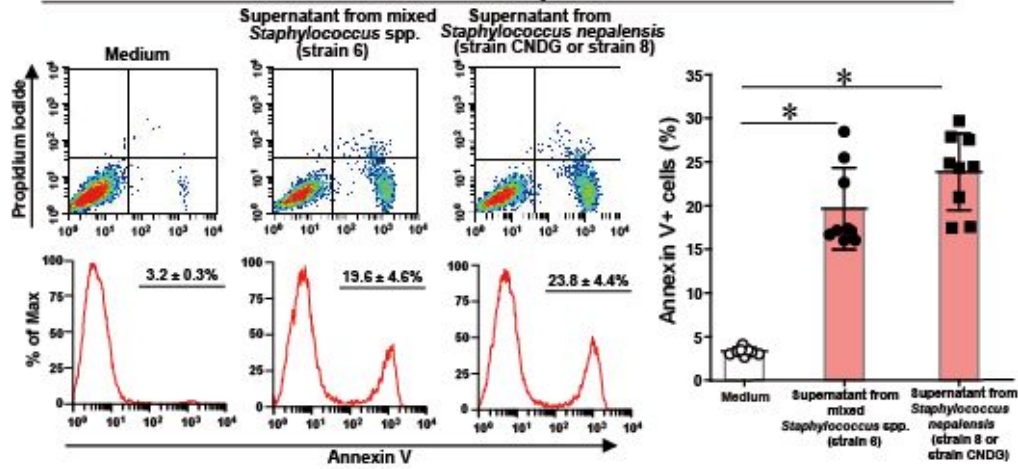


図3 菌の培養上清は肺胞上皮細胞のアポトーシスを誘導

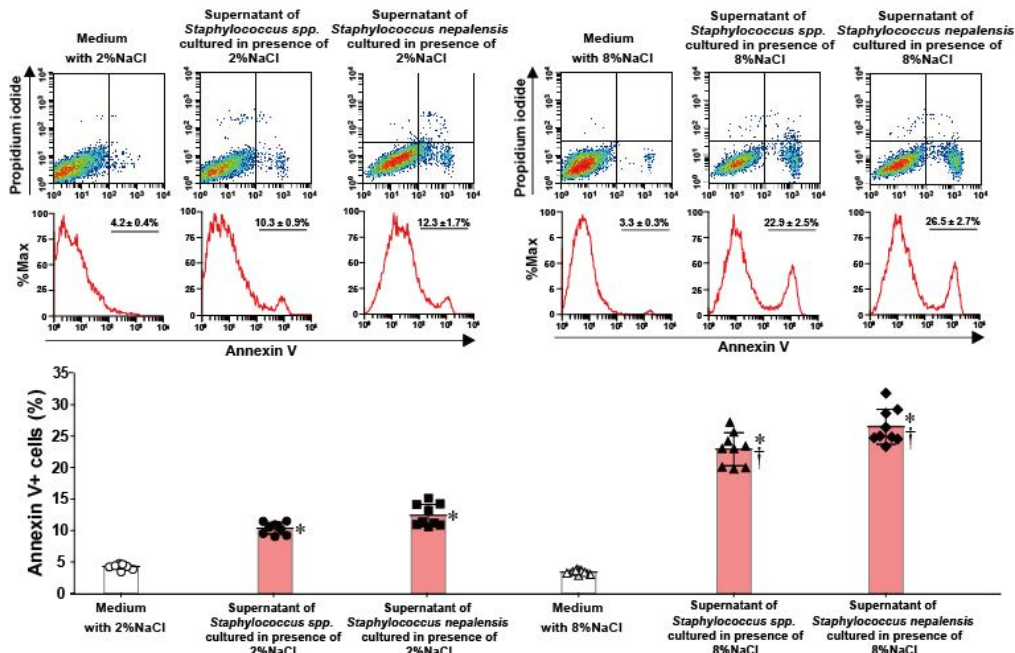
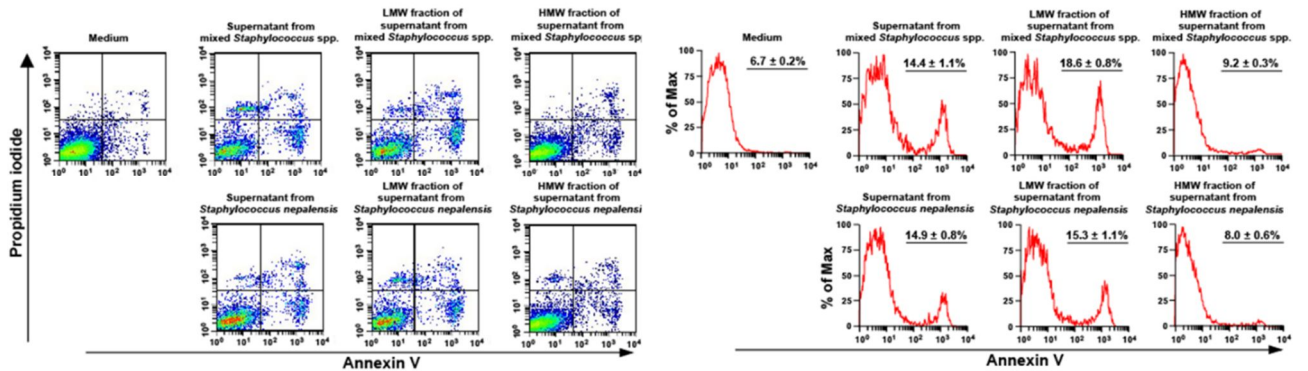


