

令和 5 年 5 月 26 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16116

研究課題名（和文）細菌由来アポトーシス促進ペプチドを標的とした特発性肺線維症治療法の開発

研究課題名（英文）Development of treatment for idiopathic pulmonary fibrosis targeting bacterial-derived apoptosis-promoting peptides

研究代表者

安間 太郎（Yasuma, Taro）

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80773887

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：特発性肺線維症（IPF）は、慢性進行性に高度の線維化と肺胞構築の改変を呈する原因不明の致死的な肺疾患である。近年、細菌叢がIPFの病態に関与することが報告されているが詳細な機序は不明である。我々は以前に肺線維症マウスの肺組織から細菌由来の細胞死誘導ペプチドであるcorisinを発見した。本研究ではcorisinの活性を抑制するモノクローナル抗体を作製し、複数の肺線維症マウスモデルに投与して病態抑制効果を検討した。その結果、抗corisin抗体の投与により肺の炎症や線維化、肺胞上皮細胞の細胞死が抑制された。本研究結果から、corisinが肺線維症の病態進行や急性増悪に関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

IPFの病態に細菌叢が関与することが報告されてきたが、詳細な分子機構は不明であった。我々は、細菌叢由来のペプチドであるcorisinが肺線維症の病態進行や急性増悪に関与することを初めて明らかにした。これは細菌がペプチドの放出を介して病態に直接的に関与することを示している。本研究結果は、難治性疾患であるIPFの新規治療や新規バイオマーカーの開発につながりうる、大変有意義な研究成果であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Idiopathic pulmonary fibrosis is an incurable disease of unknown etiology. We recently identified corisin, a proapoptotic peptide that triggers acute exacerbation of pulmonary fibrosis. In this study, we prepared a monoclonal antibody that suppresses the activity of corisin and verified its effect on a pulmonary fibrosis mouse model. We have shown that an anticorisin monoclonal antibody ameliorates inflammation, fibrosis and apoptosis of alveolar epithelial cells in the human transforming growth factor 1 model and the bleomycin model. These results underscore the role of corisin in the pathogenesis of acute exacerbation of pulmonary fibrosis and provide a novel approach to treating this incurable disease.

研究分野：免疫学

キーワード：特発性肺線維症 細菌叢 アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (IPF) は特発性間質性肺炎の中で最も頻度が高く、慢性進行性に高度の線維化と肺泡構築の改変を呈し、不可逆的な蜂巣肺の形成をきたす原因の特定できない致死的な肺疾患である。IPF の患者数は世界全体で 300 万人と推定され、中年以降の発症が多いのが特徴で、高齢化社会を背景に患者数は増加している。IPF の予後は多くの種類の悪性腫瘍よりも悪く、診断後の中間生存期間は平均 3 年で、5 年生存率が 20~40%と極めて予後不良である。特に IPF 急性増悪の致命率は高く、IPF 患者の死亡の 4 割を占める。近年、薬物療法として抗線維化薬である pirfenidone や nintedanib が用いられるようになり、線維化の進行を遅らせることが報告されているが、治療効果は限定的であり、新たな治療方法の開発が急務である。

IPF の疾患の進行や急性増悪において、肺上皮細胞のアポトーシスが重要な役割を果たす。また近年、肺細菌量の増加が IPF の急性増悪と高い死亡率に関連し (Am J Respir Crit Care Med 190, 906-913)、ブドウ球菌属および連鎖球菌属の肺内細菌叢の相対的な量が IPF の進行の加速と関連する (Lancet Respir Med 2, 548-556) ことが報告され、肺マイクロバイオームが IPF の原因の一つとして注目されている。

