

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07418

研究課題名(和文) 周皮細胞に着目した特発性肺線維症の発症機序解明と治療法の提唱

研究課題名(英文) Pericytes play a critical role in the development of idiopathic pulmonary fibrosis

研究代表者

佐久間 裕司 (Sakuma, Yuji)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10364514

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト肺組織から分離した間葉系細胞(HuL-P)は周皮細胞マーカー PDGFRB, CSPG4を発現していた。HuL-P細胞は TGF- β signaling存在下で筋線維芽細胞様に、非存在下で周皮細胞様になった。一方、特発性肺線維症(IPF)肺組織内に存在する線維芽細胞巢もHuL-P同様、PDGFRB, CSPG4を発現していた。以上の結果より、線維芽細胞巢を構成する筋線維芽細胞は病的に活性化した周皮細胞に由来すると考えられ、周皮細胞・筋線維芽細胞移行を阻害することが IPFによる肺線維化を抑制しうると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性肺線維症の線維化は異時性、多発性に患者肺に形成される線維芽細胞巢(fibroblastic foci, FF)により引き起こされる。FFの内部に毛細血管は存在せず、その存在は肺泡領域の生理的血流を遮断し、その下流に位置する肺泡隔壁を傷害する。FFはその特徴的局在と複数の周皮細胞マーカーを発現していることから周皮細胞由来が示唆される。さらに正常肺組織から得た周皮細胞は TGF- β signalの有無に応じて周皮細胞様から筋線維芽細胞様まで動的に表現型を変化させる。纏めると周皮細胞・筋線維芽細胞移行を抑制することが特発性肺線維症の病的線維化を抑制しうると考えられた。

研究成果の概要(英文)： Human lung pericytes (HuL-P), derived from normal human lung tissues, express PDGFRB and CSPG4, markers for pericytes. HuL-P cells stimulated by TGF- β signaling transition to myofibroblast-like cells. In addition, PDGFRB and CSPG4 are expressed in fibroblastic foci (FF) in lung tissues affected by IPF as well. These results collectively suggest that 1) pericytes activated by TGF- β signaling would transition to myofibroblasts in FF, and 2) suppression of pericyte-myofibroblast transition could mitigate pulmonary fibrosis.

研究分野：分子細胞病理学

キーワード：特発性肺線維症 周皮細胞 筋線維芽細胞 TGF-

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 IPF は慢性進行性、不可逆性の間質性肺疾患であり、多くの患者は診断後 3-5 年で死亡する。その病理組織像は usual interstitial pneumonia (UIP) であり、下葉の胸膜直下から既存構築が破壊され、蜂窩肺を形成する。蜂窩肺の近傍にはほぼ正常な肺組織があり (空間的多彩性)、陳旧性の病変である蜂窩肺の近傍には幼若な、活動性の線維化巣である fibroblastic foci (FF) がしばしば認められる (時間的多彩性)。FF は末梢肺上皮の直下に線維芽細胞・筋線維芽細胞が集族した細胞外基質の豊富な構造体であり、我々は先の論文で FF (毛細血管を欠いている) が肺泡領域の生理的に豊富な血流を遮断することにより、既存の肺泡隔壁を破壊することを指摘した。これは、FF (= 進行性線維化) と既存構築の破壊 remodeling を結びつける (繋ぐ) 初の報告であり、同時に、FF の新たな形成を抑制することが IPF の制御 (進展を抑制) に通じることを示している。

IPF は炎症性疾患ではないことはコンセンサスが得られている。また IPF は高齢者の病気であること、喫煙と深く関連していることに加えて、telomere length を制御する *TERT*, *TERC* 等に遺伝子変異が同定されることから機能不全に陥った末梢肺上皮により引き起こされる病変との認識が広まっている。IPF 肺から分離された 2 型肺胞上皮では telomere が短縮し、organoid 形成能が傷害されていることも報告されている。具体的には傷害され integrin $\alpha v \beta 6$ を発現するようになった末梢肺上皮が潜在型 TGF- β を活性化させ、あるいは TGF- β を分泌し、近傍の間葉系細胞を活性化 (筋線維芽細胞化) させるというものである。よって、IPF は本質的には上皮の機能異常の病気であり、その結果としての線維化であると考えられる。

