

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08450

研究課題名(和文) 間質性肺炎に対する新規マクロファージ抑制タンパク質の抗炎症・線維化作用の検討

研究課題名(英文) Anti-inflammatory and anti-fibrotic effects of a novel macrophage-inhibitory protein in interstitial pneumonia

研究代表者

武内 徹 (TAKEUCHI, Tohru)

大阪医科薬科大学・医学部・教授

研究者番号：10330078

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)：間質性肺炎(IP)の発症や病態形成にはマクロファージの活性化が関与しており、S100タンパク質A8/A9を標的とするリコンビナントタンパク質MIKO-1のIPに対する治療効果を明らかにした。IPモデルマウスにおいてMIKO-1は炎症性サイトカインおよびS100タンパク質を調節することで肺組織における炎症および線維化を抑制した。また、マウス腹腔マクロファージ・ヒト由来マクロファージ細胞株THP-1を用いたin vitroにおいて線維化と関連があるマクロファージのM2への分極をMIKO-1が抑制した。MIKO-1はマクロファージ活性化を抑制することでIPにおける肺組織での炎症と線維化を抑制した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MIKO-1はS100タンパク質A8/A9を標的としてマクロファージ活性化を抑制することでIPにおける肺組織での炎症と線維化を抑制する。この結果から、S100タンパク質A8/A9およびマクロファージがIPの病態に重要な役割を果たしていることを示しただけでなく、マクロファージ活性化が病態に大きく関わるIPを始めとする病態に対してMIKO-1が新たな治療薬候補として考えられた。

研究成果の概要(英文)：Activation of Macrophage is involved in the pathogenesis of interstitial pneumonia (IP) related to connective tissue diseases. This study demonstrated the effects of a recombinant protein (MIKO-1) targeting in S100A8/A9 protein in a bleomycin (BLM)-induced model (in vivo) and in murine peritoneal macrophages and human-derived cell lines (in vitro).

MIKO-1 suppressed the lung inflammation and fibrosis by regulating inflammatory cytokines and S100 proteins in BLM-induced IP model. The agent also inhibited the polarization of macrophages to M2, which is associated with fibrosis, in murine peritoneal macrophages in vitro. Similar effects were shown in a human-derived cell line, THP-1.

This study presented that S100A8/A9 protein played a crucial role of in IP and MIKO-1 is a potential agent for the treatment of IP.

研究分野：リウマチ学

キーワード：間質性肺疾患 膠原病 S100タンパク質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 膠原病 (connective tissue disease: CTD) は原因不明の全身性炎症性疾患であり、しばしば間質性肺炎 (interstitial pneumonia: IP) を合併する。IP は肺の間質を病変の主座としリンパ球を中心とする炎症細胞の浸潤、肺胞上皮細胞の障害や線維化が様々な程度にみられるびまん性肺疾患である。申請者及び他施設の研究から CTD-IP において Th1 細胞およびマクロファージが病態形成に深く関与することが示唆されている。

(2) S100 タンパク質の基礎研究から、S100A8 および S100A9 タンパク質はマクロファージ機能を制御することにより炎症のみならず線維化に関与していることから、IP の治療標的となり得ることを示唆されている。申請者らは S100 タンパク質 A8/A9 を標的としたリコンビナントタンパク質 (MIKO-1) が *in vitro* の系においてマクロファージの異常活性化を強く抑制すること、*in vivo* の系においてもモデルマウスにおいて潰瘍性大腸炎の発症抑制することを明らかにしている。これらの結果から MIKO-1 が IP に対しても有効である可能性が示唆される。

### 2. 研究の目的

(1) IP における S100A8 および S100A9 の役割を明らかにし、IP モデルマウスを用いて MIKO-1 の IP に対する免疫および線維化抑制効果を明らかにする。

