

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：20101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22880

研究課題名(和文)肺線維症に対する肺破骨細胞を標的とした新たな治療戦略

研究課題名(英文) Pulmonary osteoclast-like cells as a novel therapeutic target in pulmonary fibrosis

研究代表者

長谷川 喜弘 (Hasegawa, Yoshihiro)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：90643180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：シリカ粒子の経気道投与により珪肺モデルマウスを作製したところ、肺内のRANKLの発現が増加しており、肺胞腔内に破骨細胞マーカーが陽性の多核巨細胞(肺破骨細胞とする)が存在することがわかった。回収した肺破骨細胞を骨切片上で培養すると、骨表面にピットが形成され、骨吸収能を有することが示唆された。珪肺モデルマウスへ抗RANKL抗体を投与すると、肺破骨細胞への分化が抑制されただけでなく、繊維性肺病変の形成が抑制された。RANKLおよび肺破骨細胞を標的とした治療が有効であ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

じん肺症は粉じんの吸引により進行性・不可逆性の肺線維症を引き起こす職業性肺疾患で、世界的に増加している。じん肺症の中で最多である珪肺は、シリカの吸引が原因であることが知られているが、肺線維症を発症する機序は不明で根本的な治療法はない。抗RANKL抗体は、骨粗鬆症の患者に対する使用実績から、安全性に問題がないことが証明されている。本研究で線維化肺病変の抑制効果を個体レベルで示すことができたため、速やかに臨床応用できる可能性がある。さらに石綿肺を始めとする他のじん肺症の治療に応用できる可能性も高い。

研究成果の概要(英文)：In silicosis model mice, RANKL expression increased in the lungs and multinucleated giant cells with positive osteoclast markers (designated as pulmonary osteoclasts) were found to be present in the alveolar space. Culture pulmonary osteoclasts on bone sections induced to form pits on the bone surface, suggesting that pulmonary osteoclasts have bone resorption ability. Administration of anti-RANKL antibody to silicosis model mice not only inhibited differentiation into lung osteoclasts but also prevented formation of fibrotic lung lesions, suggesting that targeting RANKL and lung osteoclasts may be an effective therapeutic strategy.

研究分野：呼吸器内科、肺線維症

キーワード：じん肺 珪肺 肺線維症 破骨細胞 RANKL

## 1. 研究開始当初の背景

じん肺症は粉じんの吸引により進行性・不可逆性の肺線維症を引き起こす職業性肺疾患である。世界的に増加の一途をたどっており、米国疾患予防センター (CDC) が警告を発している。シリカの吸引による珪肺はじん肺症の中で最多であるが、肺線維症を発症する機序は不明で根本的な治療法はない。

骨の恒常性は骨吸収を担う破骨細胞と骨形成を担う骨芽細胞によって維持されている。腫瘍壊死因子 (TNF) サイトカインファミリーに属する破骨細胞分化誘導因子 (RANKL) は、破骨細胞分化誘導因子受容体 (RANK) に結合し、単球・マクロファージ系前駆細胞を多核巨細胞である破骨細胞へと分化させる。成熟した破骨細胞は骨表面に接着し、酸やタンパク分解酵素を分泌することで骨のミネラル成分や有機基質を溶解・分解し、骨吸収を担う。

