

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K08614

研究課題名(和文) 肺線維化環境での免疫担当細胞のクロストークおよび加齢影響と治療応用についての研究

研究課題名(英文) The crosstalk mechanisms between immunological cells responsible for fibrotic microenvironment and the effect of aging.

研究代表者

神尾 孝一郎 (KAMIO, Koichiro)

日本医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20465305

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)： 骨髄細胞をサイトカイン類で培養し、肺線維症モデルマウスに投与すると、肺線維化が有意に抑制されることが確認された。本細胞はF4/80をマクロファージと同程度に発現していることが確認された。さらにこれらの細胞の表面マーカーの検討から、M2-like マクロファージである事が示唆された。MAGI2の検討は、ヒト肺線維芽細胞を用いた。TGF- β 1による刺激で α -SMAの発現上昇とともに筋線維芽細胞への分化が確認され、その際MAGI2の発現低下を確認した。またHFL-1においてMAGI2のノックダウンを行うと、 α -SMAの発現が上昇し、PTEN、Aktのリン酸化が亢進していることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

骨髄由来のマクロファージ様細胞投与による肺線維症モデルマウスの線維化の改善作用は、肺線維症に対する細胞治療に発展する可能性を秘めている。今後これらの細胞の詳細な抗線維化メカニズムの検討が必要である。

線維化病態においてMAGI2とPTENとの関与が確認され、MAGI2の抑制により線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化が促進されることが明らかとなった。MAGI2-PTEN axisは、肺線維化病態の新たな治療標的となることが期待される。

研究成果の概要(英文)： 1) The bone marrow derived cells were cultured with cytokines. These cells were adoptively transferred to bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis model, and significant attenuation of the fibrosis development was observed. The analysis of cell-surface markers revealed that these cells have properties similar to M2 macrophage.

2) A scaffolding protein MAGI2 serves as a tumor suppressor. However, the involvement of MAGI2 in fibroblast to myofibroblast is unclear. Therefore, we examined the role of MAGI2 in myofibroblast differentiation using normal human lung fibroblasts. MAGI2 expression was significantly down-regulated by TGF- β 1. α -SMA expression was significantly increased upon MAGI2 depletion by siRNA, which was accompanied by AKT phosphorylation and PTEN instability. Up-regulation of α -SMA upon MAGI2 silencing was also confirmed by immunocytochemistry.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：特発性肺線維症 骨髄由来細胞 macrophage polarization MAGI2 PTEN

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症において、線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化は病態形成のための重要なメカニズムのひとつであり (1-3)、PTEN は筋線維芽細胞への分化における negative regulator として知られている (4)。PTEN はがん抑制遺伝子の一つであり、PTEN の異常は様々な癌腫において報告されている。われわれの教室ではこれまで、肺癌における PTEN の異常と薬物療法耐性の関連について研究を積み重ねて来ている (5, 6)。

MAGI2 は脳内で発見された蛋白で、synaptic scaffolding molecule としても知られるが、様々な神経疾患の発症に関与している (7)。一方、MAGI2 はがん抑制遺伝子の側面も有しており (8)、PTEN との相互作用を通じてその安定化に寄与するとの報告もある (9)。われわれの教室からも、*miR-134/miR-487b/miR-655* cluster が MAGI2 を抑制し、肺癌の epithelial to mesenchymal transition を促進させることを報告している (10)。しかしながら、肺線維化病態において線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化における MAGI2 の役割は十分に解明されていない。

2. 研究の目的

本研究では、肺線維化病態における MAGI2 の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ヒト肺線維芽細胞株として、human fetal lung fibroblast (HFL-1) cells を使用した。

筋線維芽細胞への分化誘導は、TGF- β 1 (5 ng/mL) を用いて行った。

標的分子の発現変化は、リアルタイム定量 PCR 法とウェスタンブロッティング法を用いて確認した。

MAGI2 の機能解析には、siRNA (50 nM) を使用した。

Akt 経路の抑制は、Akt inhibitor; MK-2206 (200 nM) を用いて行った。

4. 研究成果

(1) TGF- β 1 による線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化と MAGI2 の変化