図4 アポトーシスは培地の塩分濃度に依存



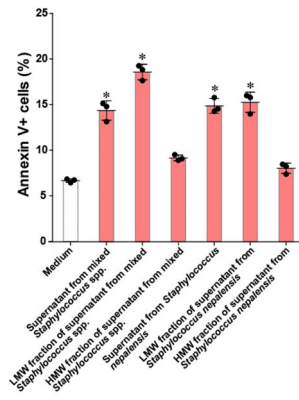


図5 アポトーシス誘導因子は低分子蛋白質

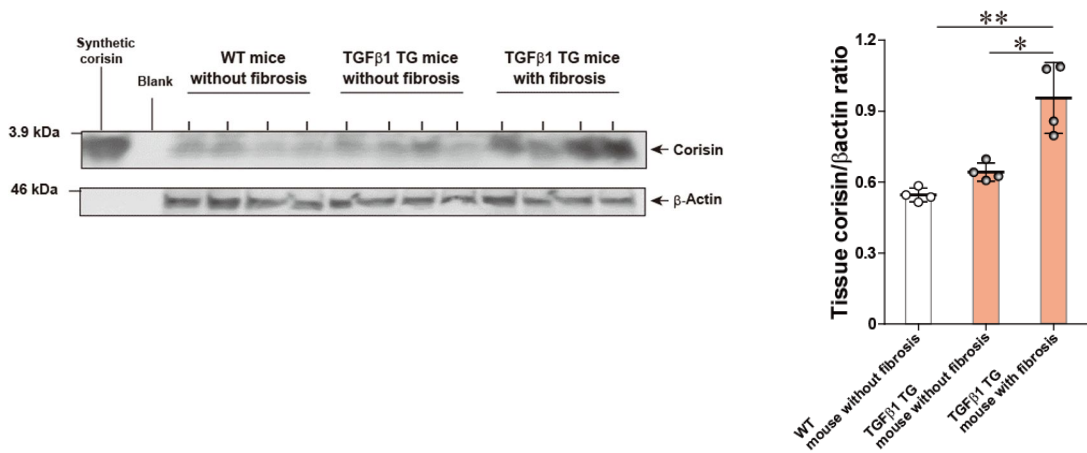


図6 TG マウスの肺組織中のコリシン濃度

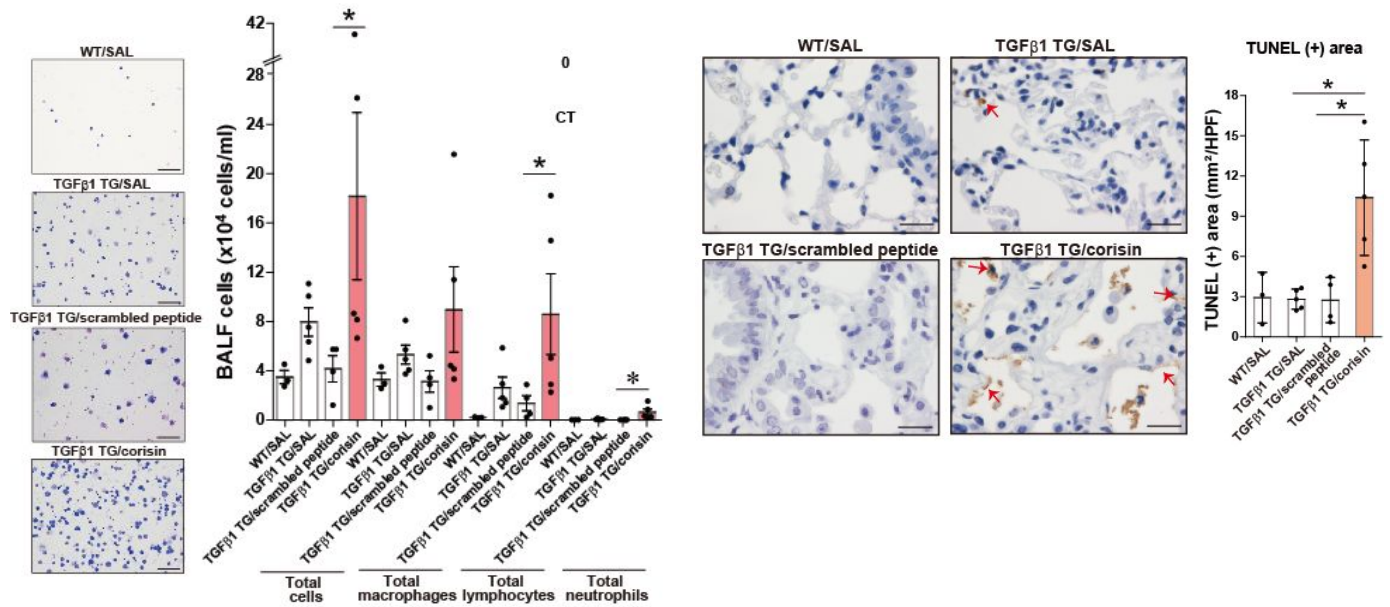


図7 コリシンはTG マウスの肺線維症を悪化させる

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Okano Tomohito, Kobayashi Tetsu, Yasuma Taro, D' Alessandro-Gabazza Corina N., Toda Masaaki, Fujimoto Hajime, Nakahara Hiroki, Okano Yuko, Takeshita Atsuro, Nishihama Kota, Saiki Haruko, Tomaru Atsushi, Fridman D' Alessandro Valeria, Ishida Satoru, Sugimoto Hiromi, Takei Yoshiyuki, Gabazza Esteban C.	4. 巻 11
2. 論文標題 Low-Dose of Intrapulmonary Pirfenidone Improves Human Transforming Growth Factor 1-Driven Lung Fibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	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) 10.3389/fphar.2020.593620	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 Fujiwara Takumi, Kobayashi Tetsu, Yasuma Taro, D' Alessandro-Gabazza Corina N., Toda Masaaki, Fujimoto Hajime, Fujiwara Kentaro, Takeshita Atsuro, Nishihama Kota, Okano Tomohito, D' Alessandro Valeria Fridman, Takei Yoshiyuki, Hataji Osamu, Gabazza Esteban C	4. 巻 12
2. 論文標題 De Novo T790M Mutation in an L858R Epidermal Growth Factor Receptor Mutant-Associated Lung Adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 3074 ~ 3074
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers12103074	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 Kobayashi Tetsu, Hataji Osamu, Fujimoto Hajime, D' Alessandro-Gabazza Corina, Yasuma Taro, Gabazza Esteban C.	4. 巻 201
2. 論文標題 Too Premature to Deny the Potential of Thrombomodulin Alfa in Idiopathic Pulmonary Fibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine	6. 最初と最後の頁 1449 ~ 1450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1164/rccm.202002-0271LE	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 Nishii Y, Yasuma T, Ito K, Suzuki Y, Watanabe F, Kobayashi T, Nishihama K, D'Alessandro-Gabazza CN, Fujimoto H, Gabazza EC, Asano F, Taguchi O, Hataji O.	4. 巻 20
