

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16122

研究課題名(和文) ヒト間葉系幹細胞由来細胞外小胞の肺線維化制御の解明

研究課題名(英文) The mechanisms of antifibrotic effects of extracellular vesicles derived from human mesenchymal stem cells

研究代表者

門屋 講太郎 (Kadoya, Kotaro)

順天堂大学・医学部・非常勤助教

研究者番号：10849706

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)：間葉系幹細胞(MSC)由来Extracellular Vesicle(EV)製剤をTGF β 刺激下で肺線維芽細胞に作用させたところ、ファイブロネクチン濃度勾配に対する遊走能の抑制、コラーゲンゲル収縮能の抑制がみられた。また、SMAや型コラーゲンの産生能の抑制がみられた。次に、MSC由来EV製剤のmiRNA網羅的解析やmiRNA mimic実験により、ある特定のmiRNAが抗線維化作用を有することが示した。さらに作用機序解明のために細胞内シグナル経路に着目して検証を進め、EV製剤を投与された肺線維芽細胞では線維化に関連するリン酸化シグナルおよび特定の蛋白発現を抑制することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、従来にない間葉系幹細胞由来Extracellular Vesicle(EV)による肺線維症の病態制御機序の解明を行い、間葉系幹細胞由来EVのタンパク質やmiRNAの新たな抗線維化標的因子の同定を行う。革新的な新規バイオ抗線維化薬剤として間葉系幹細胞由来EVの臨床応用にに向けた基盤研究である。

研究成果の概要(英文)：When lung fibroblasts were subjected to TGF β stimulation and treated with extracellular vesicle (EV) preparations derived from mesenchymal stem cells (MSCs), there was a notable inhibition of their migratory capabilities in response to fibronectin concentration gradients and a reduction in their ability to contract collagen gels. Additionally, these preparations suppressed the production of α -smooth muscle actin (α -SMA) and type I collagen. Further investigations, including comprehensive miRNA analyses and miRNA mimic experiments of the MSC-derived EVs, identified a specific miRNA that exhibited anti-fibrotic effects. To explore the underlying mechanisms, the study focused on intracellular signaling pathways in the treated fibroblasts. It was demonstrated that the EV treatment suppressed fibrosis-related phosphorylation signaling and specific protein expression in lung fibroblasts, suggesting a potential therapeutic pathway for fibrotic diseases.

研究分野：肺線維症

キーワード：Extracellular vesicles 間葉系幹細胞 肺線維芽細胞 TGF- β micro RNA

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症は肺の線維化の進行により呼吸不全をきたし生存率に寄与する有効性を証明した薬物療法はなく非常に予後不良な疾患である。肺線維化の病態に直接深く関与する肺線維芽細胞の間葉系幹細胞 (MSC) 由来 Extracellular Vesicle (EV) による機能活性制御に着目した。MSC 由来 EV は内包される多種多様なタンパク質や miRNA が細胞に作用し、生体内の均衡を保ちながら抗炎症効果や組織修復効果を発揮する。申請者らの研究グループは、独自の手法で臍帯血から抽出した高純度の MSC 由来 EV を用い (特許出願済) 肺線維芽細胞の過剰な機能活性や、肺線維症動物モデルにおける肺線維化の抑制から、線維化肺から正常肺再生機序の解明を達成目標とした。

本研究は、従来にない MSC 由来 EV による肺線維症の病態制御機序の解明を行い、MSC 由来 EV のタンパク質や miRNA の新たな抗線維化標的因子の同定を行う。革新的な新規バイオ抗線維化薬剤として MSC 由来 EV の臨床応用に向けた基盤研究である。

2. 研究の目的

肺線維症の中でも特発性肺線維症 (IPF) は慢性経過で肺の線維化が進行し発症後の平均生存期間は 3-4 年と非常に予後不良な疾患である。現時点では生存率や健康関連 QOL に寄与する有効性を証明した薬物療法はなく治癒が期待出来ない。よって悪化を阻止することを治療目標とする慢性進行性の線維化の完成した肺組織は、重度の呼吸不全につながる後遺症として非可逆性であり、生涯において正常肺の再生は困難と考えられている難治性肺疾患である。IPF の承認薬であるピルフェニドンおよびニンテダニブは副作用も強い上、効果に乏しく、平均余命は 9 カ月とアンメットニーズであり、新薬が望まれている。近年、間葉系幹細胞 (MSC) 移植の有効性は様々な疾患を対象に臨床試験で確認されつつある。

