

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15918

研究課題名(和文) マウス肺移植モデルを用いた上葉優位型肺線維症の診断と治療法の開発

研究課題名(英文) Developments of effective diagnosis and therapeutic methods for pleuroparenchymal fibroelastosis using lung transplantation model

研究代表者

漆山 博和 (URUSHIYAMA, Hirokazu)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20725303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：上葉優位型肺線維症(PPFE)は、肺活量の急速な減少を来す予後不良な肺線維症であるが、有効な治療法は存在せず治療法の開発が求められている。

本研究はminor alloantigenミスマッチ肺移植モデルとPPFE症例を用い、RNA-seqやタンパク発現解析を実施した。結果、両者は組織学的に類似するも、遺伝子やタンパクの発現に相違があり、PPFEの治療薬として抗線維化薬が有望であると考えた。

得られた結果をもとに、1-アドレナリン受容体拮抗薬の肺線維症での治療効果を検証し、論文にて発表した。本研究で得られた発現変動遺伝子や沈着タンパク質を標的とした新規治療法の開発を今後も進めていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

上葉優位型肺線維症(PPFE)の原因として特発性のほか、過敏性肺臓炎、膠原病、粉塵吸入、抗癌剤投与や放射線照射、造血幹細胞移植など多岐に及ぶため、炎症に続発する線維化か、炎症を伴わない持続する肺傷害によって生じる線維化であるのか不明であった。本研究ではPPFEと類似した線維化を呈するminor alloantigenミスマッチ肺移植モデルが、PPFEの動物モデルとして妥当か検証した。結果として、両者は発現する遺伝子やタンパクに相違があり疾患モデルとしては妥当ではなかったが、解析結果からPPFEにおいて抗線維化薬が有望であると推察される結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Pleuroparenchymal Fibroelastosis (PPFE) is a poor prognosis pulmonary fibrosis that causes rapid decrease in lung capacity.

In this study, we performed RNA-seq and protein expression analysis using a minor alloantigen mismatch lung transplantation model and PPFE cases. The results showed that although the two models were histologically similar, there were differences in mRNA and protein expression, suggesting that anti-fibrotic drugs would be a promising treatment for PPFE.

Based on these results, the therapeutic efficacy of 1-adrenoceptor antagonists in pulmonary fibrosis was examined and published in a paper. We will continue to develop novel therapies targeting the differentially expressed genes and deposition proteins obtained in this study.

研究分野：間質性肺炎

キーワード：慢性肺線維症モデル 上葉優位型肺線維症 肺移植動物モデル 線維芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

上葉優位型肺線維症は、厚い胸膜肥厚と胸膜直下肺泡領域に帯状で密な線維化病変の形成を病理学的特徴とし、特発性間質性肺炎の分類に関する 2013 年の国際共同声明においても、Pleuroparenchymal Fibroelastosis (PPFE) として新規に提唱された疾患概念である。

上葉優位型肺線維症においては、肺上葉の収縮による肺活量の急速な減少を来し、難治性気胸を合併することや、急性増悪を認めることなど、予後は特発性肺線維症に匹敵し不良だが、有効な治療法は現時点で存在せず、早期診断・治療方法の開発が早急に求められている。

上葉優位型肺線維症は両側肺上葉の進行性収縮と肺門の吊り上がり、胸郭の扁平化と呼吸機能検査での残気率の上昇、乾性咳嗽と進行性の労作時呼吸困難および体重減少といった、他疾患では認められない特徴的な臨床画像身体所見を呈する。しかしその原因としては、特発性(原因不明)なもののほか、過敏性肺臓炎、膠原病、アスベストや超硬合金、アルミニウムなどの粉塵吸入、抗癌剤投与や放射線照射、造血幹細胞移植後など非常に多岐に及んでいる[1]。

このような背景から、上葉優位型肺線維症の根本的な病態が、炎症に続発して起こる肺の線維化なのか、炎症を伴わない持続的な肺傷害によって生じる肺の線維化であるのかも不明である。したがって、その治療もステロイドや免疫抑制剤による炎症抑制を主体とすべきか、特発性肺線維症に準じて抗線維化薬を主体とすればよいのか分かっていない状況である。

