

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16118

研究課題名（和文）肺線維症の新たな病態理解に基づく治療法の探索

研究課題名（英文）Exploring treatments based on a new understanding of the pathogenesis of pulmonary fibrosis.

研究代表者

福島 清春（Fukushima, Kiyoharu）

大阪大学・免疫学フロンティア研究センター・特任助教（常勤）

研究者番号：00752156

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：特発性肺線維症（IPF）は、予後不良の指定難病であり、根治的な治療薬は開発されていない。先行研究により見出されたRBM7/NEAT1/CXCL12カスケードによる線維化制御メカニズムおよび免疫細胞・非免疫細胞の相互連関を検討することで、線維症の発症過程の包括的な理解を目指した。進展した線維化肺は荒廃した終末期の病像ととらえられてきたが、線維芽細胞活性化を維持し線維化を進展させる活発な免疫応答があることが示された。免疫細胞・非免疫細胞の相互連関による線維化制御メカニズムを検討することで、線維化を維持・進展させる分子・細胞間ダイナミズムを明らかにすることが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今なお根本的な治療薬は開発されておらず、効果的な治療法が不足しているIPFに対して、申請者のグループはSatMやRBM7等の新たな知見を次々に見いだして報告してきており、これらの新知見により肺線維症の発症メカニズムの理解に関して大きな転換がもたらされた。

本研究は、申請者の新知見によりもたらされた肺線維症発症のメカニズムに基づく病態理解をさらに発展させるものであり、社会的にも求められる方向性であり、本研究により線維症を引き起こすメカニズムを新たな視点から理解することが出来るとともに、本研究により新たに見出される知見は更なる新規治療への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is an incurable disease with a poor prognosis and a strong association with smoking in its pathogenesis. We aim to gain a comprehensive understanding of the pathogenesis of fibrosis by investigating the mechanisms of fibrosis regulation by the RBM7/NEAT1/CXCL12 cascade and the interplay between immune and non-immune cells, as identified in previous studies. The regulatory mechanisms of RBM7 expression were investigated. The novel pathogenesis of fibrotic lesions was investigated by single-cell RNA-seq analysis of lung fibrosis patient samples. Advanced fibrotic lung is considered a devastating end-stage disease, but an active immune response has been shown to maintain fibroblast activation and promote fibrosis. By studying the mechanisms of fibrosis regulation through the interplay between immune and non-immune cells, we have been able to elucidate the molecular and intercellular dynamics that maintain and promote fibrosis.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺線維症

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (IPF) は、病態解明が不十分で根治薬も存在しない予後不良の疾患であり、発症には喫煙との強い関連が指摘されている。IPF においては、治療の主体は抗線維化薬となり、病態をめぐる理解に関しても近年大きな転換がもたらされた。従来、肺線維症の病態は「慢性の胞隔の炎症から肺障害、そして線維化に至る過程」として捉えられてきた (慢性炎症仮説)。そのため、薬物治療としてはステロイドや免疫抑制剤が治療の中心を担ってきたが、現在その有効性は否定されつつある。近年の分子生物学的研究の進歩により、線維症とは慢性炎症自体に起因するものではなく、異常な創傷治癒過程としての持続的な繊維芽細胞巢の増生・進行性の線維化が起こるものとして理解されるに至り、線維化それ自体のメカニズムが研究・創薬の標的として中心的な存在となっている。申請者は線維症の発症の起点となる単球サブセット<sup>3)</sup>、および線維症関連遺伝子である RBM を先行研究において見出し、線維症の病態形成過程を精緻に分析することにより治療へとつながる画期的な知見を得ている。

### 2. 研究の目的

マウスモデルと臨床検体の先行研究成果をもとに、新たな病態理解に基づく治療標的を確立できないか? と考え、豊富な臨床検体を用いた RBM7 の上流・下流に存在する分子も含めた RBM7 の治療標的の妥当性の検討、線維症発症過程における多彩な免疫細胞・非免疫細胞の相互関連の解析を通じた新たな病態理解・治療標的の同定をおこなう。