現在、IPF 患者に対して MSC 細胞移植治療の第 Ⅰ 相試験が行われている (A Phase I Safety Clinical Trial. Chest.2017, 151(5):971-981.)。また、プレオマイシン誘発肺線維症モデルで、MSC 由来の EV は線維化期からの投与でも有効だとの報告がある。(JCI Insight. 2019, 1;4(21):e128060.) 更に、難治性疾患への適応拡大も可能 (Biomarker Research. 2019, 7:(8),3-8) であり、社会的貢献度は非常に高い。EV は MSC 細胞製剤よりもハンドリングしやすく、保存性に優れ、安定供給が可能な上、安全に投与量を増やせるため薬効の増強も期待できる。MSC 由来 EV は内包される多種多様なタンパク質や miRNA が細胞に作用し、生体内の均衡を保ちながら抗炎症効果や組織修復効果を発揮することが十分に期待される。

3. 研究の方法

線維化の病態を強力に促進させることが知られている TGF-β1 が誘導する (1) 遊走能 (2) 肺線維芽細胞含有コラーゲンゲル収縮能 (3) 収縮性ストレスファイバーである平滑筋アクチン (SMA) 産生能 (4) 細胞外基質 (ECM) 産生能を、Ex-vivo における代表的線維化モデルの解析方法として導入した。上記の実験には、ATCC より購入したヒト胎児肺由来線維芽細胞株 HFL-1、当院呼吸器外科手術症例において肺癌患者の摘出肺の非癌部肺組織から分離培養した正常肺線維芽細胞、研究協力施設の神奈川循環器呼吸器病院より提供いただいた肺線維症肺線維芽細胞を用いた。また、In-vivo 検証としてプレオマイシンモデルマウスに MSC-EV 製剤を経静脈的に投与し、肺組織の免疫組織化学染色や IVUS などにより抗線維化作用機序の検証を行った。

4. 研究成果

(1) 間葉系幹細胞 (MSC) 由来 Extracellular Vesicle (EV) 製剤を TGF-β1 刺激下でヒト胎児肺由来線維芽細胞株 HFL-1 に作用させたところ、ファイブロネクチン濃度勾配に対する遊走能の抑制、肺線維芽細胞含有コラーゲンゲル収縮能の抑制がみられた (Figure 1A-B)。また、ウエスタンプロット法を用いて、SMA や α1(I) 型コラーゲンの産生能の抑制がみられた。

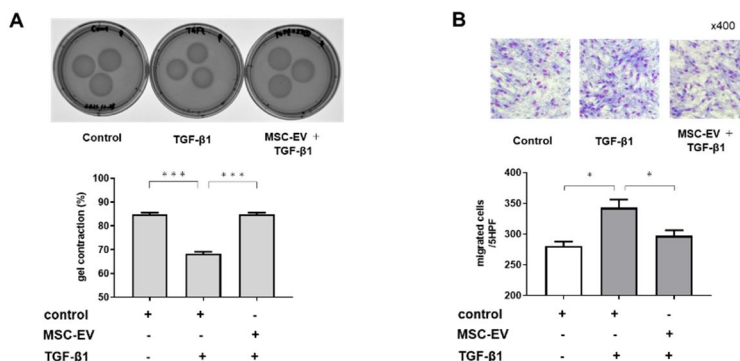


Figure 1A-B. Collagen gel contraction assay chemotaxis cell migration assay

(2) また、正常肺線維芽細胞および肺線維症肺線維芽細胞を用いて同様の検証を行った。遊走能抑制効果、収縮能抑制効果、および SMA/型コラーゲン産生能抑制効果は、いずれも肺線維症肺線維芽細胞でより顕著に認められた。これらの結果から、MSC 由来 EV 製剤が線維芽細胞に直接作用することで、肺線維症の病態を抑制しうる可能性が示唆された。