上葉優位型肺線維症の病態生理の解明、治療開発においての問題点は、適切と思われる動物モデルが確立していないことも挙げられる。実験的肺線維症として最も広く利用されるプレオマイシン肺線維症モデルは、急性肺傷害とそれに引き続く肺線維化を示し、上葉優位型肺線維症のような胸膜直下に密な帯状線維化を形成しない。動物モデルにおいて胸膜肥厚と胸膜直下の帯状線維化を呈するモデルは minor alloantigen ミスマッチ肺移植モデルのみと考えられる。

実際のヒト肺移植後の慢性肺拒絶においても、閉塞性細気管支炎の他に拘束性肺機能不全の発症が報告されるようになり、呼吸機能や画像所見、扁平胸郭など上葉優位型肺線維症と同様の所見を呈する。以上より、上葉優位型肺線維症と肺移植後拘束性肺機能不全には共通する肺線維化機序が存在すると推測された。

2. 研究の目的

minor alloantigen ミスマッチ肺移植モデルや、上葉優位型肺線維症患者の肺移植時摘出肺を用いた網羅的 RNA 発現解析やタンパク発現解析を行い、治療標的となるサイトカイン・ケモカインなどを同定し、上葉優位型肺線維症の新規治療法の開発を目的とする。また上葉優位型肺線維症の疾患動物モデルとしての minor alloantigen ミスマッチ肺移植モデルの妥当性を検証する。

3. 研究の方法

(1) minor alloantigen ミスマッチ肺移植モデルの作成

LEW 系ラットの左肺を摘出し、BN 系ラットの左肺を移植することで minor alloantigen ミスマッチ肺移植モデル(同所性左肺移植モデル)を作成する。移植後 1 週間シクロスポリン 25mg/kg にて週 4 回投与した後、その後シクロスポリンの投与を行わない肺移植モデル(急性拒絶モデル)と、2 週間シクロスポリンを休薬し、その後 25mg/kg にて週 2 回投与を行う肺移植モデル(拒絶/治療モデル)を作成し、形成される胸膜直下帯状線維化の程度を組織学的に評価する。また帯状線維化領域をマクロダイセクションにて切り出し、RNA シーケンスを実施し mRNA 発現の網羅的解析を行う。

(2) 上葉優位型肺線維症患者の肺移植時摘出肺を用いた、胸膜直下帯状線維化領域での RNA・タンパク発現解析

当院呼吸器外科にて実施された肺移植のうち、上葉優位型肺線維症患者から摘出されたレシピエント肺の一部を組織学的に評価し、胸膜直下帯状線維化領域に発現するサイトカイン・タンパク質を免疫組織化学にて評価する。マクロダイセクションにて帯状線維化領域を切り出し、RNA シーケンスを行い mRNA 発現の網羅的解析を行う。

(3) 肺線維症に対する新規治療戦略の探索

minor alloantigen ミスマッチ肺移植モデルや上葉優位型肺線維症患者の肺移植時摘出肺を用いた解析をもとに新規治療戦略を策定し、プレオマイシン肺線維症モデルを用い、その有効性を検証する。

4. 研究成果

(1)(2) minor alloantigen ミスマッチ肺移植モデルおよび上葉優位型肺線維症患者の肺移植時摘出肺を用いた RNA・タンパク発現解析

肺移植モデルは急性拒絶モデルおよび拒絶/治療モデルともに、図 1 のように胸膜直下帯状線維化を呈した。マクロダイセクションにより胸膜直下帯状線維化領域を主体に切り出しを行い、

RNA-seq により発現する mRNA を網羅的に解析した(表 1、2：いずれも移植していない右肺をコントロールとした)。

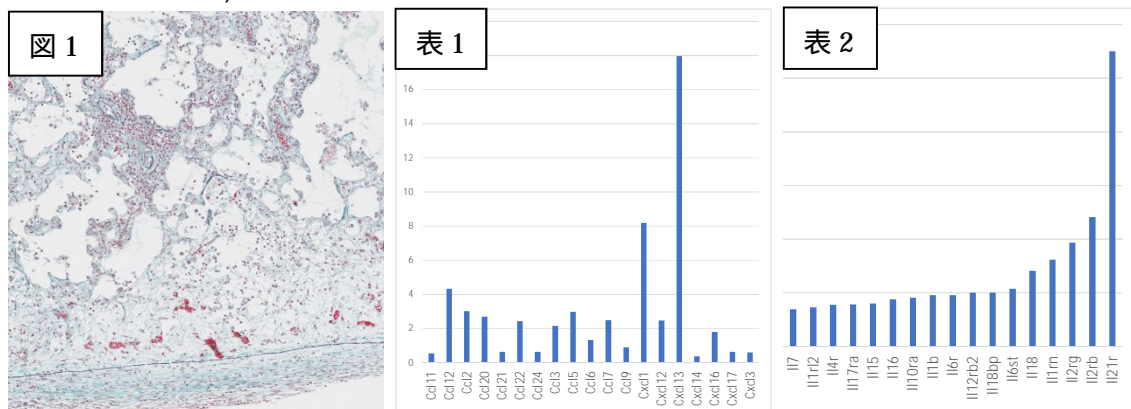


図 1：胸膜直下肺泡領域に帯状線維化の形成を認める。(弾性線維染色：EMG)

