

令和 4 年 9 月 6 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08844

研究課題名(和文) トロンボモジュリン由来ペプチドによる特発性肺線維症の新規治療法の開発

研究課題名(英文) Thrombomodulin suppresses bleomycin-induced pulmonary fibrosis and develop to a new candidate for IPF treatment

研究代表者

王 新涛 (WANG, XINTAO)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：00448630

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)：本研究は難治性疾患である特発性肺線維症(IPF)に対する新規治療薬の開発を目的とした。Bleomycin (BLM)によるマウス肺線維症モデルに対して、Thrombomodulin (rTM)はBLMマウス肺線維症において抗炎症作用及び細胞保護作用を発揮し、肺線維化を抑制することが示唆された。また、我々の実験結果はrTMの抗線維化作用はオファールセプターであるGPR15を介することを明らかにした。更に、肺線維症の病態へのリンパ球遊走の関与を明らかにし、肺線維症の病態解明及び治療開発の新たな視点を解明した。今回の我々の実験結果から、rTMはIPFに対する有力な治療候補薬であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性肺線維症は難治性肺疾患であり、進行性病態を示す。呼吸困難の症状によりQOLが極めて低い。いまだに有効な治療薬がなく、新薬の開発は急務である。今回の研究では、既存薬であるThrombomodulin(TM)を用いて、その抗炎症作用及び細胞保護作用による肺線維症における抗線維化効果を検証した。肺線維症治療に貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive, irreversible and lethal lung fibrosis disease characterized by variable degrees of pulmonary inflammation and fibrosis. However, the pathogenic mechanisms remain unclear and currently there is no effective treatment for IPF. Thrombomodulin (TM) is an anticoagulant agent indicated for DIC treatment since 2008 in Japan. In this study, we identified that TM suppresses the BLM-induced pulmonary fibrosis and elucidated the underlying mechanisms which are anti-inflammation and cytoprotection. We propose that TM can be considered as a new candidate for IPF treatment.

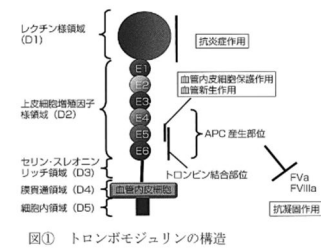
研究分野：呼吸器内科学 分子細胞呼吸器学

キーワード：特発性肺線維症 Thrombomodulin GPR15 Bleomycin

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (Idiopathic Pulmonary Fibrosis, IPF) は平均生存期間が 3-5 年の慢性肺線維化疾患である。経過中に急激な呼吸不全の進行を呈する急性増悪例 (Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: AE-IPF) があり、その死亡率は 80%にも及ぶ極めて予後不良疾患である。IPF の病態には血液凝固異常が関与していると考えられ、ヘパリン類やワルファリンによる抗凝固療法が抗炎症療法に併用されたが一貫した有効性は示されていない (1, 2)。トロンボモジュリン (thrombomodulin: TM) は複数のドメインから構成される膜タンパク質で、主に血管内皮細胞に発現して血液凝固を負に制御している (図 1)。

TM の細胞外ドメインからなる遺伝子組換え TM 製剤 (rTM) は播種性血管内凝固症候群 (Disseminated Intravascular Coagulation, DIC) に対する治療薬として 2008 年から日本で使用されている。我々のグループのこれまでの研究では TM の 5 番目の上皮細胞増殖因子様ドメイン (TME5) は抗炎症作用、また血管新生促進作用及び血管



図① トロンボモジュリンの構造

内皮細胞保護作用を持つことを報告し (3, 4, 5, 6) その機能は、内皮細胞上のケモカイン受容体 GPR15 (G-protein coupled receptor-15) を介して発揮されることを報告した (7)。

2. 研究の目的

本研究で、IPF の病態解明と TM 由来ペプチドによる新規 IPF 治療の開発を目指す。

培養ヒト肺胞上皮細胞や肺線維芽細胞に対して TM の細胞保護作用、抗炎症作用、細胞増殖抑制作用、またそのメカニズムを明らかにする。

IPF の進展に炎症、上皮細胞障害、血液凝固因子の関与を検討する。

TM 由来ペプチドは IPF マウスモデルでの効果を検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト肺胞上皮細胞や肺線維芽細胞を使用した in vitro の実験

