

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：24405
研究種目：若手研究
研究期間：2021～2023
課題番号：21K16520
研究課題名（和文）マクロファージ活性化制御による肺線維症およびその急性増悪に対する治療の確立
研究課題名（英文）Establishment of treatment for pulmonary fibrosis and its acute exacerbation by regulating macrophage activation
研究代表者
宮本 光（Miyamoto, Hikaru）
大阪公立大学・大学院医学研究科・研究員
研究者番号：20803092
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：特発性肺線維症急性増悪治療薬の開発を目標に、ラット肺胞マクロファージの分極制御による肺線維症の急性増悪進展抑制に有効な化合物の探索、探索した化合物のラットモデルにおける有効性の確認、その作用機序の解明を目的とし研究をすすめた。探索した新規化合物がマクロファージの分極制御により肺線維化の進行を抑制している可能性がしめされた。一方で、肺組織中の上皮間葉移行関連マーカーの変化も認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本邦の特発性肺線維症（IPF）患者は15000人以上であり、IPFの診断確定後の平均生存期間は3から5年間と報告されている。その40%程度に急性増悪がおり、急性増悪を来たした後の平均生存期間は、2カ月以内と予後不良である。

しかし、現在肺線維症の急性増悪については有効な動物モデルも乏しく、ましてや治療薬開発もすすんでいないのが現状である。

従って、肺線維化の急性増悪の動物モデルの確立や予防・治療薬の開発が急務である。

研究成果の概要（英文）：With the aim of developing drugs for the treatment of acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis, we conducted research to find compounds effective in suppressing the progression of acute exacerbations of pulmonary fibrosis by regulating the polarization of rat alveolar macrophages, to confirm the efficacy of the compounds in rat models, and to elucidate their mechanisms of action.

It was shown that the novel compounds may inhibit the progression of pulmonary fibrosis by regulating macrophage polarization. On the other hand, changes in epithelial-mesenchymal transition-related markers in lung tissue were also observed.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：特発性肺線維症 急性増悪

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

難治性で進行性の IPF に対しては根治療法が存在せず、従来、対症療法が中心であったが、有効性が示されている治療薬もある。特に Pirfenidone(PFD)、Nintedanib(チロシンキナーゼ阻害による線維芽細胞増殖因子受容体の阻害)は、両薬剤とも線維芽細胞の増殖抑制剤として開発されたものである。しかし、PFD の作用機序については未だ十分には解明されていない。また、どちらの薬剤も急性増悪に対する効果は証明されていない。従って、肺線維化の急性増悪の予防・治療薬の開発は重要な課題である

2. 研究の目的

本邦の特発性肺線維症(IPF)患者は 15000人以上であり、IPF の診断確定後の平均生存期間は 3～5 年間と報告されている。その 40%程度に急性増悪がおこり、急性増悪を来した後の平均生存期間は、2 か月以内と予後不良であるため予防・治療薬の開発が急務である。しかし、現在肺線維症の急性増悪については有効な動物モデルも乏しく、ましてや治療薬開発もすすんでいないのが現状である。

PF 急性増悪治療薬の開発を目標に、

NR8383(ラット肺胞 M ϕ)を用い、M ϕ の分極制御による肺線維症の急性増悪進展抑制に有効な化合物の探索(in vitro)、
探索した化合物のラットモデルにおける有効性の確認、
その作用機序の解明を目的とする。

3. 研究の方法

動物モデル

7 週齢の雄性 Wister 系ラットを用いて BLM (1.5 mg/mL PBS) 気道内投与により間質性肺炎を惹起した。さらに BLM 投与後 14 日目より 3 日毎に 3 回、LPS (0.075 mg/mL PBS) を気道内投与し実臨床に近似した間質性肺炎モデルを確立。

細胞培養

NR8383 (American Type Culture Collection: Manassas, VA) を使用。LPS (5 ng/mL) と IFN- γ (1 ng/mL) を 24 時間添加することで M1 型 M ϕ に、IL-4 (10 ng/mL) と IL-13 (10 ng/mL) を 48 時間添加することで M2 型 M ϕ に分極させた。

肺線維化の評価。

Hematoxylin Eosin、Masson Trichrome 染色 modified Ashcroft scale
による肺線維化のスコアリング

線維素関連因子の解析

Western Blot, RT-qPCR

4. 研究成果

NR8383 は M1 型 M ϕ 、M2 型 M ϕ に分極することで、それぞれ M1 マーカーである iNOS と M2 マーカーである CD206 タンパク量が増加した。試験化合物の有無で iNOS タンパク量は変化しなかったが CD206 タンパク量を有意に減少させた。試験化合物は単球由来浸潤 M ϕ および組織在留 M ϕ の M2 への分極を直接抑制することで線維化進展を改善した可能性が示唆された。