表 1：肺移植モデルにおける各ケモカインの RNA 発現解析

表 2：肺移植モデルにおける各インターロイキンの RNA 発現解析 (高発現量の物の抜粋)

これまでの報告では肺移植時の拒絶反応の中心的な役割を果たすサイトカインとして IL-17 が注目されてきたが[2]、今回の研究からは IL-21 や CXCL13 が顕著に発現上昇していた。

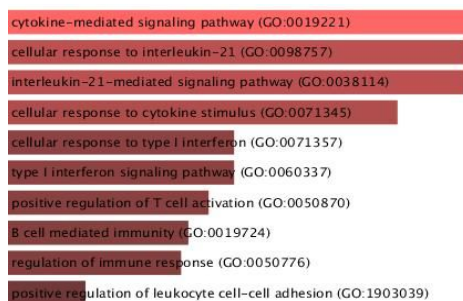


表 3

Gene ontology 解析においても、IL-21 を中心としたサイトカインに対する反応遺伝子群の発現上昇が主体であり、PDGF や細胞外基質産生など、肺線維症で見られる遺伝子群の上昇は上位ではないことが確認された(表 3)。

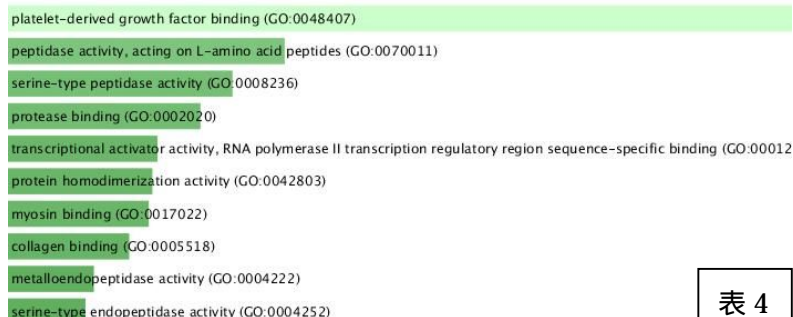


表 4

次に、上葉優位型肺線維症患者 2 例の肺移植時摘出肺を用い、RNA-seq を用いて発現 mRNA を網羅的に解析した。同一患者で線維化の乏しい肺領域をコントロールとして 2 倍以上発現している遺伝子を抽出し、2 症例で共通している遺伝子について gene

ontology 解析を行った(表 4)。その結果、上葉優位型肺線維症の肺組織では PDGF や産生・沈着するコラーゲンに対する反応遺伝子群の発現上昇が上位で、肺移植モデルにおいて優位な炎症性サイトカインに関連する遺伝子発現は乏しかった。

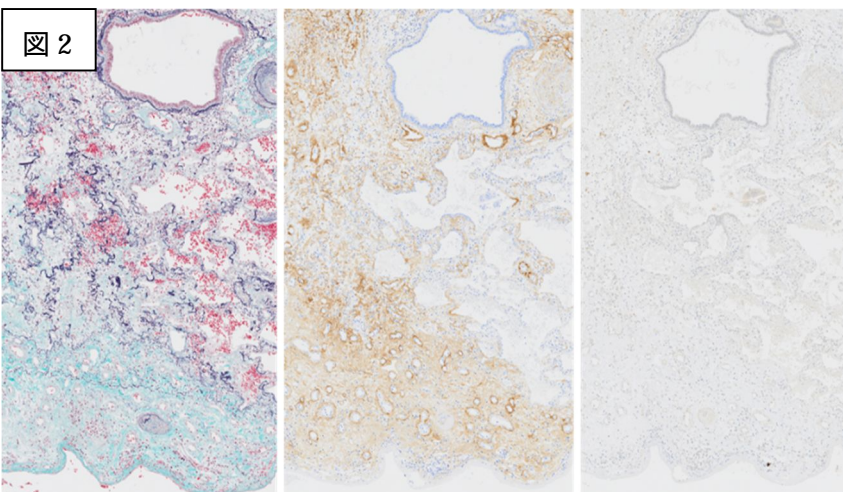


図 2

さらに発現上位の遺伝子群の中に、特発性肺線維症 (IPF) において発現が上昇しており、治療標的やバイオマーカーとしての役割が期待されているタンパク質が見出し、免疫染色を行ったところ、胸膜直下肺泡領域の帯状線維化領域に強く発現していることを確認した(図 2 中)。