2. 論文標題 Factors leading to failure to diagnose pulmonary malignant tumors using endobronchial ultrasound with guide sheath within the target lesion.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respir Res.	6. 最初と最後の頁 207
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12931-019-1178-8	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 Takahashi Y, Kobayashi T, D'Alessandro-Gabazza CN, Toda M, Fujiwara K, Okano T, Fujimoto H, Asayama K, Takeshita A, Yasuma T, Nishihama K, Inoue R, Qin L, Takei Y, Taguchi O, Gabazza EC.	4. 巻 10
2. 論文標題 Protective Role of Matrix Metalloproteinase-2 in Allergic Bronchial Asthma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Immunol.	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) 10.3389/fimmu.2019.01795	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 Baffour Tonto P, Yasuma T, Kobayashi T, D'Alessandro-Gabazza CN, Toda M, Saiki H, Fujimoto H, Asayama K, Fujiwara K, Nishihama K, Okano T, Takeshita A, Gabazza EC.	4. 巻 20
2. 論文標題 Protein S is Protective in Acute Lung Injury by Inhibiting Cell Apoptosis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Mol Sci.	6. 最初と最後の頁 1082
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms.20051082	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 Kuwabara Yu, Kobayashi Tetsu, D'Alessandro-Gabazza Corina N., Toda Masaaki, Yasuma Taro, Nishihama Kota, Takeshita Atsuro, Fujimoto Hajime, Nagao Mizuho, Fujisawa Takao, Gabazza Esteban C.	4. 巻 9
2. 論文標題 Role of Matrix Metalloproteinase-2 in Eosinophil-Mediated Airway Remodeling	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	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) 10.3389/fimmu.2018.02163	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 D' Alessandro-Gabazza Corina N., Méendez-García Celia, Hataji Osamu, Westergaard Sara, Watanabe Fumiaki, Yasuma Taro, Toda Masaaki, Fujimoto Hajime, Nishihama Kota, Fujiwara Kentaro, Taguchi Osamu, Kobayashi Tetsu, Mackie Roderick I., Cann Isaac, Gabazza Esteban C.	