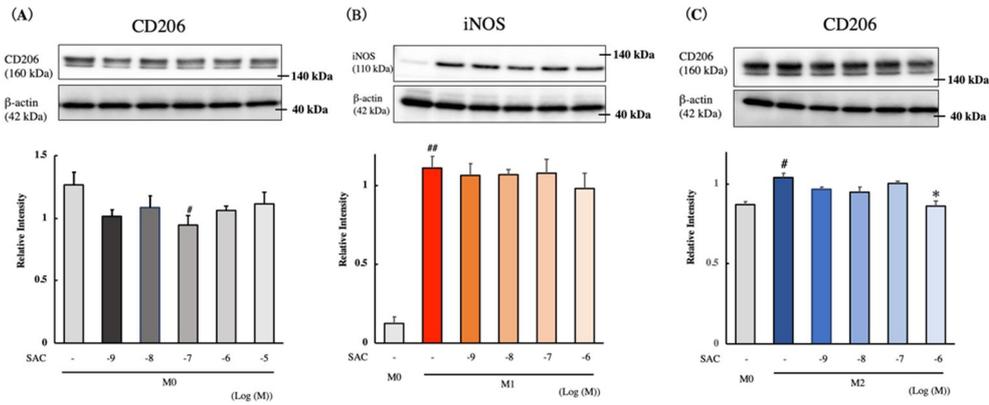


Fig. 18 SAC添加時のNR8383のM1マーカー(iNOS)およびM2マーカー(CD206)タンパク質発現
 NR8383を12well plateに接着させ、SACを添加した。
 24時間後に、LPS (5 ng/ml) およびIFN- γ (1 ng/ml) で24時間刺激。またはIL-13 (10 ng/ml) およびIL-4 (10 ng/ml) で48時間刺激した。
 LPSおよびIFN- γ で刺激したものをM1、IL-13およびIL-4で刺激したものをM2、未刺激のものをM0とした。
 その後タンパク質を回収し分極マーカータンパク質をWestern Blot法を用いて解析した。
 ※Values are mean \pm S.E. (n=3-4) #p<0.05, ##p<0.01 VS M0 SAC(-), *p<0.05 VS M2 SAC(-)

7週齢の雄性Wister系ラットを用いてBLM (1.5 mg/mL PBS) 気道内投与により間質性肺炎を惹起した。さらにBLM投与後14日目より3日毎に3回、LPS (0.075 mg/mL PBS) を気道内投与し実臨床に近侍した間質性肺炎モデルを確立した。本モデルにおいて試験化合物の摂取により炎症細胞浸潤、線維化関連指標の増加および線維化の亢進を抑制することが明らかとなった。

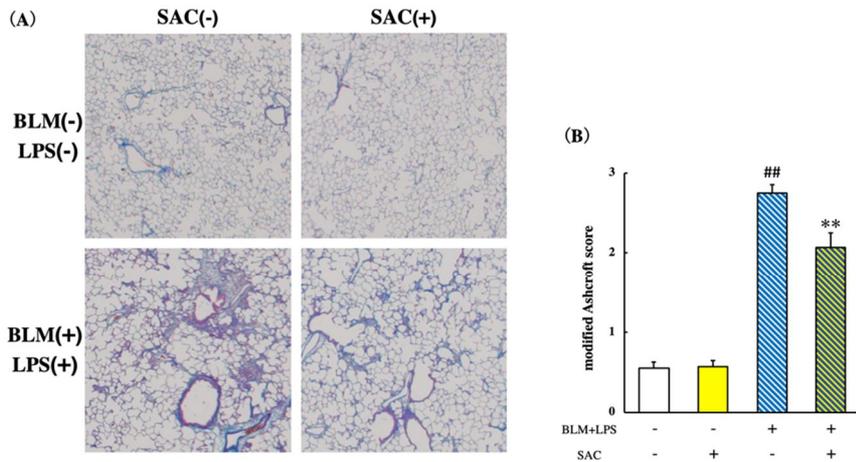


Fig. 13 SAC投与時の肺組織Masson trichrome染色とmodified Ashcroft score
 Sham群, SAC群, BLM+LPS群, BLM+LPS+SAC群の肺組織切片を(A) Masson trichrome染色し、
 (B) modified Ashcroft scoreにより定量化した。
 ※Values are mean \pm S.E. (n=5-11) ##p<0.01 VS BLM(-)LPS(-)SAC(-), **p<0.01 VS BLM(+LPS(+))SAC(-)

新規化合物がマクロファージの分極制御により肺線維化の進行を抑制している可能性が認められた。一方で、肺組織中の上皮間葉移行関連マーカーの変化も認められている。試験化合物による2型肺胞上皮細胞の上皮間葉移行を介した線維化抑制作用について検討中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 月岡卓馬 |
| 2. 発表標題 臨床病態を反映した間質性肺炎動物モデルの確立 |
| 3. 学会等名 第123回日本外科学会学術集会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 遠藤僚一 |
| 2. 発表標題 ラットを用いた肺線維症急性増悪モデルの確立とS-allyl cysteineによる肺線維化抑制効果の検討 |
| 3. 学会等名 第77回日本栄養・食糧学会大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 遠藤僚一 |
| 2. 発表標題 ラットを用いた肺線維症急性増悪モデルの確立とS-allyl cysteineによる予防効果の検討 |
| 3. 学会等名 第76回日本酸化ストレス学会学術集会 |
| 4. 発表年 2023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 |
|-------|--------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 月岡 卓馬 (Tsukioka Takuma) | | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 |
|-------|-----------------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 遠藤 僚一 (Endo Ryoichi) | | |
| 研究協力者 | 竹村 茂一 (Takemura Shigekazu) | | |
| 研究協力者 | 南山 幸子 (Minamiyama Yukiko) | | |

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