(2) マウス由来のマクロファージおよびヒト由来マクロファージ細胞株を用いて MIKO-1 のマクロファージに対する免疫抑制効果と作用機序を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) プレオマイシン (bleomycin: BLM) 誘導性 IP マウスは 13~14 週齢の C57BL/6J マウスを用いる。麻酔後、皮下にミニ浸透圧ポンプを埋め込む。ミニ浸透圧ポンプを介して生理食塩水 100  $\mu$ L に溶解した BLM (3 mg) もしくは生理食塩水 100  $\mu$ L を 0 日から 7 日までマウスに注入する。S100A8、S100A9 または MIKO-1 は 50~100  $\mu$ g/body の量を BLM 投与開始後、14 日目までマウスに連日腹腔内投与する。

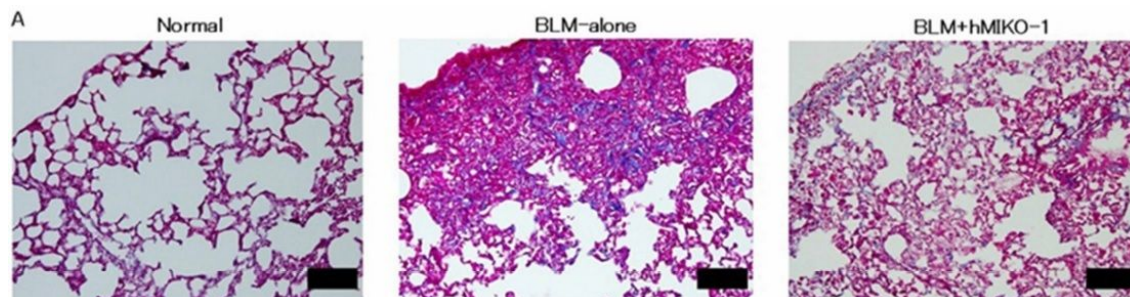
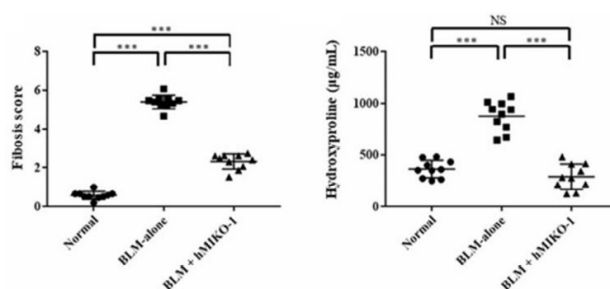
(2) マウスの右肺中葉から組織切片を作製し、H&E 染色もしくは Masson トリクローム染色、免疫組織染色により線維化を形態学的に解析・評価する。また、コラーゲン量測定はヒドロキシプロリン定量アッセイキットを用い比色定量法で測定する。

(3) 4 週目においてマウス肺組織から mRNA を抽出し cDNA を作製し mRNA 発現量を測定する。内因性 GAPDH 遺伝子をコントロールとして、IL-1、IL-6、IL-10、IL-12、TIMP-1、TNF- $\alpha$ 、GATA3、ROR- $\gamma$ t、FoxP3、collagen type 1 $\alpha$ 1、GAPDH、S100A8、S100A9 の相対的な mRNA 発現量は測定する。

(4) チオグリコール酸処理をしたマウス腹腔マクロファージおよびヒト由来マクロファージ細胞株 THP-1 を用いてマクロファージの表面分子 CD64・CD163 の発現量と培養上清中の IL-12・IL-10 濃度、マクロファージの IL-1、IL-6、IL-10、IL-12、CD64、CD163 の相対的な mRNA 発現量は測定する。