肺胞微石症はナトリウムリン酸共輸送体遺伝子 (SLC34A2) 変異により、肺胞内にリン酸カルシウム結石が蓄積する稀少肺疾患である。研究代表者らは、肺胞微石症モデルマウス (SLC34A2 ノックアウトマウス) において、破骨細胞マーカーが陽性の多核巨細胞 (肺破骨細胞とする) が肺胞腔内に存在し、蓄積したリン酸カルシウム結石を分解することを発見した (論文投稿中)。以上の知見から、肺破骨細胞への分化はリン酸カルシウム結石に対して特異的なものではなく、肺胞腔内に存在する無機粒子へのステレオタイプな反応ではないかと思いついた。さらに、リン酸カルシウム結石と異なり分解不能なシリカ粒子では、肺破骨細胞が継続して肺内に存在し、分泌する酸やタンパク分解酵素が肺実質に損傷を与え、線維性肺病変の形成を誘導しているのではという着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、「シリカ粒子への暴露により分化誘導された肺破骨細胞が酸やタンパク分解酵素を分泌し、線維性肺病変を形成する」という仮説のもと、珪肺モデルマウスを用いて、肺破骨細胞が分泌する酸やタンパク分解酵素が線維性肺病変の誘因となることを示す。さらに、肺破骨細胞を標的とした新たな抗線維化治療を提唱することを目的とする。具体的には以下の項目について検討する。

- (1) 破骨細胞様多核巨細胞 (肺破骨細胞) が存在することを証明する
- (2) 肺破骨細胞が骨吸収能を有することを示す
- (3) 肺内に RANKL が発現していることを証明する
- (4) 肺破骨細胞の阻害法を確立する
- (5) 肺破骨細胞を標的とした抗線維化療法の有用性を検討する

## 3. 研究の方法

### (1) 珪肺モデルマウスの作製

野生型の C57BL/6J マウスに気管内挿管を行い、シリカ粒子を経気道投与する。4週間後に肺組織像の解析、肺組織中の線維化関連遺伝子定量とコラーゲン定量を行い、線維性肺病変が誘導されたことを確かめる。

### (2) 肺破骨細胞の存在の証明

珪肺モデルマウスの肺胞腔内に肺破骨細胞が存在することを、破骨細胞マーカーによる肺組織の免疫染色で検討する。さらに、肺組織の破骨細胞関連遺伝子を定量する。また、TRAP5b は破骨細胞が特異的に分泌し、骨表面における破骨細胞の活性化マーカーとして実用化しているが、気管支肺胞洗浄液中の TRAP5b を ELISA で定量する。

### (3) 肺破骨細胞の機能解析

肺破骨細胞は珪肺モデルマウスの気管支肺胞洗浄で回収できることを確かめている。回収した肺破骨細胞を骨切片スライス上で培養する。培養後に、骨切片表面を染色することでピット形成能を評価するとともに、培養上清中に溶出した骨成分C-terminal telopeptides of Type I collagen (CTX-I) をELISAで定量し、肺破骨細胞の骨吸収能を評価する。

#### (4) 肺におけるRANKLの証明

珪肺モデルマウスの肺組織中の RANKL 遺伝子定量を行う。また、気管支肺胞洗浄液中の RANKL タンパクを ELISA で定量する。

#### (5) 肺破骨細胞の阻害法の確立

抗 RANKL 抗体やビスホスホネート製剤は骨表面の破骨細胞の活性を阻害することで骨吸収を抑制するため、骨粗鬆症の治療薬として実用化されている。珪肺モデルマウスへ抗 RANKL 抗体やビスホスホネート製剤を腹腔内投与し、肺組織の免疫染色や破骨細胞関連遺伝子定量により、肺破骨細胞への分化が阻害されるか検討する。

#### (6) 肺破骨細胞を標的とした抗線維化治療の検討

抗 RANKL 抗体もしくはビスホスホネート製剤によって、肺破骨細胞への分化が抑制された場合は、肺組織像、肺組織中の線維化関連遺伝子定量とコラーゲン定量により線維化病変の重症度を評価する。

### 4. 研究成果

#### (1) 珪肺モデルマウスの作製

野生型の C57BL/6J マウスへシリカ粒子を経気道投与することにより、線維化病変の形成、線維化関連遺伝子定量の増加、肺組織中のコラーゲンの増加を確認できた。

#### (2) 肺破骨細胞の存在の証明

珪肺モデルマウスの肺胞腔内には破骨細胞マーカーが陽性の多核巨細胞が存在していた。また肺組織の破骨細胞関連遺伝子が増加していた。さらに気管支肺胞洗浄液中の TRAP5b が生理食塩水投与群と比較して増加していた。

