

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：33916

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21599

研究課題名（和文）線維芽細胞巣特異的造影マイクロCTによる肺線維症の免疫病理学診断人工知能開発研究

研究課題名（英文）Immune-pathological diagnostic artificial intelligence development research for pulmonary fibrosis using fibrotic foci-specific enhanced micro-CT

研究代表者

橋本 直純（Hashimoto, Naozumi）

藤田医科大学・医学部・教授

研究者番号：30378020

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：X線造影物質による通常造影CTでの評価は診断上有用な情報をもたらすが、本研究は金ナノ粒子をX線造影物質とする造影マイクロCTスキャンから得られる高分解能・高解像度の放射線画像で肺疾患特異的分子を同定するという着想に基づいた研究である。今回の研究では、金ナノ粒子結合肺特異的抗体の作製と生体マウスに対する経静脈投与により肺組織内での金ナノ粒子結合肺特異的抗体を検出するマイクロCT撮影を確立することができた。今後、金ナノ粒子結合肺特異的抗体の投与量を調整し肺組織に結合した金ナノ粒子を効率的にマイクロCTで検出することにより、マイクロCTに免疫病理学的診断能を付与す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

マイクロCTスキャンの臨床応用が期待される中、X線造影物質である金ナノ粒子標識抗原特異的抗体により組織内での標的抗原検出を可能にすることはマイクロCTスキャンに免疫病理学的診断能を付与することができ、侵襲的な検査を最小限にするという患者のアンメットニーズの解消につながることを期待される。5~10年後の実臨床への応用を見据えた患者のunmetニーズを解消する挑戦的研究であり、本研究が得た研究基盤は、対象疾患に疾患特異的病理所見・疾患特異的抗原・その特異的抗体がある場合に適用でき、既存の学術の体系や方向を大きく変革・転換させる潜在性を有する。

研究成果の概要（英文）：Although evaluation by conventional contrast-enhanced CT with X-ray contrast agents provides useful diagnostic information in clinical setting, the aim of this study is to identify lung disease-specific molecules using high-resolution and high-resolution radiographic images derived from contrast-enhanced micro-CT scans with gold nanoparticles as X-ray contrast agents. In this study, we were able to set micro-CT imaging to detect gold nanoparticle-bound lung-specific antibodies in the lung tissue by producing gold nanoparticle-bound lung-specific antibodies and intravenously administering them to living mice. In the future, administration of adjusted dose of gold nanoparticle-bound lung-specific antibody and adequate detection setting of gold nanoparticles bound to lung tissue by micro-CT might give micro-CT immunopathological diagnostic ability.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺線維症 線維芽細胞 金ナノ粒子 マイクロCT 血管内皮細胞