### 3. 研究の方法

ヒト IPF における RBM7 の発現を大学病院及びその関連施設の豊富な臨床サンプルを利用して大規模コホートで検証した。疾患群において発現が高度に上昇することは既に検証済みであり、さらに疾患群における検討でも発現と予後の相関が得られた。RBM7 の上流・下流に存在する分子も含めた RBM7 標的療法の妥当性の検証を目指すため、RBM7 の発現制御メカニズムを検討する。RBM7 は線維化とともに著しく増加するが、その発現を制御するメカニズムは不明であった。RBM7 の発現上昇は RNA レベルよりもタンパクレベルで顕著であること、プロテアソーム阻害薬である MG132 投与により RBM7 の発現が上昇することにより、タンパク分解のレベルでの制御が重要であると考えた。共免疫沈降-質量分析により、RBM7 と相互作用するユビキチンリガーゼの検討をおこなった。複雑で多様な肺線維症の病態の理解のために、バルク解析による平均値を捉えるこれまでの手法では見逃されてきた特定の細胞集団の同定をシングルセル RNA-seq 解析により解決した。申請者らはすでに線維症特異的血球サブセットである SatM (Nature 2017) を見出しているとともに、線維化肺において非免疫細胞との相互作用による細胞内代謝変化により、特定の単球由来マクロファージ細胞群に線維化促進性の形質が誘導されることを見出しており、肺線維症患者検体の解析により得られる知見により線維化という複雑な病態の核心に迫ることが出来る。間質性肺炎患者肺の気管支肺胞洗浄液に加えて、肺組織、末梢血のシングルセル RNA-seq を施行するとともに空間的遺伝子発現解析を可能にした Visium 10x を併用することで多様な細胞群の組織空間内の動的なダイナミズムを検証した。

### 4. 研究成果

共免疫沈降-質量分析により、RBM7 と相互作用するユビキチンリガーゼの検討をおこなった。共免疫沈降-質量分析により、RBM7 が E3 ユビキチンリガーゼである HUWE1, LTN1, SHPRH, RNF140 と相互作用することを見出した。これらの E3 ユビキチンリガーゼに関して siRNA を用いて発現を抑制したところ、HUWE1 の knock down により RBM7 発現が上昇することが見出された。HUWE1 以外の分子についても RBM7 発現との関連性を検討する。線維化肺における HUWE1 の発現および新たな標的分子の探索をおこなう。HUWE1 のノックアウトマウスを作成している。間質性肺炎患者肺の気管支肺胞洗浄液のシングルセル RNA-seq 解析を 20 例において施行した。線維化の病勢と顕著な相関を示す Fibrotic macrophage の population を同定することが出来たとともに、複数の異なった免疫細胞サブセットが線維化の進行と関連していることを見出した。これら細胞群はそれぞれ特徴的な遺伝子発現、表面マーカーを有し、密接な相互関連が進行性線維化病態を形成していると考えられる。この事実は間質の病変の反映としての免疫細胞サブセットと、進行性線維化に特異的な免疫細胞サブセットを、非線維化性間質性肺炎患者の免疫細胞動態を考慮することにより明確に分離することが出来ることを示唆している。線維化肺で空間的遺伝子発現解析を施行し、活性化線維芽細胞周囲には Foci 状の Fibrotic macrophage の集積があることを見出し、線維化を伴う多様な間質性肺疾患で同様の所見を認めたことから、Fibrotic macrophage foci (FMF) と名付けた。続いて、肺線維症患者 (IPF および他の間質性肺炎を想定) の気管支鏡検査検体 (気管支肺胞洗浄液 (BALF))、手術検体、末梢血単核球 (PBMC) について、scRNA-seq を施行した。scRNA-seq により線維化に影響する特異的な単球/マクロファージサブセットの同定をおこなうとともに、線維芽細胞や上皮細胞との細胞間相互作用による線維化促進メカニズムの解析をおこなった。間質性肺炎患者および対照群の scRNA-seq を施行し、20 例

