

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08560

研究課題名(和文)代謝リプログラミングによる細胞分化誘導に着目した肺の線維化進展メカニズムの解明

研究課題名(英文)The Role of Metabolic Reprogramming-Induced Cell Differentiation in the Development of Pulmonary Fibrosis

研究代表者

松野 洋輔 (Matsuno, Yosuke)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：30633177

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)：ミトコンドリアは細胞内の代謝を司り、その機能の低下は代謝経路を改変させて細胞の機能に重大な影響を及ぼす。ミトコンドリアゲノムの変異によりミトコンドリア機能が低下したミトマウスを用い、肺線維化におけるミトコンドリアの役割の解明を目的として本研究を行った。プレオマイシンで誘導される肺の線維化はミトマウスでは増強していた。ミトマウス由来の肺線維芽細胞では、TGF- β 1による筋線維芽細胞への分化が増強しており、コラーゲン生合成に必要な代謝経路の活性化を伴っていた。ミトコンドリアは、線維芽細胞において代謝様式の改変と病的な細胞分化を誘導し、肺の線維化進展に寄与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、肺線維化の病態においては、ミトコンドリアの機能障害を含め、様々な老化と関連した細胞形質の存在が知られていたが、ミトコンドリアが肺線維化で担う独自の役割は不明であった。本研究はミトマウスを用いることにより、ミトコンドリア機能障害が、単独で肺の線維化進展に寄与すること、線維化と関連した線維芽細胞の分化を誘導すること、を初めて明らかにした。本研究を礎として、ミトコンドリアを標的とした肺線維症の新たな診断・治療方法の開発が進展することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Mitochondria plays a crucial role in regulating intracellular metabolism, and loss of mitochondrial function has a profound effect on cell function by altering metabolic pathways. We conducted this study to elucidate the role of mitochondria in lung fibrosis using mito-mice with impaired mitochondrial function due to mutations in the mitochondrial genome. Lung fibrosis induced by bleomycin was enhanced in Mito mice. In lung fibroblasts from Mito mice, TGF- β 1-induced differentiation into myofibroblasts was enhanced, accompanied by activation of metabolic pathways required for collagen biosynthesis. Mitochondria may contribute to the development of lung fibrosis by inducing metabolic reprogramming and pathological differentiation in fibroblast.

研究分野：びまん性肺疾患

キーワード：肺線維症 ミトコンドリア 線維芽細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (Idiopathic Pulmonary Fibrosis: IPF) は非可逆的な線維化が進行性に悪化する予後不良の疾患である。IPF の進展には、上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT)、線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化、肺泡マクロファージの M2 への分化、といった細胞の分化異常が関わり、そのメカニズムの解明と制御は、IPF の進行を抑えるために重要である。

近年、肺線維化における代謝産物の担う役割が注目されている。活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) は酸化ストレスを引き起こし、肺の炎症や線維化の進展に重要な役割を担う (Kikuchi, Ishii et al. Am J Resp Cell Mol Biol 2011) が、TGF- β 1 で誘導される肺泡上皮の EMT では、ROS はシグナル伝達物質として EMT の誘導に寄与する (Matsuno et al. Int J Biochem Cell Biol 2012、Matsuno et al. ATS conference 2018)。また IPF 肺では、解糖系亢進により乳酸が増加しているが、乳酸は筋線維芽細胞や M2 マクロファージへの分化を促進する (Kottmann et al. Am J Resp Crit Care Med 2012)。

ミトコンドリアは、ATP 産生と恒常性維持において重要な役割を担う細胞内小器官である。ATP 合成は ROS 産生を伴い、ミトコンドリアは細胞における ROS の主要な産生源となっている。ミトコンドリア機能の低下は、代謝様式を改変し、ROS や乳酸の産生を増加させる。IPF 肺では、ミトコンドリア機能の低下を含め、老化と関連した様々な細胞形質の変化が報告されているが、ミトコンドリア機能障害が、IPF の病態で担う独自の役割は不明である。

