

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08652

研究課題名（和文）一細胞遺伝子発現解析を用いた新規線維化促進細胞集団の同定と分子標的薬開発への応用

研究課題名（英文）Identification of novel profibrotic cell populations using single cell gene expression analysis and its application to the development of molecular targeted drugs

研究代表者

河野 弘 (KAWANO, Hiroshi)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部（医学域）・特任准教授

研究者番号：30771571

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、肺線維細胞の一細胞遺伝子解析を行い、線維細胞の新しい機能的亜集団の同定、線維細胞特異的な新規細胞表面マーカーの同定、線維細胞の分化調節因子の同定を行い、線維細胞制御に基づく新たな抗線維化薬の開発へ発展させることを目的とした。肺線維症モデルにおいて、独自に開発した手法で線維細胞を含む細胞集団を分取し、一細胞RNA-seqを行った結果、マクロファージ集団の中にコラーゲン遺伝子を発現する亜集団を同定した。同亜集団特異的に発現する細胞表面マーカーとして細胞接着分子を同定し、その発現動態を明らかにした。今後は同定した接着分子の機能解析を進め、治療応用を目指した研究へと展開する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コラーゲン遺伝子を発現するマクロファージ亜集団は線維細胞を含む可能性が高く、本研究結果は線維細胞特異的マーカーの同定につながる。その後の詳細な線維細胞の機能解析により、肺線維症に対する新たな治療標的分子を同定しうる点で意義、重要性が高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed single cell gene expression analysis of lung fibrocytes to identify new functional subpopulations of fibrocytes, identify novel cell surface markers specific to fibrocytes, and identify regulators of fibrocyte differentiation, with the aim of developing new anti-fibrotic agents based on fibrocyte regulation. In pulmonary fibrosis model, we isolated a cell population containing fibrocytes using our original method, and performed single cell RNA-seq. We detected subpopulation of macrophages expressing collagen gene. A cell adhesion molecule was identified as cell surface markers specifically expressed in this subpopulation, and their expression kinetics were clarified. We plan to further analyze the functions of the identified adhesion molecules and expand our research to therapeutic applications.

研究分野：呼吸器膠原病内科

キーワード：線維細胞 一細胞遺伝子発現解析 肺線維症

1. 研究開始当初の背景

近年、肺線維症における新たなエフェクター細胞として報告された線維細胞は、骨髄由来の細胞でありながら、collagen I や vimentin などの細胞外基質を産生する。線維細胞は、炎症の増幅、遷延に寄与する単球/マクロファージと、細胞外基質産生を担う線維芽細胞の両方の特徴を合わせ持つ。ひとたび誘導された炎症が適切に終息せず、慢性炎症から線維化へと至る病的プロセスのカギを握る細胞であると考えられるが、これまで生体内における生細胞としての機能解析は十分行われていない。さまざまな臨床データから、肺線維症をはじめとする線維化疾患において重要な役割を持つ細胞である可能性が示されており、線維細胞の詳細な解析とともに、線維細胞をターゲットとした抗線維化薬の創薬は今後の重要な課題であるといえる。

2. 研究の目的

上記背景をもとに、肺線維細胞の生体内動態を調べるために以下に焦点を絞った。

- (1) 線維細胞の不均質性の確認 (肺線維症の病態形成に関与する機能的亜集団の有無)
- (2) 線維細胞に特異的な新規細胞表面マーカーの同定
- (3) 生体内における線維細胞の分化促進関連分子の同定

本研究では、肺線維症の病態形成に深く関わる線維細胞の機能抑制法の基盤を創出することにより、肺線維症に対する新規分子標的治療薬を開発するための足がかりをつかむことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、一細胞 RNA シークエンス法 (RNA-seq) に着目し、私たちが独自に開発した肺線維細胞単離法と組み合わせることにより、従来は困難であった生体内における肺線維細胞の一細胞レベルでの機能解析を試みた。