(3) 次に、MSC 由来 EV 製剤の miRNA マイクロアレイ網羅的解析を行い、製剤中に特に豊富に含まれている miRNA 群を同定した。本解析結果をもとに、特に抗線維化作用が期待される複数の miRNA に着目し、miRNA mimic や miRNA inhibitor を用いて上記の Ex-vivo 実験を行った。その結果、ある特定の miRNA mimic が遊走能抑制効果、収縮能抑制効果、および SMA/型コラーゲン産生能抑制効果を有していることが示された。よって、MSC 由来 EV 製剤に含まれる特定の miRNA が抗線維化作用を有する可能性が示唆された。

(4) さらに作用機序解明のために細胞内シグナル経路に着目して検証を進めた。MSC 由来 EV 製剤を投与された肺線維芽細胞では、最も強力な線維化シグナルである Smad 経路 (canonical 経路) は抑制されていなかった。一方、その他の線維化に関連する non-canonical 経路と呼ばれる複数のリン酸化シグナル経路が抑制されていた (Figure2A)。また、シグナル上流に位置するリン酸化蛋白のリン酸化や、それに関連する特定の受容体蛋白発現を抑制することも示した。さらに、上記で同定した特定の miRNA が、この受容体蛋白発現を抑制することが、miRNA mimic を用いた検証によって示された。

よって、MSC 由来 EV 製剤の抗線維化作用機序として、特定の miRNA を介した線維芽細胞の non-canonical 経路のリン酸化抑制が関わっていることが示唆された。

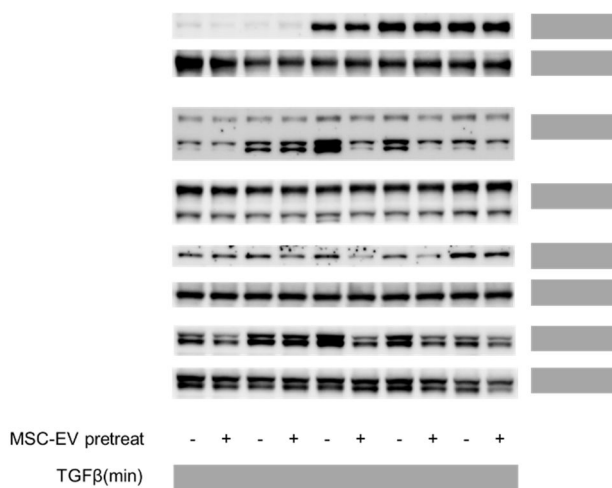


Figure2. Phosphorylation of TGF-β signaling pathways

(5) 上記実験結果を In-vitro でも検証するために、肺線維症モデルとしてプレオマイシンマウスモデルを用いて MSC 由来 EV 製剤の薬効を検証した。プレオマイシン投与マウスに MSC 由来 EV 製剤を経静脈的に投与したところ、マウス肺に集積していることが IVUS 画像により示された。また、MSC 由来 EV 製剤の治療効果によって、体重減少の抑制および肺線維化の組織スコアの改善がみられた。また、マウス肺組織の免疫組織化学染色を行ったところ、上記実験で同定した受容体蛋白発現が抑制されていることが示された。

<引用文献>

A Phase I Safety Clinical Trial. Chest.2017, 151(5):971-981.
 JCI Insight. 2019, 1;4(21): e128060.
 Biomarker Research. 2019, 7:(8),3-8