一方、肺移植モデルで強く発現していると考えられた CXCL13 は血管壁にわずかに発現を認めるものの、帯状線維化領域ではほとんど発現を認めなかった(図2 右)。

以上の結果より、minor alloantigen ミスマッチ肺移植モデルと上葉優位型肺線維症は形態学的に類似しているが、肺移植モデルでは炎症性サイトカインの発現が亢進し線維化関連の増殖因子は発現の上位ではなく、一方、上葉優位型肺線維症では線維化関連の増殖因子の発現が亢進し炎症性サイトカインの発現は上位ではない結果であった。肺移植モデルと上葉優位型肺線維症は、機序は異なるものの強い肺傷害が持続した結果として胸膜直下帯状線維化を呈し、肺組織の終末像の一形態であることが推察された。上葉優位型肺線維症患者2例に共通して、発現亢進している遺伝子群が IPF と共通していることから、上葉優位型肺線維症において炎症反応に乏しい場合には IPF と同様に、抗線維化薬による治療が抗炎症治療よりも優先されると推察される結果となった。

(3) 1-アドレナリン受容体拮抗薬の肺線維症に対する効果の検証

これまでの実験結果から上葉優位型肺線維症の治療戦略として、抗炎症よりも抗線維化を主体とした治療戦略が有効であると推察した。1-アドレナリン受容体拮抗薬の一つである naftopidil はアドレナリン受容体拮抗作用とは独立して、前立腺の線維芽細胞や上皮細胞の増殖を抑制し、前立腺肥大を改善させることが報告されている[3]。この知見をもとに naftopidil の肺線維芽細胞やプレオマイシン肺線維症モデルにおける作用の解析を行った。実験の結果、naftopidil は、肺線維芽細胞に対しても G1 cell cycle arrest を誘導することで増殖抑制作用を有しており、プレオマイシン肺線維症モデルにおいて肺線維症の軽減効果を有していた。これらの知見をまとめ英文誌に報告した。Naftopidil は前立腺肥大症の治療薬として、ヒトに対する安全性・有効性が確立していることから、上葉優位型肺線維症を始めとする難治性間質性肺炎の治療薬としての可能性を今後も検証していく方針である。

参考文献：

1. Yoshida Y, Nagata N, Tsuruta N, Kitasato Y, Wakamatsu K, Yoshimi M, Ishii H, Hirota T, Hamada N, Fujita M, Nabeshima K, Kiyomi F, Watanabe K. Heterogeneous clinical features in patients with pulmonary fibrosis showing histology of pleuroparenchymal fibroelastosis. *Respir Investig*. 2016 May;54(3):162-9. doi: 10.1016/j.resinv.2015.11.002. Epub 2015 Dec 29. PMID: 27108011.
2. Shilling RA, Wilkes DS. Role of Th17 cells and IL-17 in lung transplant rejection. *Semin Immunopathol*. 2011 Mar;33(2):129-34. doi: 10.1007/s00281-011-0257-9. Epub 2011 Feb 1. PMID: 21279808; PMCID: PMC3945469.
3. Kojima Y, Sasaki S, Oda N, Koshimizu TA, Hayashi Y, Kiniwa M, Tsujimoto G, Kohri K. Prostate growth inhibition by subtype-selective alpha(1)-adrenoceptor antagonist naftopidil in benign prostatic hyperplasia. *Prostate*. 2009 Oct 1;69(14):1521-8. doi: 10.1002/pros.21003. PMID: 19544328.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 1件）

1. 著者名 Urushiyama Hirokazu, Terasaki Yasuhiro, Nagasaka Shinya. et al.	4. 巻 march
2. 論文標題 Naftopidil reduced the proliferation of lung fibroblasts and bleomycin induced lung fibrosis in mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Cellular and Molecular Medicine	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jcmm.14255	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------