

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17747

研究課題名（和文）高ヒスチジン糖タンパク質に着目した肺線維化疾患に対する新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel therapy for interstitial lung disease focused on histidine-rich glycoprotein

研究代表者

塩谷 俊雄（Shiotani, Toshio）

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：90851246

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、（1）肺線維症（IPF）患者における血漿中の高ヒスチジン糖タンパク質（HRG）濃度の測定と、（2）肺移植後原発性移植片機能不全（PGD）における血漿中のHRG濃度の測定、（3）マウス虚血再灌流障害（IRI）モデルを用いた急性肺障害におけるHRG濃度の測定を行った。（1）血漿HRGはIPF患者で低下していた。（2）重症PGD患者においても血漿HRG濃度は低下しており、（3）マウスIRIモデルにおいてもHRG濃度は低下していた。ヒト由来HRGの補充は急性肺障害および慢性肺障害における新たな治療戦略となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間質性肺炎は慢性炎症による肺疾患の一つであり、現在TGF- β 等を標的とした抗線維化薬をはじめ、複数の薬剤による治療が行われるが、その治療法は確立しておらず、肺線維化を引き起こす経路を標的とした治療法の確立が急務とされている。また、間質性肺炎の最終的な治療として肺移植が行われるが、肺移植後の原発性移植片機能不全は、肺移植後に発症する急性肺障害であり、肺移植の予後を妨げる一因となっている。本研究結果により、高ヒスチジン糖タンパク質の補充療法が間質性肺炎や原発性移植片機能不全の新規治療法として応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we first measured plasma levels of histidine-rich glycoprotein (HRG) in patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). Second, plasma HRG levels were measured in primary graft dysfunction (PGD) after lung transplantation. Finally, plasma HRG levels were measured in acute lung injury using a mouse model of ischemia-reperfusion injury. Plasma HRG levels were decreased in IPF and PGD patients, and plasma HRG levels were also decreased in the mouse IRI model, suggesting that supplemental HRG therapy may be a new therapeutic strategy in acute and chronic lung injury.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：高ヒスチジン糖タンパク質（HRG）、間質性肺炎、肺移植、原発性移植片機能不全（PGD）、バイオマーカー、新規治療法、虚血再灌流障害（IRI）、肺線維症（IPF）

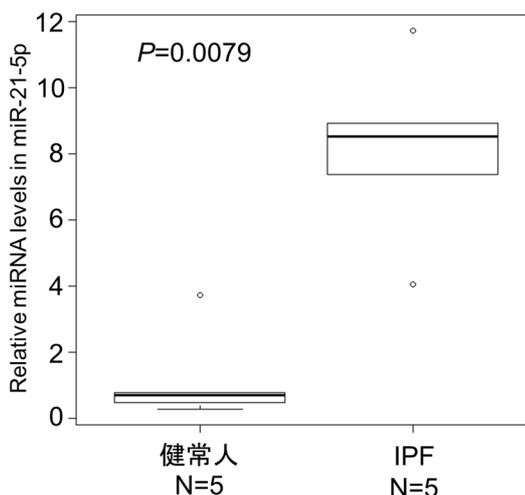
科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 間質性肺炎における miRNA 発現

