

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08598

研究課題名(和文) 肺線維症における細胞種特異的TGF-β活性化機構の役割

研究課題名(英文) Role of a cell type-specific mechanism of TGF-β signaling activation in lung fibrosis

研究代表者

鯉沼 代造 (Koinuma, Daizo)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・准教授

研究者番号：80375071

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)：本研究ではTGF-βというサイトカインの活性化の役割について、制御する細胞膜タンパクに注目して変異マウスの人工的肺線維症モデルの実験により検討した。その結果、この細胞膜タンパクを欠失したマウスでは、肺線維化ではなく肺炎症が増悪することが分かり、そのメカニズムもこれまで知られたTGF-βの活性化を介さないことが明らかになった。単一細胞毎の遺伝子の発現を調べる方法により、その炎症抑制作用に関わる細胞種の存在が示唆された。開発中の抗がん剤はこのタンパクを標的としており副作用の面で肺炎症抑制作用との関係性を評価すべきと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺線維症は感染症など様々な原因による肺の炎症の治癒過程の結果として肺に残る傷跡でありその程度によっては呼吸機能に障害をきたす。線維化に関わる細胞の増殖を抑える分子標的薬の効果が出ているが、どのようなメカニズムが炎症と線維化に関わるか明らかにすることはよりよい治療法を開発するうえでなお必要である。本研究の対象とした膜タンパクを標的とする抗がん剤など創薬が進行している中、今回明らかになった肺炎症抑制作用はその副作用を考慮するうえで重要な知見になったと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We focused on the role of a cell surface protein, which reportedly activates TGF-β signaling pathway, in a mutant mouse model of lung fibrosis. We found that inflammation of lung tissue, not fibrosis, was enhanced by deleting the gene encoding this protein. The mechanism appeared not related to the known function of TGF-β signaling activation. By using single cell RNA-sequencing, we were able to identify the responsible population of the cells related to the effect of this protein. As a conclusion, TGF-β-independent suppressive effect of this cell surface protein on the lung inflammation should be evaluated in the ongoing development of anti cancer drugs targeting this protein.

研究分野：分子病理学

キーワード：肺線維症 TGF-β マウスモデル 血管内皮細胞 肺障害 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

間質性肺炎・肺線維症は多くの疾患から構成されるが、いまだその病態の理解は研究の途上であり、十分な治療法が確立したとはいえない。中でも原因が不明の特発性肺線維症 Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)は本邦をはじめ治療法開発が精力的に進められた結果、pirfenidone や nintedanib の登場により光明が見いだされつつあるものの、肺がんの治療法開発が大きく進展した現在、呼吸器疾患において最も予後不良な疾患の一つになっている。IPFに限らずとも肺線維化病変を背景に有する症例は、治療薬投与によりその副作用として肺線維症を増悪するなど、しばしばほかの疾患の治療の大きな妨げとなっている。治療法開発に向けて、未だ不足している病態の理解は今後も呼吸器内科領域研究が取り組んでいくべき大きな課題であると考えられる。

Transforming growth factor- β (TGF- β)は組織の線維化を促進する主要なサイトカインの一つとして知られ、TGF- β の過剰発現は主要な肺線維症マウスモデルの一つとして確立しており、またプレオマイシン肺線維症モデルの形成にも関与することが明らかになっている。TGF- β はその前駆体由来の latency-associated peptide (LAP)および LTBP タンパク質に結合して不活性型として間質に存在し、インテグリンはじめ様々な刺激で活性化されることで細胞内にシグナルを伝達する。これに対してある細胞膜タンパク質はLAPとともに不活性TGF- β と結合してTregや血小板などの細胞表面に発現することが分かっている。このタンパクはインテグリンと協調して保持しているTGF- β の活性化を行うことが知られ、間質に存在するTGF- β とは異なり、発現する細胞の表面に保持されて活性化されることで、より限られた範囲の細胞にシグナルを伝達する役割を有することが示唆されている。またこのタンパク質ファミリーには細胞内NF κ Bシグナルの制御作用が報告されており、その多彩な分子機能が示唆される。