2. 研究の目的

肺のみならず他臓器においても過剰な膠原線維を産生する細胞 (病的な線維芽細胞) の母細胞については論争が続いてきたが、lineage tracing approach を使用した実験から周皮細胞あるいは周皮細胞様細胞が注目されている。しかしながらヒト肺組織由来の周皮細胞の解析は十分には行われてはならず、周皮細胞と間葉系幹細胞との鑑別もしばしば困難である。本研究では、1) 正常肺組織由来の周皮細胞は TGF- β signaling により筋線維芽細胞化すること (pericyte-myofibroblast transition)、2) IPF 肺組織上の FF も周皮細胞由来であると考えられること、3) pericyte/myofibroblast は部分的には Bcl-xL + MCL1 依存性に生存していること、を報告する。

3. 研究の方法

3-1 IPF組織：典型的組織像を呈する3つのIPF肺組織を対象に CD34, keratin 7 (KRT7), chondroitin sulfate proteoglycan 4 (CSPG4), platelet-derived growth factor receptor β (PDGFRB) の免疫組織化学染色を行った。

3-2 ヒト肺組織からの周皮細胞の分離：正常肺組織 (肺腺癌のための手術された患者さんの背景肺) 2個から細胞成分を分離した。その後、上皮細胞を除去し、Endothelial Cell Growth Medium-2 MicroVascular (EGM-2MV, Lonza) で周皮細胞を培養した。本研究で分離・培養した間葉系細胞を human lung pericyte (HuL-P) と呼ぶ。HuL-P培養時には、適宜、cytokineである PDGF-BB, TGF- β を添加した。また、特異的TGF- β type I receptor inhibitorである EW-7197 も使用した。

3-3 HuL-P と血管内皮細胞の共培養：HuL-P 細胞がどの程度、周皮細胞としての機能を保持しているかを検証するため、血管内皮細胞との共培養を行った。

3-4 Flow Cytometry：HuL-P 細胞の PDGFRB, CSPG4, CD31 の発現の有無を検証した。

3-5 RT-PCR：HuL-P 細胞から RNA を抽出し、CSPG4, ACTA2, COL1A1, PDPN, BCL2, BCL2L1, MCL1 の発現を検証した。

3-6 RNA 干渉：HuL-P 細胞における BCL2L1 と MCL1 の発現を抑制するため、各々2種類の silencer select siRNA を購入し、Lipofectamine RNAi MAX を使用し細胞導入した。

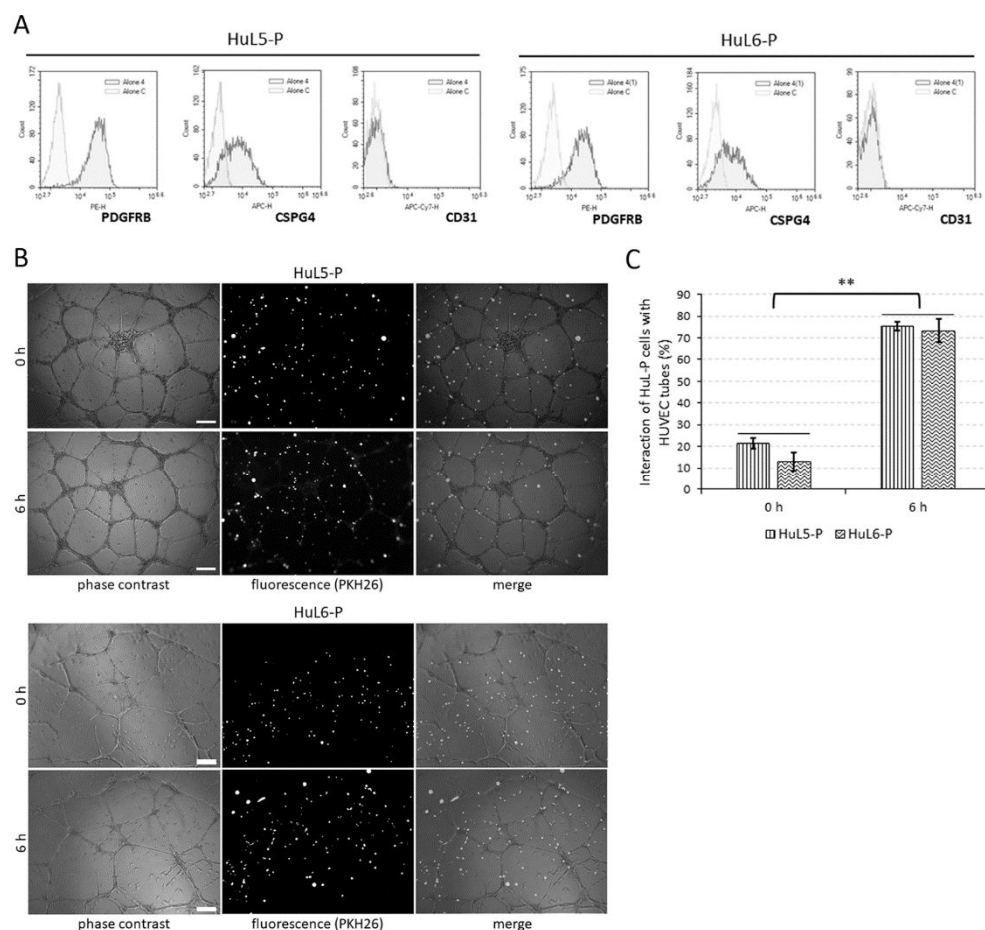
3-7 Western Blot：BCL2, Bcl-xL, MCL1, γ H2AX, β -actin の蛋白発現を western blot 法で検索した。