我々は、以前に IPF 患者および肺線維症マウスの肺細菌叢が類似し、好塩菌が豊富であることを報告した (Front Microbiol 18:1892, 2018)。そして肺線維症マウスの肺組織を高塩環境で培養し、単離した細菌を 16S rRNA 遺伝子の配列により同定し、その培養上清が気管支上皮細胞および肺胞上皮細胞のアポトーシスを促進することを発見した。さらに培養上清中の生物活性物質を精製し、質量分析法により 19 アミノ酸残基で構成されるペプチドを同定し、corisin と名付けた。さらに corisin の配列は様々な細菌のトランスグリコシラーゼ内に高度に保存されていることを明らかにした。合成した corisin を気管支上皮細胞および肺胞上皮細胞に投与したところアポトーシスが増加し、in vivo 実験においても、corisin を投与された肺線維症マウスは、肺胞上皮細胞のアポトーシスが有意に増加し病態が悪化した。さらに IPF 患者の気管支肺胞洗浄液中で corisin が上昇しており、急性増悪を起こした患者ではさらに上昇していることがわかった。これらの研究結果から細菌由来のアポトーシス促進因子である corisin の過剰な放出が IPF の病態に寄与することが示唆された (Nat Commun. 24;11(1):1539, 2020)。corisin をターゲットとした医薬を開発することにより、未だに画期的な治療薬の発見に至っていない IPF の新たな治療法につながる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、細菌由来ペプチド corisin の活性を抑制するモノクローナル抗体を用い、肺線維症モデルにおいて肺の線維化や急性増悪に対する効果を検討することにより、新しい IPF 治療薬としての可能性を見出し、臨床応用への展開を計る研究基盤を構築する事を目的とする。

3. 研究の方法

①肺線維症の進行に対するモノクローナル抗 corisin 抗体の効果の検討

野生型マウスに皮下浸透圧ポンプを用いてプレオマイシンを持続投与し、肺線維症を誘発した。プレオマイシン投与開始翌日より、治療群には週に 3 回、モノクローナル抗 corisin 抗体を腹腔内投与し、非治療群には control IgG を投与した。3 週後に肺 microCT の撮影を行った後に、気管支肺胞洗浄液 (BALF)、血液の採取および肺摘出を行った。肺線維化の程度をヘマトキシリン・エオジン染色標本における Ashcroft score により評価した。BALF、血液、および肺組織中の炎症性サイトカイン、線維化関連因子、アポトーシス関連因子を評価した。TUNEL 染色により肺胞上皮細胞のアポトーシスを評価した。

②肺線維症急性増悪に対するモノクローナル抗 corisin 抗体の効果の検討

我々が開発した肺特異的ヒト TGF-1-TG マウス (Am J Respir Cell Mol Biol 46:397-406, 2012) の肺 microCT を撮影し、肺線維化の程度が治療群と非治療群で同等になるように群分けし、corisin 気管内投与による肺線維症急性増悪モデル (Nat Commun. 24;11(1):1539, 2020) を作製した。肺線維化を有さないマウスを対照群とした。治療群には corisin 気管内投与前の 2 週間で 5 回モノクローナル抗 corisin 抗体を腹腔内投与し、非治療には control IgG を投与した。corisin 気管内投与の 24 時間後に肺 microCT 撮影した後に、気管支肺胞洗浄液 (BALF)、血液の採取および肺摘出を行い、炎症と線維化の程度を評価した。

4. 研究成果

①プレオマイシン誘発肺線維症モデルにおいて、抗 corisin 抗体投与により非治療群と比較して有意に Ashcroft score、肺 microCT の線維化スコアが改善し、血液中・気管支肺胞洗浄液中のオステオポンチンおよび MUC-1 の濃度、気管支肺胞洗浄液中の MUC5B 濃度が有意に減少した (図 1A,B,C)。また抗 corisin 抗体投与により有意に TUNEL 染色陽性面積が減少し、肺組織における活性化カスパーゼ 3 の蛋白発現レベルが減少した (図 2A,B)。