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(IPF: Idiopathic Pulmonary Fibrosis)は、肺の線維化のために呼吸不全に至る難病で、5年生存率は他臓器のがん種よりも不良である。IPFに特徴的な病理所見である“線維芽細胞巣: FF(Fibrotic Foci)”は、線維芽細胞が増殖・集積する線維化形成の最前線とされており、FFの形成機序の解明は肺線維症研究において最重要課題であった。IPFの病態解明には機能性線維芽細胞の同定が重要であると認識されてきたが、線維芽細胞特異的分子は同定されずIPFの病態解明には至らなかった。研究代表者の橋本は、肺線維症の線維化病変に存在する多様な表現型を有する線維芽細胞の存在に着目して、肺線維症の線維化病変形成に対する学術的研究を行ってきた ([Hashimoto N](#), et al. J Clin Invest 2004 113:243-252.; [Hashimoto N](#), et al. Am J Respir Cell Mol Biol 2010 43: 161-17.). Single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) という革新的な解析技術の登場により、疾患臓器の1細胞分析から新規細胞群を同定することが可能になった。米国Yale大学Kaminskiらは、移植ドナー肺(control肺)29例、および、IPF肺32例から採取した243,472個の細胞をscRNA-seq解析を行い、IPF肺に末梢気管支の発達と修復に重要な転写因子であるSOX9の高発現を示す“aberrant basaloid cells”を同定した。また、この“aberrant basaloid cells”は、FF周囲の上皮細胞に局限して発現していることを報告した。既報でmeflin(メフリン; ISLR遺伝子によってコードされる蛋白)は間葉系幹細胞の新規マーカーであることが報告されていたが、我々は米国Yale大学Kaminskiらとの共同研究でscRNA-seq解析を行い、ISLRが線維芽細胞/筋線維芽細胞に局限して発現することを同定した。他の公開されたdataセットにおいても、ISLRが線維芽細胞/筋線維芽細胞に局限して発現することが確認された。ISLRはFFに局限して発現していたが、癒痕化した線維化病変ではわずかに認めるのみであった。野生型マウス(WT mice)に対してbleomycin (BLM)誘導肺線維症モデルを作出し評価したところ、メフリンは肺線維化病変形成に応じてBLM群の肺ホモジネート・肺胞洗浄液中で有意な増加を認めた。メフリン欠損マウス(KO mice)を用いてBLM誘導肺線維症モデルにおいて、メフリン陽性線維芽細胞が抗線維化能を有することが明らかになった。

病理診断が極めて重要なIPFにおいて、通常胸部CTではFFを同定し得ず治療反応性を予測できない。マイクロCTスキャンは、非破壊的に高分解能・高解像度3次元画像を取得できる革新的な技術であり肺微細構造を評価できる。X線造影物質による通常造影CTでの評価は診断上有用な情報をもたらすが、造影マイクロCTスキャンから得られる高分解能・高解像度の放射線画像で肺疾患特異的分子を同定する技術基盤情報は、マイクロCTスキャンの臨床応用が期待される中で皆無である。X線造影物質である金ナノ粒子標識抗原特異的抗体により組織内での標的抗原検出を可能にすることはマイクロCTスキャンに免疫病理学的診断能を付与する可能性がある。

2. 研究の目的

以上の背景から、IPF肺に金ナノ粒子標識FF特異的meflin抗体による造影マイクロCTスキャンを行い、線維芽細胞巣の形態学的所見とともにIPF肺のmeflin陽性線維芽細胞巣を高分解能・高解像度3次元画像により分子学的定量解析を行い、マイクロCT病理診断を実現する基盤情報を得て【マイクロCTによるIPFの免疫病理学診断人工知能(AI)】開発につなげる本研究構想に至った。

課題1) 線維芽細胞巣(FF)特異的meflinに対する金ナノ粒子標識抗体の作製とin vitro検出効果評価

課題2) マウスブレオマイシン誘導肺線維症モデル肺を用いた単純・造影マイクロCTスキャン

による肺線維化病変の画像 profiling 構築

課題 3) ヒト IPF 検体を用いた金ナノ粒子標識 FF 特異的 meflin 抗体による肺線維化病変の FF に対する画像診断アルゴリズム確立と AI のための教師 data 構築
以上を計画する。

3. 研究の方法

課題 1) 線維芽細胞巢(FF)特異的 meflin に対する金ナノ粒子標識抗体の作製と in vitro 検出効果
評価

我々は、既報で meflin のタンパク定量を行った抗 meflin 抗体を用いて、ヒト肺線維症の肺検体を用いて、meflin の局在を免疫染色で検証するために、詳細な条件設定を行った。ヒト・マウスの肺検体における meflin のタンパク発現は同定できた。In-situ hybridization と免疫染色法を行った。気道上皮細胞は Meflin mRNA 分子が FF に局在していることが確認できるものの、免疫染色法によって気道上皮特異的タンパクの発現は同定できるものの、既存の抗 meflin 抗体を用いた免疫染色では、ヒト線維化肺の FF 特異的な meflin の発現を同定できなかった(図 1)。これは 2 つの可能性が考えられた。1 つは既存の抗 meflin 抗体は免疫染色で meflin を同定できないこと、1 つは meflin が分泌タンパクであるため FF 特異的発現を同定できなかったこと、が考えられた。

