

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17668

研究課題名(和文)自然免疫系から見た間質性肺炎新規治療法の開発

研究課題名(英文) Finding a new strategy for the treatment of interstitial pneumonia with Innate immunity system

研究代表者

石井 崇史 (Ishii, Takashi)

東京大学・保健・健康推進本部・助教

研究者番号：30803118

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)：本研究では、間質性肺炎/肺繊維症におけるMDA5の役割を検証している。MDA5はウイルス核酸を認識する自然免疫系の受容体の1つで、MDA5を欠損したマウスと野生型マウスとの肺繊維症モデル(ブレオマイシン投与による)における比較から、MDA5は肺繊維症において保護的な役割を果たすと考えられた。その機序としてブレオマイシン投与後の好中球の増多やマクロファージの活性化、好中球を誘導するT細胞(免疫細胞の1種)の活性化をMDA5が制御している可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間質性肺炎/肺線維症は治療薬が十分になく、予後不良の疾患である。間質性肺炎の病態はマクロファージや好中球のような自然免疫系細胞が関わっており、肺胞上皮や線維芽細胞などの構造細胞との相互作用が考えられるが、その機序や自然免疫系との関わりはいずれも十分に解明されていない。今回ウイルス核酸を認識する自然免疫受容体MDA5に焦点を当て、MDA5の間質性肺炎における新しい役割の解明を行った事でMDA5の機能に基づいた間質性肺炎に対する新しい治療候補として今後発展しうると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of MDA5, one of innate immune receptors that recognizes viral nuclear acid, in the pathogenesis of interstitial pneumonia/ lung fibrosis. Comparing the lung fibrosis model induced by bleomycin between wild-type and MDA5 deficient mice, we assume that MDA5 plays a protective role in the pathogenesis of lung fibrosis. We further demonstrated that MDA5 may regulate the activation of macrophages, the increase on lung neutrophils, and the function of Th17 cells which are involved in activity of neutrophils.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺繊維症 間質性肺炎 自然免疫系

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)自然免疫系は病原体構成成分や組織損傷時に放出される生体内構成成分を自然免疫受容体が認識して活性化され、感染防御に重要な役割を果たしている。一方で自然免疫受容体の中には、呼吸器疾患の病態に関わっていることが指摘されている。間質性肺炎/肺線維症は慢性進行性疾患であり、治療としては抗線維化薬や病状によってはステロイドや免疫抑制薬が用いられるが効果は限定的である。肺線維化病態において線維芽細胞や筋線維芽細胞、内皮細胞のような組織構成細胞が関与している事が指摘されている一方で、自然免疫系に関わりの深いマクロファージや好中球も肺線維化への関与が示唆されている。

(2)melanoma differentiation-associated gene 5 (MDA5)は自然免疫受容体の一つで、細胞質に存在し、ウイルス由来 RNA を認識後に活性化され、type 1 インターフェロンなどを分泌してウイルス感染防御に重要な役割を果たしている。また、膠原病である皮膚筋炎は間質性肺炎を合併する事で知られているが、この中には感冒などを契機に間質性肺炎や皮膚症状が先行して起こる amyopathic DM と呼ばれる亜型が存在し、間質性肺炎が難治かつ急速進行性である。患者血清からは抗 MDA5 抗体が検出され、病態形成に関わっていると推察される。また、MDA5 をコードする遺伝子 IFIH1 に変異をもつ疾患はヒトでも存在し、遺伝性の脳症である Aicardi-Goutières syndrome の亜型では IFIH1 gain-of-function 型の変異を持つ。一方、IFIH1 loss-of-function 型変異疾患も存在し、上気道感染を幼少期に反復する症例が報告され、この中では慢性肺疾患を持つ事が指摘されている。

(3)以上より RNA 認識受容体、特に MDA5 の呼吸器疾患病態への関与を解明する価値があると考えられた。本研究では自然免疫系が呼吸器疾患病態にどのように関わっているか、を大卒の学術的問いとして設定し、標的分子として主に MDA5 に焦点を当て、間質性肺炎/肺線維症への役割を追究した。

2. 研究の目的

主に MDA5 に着目して間質性肺炎/肺線維症の病態での役割を検証し、それにマクロファージや好中球、リンパ球の免疫系細胞や、線維芽細胞や肺胞上皮細胞の構造細胞がどのように関わるかを明らかにする事で細胞ネットワーク、相互作用を含めて明らかにする事で新規創薬への 1st step とする事を目指す。