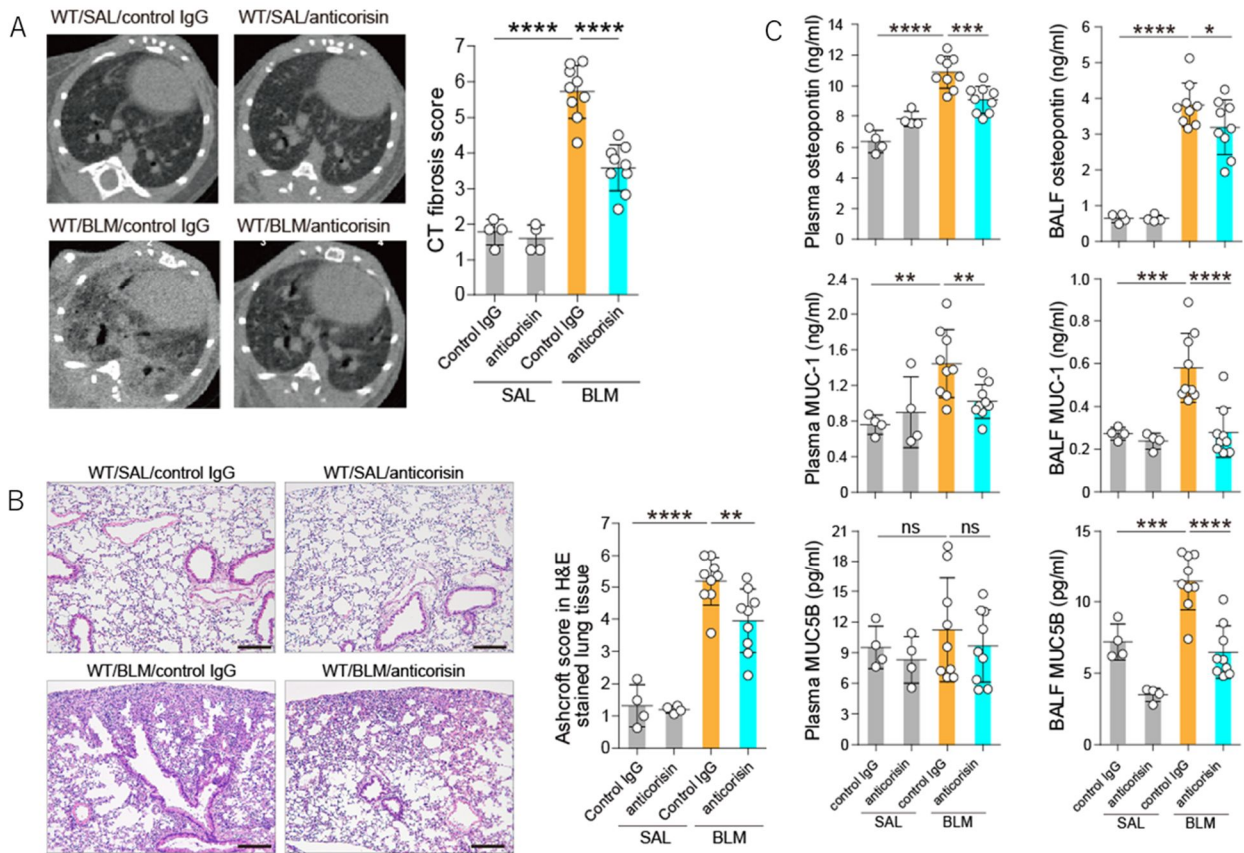


図1 プレオマイシン肺線維症モデルにおいて、抗 corisin 抗体の投与により肺線維化が抑制される。A.肺 microCT の線維化スコア B.肺の病理と Ashcroft score C.血液および気管支肺胞洗浄液中の線維化関連因子の濃度

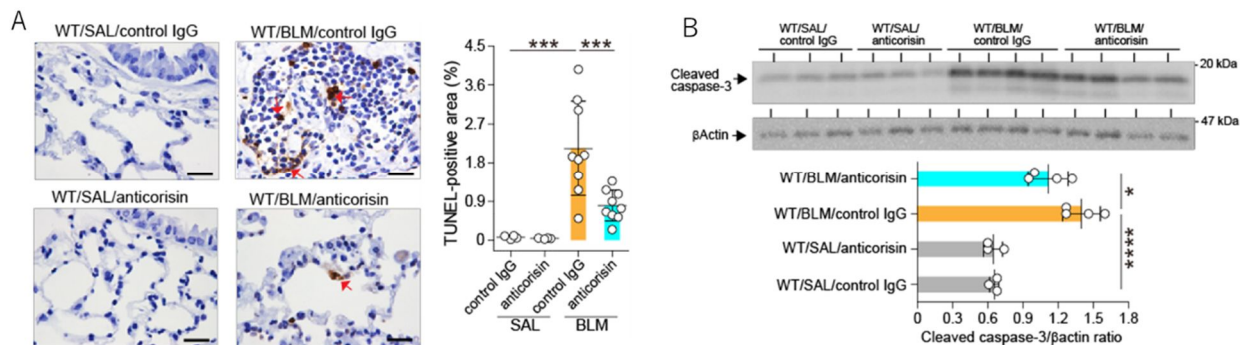
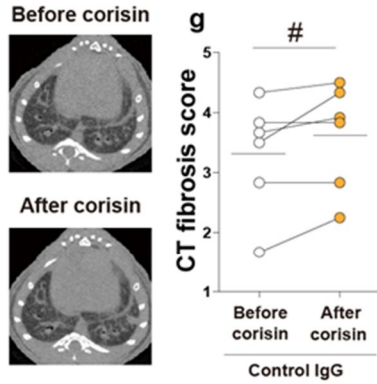


