

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591163

研究課題名(和文) 線維化病態における骨髄前駆線維細胞の役割と新規治療薬の効果判定に関する研究

研究課題名(英文) Involvement of bone marrow-derived fibrocyte in the pathogenesis of pulmonary fibrosis and the effect of newly developed anti-fibrotic agents

研究代表者

吾妻 安良太 (Azuma, Arata)

日本医科大学・医学部・教授

研究者番号：10184194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：新規抗線維化薬であるピルフェニドン(PFD)が骨髄由来の線維細胞 fibrocyte にどのような作用を有するかを肺線維症モデルマウスを用いて検証した。C57BL/6マウスにブレオマイシン(BLM)を浸透圧ポンプで投与し、PFDを14日間経口投与する予防モデルと、10日目から21日目まで投与する治療モデルを作成した。いずれのモデルでも肺内のfibrocyte (CD45, collagen I陽性細胞と定義)のpool sizeは抑制された。この抑制にはケモカインであるCCL2の抑制とCCL2に対する遊走能の抑制が関与していた。以上の結果は、PFDの新規抗線維化作用の一つと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Bone marrow-derived fibrocytes reportedly play important roles in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. Pirfenidone (PFD) is an anti-fibrotic agent; however, its effects on fibrocytes have not been investigated. The aim of this study was to investigate whether PFD inhibits fibrocyte pool size in the lungs of bleomycin (BLM)-treated mice. To achieve this, C57BL/6 mice were treated with BLM and PFD was administered. Fibrocyte pool size in BLM-treated mice lungs was attenuated by PFD. This was also observed in a therapeutic setting. Increased chemokine (CC motif) ligand-2 (CCL2) and CCL12 production in BLM-treated mouse lungs was significantly attenuated by PFD. Fibrocyte migration toward CCL2 and chemokine (CC motif) receptor-2 expression on fibrocytes were significantly inhibited by PFD in vitro. Fibrocyte inhibition is considered a mechanism of anti-fibrotic action of PFD.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：特発性肺線維症 線維細胞 ピルフェニドン

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) は細胞外マトリックスの異常沈着を来し、慢性かつ進行性に高度の線維化を来す予後不良な疾患である。IPF は病理学的に usual interstitial pneumonia (UIP) パターンを呈し、過剰なコラーゲン産生、fibroblastic foci の出現などを認めるが、その病態はまだ解明されていない。肺に沈着する過剰な細胞外マトリックスは、肺線維芽細胞が産生していると考えられている。これまで、肺の線維化病態には肺内に存在する肺線維芽細胞や、上皮間葉移行 (epithelial mesenchymal transition: EMT) が関与すると考えられてきたが、肺へ遊走する骨髄由来の fibrocyte の線維化病態への寄与も想定されている。Fibrocyte は、fibroblast の前駆細胞と考えられる細胞の一つで、骨髄由来間葉系前駆細胞であり、白血球共通抗原、造血幹細胞マーカーを発現している。IPF 患者、とくに IPF 急性増悪患者の末梢血中では、健康人と比較し fibrocyte が増加し予後とも関連しているという報告もある。Pirfenidone (PFD) は IPF に対して世界で初めて承認された抗線維化薬である。その作用機序として、TGF- β 産生抑制やコラーゲン産生抑制作用、TNF- α 産生抑制作用などが報告されているが、その標的分子は未だ不明であり、明確な作用機序は解明されていない。我々は *in vivo*、*in vitro* において、PFD の fibrocyte に対する抑制効果を検討した。

2. 研究の目的

ブレオマイシン誘発肺障害モデルマウスにおける fibrocyte の関わりを解明することにより、線維化の細胞資源を解明し、同時に、新規抗線維化薬 PFD 治療導入後の fibrocyte の推移、ケモカインとの関連を検証すること。

3. 研究の方法

C57BL/6 マウスをコントロール群、ブレオマイシン (BLM) (100mg/kg) 群、PFD (300mg/kg/day) 群、BLM+PFD 併用群の 4 群に分け、浸透圧ポンプで BLM を 7 日間持続的に投与し、BLM 投与開始日から PFD を 28 日間経口投与したマウスで、肺の線維化に対する PFD の効果を評価した。次に、BLM 投与開始から PFD を 14 日間投与する予防モデルと、BLM 投与 10 日目から 21 日まで PFD を投与する治療モデルを作成した。予防モデルにおいて、BLM 投与開始から 14 日目に肺を摘出し fibrocyte (CD45, collagen I 陽性細胞と定義) を flow cytometry で評価し、肺内の fibrocyte を定量的に評価するため免疫蛍光