そこで金ナノ粒子標識抗体の作製を、肺構成細胞特異的分子に対する既存の抗体を用いて作成するとともに、meflin 分子特異的な制御分子の同定を行い FF の検出を試みた。まず、マウス肺の平滑筋および線維化肺の筋線維芽細胞に特異的に発現する α -SMA に対するビオチン結合特異的抗体とストレプトアビジン結合金ナノ粒子を肺組織上で反応させて、暗視野顕微鏡を用いて肺組織上で α -SMA に特異的に発現する金ナノ粒子の検出を試みた(図 2)。暗視野顕微鏡により、正常肺には α -SMA を特異的に発現する血管平滑筋上に金ナノ粒子と考えられる輝度を確認し、線維化肺内で α -SMA を特異的に発現する筋線維芽細胞と考えられる金ナノ粒子と考えられる輝度を確認した。

次に、血管内皮細胞特異的に発現する CD31 分子に対する purified 抗体に金ナノ粒子と直接結合させた。Purified CD31 抗体は肺組織に対する免疫染色で血管内皮細胞に発現することを確認した(図 3)。金ナノ粒子結合 CD31 抗体を血管内皮細胞株(MS1)と上皮細胞株(HEK)に反応させて、暗視野顕微鏡で評価した(図 3)。金ナノ粒子結合 CD31 抗体は血管内皮細胞株上で濃度依存的に検出されたが、上皮細胞株では検出されなかった。このことから、purified CD31 抗体に対する金ナノ粒子の結合させるプロトコルを確立した。

課題 2) マウスプレオマイシン誘導肺線維症モデル肺を用いた単純・造影マイクロ CT スキャン
による肺線維化病変の画像 profiling 構築

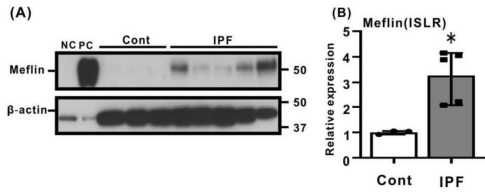
まず、In vivo マウスに対して、金ナノ粒子結合 CD31 抗体を静脈注入して、抗体を肺血管床に還流させて、肺血管内皮特異的に抗体を結合させることを検証した。マウスへの静脈注入により抗体溶液が肺血管床を十分還流することを確認するために、吸入麻酔下のマウスの頸部を露出して外経静脈から青色染色液のトリパンブルーの静脈注入を行った(図 4)。図に示すように、生理食塩水静脈注入マウス肺と比較して、トリパンブルー静脈注入後 2 時間において肺検体を採取したところ、全肺が青色に染色がなされていたことより、金ナノ粒子結合 CD31 抗体の静脈注入によっても、肺血管内皮細胞に金ナノ粒子が結合させることができる金ナノ粒子結合 CD31 抗体の投与量を決定した。

次に、金ナノ粒子結合 CD31 抗体の静脈投与群、金ナノ粒子非結合 CD31 抗体の静脈投与群、生理食塩水の静脈投与群のマウスを準備して、投与後 2 時間の肺組織を en block に胸腔から取り出しパラフィン包埋を行い、マイクロ CT の撮影を行った。マイクロ CT の撮影で肺の肺胞構造は検出できたが(図 4)、金ナノ粒子結合 CD31 の分別までには至らず、投与量や投与後の肺組織の回収のタイミングなど、実験条件のさらなる検討が必要であった。