まず始めに、HFL-1 cells を TGF- β 1 と培養し、筋線維芽細胞への分化を確認した。図 1 A の通り、TGF- β 1 は α -SMA の mRNA 発現を増加させた (* $P = 0.047$)。 α -SMA の増加は蛋白レベルでも認められ (図 2 B)、TGF- β 1 による線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化が確認された (** $P = 0.018$)。

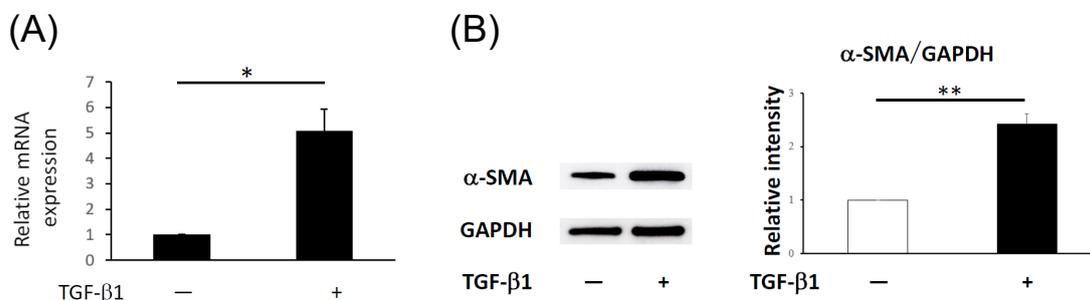


図 1 TGF- β 1 による筋線維芽細胞への分化

次に TGF- β 1 刺激による、MAGI2 の変化を確認した。TGF- β 1 と培養し、筋線維芽細胞への分化を確認した。図 2 A の通り、TGF- β 1 は MAGI2 の mRNA 発現を有意に低下させた (* $P = 0.00045$)。また蛋白レベルでは、TGF- β 1 刺激により時間依存的な MAGI2 の低下が確認された (** $P = 0.045$ 、図 2 B)。

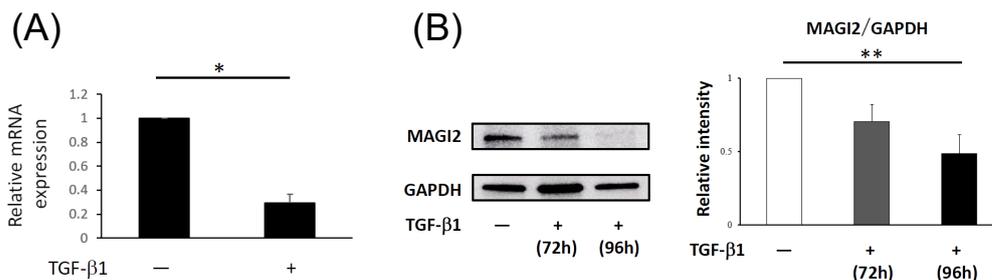


図 2 TGF- β 1 による MAGI2 の抑制

(2) MAGI2 ノックダウンの筋線維芽細胞分化への影響

以上より、MAGI2 の低下が筋線維芽細胞への分化に関係するかを確認するために、siRNA を用いて HFL-1 において MAGI2 をノックダウンした。図 3A の通り、MAGI2 のノックダウンにより、 α -SMA の発現は有意に増加した (* $P = 0.024$)。