3. 研究の方法

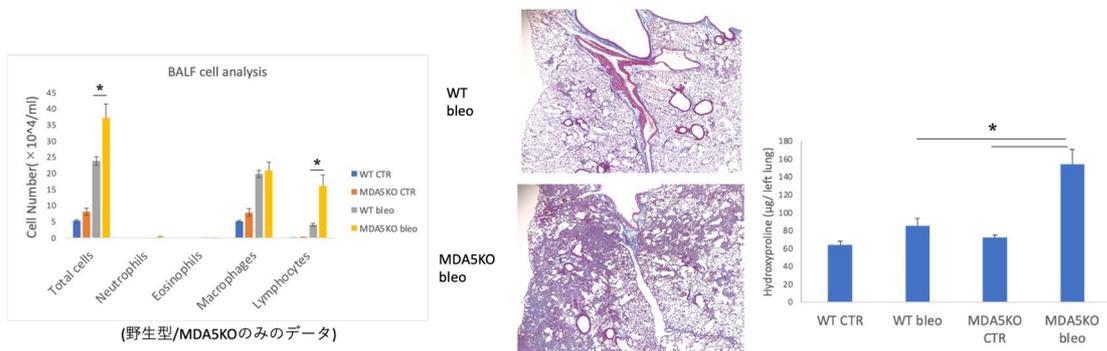
(1) C57BL/6N マウスにブレオマイシン経気道的投与により、肺線維症を惹起させる動物モデルを用いた(投与後3週)。野生型と MDA5 KO マウス、MAVS KO マウス(MAVS:ウイルス核酸認識シグナリングにおいて核酸結合した MDA5 と結合する分子)間で肺線維症病態の比較を行なった。評価項目は以下とした。気管支肺胞洗浄液細胞数、肺組織病理像による線維化病変分布の評価/動物用 micro CT における間質性病変評価、線維化に関与するメディエーターの肺組織由来 RNA を用いた qPCR による測定、肺コラーゲン量の測定、呼吸機能測定装置を用いた肺機能測定。

(2) 野生型と MDA5KO マウスにブレオマイシン投与後肺を蛍光抗体処理後フローサイトメトリーを施行し好中球、マクロファージを特定し、ソーティングを行なった。各細胞由来 RNA を回収し、qPCR を行なった。また、IL-17 陽性 CD4⁺ T 細胞を細胞内染色を用いて同定した。

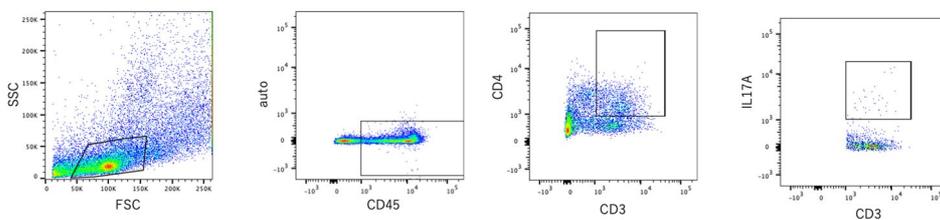
(3) ヒト単球細胞株の U937 に siRNA を用いて IFIH1(MDA5 遺伝子名)の発現抑制を起こした細胞を作成した。この系にブレオマイシンを投与し、細胞死比率の測定と qPCR による遺伝子発現測定を行なった。野生型/MDA5KO マウスの骨髓細胞を取り出し、M-CSF を添加した培地によりマクロファージを分化させた。この骨髓マクロファージを用いてブレオマイシンを投与し、遺伝子発現変化を qPCR を用いて調べた。

4. 研究成果

(1) ブレオマイシン経気道的投与により、気管支肺胞洗浄液細胞数の増多(下左図)、動物用 microCT で肺線維症の特徴を持つ陰影の確認を行い、肺線維化に関わるメディエーターの発現上昇、肺内コラーゲン沈着の増加や肺組織病理像での線維化病変の進行を認めた(下中図)。また、肺コラーゲン量の増加も認めた(下右図)。また、肺免疫細胞の解析を行い、マクロファージやリンパ球、樹状細胞などの肺の線維化に関わる細胞群の変動を認めた。この肺線維症のモデルにおいて、MDA5KO マウスと MAVSKO マウス、野生型マウスの間で比較すると線維化病変の広がりや気管支肺胞洗浄液のリンパ球数、肺由来 RNA を用いた qPCR における Col1a1 FN1 などの線維化マーカーの発現、好中球増多に関与する IL-17a 発現が MDA5KO にて増悪傾向を認めた。



(2) プレオマイシン投与後肺より単細胞懸濁液を作成し細胞分画を解析した所、好中球分画比率の増多と炎症性サイトカイン MIP-2 発現の上昇を認めた。公開データベースにおいて MDA5 の発現がマクロファージの特定分画においてより顕著である事から、プレオマイシン投与後の肺よりこの細胞集団を分離して RNA-seq により網羅的解析を行なっている。また IL-17A 陽性の CD4⁺ T cell を以下の通り同定し、MDA5KO 肺において野生型より同細胞は増多傾向となっていた。



(3) U937 に control/IFIH1 siRNA 投与後にプレオマイシンを投与した所、細胞死比率や CCL2 などの炎症性メディエーター発現が IFIH1 抑制群において増加が認められた。現在正常線維芽細胞との共培養で繊維化マーカーに相違が観察されるかを解析中である。また、マウス骨髄マクロファージにおいても上記と類似結果が得られ、RNA-seq にて遺伝子発現プロファイルを網羅的解析すると共に、これらを野生型マウスに移植する事で起こる肺繊維化に関して評価している。

(4) 以上より、MDA5 はプレオマイシン誘発肺繊維症において保護的な役割を持つと考えられ、その機序としてマクロファージや好中球の活性制御が考えられた。今後、更に詳細な細胞レベルでの解析を進めていき、肺繊維症の進行を抑制する核酸やペプチドを含めた創薬候補同定を目指す。

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