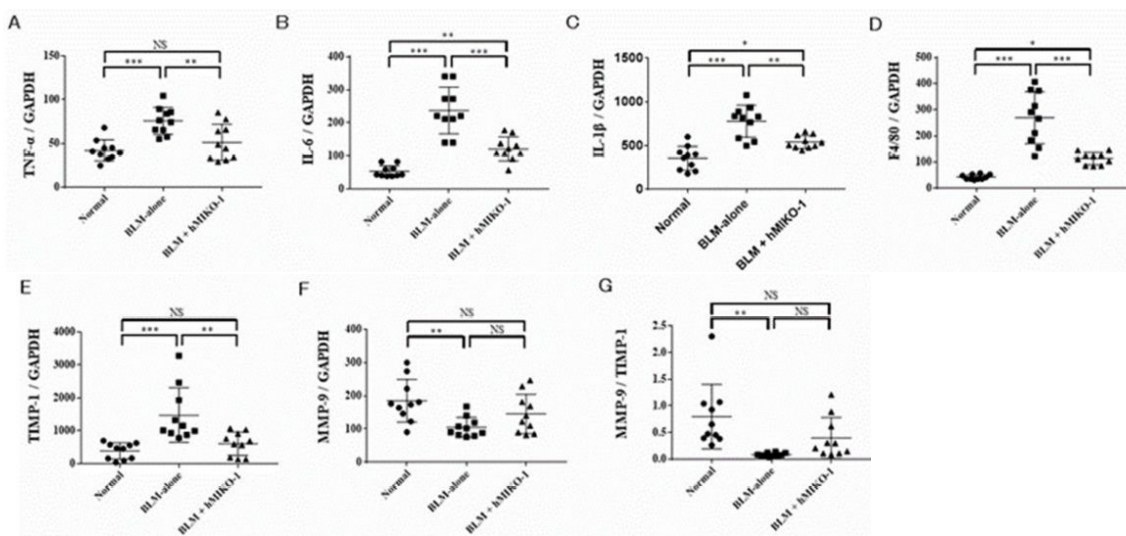
### 4. 研究成果

(1) BLM 誘導性 IP モデルにおいて、非投与群と比較して MIKO-1 投与群では肺の線維化を 1/3 まで抑制し、コラーゲン量を反映する肺組織のヒドロキシプロリン量は IP を誘導しない健常群と同レベルまで低下させた。

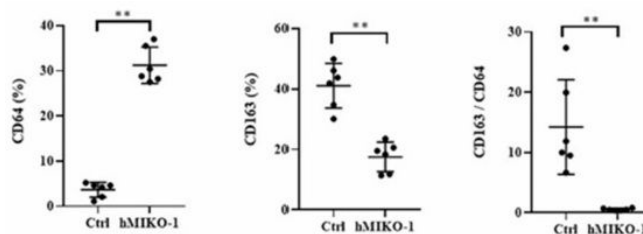


(2) 肺組織を用いた定量 PCR 法で IL-6、IL-1、TNF、F4/80 の mRNA 発現が健常群と比較して非投与群では有意に増加し、MIKO-1 投与群では健常群と同レベルまで低下した。ま

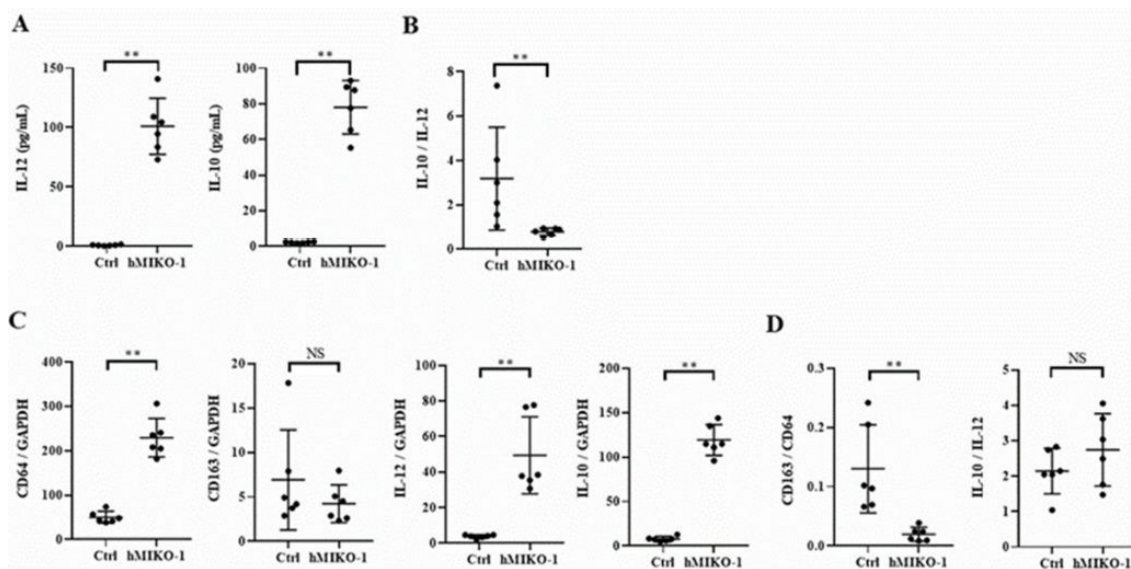
た、線維化因子である TIMP-1 の mRNA 発現も健常群と比較して非投与群では有意に増加し、MIKO-1 投与群では健常群と同レベルまで低下した。MMP-9 は非投与群では低下したが、MIKO-1 投与群は健常群と同程度であった。一方で、S100 タンパク質 A8/A9 の mRNA 発現は有意に増加した。