ここで肺線維症の病態に関わる様々な細胞の一つとして、血管内皮細胞の役割が報告されている。研究代表者も参画した過去のがん病態に関する研究プロジェクトや近年の他のグループの報告においてこのタンパクが血管内皮細胞に発現することが明らかになっている。血管内皮細胞表面でのTGF- β の活性化、さらには血管内皮細胞内シグナルの活性化による各種ケモカイン分泌は肺胞組織の構造上隣接する肺胞上皮細胞や各種浸潤細胞・線維芽細胞に多大な影響を与えることが示唆されるが、肺線維症におけるこの遺伝子の役割の有無も含めて明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究では、肺線維症マウスモデルにおける血管内皮細胞及び上記TGF- β 結合細胞膜タンパクによる特徴的なTGF- β 活性化機構の役割を明らかにすることを目的とした。TGF- β シグナルが肺線維症の病態促進に与える影響は様々な報告により確立しているが、TGF- β には組織線維化促進作用のほかに免疫抑制作用など多彩な作用を有しており、同シグナルの制御薬は未だ有効な線維化疾患の治療薬開発へと結びついていない。TGF- β シグナルの多彩な作用が如何にコンテキスト依存的に特異的に制御されているか解析が進む中で独特のTGF- β 活性化機構が限られた細胞系統に存在することが明らかとなっている。またこの細胞膜タンパクに対する特異的なマウス或いはヒト抗体作成によりこれまでGVHDモデルなど個体レベルでのTregの機能制御における役割が明らかになっている。しかしながら上述のように研究代表者も参画したがん微小環境での機能に関わる先行プロジェクトではこのタンパクはほかにも血管内皮細胞や血小板で強く発現することが明らかになっている。他の研究グループからも血小板での発現に関する報告がなされたが、これらの意義は十分に分かっていない。また、ほかのファミリー分子で認められるようにその発現する細胞においてTGF- β とは別個の細胞内シグナル伝達に関わることが示唆されるが、その分子機構と役割についてはほとんどわかっていない。Tregの機能制御を目指したこのタンパク活性の阻害剤開発が進む中で、しばしば肺がんをはじめとする臨床において問題となる肺線維症への影響を評価することは欠かせないと考えられる。

3. 研究の方法

マウスモデルとして最も確立しているプレオマイシン誘導肺線維症モデル(経鼻投与モデル: Watanabe et al, Mol Ther 2005)を採用し、Cdh5プロモーターの制御下にタモキシフェン依存的にCreレコンピナーゼを発現するコンディショナルノックアウトマウスを用いてプレオマイシンによる肺線維症発症の程度を病理組織学的に検討したほか、ヒドロキシプロリン定量比較を行った。肺組織におけるTGF- β シグナルの活性化を免疫染色或いはELISA、活性化シグナ

ル分子のリン酸化で評価して線維化病変の微小環境において線維芽細胞をはじめどのような細胞でシグナルの活性化が起きているかを調べた。さらに研究代表者も参画した先行研究での RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析の成果を踏まえ、血管内皮細胞内へのシグナル伝達のメカニズムと標的遺伝子としての細胞外分泌因子・特にケモカイン発現誘導についても検討した。

4 . 研究成果

Cdh5 プロモーターの制御下にタモキシフェン依存的に Cre レコンビナーゼを発現することで、この遺伝子が発現している血管内皮細胞特異的なコンディショナルノックアウトマウスを用いてプレオマイシン経気道内投与による肺線維症モデルでの検討を行った。その結果少なくとも特定の条件においては再現性をもってマウスの肺線維化が遺伝子のノックアウトにより病理組織学的に減弱することが明らかになったが、異なる条件では影響は明確にならず、結論として肺線維化への影響は限定的であると判断した。また当該変異マウスにおける血中活性化 TGF- β を ELISA により定量した。さらに血管内皮細胞自身におけるこの遺伝子の役割と肺線維症への関与の可能性についても探索を行った。特にこの遺伝子によって制御される細胞外分泌因子について ELISA による血中濃度の検討を行ったが、いずれも線維化誘導時の cK0 マウスでの明らかな変動は見いだせなかった。

一方で、プレオマイシン投与により、線維化ではなく肺の炎症への影響が示唆されたことから、内皮細胞での検討を続けたところ、数系統の炎症細胞への作用を持つ分泌因子群の発現が制御されることが示唆された。炎症細胞発現マーカーの免疫組織化学染色により関与する細胞種を明らかにすることを試みたが明らかな傾向を示さなかった。重要なことにこれまで知られていた TGF- β 活性化作用に関しては、Smad の活性化状態であるリン酸化 Smad の免疫化学染色による検討結果から、プレオマイシンによる明らかなシグナル活性化細胞種の存在を観察できたもののタンパク発現欠失の影響が認められず、TGF- β シグナル以外の作用を介したメカニズムの存在が示唆された。これを踏まえて当初注目していた TGF- β シグナルへの作用を離れて肺炎症への作用機構を明らかにする必要性が生じた。そこでプレオマイシンによる炎症肺組織からシングルセル遺伝子発現解析を行い、タンパク欠失の影響について調べたところ、特定の細胞クラスターの遺伝子発現に影響を与えていることが明らかになった。

以上の結果から当初 TGF- β シグナルの局所活性化を介した肺線維症への役割を想定した細胞膜タンパクが、TGF- β シグナル非依存的に肺炎症の抑制に関わっていると結論した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------