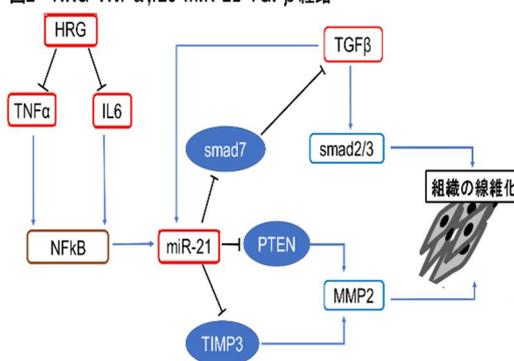
間質性肺炎はびまん性肺疾患に属し、病理学的に細胞間質または細気管支周囲間質に線維化を来す疾患群である。職業性や環境性、薬剤性など原因の明らかなものもあるが、多くは原因不明の特発性肺線維症 (Idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) である。肺の線維化を来す原因として、局所炎症刺激等により炎症性サイトカインが産生され、平滑筋アクチン (SMA) や細胞外マトリックスタンパク質を過剰産生することが示唆されている。IPF の予後は不良であり、生存期間中央値は約 3 年と報告されている (Natsuzaka M, et al. Am J Respir Crit Care Med 2014)。薬物治療として、現在 TGF- β 等を標的とした抗線維化薬をはじめ、複数の薬剤による治療が行われるが、その効果は確立していない。肺移植が最終的な治療となるが、本邦における脳死肺移植の平均待機期間は約 2.5 年であり、肺移植待機患者の死因第一位となっている。このため、肺線維化を引き起こす経路を標的とした、治療の確立が急務である。

図1 IPFにおけるmiR-21の過剰発現



研究責任者は、肺移植の適応となった IPF 患者血漿中の miRNA を網羅的に解析し、miR-21 が過剰発現していることを確認した (図 1)。miRNA は 22 塩基以下からなる non-coding RNA であり、メッセンジャーRNA (mRNA) がタンパク質に翻訳されることを阻害・抑制する。1 つの miRNA は複数の mRNA をターゲットとしており、いわばマルチプレイヤーの性格を有する。miR-21 は TNF- β や IL-6 により発現がポジティブに制御されている。また、miR-21 は smad7、PTEN、TIMP3 の mRNA を標的とし、これらのタンパク質をネガティブに制御している。すなわち、TNF- β や IL-6 により miR-21 が過剰発現すると、smad7 や PTEN、TIMP3 が抑制され、TGF- β の発現が亢進する。TGF- β は組織の線維化を亢進する分子であるため、TGF- β の過剰発現により、線維化が進行することが考えられる (図 2)。

図2 HRG-TNF α , IL6-miR-21-TGF β 経路



(2) 高ヒスチジン糖タンパク質 (HRG) による IPF の抑制

血漿タンパク質である高ヒスチジン糖タンパク質 (Histidine-rich glycoprotein, HRG) は、炎症性サイトカインの発現を抑制し、循環血液中の好中球と血管内皮細胞の静穏化の維持に極めて重要な働きをしている、生体自身が有している抗炎症タンパク質である。先行研究では、マウス敗血症モデルに対しヒト由来の HRG を投与することで、TNF- β や IL-6 等の炎症性サイトカインが抑制され、敗血症マウスの生存率が劇的に改善した (Wake H, Nishibori M, et al. EBioMedicine 2016)。本研究ではマウス肺線維症モデルを用いて、ヒト由来抗炎症タンパク質である HRG が慢性炎症による肺線維化を抑制するか、その効果を検討し、肺線維化をきたす肺疾患に対する新規治療法の確立を目指す。

(3) HRG による肺移植後原発性移植片機能不全 (PGD) の抑制

肺移植後の PGD の病態は敗血症における急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) と似ており、炎症性サイトカインによって発症する。虚血再灌流障害 (IRI) が原因と報告されており、重症 PGD は肺移植後の長期生存を妨げる一因となっている。さらに慢性拒絶反応 (CLAD) を惹起するとも報告されている (Hsiao HM, Kreisel D, et al. Curr Opin Organ Transplantation 2017)。先行研究では、マウス敗血症モデルにおいて、ARDS により HRG が低下していること、またヒト由来の HRG を投与することで、ARDS が改善することを確認している (Wake H, Nishibori M, et al. EBioMedicine 2016)。本研究では肺移植後患者およびマウス IRI モデルの血中 HRG 濃度およびを測定し、ヒト由来の HRG 投与が PGD に対する新しい治療法となり得るか、その有