TM 由来ペプチドのヒト上皮細胞保護作用を検討する

TGF- β (transformation growth factor) の存在下でヒト肺胞上皮細胞 A549 を培養し、上皮間葉移行 (Epithelial-mesenchymal transformation, EMT) を誘導する。この培養系に rTM を添加してその効果を検討する。TGF- β に誘導された E-cadherin の発現低下をウエスタンブロット (Western-blot) 法によるタンパク質発現量の定量化で評価する。

TM 由来ペプチドのヒト肺線維芽細胞増殖抑制作用を検討する

TGF- β によりヒト肺線維芽細胞 WI-38 を刺激し、collagen と α -SMA (α -smooth muscle actin) mRNA 発現を定量的 real-time RT-PCR で評価する。WI-38 細胞での collagen や α -SMA mRNA 発現亢進に対する rTM の影響を同様の方法で検討する。

(2) Bleomycin (BLM) 誘発 IPF マウスモデルで肺胞上皮細胞障害と線維化形成のクロストークの解明と TM 由来ペプチドの効果を検討する。

我々の既報 (8) に従い、8 週 ~ 12 週の野生型 (wild type, WT) (C57BL/6) マウスに BLM (1mg/kg) を経気管内投与し、肺障害を誘発する。rTM (2.5mg/kg) あるいはコントロール溶媒

(生理食塩水)を連日腹腔内投与して、BLM 投与 7, 14, 21 日後マウス肺胞洗浄液 (BAL) 中の細胞所見及び肺胞上皮細胞における EMT、肺線維化を比較検討する。

rTM の抗線維化作用における GPR15 の役割を検討する。

WT マウス及び GPR15 欠損 (GPR15 KO) マウスにおいて、上記 と同様に検討する。

BLM による肺線維化における GPR15 の作用を検討する。

まずは上記 の方法で BLM を WT 及び GPR15 KO マウスに気管内投与し、BLM 投与 7, 14, 21 日後に と同様の項目を比較検討する。次に、WT マウスに BLM を気管内投与し、連日生理食塩水 (コントロール群) または recombinant GPR15 ligand (rGPR15-L) (500nM/body) を腹腔内注射、BLM 投与 7 日及び 14 日後 と同様の項目を検討する。

4. 研究成果

rTM は TGF- β による A549 での EMT 及び WI-38 のコラーゲン産生増加を抑制する。

A549 細胞における TGF- β を培養液に添加することで E-cadherin の発現低下が誘導され、rTM の前処置 (pre-TM) は E-cadherin の発現低下を改善した。また、WI-38 細胞においては TGF- β 刺激によって type I collagen (COL1A1) と α -SMA mRNA 発現が増加されたが、rTM 添加 (pre-TM) により、この発現増加が著明に抑制された。

BLM によるマウス肺線維化に対して rTM の効果がある。

野生型マウスに BLM を気管内投与し肺線維化を誘発した。BLM 投与 7, 14, 21 日後に rTM 投与の有無で下記の項目を比較検討した。

a. BLM 投与後 BAL 液中の細胞所見を分析した。

BLM 投与 7 日 (D7) 及び 14 日 (D14) 後に BAL 液内の総細胞数及びリンパ球とマクロファージの増加を認めた。rTM の連日投与はこれらの細胞増加を抑制した。

b. BLM 投与後の肺組織における EMT 及びコラーゲン産生を検討した。

BLM 投与 7 日後に肺組織の E-cadherin 発現低下が Western-blot 方法で検出された。rTM 連日投与マウスは肺組織の E-cadherin 減少が軽症であった。また、BLM 投与後 14 日の肺組織にて、collagen と α -SMA mRNA 発現増加が見られ、rTM は BLM による肺組織のこれら発現増加を抑制し、BLM が誘導する肺線維化における rTM 抑制効果が示された。BLM 投与 14 日後の肺組織における病理学的分析では、rTM 投与により BLM が誘導する肺障害及び線維化形成を抑制することが確認された。