2. 研究の目的

ミトコンドリア ND6 遺伝子の変異によりミトコンドリア機能が低下したミトマウスを用い、ミトコンドリアが、肺の細胞の代謝と分化の調節を通して、肺線維症で担う役割を明らかにする。特に ROS や乳酸に着目し、これらの代謝産物や関連する代謝経路が、マクロファージや線維芽細胞の病的な分化で担う役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) プレオマイシン誘導肺線維症モデルにおけるミトコンドリアの役割の解析

野生型マウスとミトマウスに、プレオマイシンを投与して肺線維症を誘導し、肺での炎症 (気管支肺胞洗浄、炎症性サイトカイン・ケモカインの発現)、線維化 (病理学的評価に基づいたスコア、ヒドロキシプロリン定量)、代謝様式 (乳酸産生) を比較・検討する。

(2) 線維化と関連した細胞分化におけるミトコンドリアの役割の解析

野生型マウスとミトマウスより骨髓由来マクロファージ (Bone Marrow Derived Macrophages: BMDM) を単離し、IL-4+IL-13 または IFN- γ +LPS にて刺激を行い、それぞれ M2 (TGF- β 1、Arginase の発現)、M1 (TNF- α の発現) への分化を比較する。また両マウスの肺より線維芽細胞を単離し、TGF- β 1 による筋線維芽細胞への分化 (α -smooth muscle actin (SMA) の発現) を比較する。

4. 研究成果

(1) 肺線維化形成におけるミトコンドリアの役割

プレオマイシン投与後の気管支肺胞洗浄、肺での炎症性サイトカイン・ケモカインの発現は、野生型マウスとミトマウスの間に違いは見られず、ミトコンドリアがプレオマイシンによる肺の炎症に与える影響は小さいと考えられた。一方、病理組織像、肺線維化のスコア、肺のヒドロキシプロリンの定量から、ミトコンドリア機能障害はプレオマイシンによる肺の線維化を増強させることが明らかとなった (図 1)。プレオマイシン投与により肺での乳酸産生が増加したが、ミトマウスにおいては、プレオマイシン投与後においてのみ、野生型マウスと較べて乳酸が増加していた (図 2)。

以上、ミトコンドリアの機能障害は、肺の炎症には影響を与えずに、代謝経路の改変を伴い、プレオマイシンによる肺線維化を増強させることが示唆された。

(2) 細胞分化におけるミトコンドリアの役割

BMDM の M1/M2 への分化は野生型マウスとミトマウスで違いを認めず、ミトコンドリアがマクロファージの M1/M2 分化に及ぼす影響は小さいと考えられた。

TGF- β 1 刺激後の α -SMA の発現は、ミトマウス由来の線維芽細胞でより増強していた。また

コラーゲン生合成に必要なセリン-グリシン経路は、TGF- β 1 刺激で活性化されたが、ミトマス由来の線維芽細胞においてより増強していた(図 3)。

以上より、線維芽細胞におけるミトコンドリアの機能障害は、代謝リプログラミングとともに、TGF- β 1 による筋線維芽細胞への分化を促進させることが明らかとなった。

これらの結果から、ミトコンドリアは、代謝を通じて線維芽細胞の分化に影響を及ぼし、肺の線維化進展に寄与することが示唆された。

図 1. 生食(NS)またはブレオマイシン(BLM)投与後の野生型マウス(Wild)またはミトマス(ND6^M)における肺組織(上)、肺線維化スコア(Ashcroft score、下左)、肺のヒドロキシプロリン定量(下右)