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of Halophilic Microbes in Lung Fibrotic Tissue by Oligotyping	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	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) 10.3389/fmicb.2018.01892	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 D' Alessandro-Gabazza Corina N., Kobayashi Tetsu, Gabazza Esteban C.	4. 巻 198
2. 論文標題 Risks of Treating Idiopathic Pulmonary Fibrosis with a TAM Receptor Kinase Inhibitor	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine	6. 最初と最後の頁 970 ~ 971
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1164/rccm.201805-0871LE	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 D' Alessandro-Gabazza Corina N., Kobayashi Tetsu, Fujimoto Hajime, Okano Tomohito, Tomaru Atsushi, Yau Peter M., Wang Shujie, Nosaka Tetsuya, Kataoka Kensuke, Kondoh Yasuhiro, Wu Jing, Kawagishi Hirokazu, Mackie Roderick I., Cann Isaac, Gabazza Esteban C.	4. 巻 11
2. 論文標題 A Staphylococcus pro-apoptotic peptide induces acute exacerbation of pulmonary fibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	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) 10.1038/s41467-020-15344-3	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 -

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 中原博紀
2. 発表標題 TGF- β 1過剰発現マウスを用いた肺線維化と発癌に関する検討
3. 学会等名 日本呼吸器学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中原博紀
2. 発表標題 肺線維化マウスを用いた肺癌発症の検討
3. 学会等名 日本肺癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小林哲
2. 発表標題 呼吸器疾患とmicrobiome
3. 学会等名 日本呼吸器学会
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
研究分担者	小林 哲 (Kobayashi Tetsu) (20437114)	三重大学・医学部附属病院・准教授 (14101)	
研究分担者	G a b a z z a E s t e b a n (Gabazza Esteban) (00293770)	三重大学・医学系研究科・教授 (14101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------