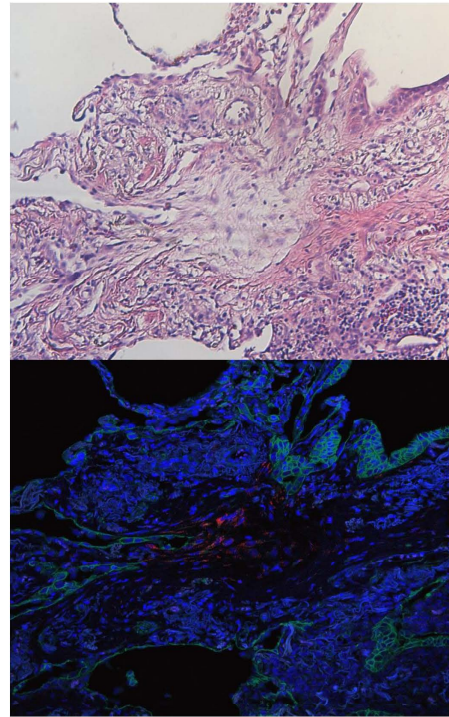
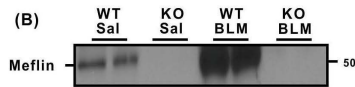
4. 研究成果

今回の研究では、金ナノ粒子結合肺特異的抗体の作製と生体マウスに対する経静脈投与により肺組織内での金ナノ粒子結合肺特異的抗体を検出するマイクロ CT 撮影を確立することができた。今後、金ナノ粒子結合肺特異的抗体の投与量と肺組織に結合した金ナノ粒子を効率的にマイクロ CT で検出することとともに、肺線維症に特異的な線維化抑制分子である meflin、さらには meflin によって直接的に線維化を制御する分子に対する特異的抗体を作製することで、マイクロ CT スキャンによって X 線造影物質である金ナノ粒子標識抗原特異的抗体により組織内の標的抗原検出を可能にして**免疫病理学的診断能**を付与することが可能になると考えられた。

ヒト線維芽細胞に対する
Western Blotting法 (Meflin)



マウス全肺に対する
Western Blotting法 (Meflin)



(上): HE染色 IPF 肺

(下): In-situ hybridization for ISLR (赤)と
免疫染色法 (緑 : E-cadherin, 青 : 核)