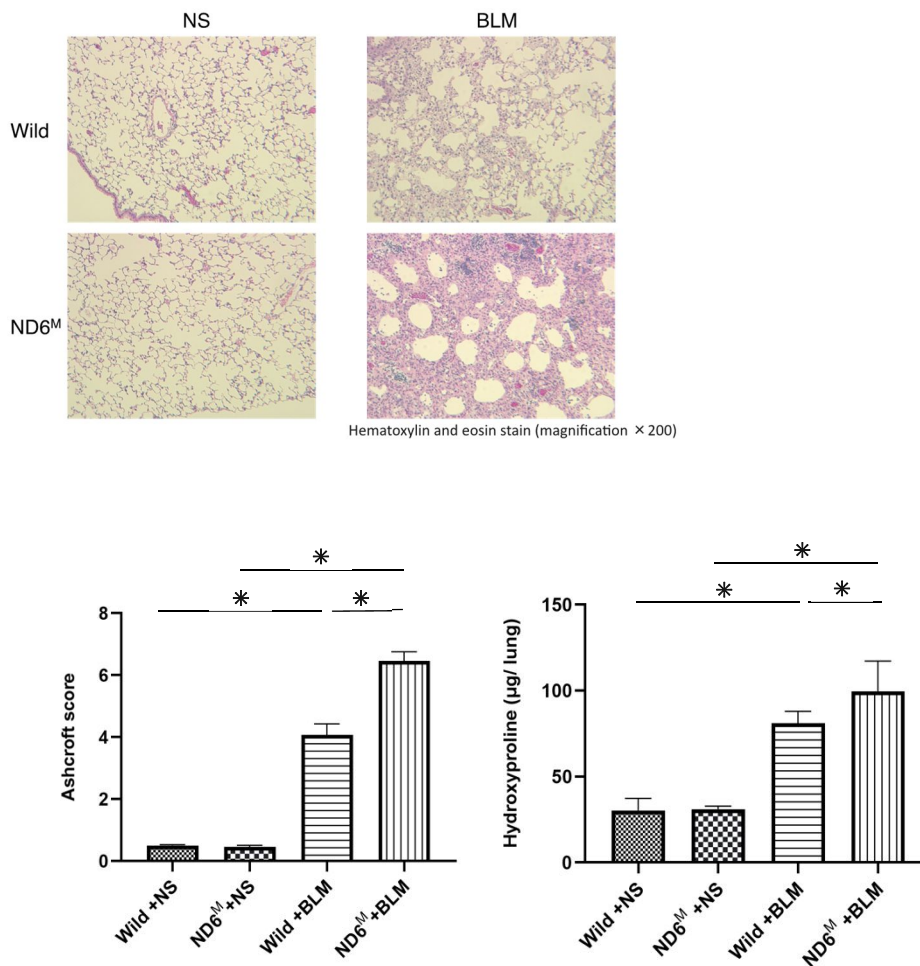


図2. 生食(NS)またはプレオマイシン(BLM)投与後の野生型マウス(Wild)またはミトマウス(ND6^M)における肺での乳酸産生

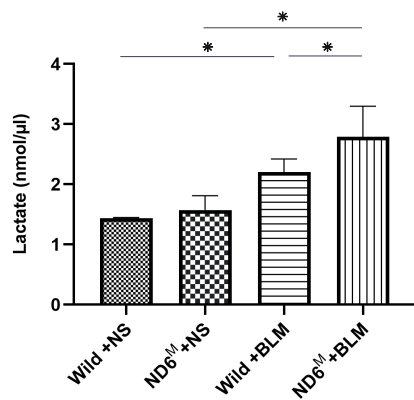
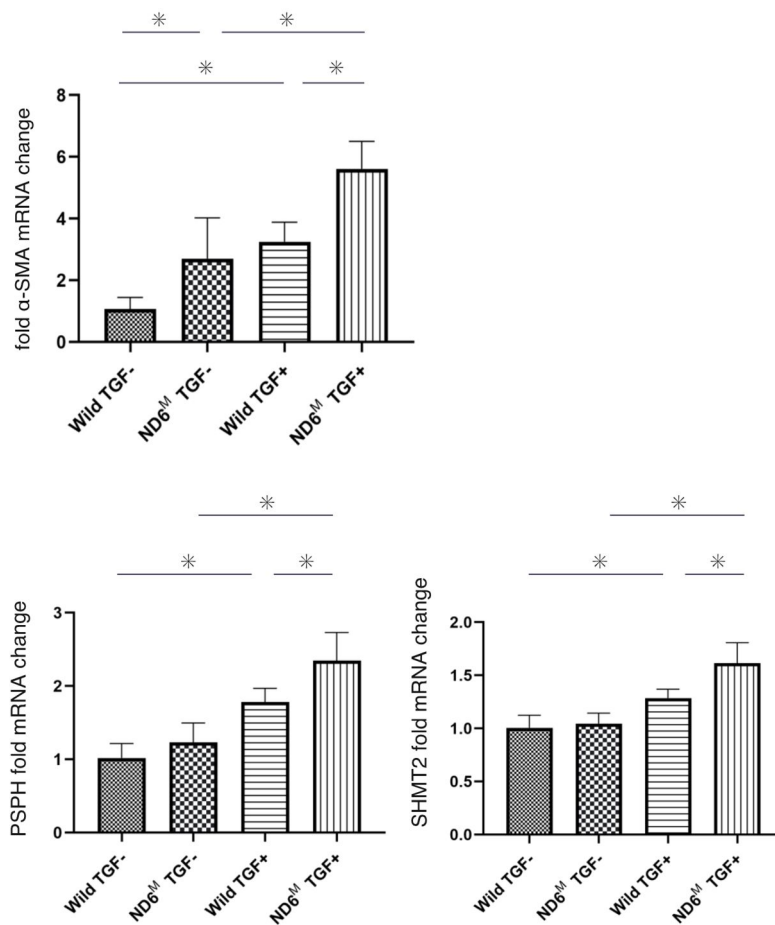


図3. Vehicle(TGF-)またはTGF-β1(TGF+)で刺激した後の、野生型マウス(Wild)またはミトマウス(ND6^M)肺から単離した線維芽細胞におけるα-SMA(上), phosphoserine phosphatase (PSPH、下左)、serine hydroxymethyltransferase 2 (SHMT2、下右) mRNA 発現



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 1件）

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 Kai Yazaki, Yosuke Matsuno, Kazufumi Yoshida, Mingma Sherpa, Masayuki Nakajima, Masashi Matsuyama, Takumi Kiwamoto, Yuko Morishima, Yukio Ishii, Nobuyuki Hizawa | 4. 巻 100 |
| 2. 論文標題 ROS-Nrf2 pathway mediates the development of TGF- 1-induced epithelial-mesenchymal transition through the activation of Notch signaling | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 European Journal of Cell Biology | 6. 