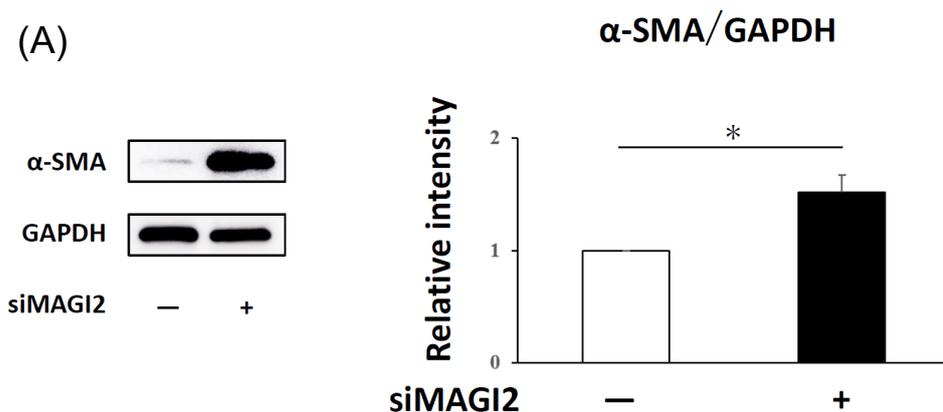


図 3A MAGI2 のノックダウンによる α -SMA 発現の変化

上記の結果は immunocytochemistry によっても確認され (図 3B)、MAGI2 の線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化への関与が示唆された。

(B)

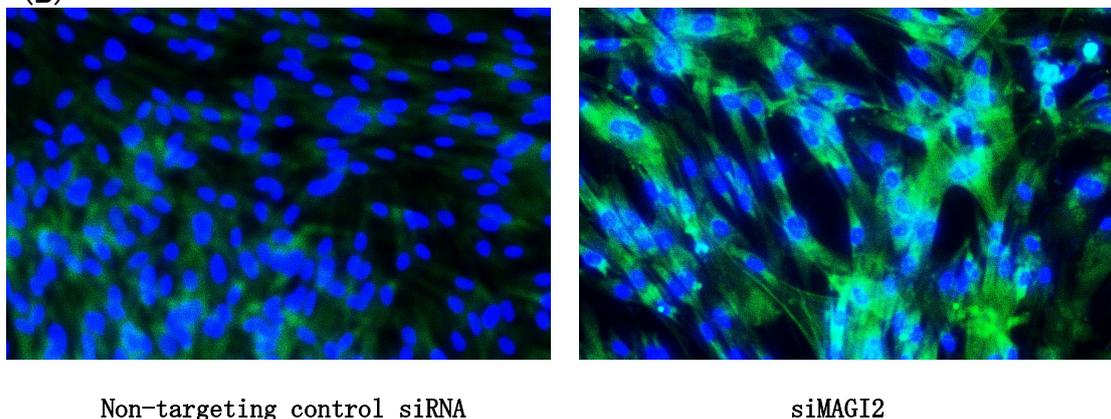


図 3B MAGI2 のノックダウンによる線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化

(3) MAGI2 ノックダウンによる、PTEN、Akt への影響および Akt 阻害薬の効果

筋線維芽細胞への分化には、PTEN および Akt のリン酸化が関与するが、MAGI2 ノックダウンによるこれらへの効果を検討した。MAGI2 のノックダウンにより、PTEN および Akt のリン酸化が亢進した (図 4)。

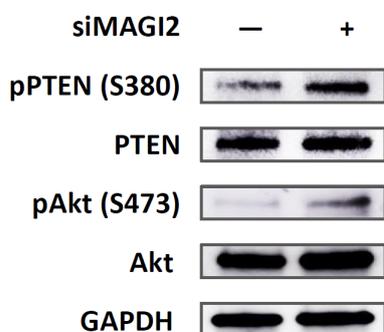


図 4 MAGI2 のノックダウンによる PTEN および Akt のリン酸化

さらに Akt の阻害薬である MK-2206 が、 α -SMA の発現に及ぼす影響を検討した。Akt 阻害薬は、MAGI2 ノックダウンによる α -SMA 亢進を有意に抑制した (図 5)。