3-8 Viabilityとapoptosisの評価：各々 CellTiter Glo 3D Cell Viability Assay と Caspase Glo 3/7 Assay (Promega)で検証した。

4. 研究成果

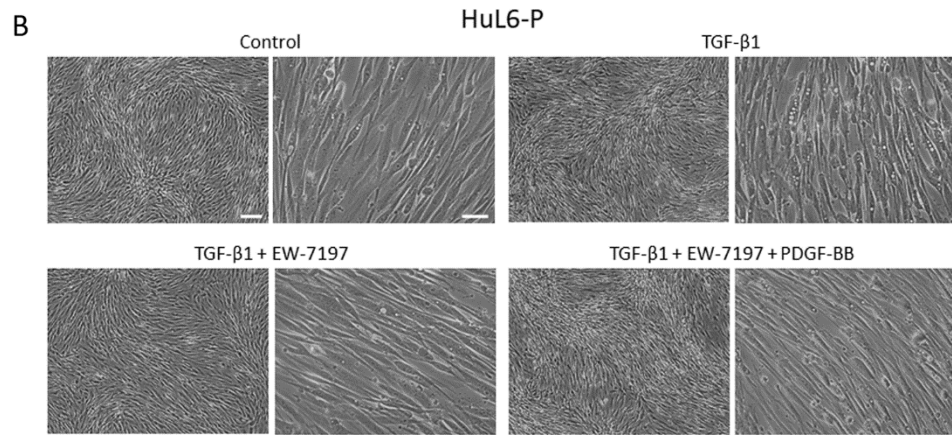
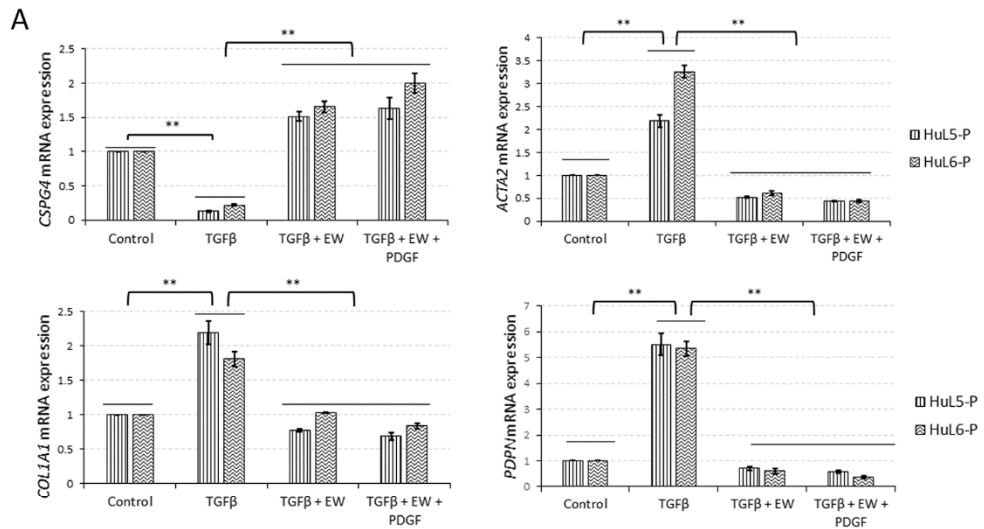
4-1 肺組織由来の周皮細胞の分離：我々は2つの正常肺組織から周皮細胞の代表的マーカー分子 PDGFRB, CSPG4 を発現し、血管内皮細胞マーカーCD31 陰性の間葉系細胞 HuL5-P cells, HuL6-P cells を得た (Fig. 1A)。CSPG4, PDGFRB の両者を発現する細胞はマウス脳においてはほぼ完全に周皮細胞に限られることが明らかにされており、我々の HuL-P cells も周皮細胞であることを支持している。このマーカー分子の発現のみならず、HuL6-P 細胞は HUVEC tubes まで僅か6時間で移動し、これを裏打ちした (Fig. 1B, C)。周皮細胞と間葉系幹細胞の鑑別はしばしば困難であり、間葉系幹細胞は周皮細胞に分化するとの報告も見られる。実際に骨髄由来の間葉系幹細胞は HUVEC tube を裏打ちしたが、肺由来の HuL6-P cells