図 1

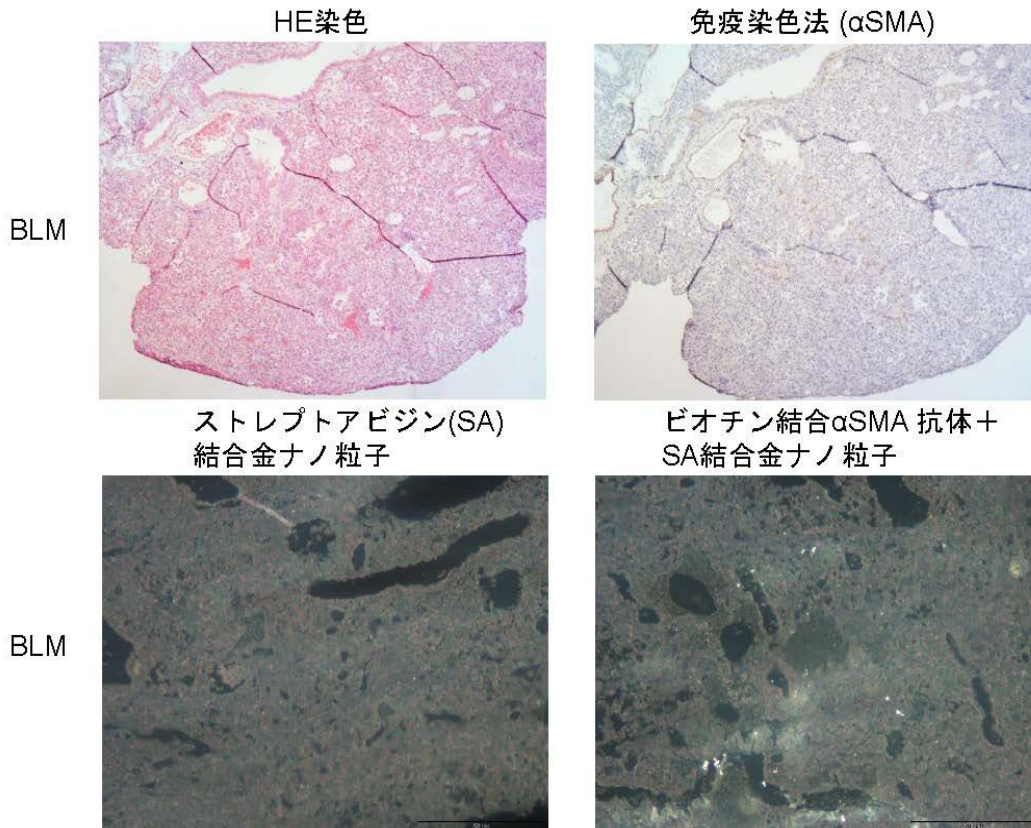
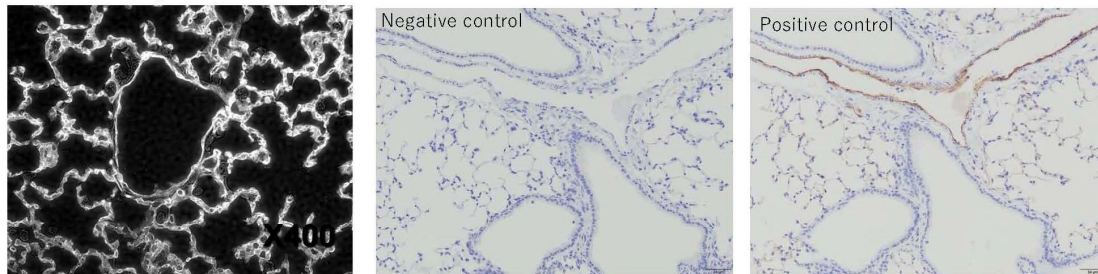


図 2

免疫染色 (マウスCD31)



金ナノ粒子結合抗体とmicro CTを用いた臓器特異的抗原の検出
金結合CD31抗体による細胞免疫染色 (暗視野顕微鏡)

接眼レンズ: ×40

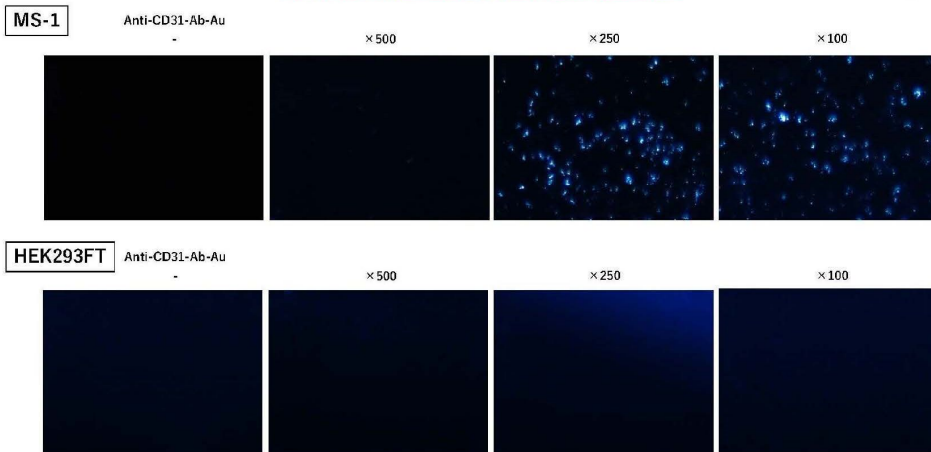
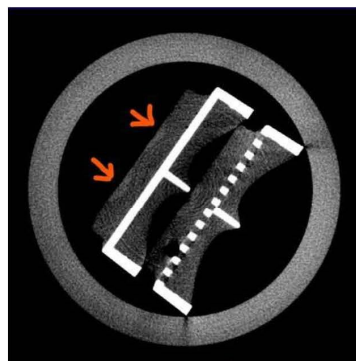