rTM の抗線維化作用における GPR15 の役割

上記 と同様の方法で、WT マウス及び GPR15 KO マウスに BLM を気管内投与し、コントロールの生理食塩水又は rTM を連日腹腔内投与 7 日及び 14 日後に以下の項目を検討した。

a. まずは WT マウスと GPR15 KO マウス肺組織の GPR15 発現を real-time PCR 方法で比較検討した。GPR15 KO マウス肺組織では GPR15 の欠損が確認された。WT マウスでは BLM 刺激により GPR15 の発現増加がみられた (図)。

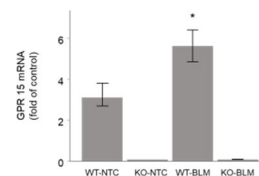


図2: GPR15 expression in wild type (WT) and GPR15 knockout (KO) mouse lung tissue. BLM induced an increase in GPR15 expression after BLM 3days. *: p<0.05 vs. WT-NTC group. Mean \pm SEM. NTC: non-treatment control; BLM: Bleomycin.

b. BLM マウス気管内投与 7 日及び 14 日後、WT マウスと比較して、GPR15 KO マウス BAL 中の総細胞数またリンパ球数及びマクロファージ数は有意に増加し、それらの増加に対して rTM の抑制作用が WT マウスにおいて認められたが、GPR15 KO マウスには同様の効果が得られなかった (Figure 1)。同様に、BLM 投与 14 日後の肺組織 collagen と α -SMA の発現増加に対して rTM の抑制作用は WT マウスでは示されたが、GPR15 KO マウスでは認めなかった。BLM による肺線維化に対する rTM 作用のメカニズムには GPR15 が重要であると考えられる。

BLM による肺線維化における GPR15 の作用

まずは上記の方法で BLM を WT 及び GPR15 KO マウスに気管内投与し、BLM 投与 7, 14, 21 日後に以下の項目を比較検討した。次に、WT マウスに BLM を気管内投与し、連日生理食塩水または rGPR15-L を腹腔内注射、BLM 投与 7 日及び 14 日後に以下の項目を検討した。

a. BLM 投与 7 日、14 日及び 21 日後の BAL 細胞において、GPR15 KO マウスは WT マウスと比較して、BAL 中の総細胞数及びリンパ球、マクロファージの増加が見られた。さらに、BAL 細胞を Flow cytometer により同定し、BLM 投与 7 日後 CD4⁺及び CD8⁺リンパ球はともに増加していた。BLM 投与 21 日後における WT マウスでは CD8⁺リンパ球の低下が見られたが、GPR15 KO マウスでは CD8⁺リンパ球の継続的な増加が示された (Figure 2)。

b. GPR15 KO マウスでは WT マウスと比較して、BLM 投与 14 日後の肺組織では、type I, collagen と α -SMA mRNA 発現の増加を認めた、また、BLM 投与 21 日後では肺組織 collagen 定量の増加を認めた。さらに、GPR15 欠損マウスでは BLM 投与による肺線維化が WT マウスと比較し重症化していることが示唆された。

c. 野生型マウスに BLM 投与 7 日及び 14 日後、BAL 細胞所見における rGPR15-L の連日投与は総細胞数及びリンパ球数増加を抑制した。また、rGPR15-L は BLM 投与による誘導された肺組織 HMGB1 (High-mobility group box 1) mRNA 発現増加を抑制した。さらに、病理学分析にて、rGPR15-L は肺組織の炎症及び線維化を抑制することを示した。