はより効果的に HUVEC を裏打ちすることも確認した (data not shown)。この所見から HuL-P cell は周皮細胞としての特徴(マーカー分子および機能)をある程度、保持していると考えられた。



4-2 周皮細胞といわゆる線維芽細胞は一連の spectrum である：いわゆる筋線維芽細胞は一つの細胞種というよりも総称であり、特異性の高いマーカー分子は知られていないが、筋線維芽細胞マーカーとして ACTA2, COL1A1, PDPN を選択した。TGF- β signal 存在下では HuL-P cells の *CSPG4* mRNA 発現量が顕著に減少する一方、*ACTA2*, *COL1A1*, *PDPN* の mRNA 発現量は有意に増加した (Fig. 2A)。逆に EW-7197 投与で TGF- β signal を遮断すると周皮細胞マーカー *CSPG4* の発現量は増加し、筋線維芽細胞マーカー 3 つはいずれも顕著に低下した。この EW-7197 の効果は PDGF-BB (内皮細胞が周皮細胞に向けて分泌することが知られている) 存在下でさらに促進された (Fig. 2A)。細胞形態の変化は限定的であるが (Fig. 2B)、PDPN については蛋白レベルでも同様に変動することを FCM で確認した (data not shown)。以上の所見は HuL-

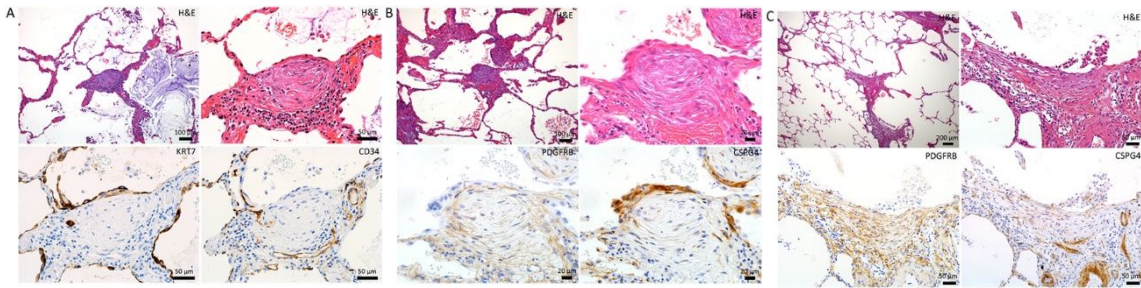
P cells は TGF- β signal を遮断し、PDGF-BB で刺激すると周皮細胞様となる一方で、TGF- β signal が流れた状態では筋線維芽細胞様となることを明確に示している。これらの現象は既に



提唱されている pericyte-myofibroblast transition の概念に合致している。別の言い方をすると周皮細胞と (筋) 線維芽細胞は同一細胞の spectrum の両端と想定される。

4-3 IPF 肺に存在する FF は PDGFRB, CSPG4 を発現している：IPF ヒト肺組織に形成された FF は KRT7 陽性の末梢肺上皮と CD34 陽性の毛細血管内皮細胞の間隙に存在していた (Fig. 3A)。この両者は生理的には基底膜を共有し密着していること、毛細血管基底膜内には生理的に周皮細胞が存在していることを考慮すると FF の局在の特異性が分かる。周皮細胞マーカー分子 PDGFRB や *CSPG4* の特異性は必ずしも高くなく、我々の検討でも PDGFRB は間葉系細胞全般に、*CSPG4* は血管壁や末梢肺上皮等にも発現していた (Fig. 3B, C)。しかし IPF 肺の FF には PDGFRB は強く、*CSPG4* は弱く発現していることも分かる (Fig. 3B, C)。

この発現パターンは *in vitro* の HuL-P cell のそれと類似している (Fig. 1A)。組織学的な存在部位と PDGFRB, CSPG4 の両者を発現することから、FF は周皮細胞に由来すると想定された。