図 3

静脈内投与肺

(左: 生理食塩水、右: トリパンプルー液)

マイクロCT (1)



マイクロCT (2): 肺領域

マイクロCT (3): 肺領域

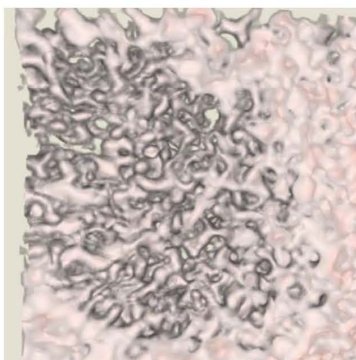
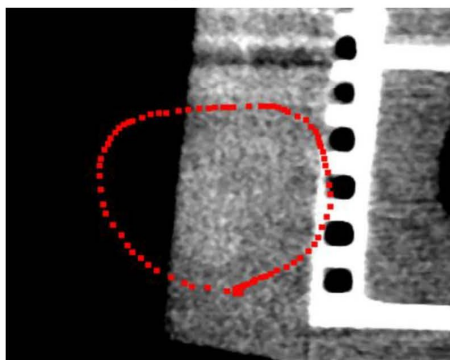


図 4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakahara Y, Hashimoto N, Sakamoto K, Enomoto A, Adams TS, Yokoi T, Omote N, Poli S, Ando A, Wakahara K, Suzuki A, Inoue M, Hara A, Mizutani Y, Imaizumi K, Kawabe T, Rosas IO, Takahashi M, Kaminski N, Hasegawa Y.	4. 巻 58
2. 論文標題 Fibroblasts positive for meflin have anti-fibrotic property in pulmonary fibrosis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Respiratory Journal	6. 最初と最後の頁 2003397
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1183/13993003.03397-2020	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 該当する
1. 著者名 Omote N, Sakamoto K, Li Q, Schupp JC, Adams T, Ahangari F, Chioccioli M, Deluliis G, Hashimoto N, Hasegawa Y, Kaminski N.	4. 巻 9
2. 論文標題 Long noncoding RNA TINCR is a novel regulator of human bronchial epithelial cell differentiation state	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e14727
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.14727	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 該当する
1. 著者名 Inoue M, Sakamoto K, Suzuki A, Nakai S, Ando A, Shiraki Y, Nakahara Y, Omura M, Enomoto A, Nakase I, Sawada M, Hashimoto N.	4. 巻 18
2. 論文標題 Size and surface modification of silica nanoparticles affect the severity of lung toxicity by modulating endosomal ROS generation in macrophages.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Particle and Fibre Toxicology	6. 最初と最後の頁 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12989-021-00415-0	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 Kodama Y, Tanaka I, Sato T, Hori K, Gen S, Morise M, Matsubara D, Sato M, Sekido Y, Hashimoto N.	4. 巻 112
2. 論文標題 Oxytocin receptor is a promising therapeutic target of malignant mesothelioma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3520-3532
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15025	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 Sakamoto Koji, Furukawa Taiki, Yamano Yasuhiko, Kataoka Kensuke, Teramachi Ryo, Walia Anjali, Suzuki Atsushi, Inoue Masahide, Nakahara Yoshio, Ryu Changwan, Hashimoto Naozumi, Kondoh Yasuhiro	4. 巻 57
2. 論文標題 Serum mitochondrial DNA predicts the risk of acute exacerbation and progression of idiopathic pulmonary fibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Respiratory Journal	6. 最初と最後の頁 2001346 ~ 2001346
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1183/13993003.01346-2020	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 該当する