の気管支肺胞洗浄液、9例の肺組織、および5例のPBMCのscRNA-seqを施行した。線維症発症過程における多彩な免疫細胞・非免疫細胞の相互連関の解析を施行し、FMFに存在するマクロファージと相同する線維化関連単球/マクロファージサブセットを同定し(FMF macrophage)、疾患の形成過程における単球/マクロファージの多様性およびその分化系譜の一端が明らかになった。すなわち、肺組織、末梢血のシングルセルRNA-seq解析との統合解析をおこない遺伝子発現パターンの類似性から細胞を擬似時間軸で並べ細胞の分化経路を調べるRNA velocityを用いたtrajectory解析をおこなったところ、異なった単球サブセットが線維化と関連する多様なマクロファージサブセットを形成することがわかった。このことより、間質性肺疾患において特徴的なマクロファージサブセットの分化が促進されるとともに、多様な細胞間相互作用の中で線維化を運命づける複数のサブセットの相互連関が疾患環境の維持・進展に関与し、複雑な病態形成が行われている可能性が示唆された。

以上より、進展した線維化病変内に集積する線維化促進性のサブセットは、周囲の線維芽細胞と緻密な代謝連関を形成し線維化病変の維持・進展をおこなっていることがわかった。すなわち、進展した線維化肺は荒廃した終末期の病像ととらえられてきたが、線維芽細胞活性化を維持し線維化を進展させる活発な免疫応答があることが示された。このため、生体には精緻な創傷治癒機転が存在するにもかかわらず、線維化は維持・進展すると考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takata S., Komukai S., Hoshino T., Tabuchi H., Masuhiro K., Yaga M., Shirai Y., Mitsui Y., Abe Y., Kuge T., Fukushima K., Kida H., Kumanogoh A.	4. 巻 27
2. 論文標題 Identifying phenotypes in interstitial lung disease using group-based trajectory modelling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease	6. 最初と最後の頁 332 ~ 334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5588/ijtld.22.0417	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 Fukushima Kiyoharu, Matsumoto Yuki, Matsuki Takanori, et al.	4. 巻 61
2. 論文標題 MGIT-seq for the Identification of Nontuberculous Mycobacteria and Drug Resistance: a Prospective Study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/jcm.01626-22	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 Niitsu Takayuki, Fukushima Kiyoharu, Komukai Sho, Takata So, Abe Yuko, Nii Takuro, Kuge Tomoki, Iwakoshi Shinichi, Shiroyama Takayuki, Miyake Kotaro, Tujino Kazuyuki, Tanizaki Satoshi, Iwahori Kota, Hirata Haruhiko, Miki Keisuke, Yanagawa Masahiro, Takeuchi Noriyuki, Takeda Yoshito, Kida Hiroshi, Kumanogoh Atsushi	4. 巻 9
2. 論文標題 Real-world impact of antifibrotics on prognosis in patients with progressive fibrosing interstitial lung disease	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 RMD Open	6. 最初と最後の頁 e002667 ~ e002667
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1136/rmdopen-2022-002667	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 Kuge Tomoki, Fukushima Kiyoharu, Matsumoto Yuki, et al.	4. 巻 28
2. 論文標題 Chronic Pulmonary Disease Caused by Tsukamurella toyonakaense	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Emerging Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1437 ~ 1441
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3201/eid2807.212320	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 Abe Yuko, Fukushima Kiyoharu, Matsumoto Yuki, Niitsu Takayuki, Nabeshima Hiroshi, Nagahama Yasuharu, Akiba Eri, Haduki Kako, Saito Haruko, Nitta Tadayoshi, Kawano Akira, Tanaka Michio, Matsuki Takanori, Motooka Daisuke, Tsujino Kazuyuki, Miki Keisuke, Nakamura Shota, Iida Tetsuya, Kida Hiroshi	4. 巻 72
2. 論文標題 Mycobacterium senriense sp. nov., a slowly growing, non-scotochromogenic species, isolated from sputum of an elderly man	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/ijsem.0.005378	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 Nii Takuro, Fukushima Kiyoharu, Kida Hiroshi	4. 巻 19
2. 論文標題 Specific targeting of lung ILC2s via NRP1 in pulmonary fibrosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular & Molecular Immunology	6. 最初と最後の頁 869 ~ 871
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41423-022-00867-0	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 Amiya Saori, Hirata Haruhiko, Shiroyama Takayuki, Adachi Yuichi, Niitsu Takayuki, Noda Yoshimi, Enomoto Takatoshi, Hara Reina, Fukushima Kiyoharu, Suga Yasuhiko, Miyake Kotaro, Koide Moe, Uchiyama Akinori, Takeda Yoshito, Kumanogoh Atsushi	4. 巻 9