#### (3) 肺破骨細胞の機能解析

珪肺モデルマウスの気管支肺胞洗浄で回収した細胞を骨切片スライス上で培養したところ、骨切片表面にピットが形成された。さらに培養上清中に溶出した骨成分CTX-Iが生理食塩水投与群と比較して有意に増加していた。肺破骨細胞は骨吸収能を有することが示唆された。

#### (4) 肺RANKLの産生細胞の同定

珪肺モデルマウスの肺組織の RANKL 遺伝子および気管支肺胞洗浄液中の RANKL タンパクが増加していた。

#### (5) 肺破骨細胞の阻害法の確立

珪肺モデルマウスへ抗 RANKL 抗体を腹腔内投与したところ、肺胞腔内の破骨細胞マーカーが陽性の多核巨細胞が有意に減少していた。また、肺組織の破骨細胞関連遺伝子も減少した。シリカ粒子の暴露による肺破骨細胞への分化は RANKL 依存性であることが示唆された。ビスホスホネート製剤による検討は時間的要因により行うことが出来なかった。

#### (6) 破骨細胞を標的とした肺線維症治療の検討

珪肺モデルマウスへ抗 RANKL 抗体を腹腔内投与したところ、線維化病変の形成が抑制された。また肺組織中の線維化関連遺伝子の増加やコラーゲン増生が抑制されていた。RANKL 阻害を介した破骨細胞を標的とした治療が有効であることが示唆された。

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 1件）

1. 著者名 Saitou A, Hasegawa Y, Fujitani N, Ariki S, Uehara Y, Hashimoto U, Saito A, Kuronuma K, Matsumoto K, Chiba H, Takahashi M	4. 巻 113
2. 論文標題 N-glycosylation regulates MET processing and signaling	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1292-1304
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15278.	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 Takahashi M, Hasegawa Y, Maeda K, Kitano M, Taniguchi N.	4. 巻 39
2. 論文標題 Role of glycosyltransferases in carcinogenesis; growth factor signaling and EMT/MET programs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Glycoconj. J.	6. 最初と最後の頁 167-176
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10719-022-10041-3.	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 Fujitani N, Ariki S, Hasegawa Y, Uehara Y, Takahashi M.	4. 巻 60
2. 論文標題 Integrated Structural Analysis of N-glycans and Free Oligosaccharides Allows for a Quantitative Evaluation of ER Stress.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1708-1721
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.biochem.0c00969.	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Yoshihiro Hasegawa, Yusuke Tanaka, Ciara M. Shaver, Kevin K. Brown, Charles Perkins, Lori B. Pitstick, Christopher G. McKnight, Huixing Wu, Elizabeth J. Koprass, Francis X. McCormack
2. 発表標題 RANKL Dependent Differentiation Of Pulmonary Osteoclast-like Cells In Silica-induced Pulmonary Fibrosis
3. 学会等名 American Thoracic Society International Conference (ATS 2020 Virtual) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshihiro Hasegawa
2. 発表標題 The interaction of pulmonary collectins with N-glycans of epidermal growth factor receptor regulates lung adenocarcinoma progression
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoshihiro Hasegawa, Yusuke Tanaka, Lori B. Pitstick, Huixing Wu, Elizabeth J. Koprass, Francis X. McCormack
2. 発表標題 Upregulation of circulating RANKL induces osteoporosis in the silicosis model mouse
3. 学会等名 American Thoracic Society International Conference (ATS 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yoshihiro Hasegawa, Yasuaki Uehara, Yusuke Tanaka, Lori B. Pitstick, Huixing Wu, Elizabeth J. Koprass, Francis X. McCormack
2. 発表標題 RANKL-dependent pulmonary fibrosis in the silicosis model mouse
3. 学会等名 The 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respirology (APSR 2021) (国際学会)
4. 発表年 2021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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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