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Okamoto Shouichi, Kobayashi Isao, Moriyama Hiroshi, Tanimura Mayuka, Kadoya Kotaro, Ienaga Hiroki, Kikuchi Toshiaki, Takahashi Kazuhisa	4. 巻 37
2. 論文標題 Silicosis-related pleural effusion diagnosed using elemental analysis of the pleural fluid cell block: A case report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Respiratory Medicine Case Reports	6. 最初と最後の頁 101665 ~ 101665
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.rmcr.2022.101665	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 Sumiyoshi Issei, Okabe Takahiro, Togo Shinsaku, Takagi Haruhi, Motomura Hiroaki, Ochi Yusuke, Shimada Naoko, Haraguchi Mizuki, Shibayama Rina, Fujimoto Yuichi, Watanabe Junko, Iwai Moe, Kadoya Kotaro, Iwakami Shin-ichiro, Takahashi Kazuhisa	4. 巻 19
2. 論文標題 High lymphocyte population-related predictive factors for a long-term response in non-small cell lung cancer patients treated with pemetrexed: a retrospective observational study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 92
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12967-021-02761-1	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 Iwai Moe, Tulafu Miniwan, Togo Shinsaku, Kawaji Hideya, Kadoya Kotaro, Namba Yukiko, Jin Jin, Watanabe Junko, Okabe Takahiro, Hidayat Moulid, Sumiyoshi Issei, Itoh Masayoshi, Koyama Yu, Ito Yasuhiko, Orimo Akira, Takamochi Kazuya, Oh Shiaki, Suzuki Kenji, Hayashizaki Yoshihide, Yoshida Koji, Takahashi Kazuhisa	4. 巻 15
2. 論文標題 Cancer associated fibroblast migration in non small cell lung cancers is modulated by increased integrin 11 expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Oncology	6. 最初と最後の頁 1507 ~ 1527
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/1878-0261.12937	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 Kato Motoyasu, Sasaki Shinichi, Mori Wataru, Kohmaru Makiko, Akimoto Takashi, Hayakawa Eri, Soma Soichiro, Arai Yuta, Matsubara Naho Sakamoto, Nakazawa Shun, Sueyasu Takuto, Hirakawa Haruki, Motomura Hiroaki, Sumiyoshi Issei, Ochi Yusuke, Watanabe Junko, Hoshi Kazuaki, Kadoya Kotaro, Togo Shinsaku, Takahashi Kazuhisa	4. 巻 13
2. 論文標題 Nintedanib administration after the onset of acute exacerbation of interstitial lung disease in the real world	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-39101-w	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12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Issei Sumiyoshi, Shinsaku Togo, Kotaro Kadoya, Izumi Kaneko, Tomoya Komatsu, Motoyasu Kato, Shun Nakazawa, Hiroaki Motomura, Yusuke Ochi, Junko Watanabe, Moe Iwai, Ryota Kanemaru, Yuichiro Honma, Ryo Koyama, Kazuhisa Takahashi
2. 発表標題 The lung fibroblast-mediated antifibrotic effects of extracellular vesicles derived from bone marrow mesenchymal stem cells
3. 学会等名 The 63th Annual Meeting of the Japanese Respiratory Society
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平川治樹、加藤元康、秋元貴至、相馬聡一郎、早川瑛梨、荒井雄太、中沢舜、末安巧人、本村宏明、越智裕介、住吉一誠、渡邊純子、井原宏彰、門屋講太郎、十合晋作、橋本貴史、峯真司、佐々木信一、高橋和久
2. 発表標題 食道癌術後経過におけるPleuroparenchymal Fibroelastosis併発有無およびその病態を検証する後方視的検討