用性と妥当性を問う。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまでの研究成果を基に、ヒト由来抗炎症タンパク質である HRG が慢性炎症による肺疾患を抑制するか、その効果を検討し、IPF に対する新規治療法の確立を目指すことである。

3. 研究の方法

これまでの研究で収集していた肺移植患者 IPF 患者の血液検体を用いて HRG 濃度の測定を行った(1)。HRG 濃度の測定は、遠心分離後に-20 で冷凍保存された血漿を解析時に解凍し、ELISA kit を用いて行った。その後、プレオマイシンの気管支内投与によりマウス肺線維症モデルを作成を開始した。しかし、2020 年の新型コロナウイルス感染症のパンデミック後、動物実験施設への入室が制限されたことや、マウス肺線維症モデルの安定した作成が困難であったため、申請当初に経過していた方法を以下のように変更した。まず、これまでの研究で収集していたレシピエントの血液検体を用いて、肺移植後 PGD における HRG 濃度の測定を行った(1)。次にマウス IRI モデルを作成し、急性肺障害における HRG 濃度の測定を行った(2)。

(1) IPF 患者における血漿中の HRG 濃度測定

肺移植患者 IPF 患者の血液検体 (IPF 群, 9 例) を用いて HRG 濃度の測定を行った。健常群 (6 例) を比較対象とした。HRG 濃度の測定は、遠心分離後に-20 で冷凍保存された血漿を解析時に解凍し、ELISA kit を用いて行った。

(2) 肺移植後 PGD における血漿中の HRG 濃度測定

これまでの研究で収集していた 18 歳以上の肺移植患者血液検体 68 例を対象とした。血中の HRG 濃度は小児では低値であることが報告されているため、本研究では除外した。国際心肺移植学会 (ISHLT) で提唱されている PGD グレード分類を用いて、非 PGD 群 (43 例)、中等度 PGD 群 (18 例)、重度 PGD 群 (7 例) の 3 群に分け比較検討した。HRG 濃度の測定は、遠心分離後に-20 で冷凍保存された血漿を解析時に解凍し、ELISA kit を用いて行い、肺移植直後から 1 日おきに肺移植後 7 日目までを対象とした。また、血漿 HRG 濃度のカットオフ値を設定し、肺移植後の予後予測因子となり得るか検討した。

(3) マウス IRI モデルを用いた急性肺障害における血中 HRG 濃度測定

マウス IRI モデル (I/R 群) の条件設定においては、偽手術群と比較して最も肺障害が強く出るマウスの左肺門クランプ時間 (虚血時間) およびクランプ解放時間 (再灌流時間) の決定を行った。また、左心室採血の 3 分前に右肺門をクランプし、健常側の影響が出ないようにした。

HRG 濃度の測定は、採取した血液検体を遠心分離し、-80 で冷凍保存された血漿を解析時に解凍し、ウエスタンブロッティング法を用いて行った。手術を行っていないマウスをコントロールとし、偽手術群および I/R 群で比較検討を行った。HRG 発現量の比較にはイメージ J を用いた。

4. 研究成果

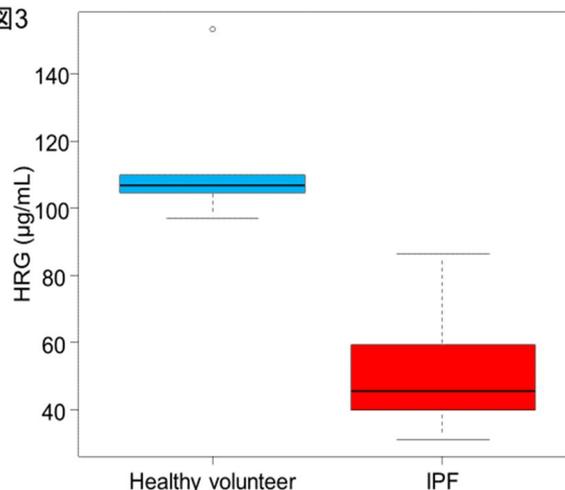
(1) IPF 患者における血漿中の HRG 濃度測定

血漿中の HRG 濃度は IPF 群において健常群より有意に低下していた ($P < 0.001$) (図 3)。本研究の結果より、血漿中の HRG は慢性炎症による肺疾患の代表である IPF においても低下しており、IPF の新たな治療標的となり得ることが示唆された。