- (1) 肺線維細胞の新規機能的亜集団の同定

ブレオマイシンを経気管内投与し、肺線維症を誘導した Col1-GFP レポーターマウス由来の肺から $CD45^+CD11b^+CD11c^{intermediate}Gr-1^{intermediate}GFP^+$ 細胞をセルソーターにて分取し、一細胞 RNA-seq を行うことで、ソートした線維細胞をクラスタリングし、線維細胞の亜集団を同定する。線維細胞に特徴的な細胞外基質遺伝子に注目した次元圧縮、クラスタリングを行い、各クラスターの中で特に線維化に関連する発現変動遺伝子を同定し、より線維化に寄与する亜集団が存在するかどうか調べる。

- (2) 肺線維細胞特異的な表面マーカーの同定

(1) で各クラスターの中で特異的な発現変動遺伝子を同定する過程において、サイトカイン受容体、ケモカイン受容体、細胞接着分子、その他の膜受容体に焦点を絞り、線維細胞に特異的な新規細胞表面マーカーを同定する。

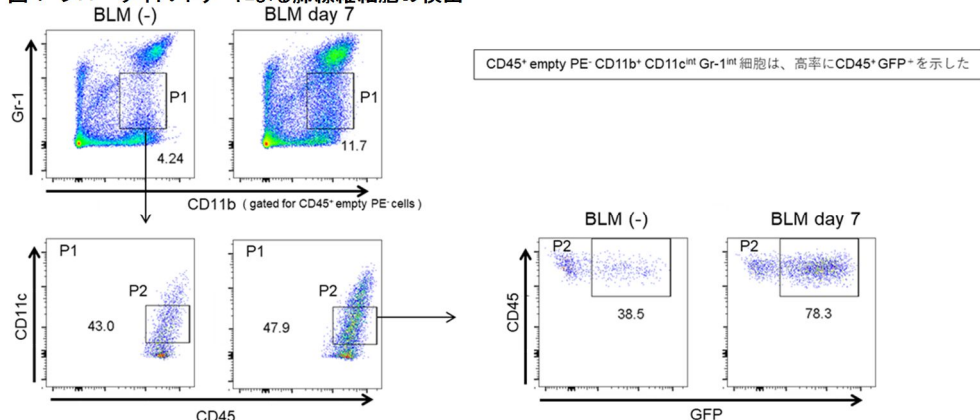
- (3) モデルマウスでの検討

(1)、(2) で同定した線維細胞特異的な細胞表面マーカーがブレオマイシン誘発肺線維症モデルの生体において発現が再現されるかどうかを調べる。同定した分子に関して、阻害抗体を用いて線維細胞における同分子の機能解析を行う。