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松本卓也、加藤元康、平野遥彦、香丸真紀子、秋元貴至、相馬聡一郎、早川瑛梨、荒井雄太、中沢舜、本村宏明、平川治樹、末安巧人、越智裕介、住吉一誠、渡邊純子、井原宏彰、門屋講太郎、十合晋作、佐々木信一、高橋和久
2. 発表標題 Nintedanibを投与された特発性肺線維症症例における急性増悪発症の検討
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平野遥彦、加藤元康、松本卓也、香丸真紀子、秋元貴至、相馬聡一郎、早川瑛梨、荒井雄太、中沢舜、本村宏明、平川治樹、末安巧人、越智裕介、住吉一誠、渡邊純子、井原宏彰、門屋講太郎、十合晋作、佐々木信一、高橋和久
2. 発表標題 Nintedanibを投与された特発性肺線維症症例の長期生存と栄養状態の関連
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 田所千智、加藤元康、平野遥彦、香丸真紀子、秋元貴至、相馬聡一郎、早川瑛梨、荒井雄太、中沢舜、本村宏明、平川治樹、未安巧人、越智裕介、住吉一誠、渡邊純子、井原宏彰、門屋講太郎、十合晋作、佐々木信一、高橋和久
2. 発表標題 当院におけるInterstitial pneumonia with autoimmune features症例の臨床的特徴
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中澤弘貴、加藤元康、相馬聡一郎、荒井雄太、中沢舜、本村宏明、越智裕介、住吉一誠、渡邊純子、井原宏彰、門屋講太郎、十合晋作、長岡鉄太郎、佐々木信一、高橋和久
2. 発表標題 特発性肺線維症に対する24ヵ月以上のNintedanib投与の安全性と有効性の検討
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 荒井雄太、加藤元康、秋元貴至、相馬聡一郎、早川映梨、中沢舜、本村宏明、越智裕介、住吉一誠、渡邊純子、井原宏彰、門屋講太郎、十合晋作、佐々木信一、高橋和久
2. 発表標題 全身性強皮症合併間質性肺疾患症例に対するNintedanib投与の後方視的検討
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 相馬聡一郎、加藤元康、荒井雄太、中沢舜、本村宏明、越智裕介、住吉一誠、渡邊純子、井原宏彰、門屋講太郎、十合晋作、長岡鉄太郎、佐々木信一、高橋和久
2. 発表標題 特発性肺線維症への低用量Nintedanib(200mg/日)投与の安全性と有効性の評価
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名	Shun Nakazawa, Motoyasu Kato, Soichiro Soma, Takashi Akimoto, Eri Hayakawa, Yuta Arai, Hiroaki Motomura, Yusuke Ochi, Issei Sumiyoshi, Junko Watanabe, Hiroaki Ihara, Kotaro Kadoya, Shinsaku Togo, Shinichi Sasaki, Arata Azuma, Kazuhisa Takahashi
2. 発表標題	The Prognostic Marker of Polymyxin B-Immobilized Fiber Column-Direct Hemoperfusion in Patients who Developed Acute Exacerbation of Chronic Fibrosing Idiopathic Interstitial Pneumonia
3. 学会等名	Asian Pacific Society of Respirology Congress 2021 (国際学会)
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	Yumi Kuroda, Motoyasu Kato, Soichiro Soma, Takashi Akimoto, Eri Hayakawa, Misa Tateyama, Yuta Arai, Shun Nakazawa, Hiroaki Motomura, Issei Sumiyoshi, Yusuke Ochi, Junko Watanabe, Hiroaki Ihara, Kotaro Kadoya, Shinsaku Togo, Shinichi Sasaki, Kazuhisa Takahashi
2. 発表標題	The tolerability and efficacy of long-term nintedanib treatment for idiopathic pulmonary fibrosis in the real-world
3. 学会等名	Asian Pacific Society of Respirology Congress 2021 (国際学会)
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	Motoyasu Kato, Shinichi Sasaki, Eri Hayakawa, Soichiro Soma, Yuta Arai, Shun Nakazawa, Hiroaki Motomura, Issei Sumiyoshi, Jyunko Watanabe, Yusuke Ochi, Hiroaki Ihara, Kotaro Kadoya, Shinsaku Togo, Kazuhisa Takahashi
2. 発表標題	The efficacy and safety of nintedanib after developing acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis in a real-world setting
3. 学会等名	European Respiratory Society Congress 2022 (国際学会)
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	Soichiro Soma, Motoyasu Kato, Yuta Arai, Misa Tateyama, Shun Nakazawa, Hiroaki Motomura, Yusuke Ochi, Issei Sumiyoshi, Junko Watanabe, Hiroaki Ihara, Kotaro Kadoya, Shinsaku Togo, Shinichi Sasaki, Kazuhisa Takahashi
2. 発表標題	A real-world study of the safety and efficacy of low-dose nintedanib for idiopathic pulmonary fibrosis
3. 学会等名	Asian Pacific Society of Respirology Congress 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
---------	---------