(2) 肺移植後 PGD における血漿中の HRG 濃度測定

血漿中の HRG 濃度は肺移植後 3 日目に最

図3



も高値となる傾向があり、特に肺移植後 3 日目における血漿中の HRG 濃度は重度 PGD 群において有意に低下していた(非 PGD 群, $P = 0.042$; 中等度 PGD 群, $P = 0.040$)(図 4)。肺移植後 3 日目における血漿中の HRG 濃度を、肺移植後全生存の指標としてカットオフ値 ($34.4 \mu\text{g/mL}$) を設定したところ、血漿中の HRG 濃度が $34.4 \mu\text{g/mL}$ 以上の群(HRG 高値群, 51 例)は HRG 濃度が $34.4 \mu\text{g/mL}$ 未満の群(HRG 低値群, 17 例)と比較して、肺移植後全生存期間(OS)および CLAD 非発症期間(CLAD-free survival)において有意に良好であった(OS, $P = 0.037$; CLAD-free survival, $P = 0.012$)(図 5)。

本研究の結果より、肺移植後 3 日目における血漿中の HRG 濃度は PGD 重症度と関連しており、また、肺移植後の長期成績とも関連していた。血漿 HRG 濃度の測定は低侵襲な PGD の新たなバイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。肺移植後に HRG を補充することによって、PGD の発症を抑制できる可能性がある。

図 4

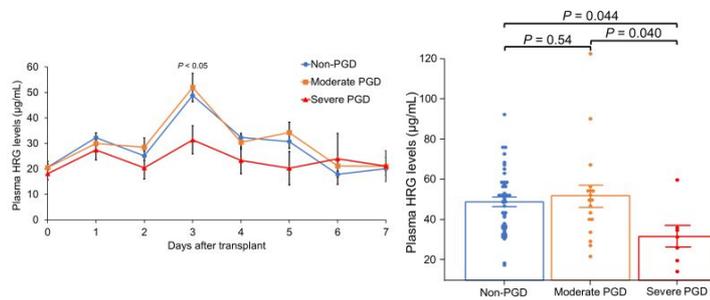
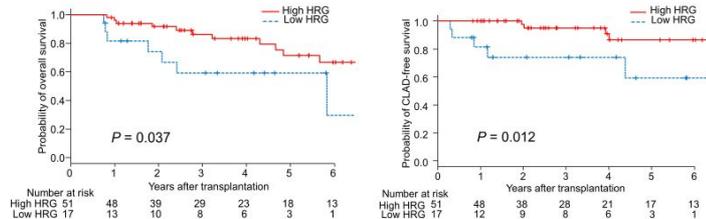


図 5



(3) マウス IRI モデルを用いた急性肺障害における血中 HRG 濃度測定

I/R 群の適切な条件として、虚血時間を 1 時間 30 分、再灌流時間を 3 時間と設定した。偽手術群と比較して、摘出肺は肺胞壁の肥厚が目立ち、肺水腫を来している状態であった。血液ガス分析においても I/R 群の方が有意に酸素化不良を起こしており ($P = 0.0082$) また、肺組織の障害の程度を評価する Lung injury score においても、I/R 群の方が有意に不良であった ($P = 0.0085$)(図 6)。血漿中の HRG 濃度はコントロール群と比較して偽手術群では有意差は認めなかったが、I/R 群においては有意に発現の低下を認めた(コントロール群, $P = 0.0047$; 偽手術群, $P = 0.0079$)(図 7)。

本研究の結果より、IRI による急性肺障害においても血漿中の HRG 濃度は低下していた。IRI は PGD の原因になる病態であり、HRG の投与という PGD に対する新規治療法に応用できる可能性がある。