今回の検討では、*in vitro* 実験においてヒト肺胞上皮細胞の EMT 及びヒト肺線維芽細胞の collagen、 α -SMA 産生増加が rTM により抑制されたことが示された。また、BLM 気管支投与による肺線維化マウスモデルにおいて、BAL 液中のリンパ球及びマクロファージ中心とした細胞の増加を rTM が抑制し、マウスの肺組織における collagen や α -SMA 発現増加を rTM が抑制することが示唆された。さらに、この rTM の作用は GPR15 欠損マウスにおいて認められなかったことから、rTM の作用機序の一部において GPR15 が重要な役割を演じている可能性が示唆された。さらに興味深いことに、GPR15 欠損マウスにおいて、BLM 気管内投与による肺線維化マウスの BAL 中のリンパ球は継続的に増加し、肺線維化は WT マウスより重症化していた。さらに、GPR15 ligand を投与することによって、リンパ球の肺胞への遊走増加及び肺組織の HMGB1 発現増加が抑制されたことが示された。GPR15 は BLM による肺線維化及び肺障害を抑制することが明らかになり、その詳細なメカニズムは今後解析予定である。

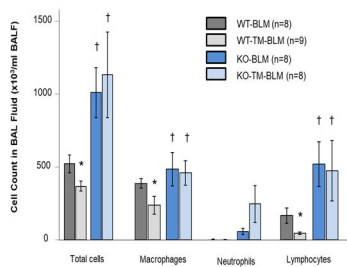


Figure 1. Bronchoalveolar Lavage (BAL) Fluid Findings at 7 days after Intratracheal BLM Administration with or without thrombomodulin (TM) treatment in WT and GPR15 KO mouse. TM reduced the total cell count and macrophage, lymphocytes in WT mouse but not in GPR15 ko mouse. *: $p < 0.05$ vs. BLM in WT mouse, †: vs. WT mouse. Mean \pm SEM.

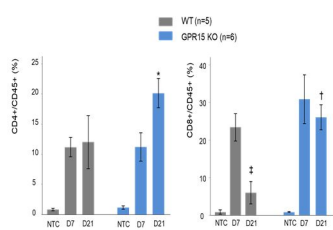


Figure 2. Flow cytometer analysis for BAL fluid cells. CD4-positive and CD8-positive lymphocyte in the BAL fluid of wild type (WT) and GPR15 knockout (GPR15 KO) mice at 7days (D7) and 21days (D21) after Intratracheal BLM Administration. *: $p < 0.05$ vs. WT group after D21 BLM; †: $p < 0.01$ vs. the WT group after D21, ‡: vs. D7 WT group. NTC: non-treatment control.

引用文献

- (1) Kubo H, Nakayama K, Yanai M, et al. Anticoagulant therapy for idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 2005; 128: 1475-1482.
- (2) Noth I, Anstrom KJ, Calvert SB, et al. A placebo-controlled randomized trial of warfarin in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; 186: 88-95, 2012.
- (3) Pan B, Wang X, Kojima S, et al. The fifth epidermal growth factor-like region of thrombomodulin alleviates murine graft-versus-host disease in a G-protein coupled receptor 15 dependent manner. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2017; 23 (5), 746-756.
- (4) Pan B, Wang X, Kojima S, et al. The fifth epidermal growth factor like region of thrombomodulin alleviates LPS-induced sepsis through interacting with GPR15. *Thrombosis and Haemostasis*. 2017; 117 (3), 570-579.
- (5) Ikezoe T, Yang J, Nishioka C, et al. Thrombomodulin protects endothelial cells from a calcineurin inhibitor-induced cytotoxicity by upregulation of extracellular signal-regulated kinase/myeloid leukemia cell-1 signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012; 32: 2259–2270.
- (6) Ikezoe T, Yang J, Nishioka C, et al. The fifth epidermal growth factor-like region of thrombomodulin exerts cytoprotective function and prevents SOS in a murine model. *Bone Marrow Transplantation*. 2017; 52 (1), 73-79.
- (7) Pan B, Wang X, Nishioka C, et al. G-protein coupled receptor 15 mediates angiogenesis and cytoprotective function of thrombomodulin. *Scientific Reports*. 2017; 7 (1), 692.
- (8) Misa K, Tanino Y, Wang X, et al. Involvement of midkine in the development of pulmonary Fibrosis. *Physiological Reports*. 2017; 5(16): e13383.

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
研究分担者	池添 隆之 (Ikezoe Takayuki) (80294833)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	

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