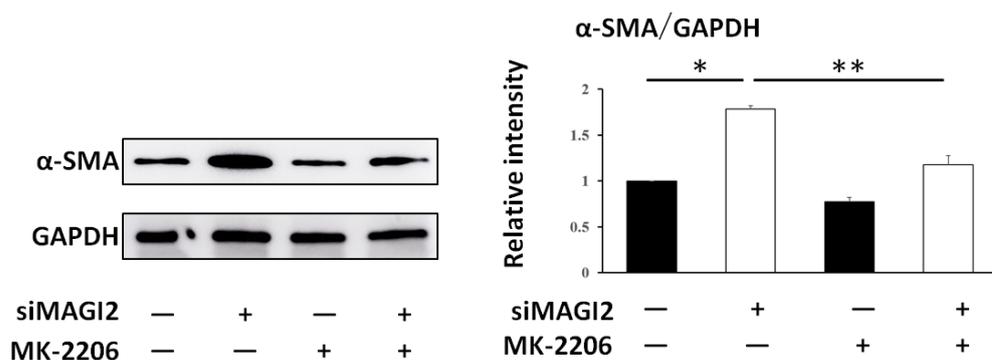


図5 Akt 阻害薬の MAGI2 ノックダウンによる筋線維芽細胞分化への抑制効果

これらの結果から、MAGI2 は線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化において重要な役割を果たしていることが示唆され、肺線維化病態における重要な治療標的となり得ることが示唆された。

(参考文献)

1. Bulvik R, et al. SIRT1 deficiency, specifically in fibroblasts, decreases apoptosis resistance and is associated with resolution of lung-fibrosis. *Biomolecules*. 2020;10(7):996.
2. Romero Y, et al. mTORC1 activation decreases autophagy in aging and idiopathic pulmonary fibrosis and contributes to apoptosis resistance in IPF fibroblasts. *Aging Cell*. 2016;15(6):1103-1112.
3. Álvarez D, et al. IPF lung fibroblasts have a senescent phenotype. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2017;313(6):L1164-L1173.
4. White ES, et al. Negative regulation of myofibroblast differentiation by PTEN (phosphatase and tensin Homolog Deleted on chromosome 10). *Am J Respir Crit Care Med*. 2006;173(1):112-121.
5. Kokubo Y, et al. Reduction of PTEN protein and loss of epidermal growth factor receptor gene mutation in lung cancer with natural resistance to gefitinib (IRESSA). *Br J Cancer*. 2005;92(9):1711-1719.
6. Noro R, et al. PTEN inactivation in lung cancer cells and the effect of its recovery on treatment with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Int J Oncol*. 2007;31(5):1157-1163.
7. Nagashima S, et al. MAGI2/S-SCAM outside brain. *J Biochem*. 2015;157(4):177-184.
8. Balbas MD, et al. MAGI-2 scaffold protein is critical for kidney barrier function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(41):14876-14881.
9. Tolkacheva T, et al. Regulation of PTEN binding to MAGI-2 by two putative phosphorylation sites at threonine 382 and 383. *Cancer Res*. 2001;61(13):4985-4989.
10. Kitamura K, et al. MiR-134/487b/655 cluster regulates TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition and drug resistance to gefitinib by targeting MAGI2 in lung adenocarcinoma cells. *Mol Cancer Ther*. 2014;13(2):444-453.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 神尾孝一郎、吾妻安良太、松田久仁子、猪俣稔、久世眞之、臼杵二郎、田中徹、柏田建、佐藤純平、西島伸彦、渥美健一郎、齋藤好信、清家正博、弦間昭彦 |
| 2. 発表標題 自家骨髄細胞による肺線維症モデルマウスの病態改善効果に関する研究 |
| 3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 佐藤陽三、神尾孝一郎、久世眞之、松田久仁子、鎗木翔太、田中徹、宮永晃彦、田中庸介、齋藤好信、清家正博 |
| 2. 発表標題 肺線維化病態におけるMAG12の関与についての検討 |
| 3. 学会等名 第64回日本呼吸器学会学術講演会 |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yozo Sato, Koichiro Kamio, Naoyuki Kuse, Kuniko Matsuda, Shota Kaburaki, Toru Tanaka, Akihiko Miyanaga, Yosuke Tanaka, Yoshinobu Saito, Masahiro Seike |
| 2. 発表標題 MAG12 is involved in the pathogenesis of pulmonary fibrosis |
| 3. 学会等名 American Thoracic Society (国際学会) |
| 4. 発表年 2024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 | 吾妻 安良太 (AZUMA Arata) (10184194) | 日本医科大学・医学部・教授 (32666) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|