(3) チオグリコール酸処理をしたマウス腹腔マクロファージを用いて *in vitro* の実験においてコントロールに比べて MIKO-I 投与によりマクロファージの CD64 発現が増強し、CD163 発現が抑制された。



また、培養上清中の IL-10 および IL-12 濃度が増加した。腹腔マクロファージの mRNA 発現についても CD64、IL-10 および IL-12 が増加した。



(4) ヒト由来マクロファージ細胞株 THP-1 を用いてもマウス腹腔マクロファージを用いた *in vitro* の実験と同様の効果が示された。また、MIKO-I はマクロファージ表面分子 X に対する抗体で細胞内への取り込みが阻害されたが、TLR-4 や RAGE に対する抗体を用いても阻害できなかった。また、炎症物質である Y があると MIKO-I 単独よりも強く細胞内に取り込まれ核に移行し、効果が増強された。

(5) 以上より BLM 誘導性 IP モデルマウスにおいて MIKO-1 は炎症性サイトカインを調節することで肺組織における炎症および線維化を抑制すること、*in vitro* において線維化と関連があるマクロファージの M2 への分極を MIKO-I が抑制することが明らかになった。また、ヒト由来マクロファージ細胞株においても同様の効果が示され、MIKO-1 が IP に対する新たな治療薬となりうるということが明らかになった。

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<br>Kotani Takuya, Ikemoto Masaki, Matsuda Shogo, Masutani Ryota, Takeuchi Tohru   | 4. 巻<br>23                |
| 2. 論文標題<br>Human MIK0-1, a Hybrid Protein That Regulates Macrophage Function, Suppresses Lung Fibrosis in a Mouse Model of Bleomycin-Induced Interstitial Lung Disease | 5. 発行年<br>2022年           |
| 3. 雑誌名<br>International Journal of Molecular Sciences  | 6. 最初と最後の頁<br>9669 ~ 9669 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.3390/ijms23179669  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

|                                |                      |                   |
|--------------------------------|----------------------|-------------------|
| 産業財産権の名称<br>間質性肺疾患の治療のための医薬組成物 | 発明者<br>武内徹、小谷卓矢、池本正生 | 権利者<br>学校法人大阪医科大学 |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、2023-42184   | 出願年<br>2023年         | 国内・外国の別<br>国内     |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                        | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                      | 備考 |
|-------|--|--|----|
| 研究分担者 | 小谷 卓矢<br><br>(Kotani Takuya)<br><br>(80411362)   | 大阪医科大学・医学部・特別職務担当教員（講師）<br><br><br>(34401) |    |
| 研究分担者 | 池本 正生<br><br>(Ikemoto Masaki)<br><br>(80144385)  | 長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・客員教授<br><br><br>(34204) |    |
| 研究分担者 | 鈴鹿 隆保<br><br>(Suzuka Takayasu)<br><br>(50748225) | 大阪医科大学・医学部・助教<br><br><br>(34401)           |    |

6. 研究組織（つづき）

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                    | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                   | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 岡田 光貴<br><br>(Okada Kohki)<br><br>(80747569) | 京都橘大学・健康科学部・専任講師<br><br><br><br>(34309) |    |

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