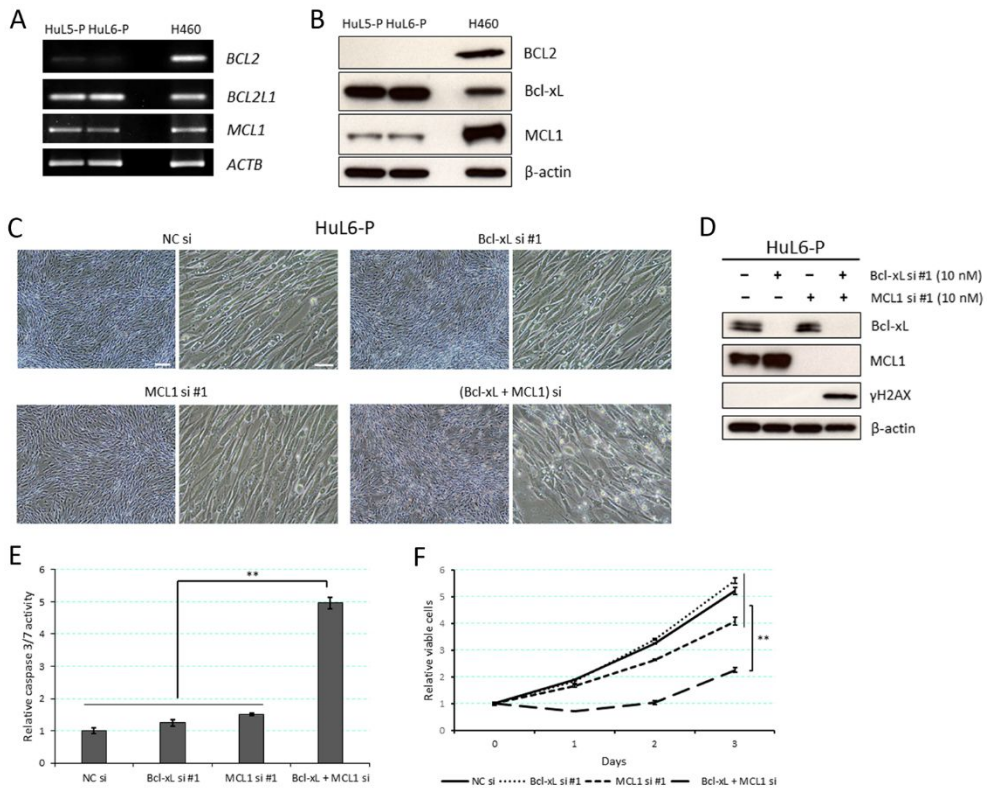


4-4 ヒト周皮細胞・線維芽細胞は dual inhibition of Bcl-xL + MCL1 で不完全ながら apoptosis

する：HuL-P cell を apoptosis に誘導するため anti-apoptotic BCL2 family 分子に注目した。

HuL-P cells は主要な anti-apoptotic BCL2 family 分子である BCL2, Bcl-xL (BCL2L1), MCL1 のうち Bcl-xL と MCL1 を RNA, 蛋白レベルで明瞭に発現している一方、BCL2 は殆ど発現していなかった (Fig. 4A, B)。HuL6-P cells は Bcl-xL, MCL1 の発現を個々に抑制しても apoptosis に陥ることはないが、両者を同時に抑制すると DNA 傷害マーカー γ H2AX が発現し、caspase 3/7 活性が

有意に上昇し apoptosis に陥る細胞が出現した (Fig. 4C-E)。同様の治療効果は HuL5-P cells でも確認され、かつ siRNA #2 でも同様の結果を得ている。



しかし、Fig. 4F を見ると、この dual inhibition of Bcl-xL + MCL1 にも抵抗性示す細胞が存在すると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 佐久間 裕司	4. 巻 34
2. 論文標題 肺組織に存在する線維芽細胞巢の由来と病的意義	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 1230-1233
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Yamaguchi M, Hirai S, Tanaka Y, Sumi T, Tada M, Takahashi H, Watanabe A, Sakuma Y	4. 巻 528
2. 論文標題 Pericyte-myofibroblast transition in the human lung	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 269-275
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.05.091.	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 Sakuma Y, Hirai S, Sumi T, Tada M, Kojima T, Niki T, Yamaguchi M	4. 巻 406
2. 論文標題 MCL1 inhibition enhances the efficacy of docetaxel against airway-derived squamous cell carcinoma cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Exp Cell Res	6. 最初と最後の頁 112763
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yexcr.2021.112763.	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〕

札幌医科大学医学部附属フロンティア医学研究所分子医学部門
<https://web.sapmed.ac.jp/molm/index.html>

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