4. 研究成果

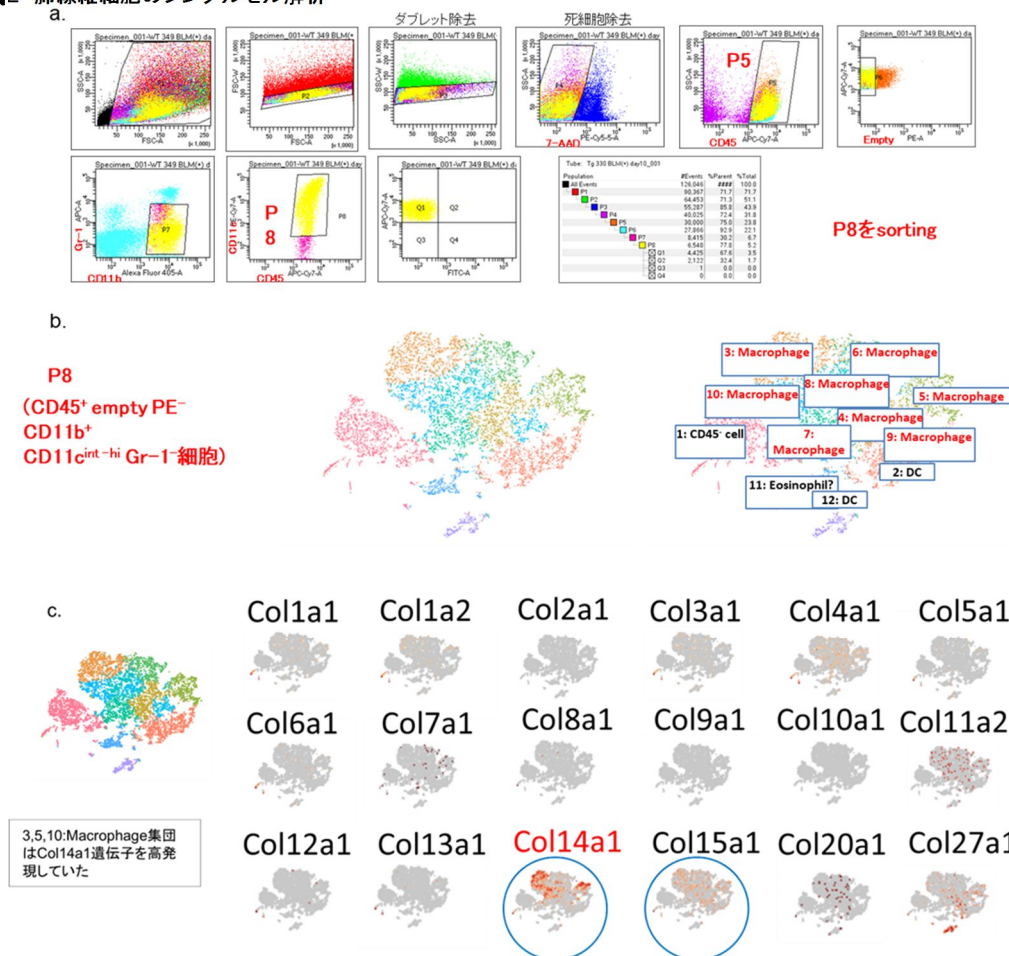
- (1) $CD45^+$ empty PE⁻ $CD11b^+$ $CD11c^{int}$ $Gr-1^{int}$ という gating strategy により、高純度の $CD45^+$ GFP⁺ 細胞が検出可能であった。

図1 フローサイトメトリーによる肺線維細胞の検出



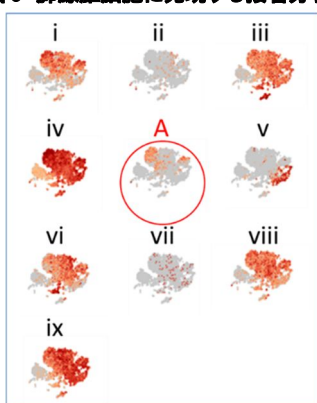
シングルセル解析 (BLM day 10)により、コラーゲンを発現するマクロファージ集団が検出された。

図2 肺線維細胞のシングルセル解析



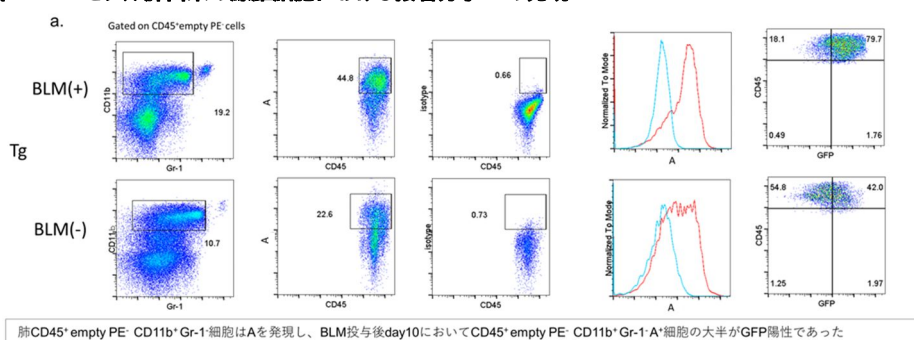
(2)接着分子 A は上記における Col14a1 と同様の発現パターンを示し、線維細胞のマーカーになりえと考えられた。