最初と最後の頁 151181 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejcb.2021.151181 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔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 矢崎海, 松野洋輔, 蔵本健矢, Sherpa Mingma, 吉田和史, 松山政史, 際本拓未, 森島祐子, 石井幸雄, 檜澤伸之 |
| 2. 発表標題 肺線維症におけるミトコンドリア依存的代謝リプログラミングの役割 |
| 3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kai Yazaki, Yosuke Matsuno, Kenya Kuramoto, Mingma Sherpa, Kazufumi Yoshida, Masashi Matsuyama, Takumi Kiwamoto, Yuko Morishima, Nobuyuki Hizawa |
| 2. 発表標題 The Role of Mitochondria-Dependent Metabolic Reprogramming in the Pathogenesis of Pulmonary Fibrosis |
| 3. 学会等名 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology 2021 in Kyoto, Japan (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 矢崎海, 松野洋輔, 大澤, Sherpa Mingma, 吉田和史, 中嶋真之, 松山政史, 際本拓未, 森島祐子, 檜澤伸之 |
| 2. 発表標題 TGF- 1誘導上皮間葉転換におけるROS-Nrf2経路とNotch経路の相互作用の検討 |
| 3. 学会等名 第60回呼吸器学会学術集会 |
| 4. 発表年 2020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 | 石井 幸雄 (Ishii Yukio) (80272194) | 筑波大学・医学医療系・教授 (12102) | |

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