2. 論文標題 Fatal cytomegalovirus pneumonia in a critically ill patient with COVID 19	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Respirology Case Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rcr2.801	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 Nii Takuro, Fukushima Kiyoharu, Kida Hiroshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Specific targeting of lung ILC2s via NRP1 in pulmonary fibrosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular & Molecular Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41423-022-00867-0	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 Kawasaki Takahiro, Kitada Seigo, Fukushima Kiyoharu, Akiba Eri, Haduki Kako, Saito Haruko, Nitta Tadayoshi, Kawano Akira, Miyazaki Akito, Nii Takuro, Kuge Tomoki, Koba Taro, Matsuki Takanori, Tsujino Kazuyuki, Miki Keisuke, Maekura Ryoji, Kida Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 The Diagnosis of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease by Single Bacterial Isolation Plus Anti-GPL-Core IgA Antibody	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Spectrum	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/spectrum.01406-21	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 Niitsu Takayuki, Kuge Tomoki, Fukushima Kiyoharu, Matsumoto Yuki, Abe Yuko, Okamoto Masashi, Haduki Kako, Saito Haruko, Nitta Tadayoshi, Kawano Akira, Matsuki Takanori, Motooka Daisuke, Tsujino Kazuyuki, Miki Keisuke, Nakamura Shota, Kida Hiroshi, Kumanogoh Atsushi	4. 巻 8
2. 論文標題 Pleural Effusion Caused by Mycolicibacterium mageritense in an Immunocompetent Host: A Case Report	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmed.2021.797171	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 Kawasaki Takahiro, Sugihara Fuminori, Fukushima Kiyoharu, Matsuki Takanori, Nabeshima Hiroshi, Machida Tomohisa, Mitsui Yuichi, Fujimura Saki, Sagawa Rio, Gaheun Lee, Kuniyoshi Kanako, Tanaka Hiroki, Narazaki Masashi, Kumanogoh Atsushi, Akira Shizuo, Satoh Takashi	4. 巻 118
2. 論文標題 Loss of FCHSD1 leads to amelioration of chronic obstructive pulmonary disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2019167118	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 Fukushima Kiyoharu, Kitada Seigo, Matsumoto Yuki, Komukai Sho, Kuge Tomoki, Kawasaki Takahiro, Matsuki Takanori, Motooka Daisuke, Tsujino Kazuyuki, Miki Mari, Miki Keisuke, Nakamura Shota, Kida Hiroshi	4. 巻 187
2. 論文標題 Serum GPL core antibody levels are associated with disease activity and treatment outcomes in Mycobacterium avium complex lung disease following first line antibiotic treatment	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Respiratory Medicine	6. 最初と最後の頁 106585 ~ 106585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.rmed.2021.106585	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 Abe Yuko, Suga Yasuhiko, Fukushima Kiyoharu, Ohata Hayase, Niitsu Takayuki, Nabeshima Hiroshi, Nagahama Yasuharu, Kida Hiroshi, Kumanogoh Atsushi	4. 巻 23
2. 論文標題 Advances and Challenges of Antibody Therapeutics for Severe Bronchial Asthma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 83 ~ 83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23010083	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 Fukushima Kiyoharu, Akira Shizuo	4. 巻 33
2. 論文標題 Novel insights into the pathogenesis of lung fibrosis: the RBM7 NEAT1 CXCL12 SatM axis at fibrosis onset	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 659 ~ 663
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxab034	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2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 福島 清春
2. 発表標題 空間・細胞間ダイナミズムから導く進行性線維化の新たな病態理解
3. 学会等名 第64回 日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 福島清春、佐藤荘、熊ノ郷淳、審良静男
2. 発表標題 新規線維症関連遺伝子RBM7によるnon-coding RNA分解を介する線維化制御
3. 学会等名 第61回呼吸器学会学術講演会
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
---------	---------