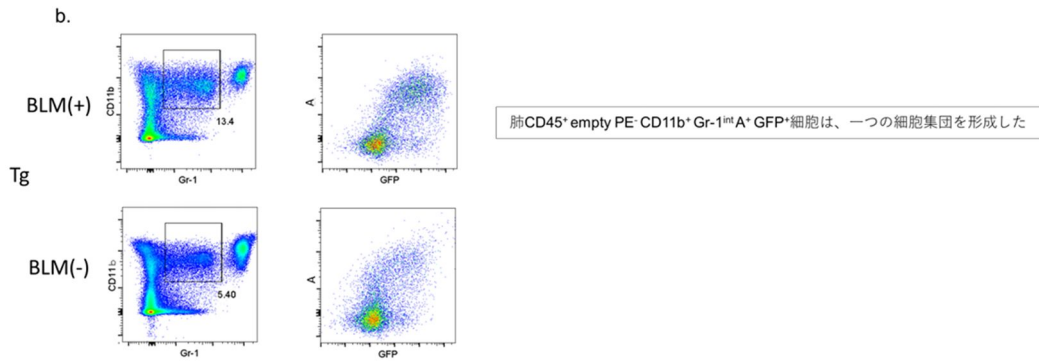
図3 肺線維細胞に発現する接着分子



(3)肺 CD11b⁺細胞は接着分子 A を発現する (BLM day10)

図4 BLM モデル肺由来の線維細胞における接着分子 A の発現





原因不明の慢性進行性線維化を特徴とする特発性肺線維症は、診断後の中央生存期間が約3年と極めて予後不良の疾患である。その克服に向けた基礎研究は、呼吸器領域の中でも特に重点が置かれ、国内外を問わず多角的な方面からアプローチされている。

線維細胞は臓器線維症の重要なエフェクター細胞と認知されており、その機能解析、及び機能抑制法の開発を目指した研究が進められている。しかしながら、線維細胞は、定常状態においては少ない細胞集団であり、また、特異的な細胞表面マーカーに乏しいことから、生体内における生細胞としての機能解析はかなり限定的であった。

一方で、最近、線維細胞の分化抑制薬である serum amyloid P (Pentraxin 2) の有効性が特発性肺線維症を対象とした第二相臨床試験で示された (Raghu et al. JAMA, 2018)。このように、特発性肺線維症のトランスレーショナルリサーチにおける線維細胞研究の位置づけは高まっている。また、近年、次世代シーケンサーによる遺伝子解析の革命を受け、一細胞レベルで網羅的生体分子情報解析を行うことが実現可能となりつつあり、一細胞解析分野は、研究先進各国において重要な研究戦略のターゲットに指定されている。

本研究では、高純度に単離した肺線維細胞を用いた一細胞遺伝子解析を行うことにより、線維細胞の生体内における詳細な機能解明を目指し、特発性肺線維症に対する新規治療法開発に向けた基盤の創出へと展開する。社会に果たす貢献度は高いと考えられる。

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 0件）

1. 著者名 Hiroshi Kawano, Kazuya Koyama, Haruka Nishimura, Yuko Toyoda, Kozo Kagawa, Seidai Sato, Nobuhito Naito, Hisatsugu Goto, Yutaka Inagaki, Yasuhiko Nishioka	4. 巻 9
2. 論文標題 Development of improved method to identify and analyze lung fibrocytes with flow cytometry in a reporter mouse strain.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Immunity, inflammation and disease	6. 最初と最後の頁 120-127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/iid3.361.	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 -

〔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
---------	---------