1. 著者名 Fukihara Jun, Kondoh Yasuhiro, Brown Kevin K., Kimura Tomoki, Kataoka Kensuke, Matsuda Toshiaki, Yamano Yasuhiko, Suzuki Atsushi, Furukawa Taiki, Sumikawa Hiromitsu, Takahashi Osamu, Johkoh Takeshi, Tanaka Tomonori, Fukuoka Junya, Hashimoto Naozumi, Hasegawa Yoshinori	4. 巻 55
2. 論文標題 Probable usual interstitial pneumonia pattern on chest CT: is it sufficient for a diagnosis of idiopathic pulmonary fibrosis?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Respiratory Journal	6. 最初と最後の頁 1802465 ~ 1802465
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1183/13993003.02465-2018	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 該当する

1. 著者名 Sakamoto Koji, Fukihara Jun, Morise Masahiro, Hashimoto Naozumi	4. 巻 58
2. 論文標題 Clinical burden of immune checkpoint inhibitor-induced pneumonitis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Respiratory Investigation	6. 最初と最後の頁 305 ~ 319
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2020.05.008	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 Suzuki Atsushi, Sakamoto Koji, Nakahara Yoshio, Enomoto Atsushi, Hino Jun, Ando Akira, Inoue Masahide, Shiraki Yukihiro, Omote Norihito, Kusaka Masahiro, Fukihara Jun, Hashimoto Naozumi	4. 巻 67
2. 論文標題 BMP3b Is a Novel Antifibrotic Molecule Regulated by Meflin in Lung Fibroblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 446 ~ 458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2021-04840C	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 Furukawa Taiki, Oyama Shintaro, Yokota Hideo, Kondoh Yasuhiro, Kataoka Kensuke, Johkoh Takeshi, Fukuoka Junya, Hashimoto Naozumi, Sakamoto Koji, Shiratori Yoshimune, Hasegawa Yoshinori	4. 巻 27
2. 論文標題 A comprehensible machine learning tool to differentially diagnose idiopathic pulmonary fibrosis from other chronic interstitial lung diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Respirology	6. 最初と最後の頁 739 ~ 746
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/resp.14310	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 Sehsah Radwa, Wu Wenting, Ichihara Sahoko, Hashimoto Naozumi, Zong Cai, Yamazaki Kyoka, Sato Harue, Itoh Ken, Yamamoto Masayuki, Elsayed Ahmed Ali, El-Bestar Soheir, Kamei Emily, Ichihara Gaku	4. 巻 370
2. 論文標題 Protective role of Nrf2 in zinc oxide nanoparticles-induced lung inflammation in female mice and sexual dimorphism in susceptibility	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Toxicology Letters	6. 最初と最後の頁 24 ~ 34
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.toxlet.2022.09.004	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 該当する

1. 著者名 Fukihara Jun, Maiolo Suzanne, Kovac Jessica, Sakamoto Koji, Wakahara Keiko, Hashimoto Naozumi, Reynolds Paul N.	4. 巻 48
2. 論文標題 Overexpression of bone morphogenetic protein receptor type 2 suppresses transforming growth factor -induced profibrotic responses in lung fibroblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Lung Research	6. 最初と最後の頁 35 ~ 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/01902148.2021.2024301	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 弦間 昭彦、橋本 直純、長谷川 好規	4. 発行年 2022年
2. 出版社 総合医学社	5. 総ページ数 472
3. 書名 最新ガイドラインに基づく 呼吸器疾患 診療指針 2023- ' 24 内 「閉塞性細気管支炎」	

〔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	若原 恵子 (Keiko Wakahara) (00631433)	名古屋大学・医学部附属病院・講師 (13901)	
研究分担者	阪本 考司 (Koji Sakamoto) (00635633)	名古屋大学・医学部附属病院・病院講師 (13901)	
研究分担者	中村 彰太 (Shota Nakamura) (20612849)	名古屋大学・医学部附属病院・講師 (13901)	
研究分担者	古川 大記 (Taiki Furukawa) (30837654)	名古屋大学・医学部附属病院・特任助教 (13901)	

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