図2 プレオマイシン肺線維症モデルにおいて、抗 corisin 抗体の投与によりアポトーシスが抑制される。A.肺 TUNEL 染色 B.活性化カスパーゼ3の発現(Western Blot 法)

②control IgG を投与した非治療群の肺線維症マウスでは corisin 気管内投与による急性増悪誘発の前後で肺 microCT の線維化スコアが有意に悪化したのに対し、抗 corisin 抗体を投与した肺線維症マウスでは線維化スコアが有意に改善した(図3)。肺マッソン・トリクローム染色標本においても抗 corisin 抗体を投与した肺線維症急性増悪マウスでは非治療群と比較して有意にコラーゲンの沈着が抑制された(図3)。また、気管支肺胞洗浄液中の総細胞数、マクロファージ数およびリンパ球数が、非治療群の肺線維症急性増悪マウスで対照群と比較して有意に増加したのに対し、抗 corisin 抗体を投与した群ではいずれも有意な増加を認めず、総細胞数とリンパ球数は抗 corisin 抗体を投与した治療群において、非治療群と比較して有意な減少をみとめた(図4)。

TGFβ1 TG/fibrosis(+)/control IgG/corisin group



TGFβ1 TG/fibrosis(+)/anticorisin/corisin group

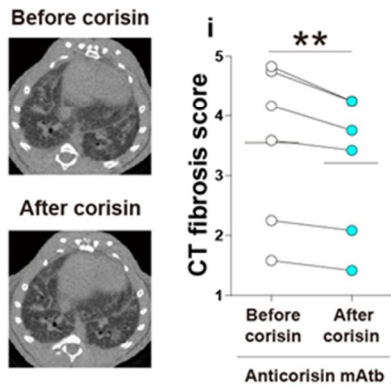


図3 corisin 気管内投与による肺線維症急性増悪モデルにおいて抗 corisin 抗体投与により肺線維化が抑制される。

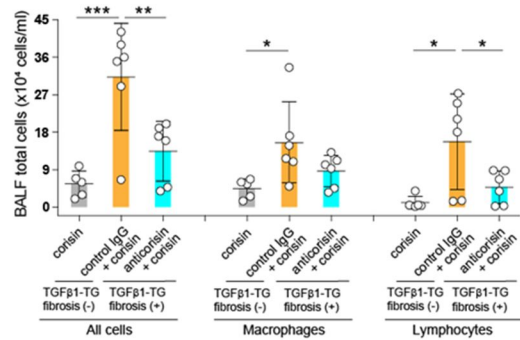
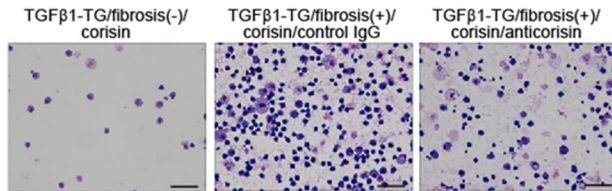


図4 気管支肺胞洗浄液中の細胞数。corisin 気管内投与による肺線維症急性増悪モデルにおいて抗 corisin 抗体投与により炎症が抑制される。

本研究ではプレオマイシン投与による肺線維症マウスモデルおよび TGF 1 過剰発現と細菌由来ペプチド corisin の気管内投与による肺線維症急性増悪マウスモデルを用いて、抗 corisin モノクローナル抗体の治療効果を検討した。いずれのモデルにおいても corisin の阻害により肺障害が抑制されることが明らかとなった。これらの結果から、corisin が肺線維症において、病態の進行や急性増悪に関与し、新規のバイオマーカーや治療標的として有用である可能性が示唆された。

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 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 D ' Alessandro-Gabazza CN, Yasuma T, Kobayashi T, Toda M et al.	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 Inhibition of lung microbiota-derived proapoptotic peptides ameliorates acute exacerbation of pulmonary fibrosis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nat Commun.	6. 最初と最後の頁 1558
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-29064-3.	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

〔学会発表〕 計0件

〔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		
米国	University of Illinois Urbana-Champaign		