図 6

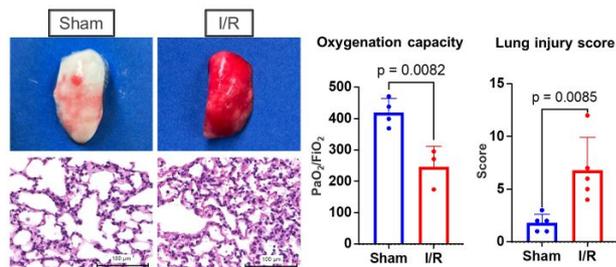
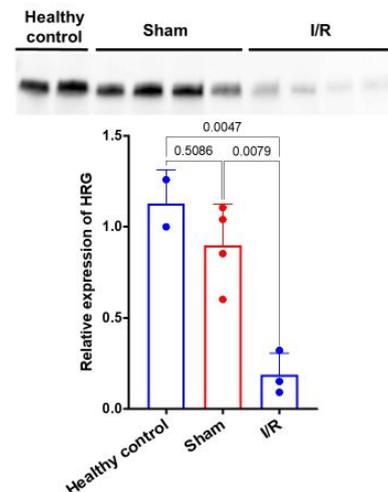


図 7



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shiotani Toshio, Sugimoto Seiichiro, Yamamoto Haruchika, Miyoshi Kentaroh, Otani Shinji, Suzawa Ken, Yamamoto Hiromasa, Okazaki Mikio, Yamane Masaomi, Toyooka Shinichi	4. 巻 52
2. 論文標題 Emphysematous changes and lower levels of plasma irisin are associated with bronchiolitis obliterans syndrome after bilateral living-donor lobar lung transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Surgery Today	6. 最初と最後の頁 294 ~ 305
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00595-021-02339-w	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 -

1. 著者名 Shiotani T, Sugimoto S, Araki K, Tomioka Y, Miyoshi K, Otani S, Yamane M, Toyooka S	4. 巻 75
2. 論文標題 Long-term Follow-up of Living-Donor Kidney Transplantation after Cadaveric Lung Transplantation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Med Okayama	6. 最初と最後の頁 87-89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18926/AMO/61439	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 -

1. 著者名 Shiotani Toshio, Sugimoto Seiichiro, Tomioka Yasuaki, Yamamoto Haruchika, Tanaka Shin, Miyoshi Kentaroh, Suzawa Ken, Shien Kazuhiko, Yamamoto Hiromasa, Okazaki Mikio, Toyooka Shinichi	4. 巻 9
2. 論文標題 Diagnostic value of circulating microRNA-21 in chronic lung allograft dysfunction after bilateral cadaveric and living-donor lobar lung transplantation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e14903 ~ e14903
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2023.e14903	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 塩谷俊雄、杉本誠一郎、富岡泰章、田中真、諏澤憲、枝園和彦、三好健太郎、山本寛斉、岡崎幹生、山根正修、豊岡伸一
2. 発表標題 血漿Histidine-rich glycoprotein濃度と肺移植後一時移植機能不全との関係
3. 学会等名 第74回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 Shiotani Toshio, Sugimoto Seiichiro, Yamamoto Haruchika, Matubara Kei, Shimizu Dai, Nakata Kentaro, Tomioka Yasuaki, Miyoshi Kentaroh, Otani Shinji, Okazaki Mikio, Yamane Masaomi, Toyooka Shinichi
2. 発表標題 Plasma Levels of Histidine-Rich Glycoprotein are Associated with the Development of Primary Graft Dysfunction after Lung Transplantation
3. 学会等名 The International Society for Heart and Lung Transplantation 41nd Annual Meeting & Scientific Sessions (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022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
研究協力者	豊岡 伸一 (Toyooka Shinichi)		
研究協力者	杉本 誠一郎 (Sugimoto Seiichiro)		

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