染色を行った。Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) で肺内のケモカインの濃度を測定し、肺内におけるケモカインの産生細胞を評価するため免疫染色を行った。肺泡マクロファージに対する PFD の効果を評価するため、気管支肺泡洗浄液中の細胞数、細胞分画を測定した。また、治療モデルにおいては BLM 投与開始から 21 日目に肺を摘出し fibrocyte を flow cytometry で評価した。さらに、BLM 投与後 14 日目に摘出した肺を 10-14 日間培養し、mesenchymal 細胞から fibrocyte を分離し (magnetic beads を用いて CD45 陽性細胞を単離)、ケモカインに対する fibrocyte の遊走能を Boyden chamber を用いて評価した。また fibrocyte におけるケモカインレセプターの発現に対する PFD の作用を確認するため、定量的 PCR を行った。

4. 研究成果

(1) C57BL/6 マウスにおける BLM の持続皮下投与による線維化肺形成

BLM 投与開始後 28 日目に摘出した肺において、HE 染色と Masson 染色で肺切片を評価したところ、コントロール群では線維化を認めなかったが、BLM 群では胸膜直下有意に線維化と肺泡構造の破壊を認め、PFD 併用群では抑制された (図 1)。線維化を定量的に評価するため Ashcroft score (図 2) と collagen assay (図 3) を検討したところ、BLM による線維化が PFD を併用することで有意に抑制された。

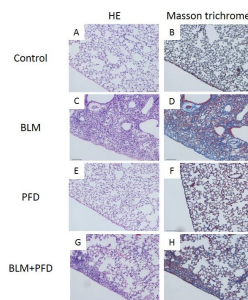


図 1. BLM 持続皮下注射による線維化肺の比較

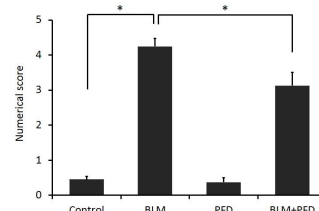


図 2. Ashcroft score の比較

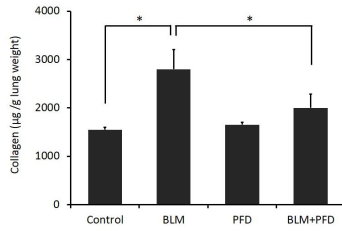


図 3. Collagen assay の比較

(2) 予防モデルにおける PFD の fibrocyte に対する抑制効果

生理食塩水群、BLM 単独群、PFD 単独群、BLM + PFD 併用群の 4 群に分け、CD45、collagen I 陽性細胞を FACS で解析した。Fibrocyte は生理食塩水群で 9.4%であったのに対し、BLM 単独群では 26.0%と上昇したが、PFD 併用群では 10.4%と減少を認めた(図 4)。

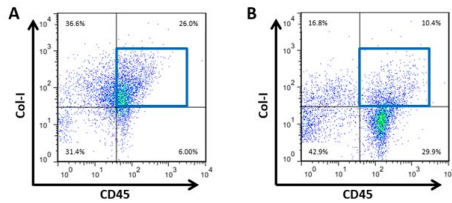


図 4. CD45、collagen I による FACS 解析。
A: プレオマイシン(BLM)単独群
B: BLM + pirfenidone(PFD)併用群

BLM 投与 14 日後のマウス肺では、生理食塩水群と比較し肺の線維化が認められた。CD45 と collagen I での免疫組織染色の結果では、BLM 群で fibrocyte の増加を認め(図 5)、BLM+PFD 併用群では有意に fibrocyte が減少していた(図 6)。

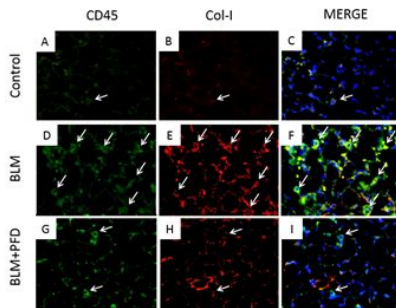


図 5. CD45、collagen I による免疫組織染色

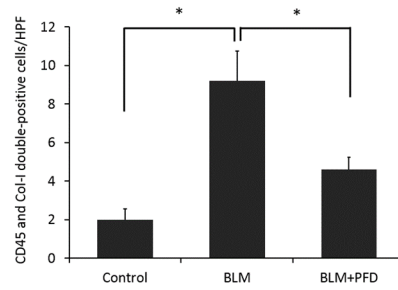


図 6. CD45、collagen I 陽性細胞(fibrocyte)数の比較

(3) PFD による chemokine 抑制効果

ELISA による CCL2、CCL12 濃度の検討では、生理食塩水群、PFD 単独群と比較し有意に CCL2、CCL12 濃度が上昇していたが、PFD 併用によって有意に減少していた(図 7, 8)。CXCL12 濃度に関しては、PFD 単独群と比較し BLM 単独群で有意に上昇していた。BLM 単独群と比較し BLM + PFD 併用群では、CXCL12 濃度に有意差は認められなかったが、減少傾向は認められた(図 9)。

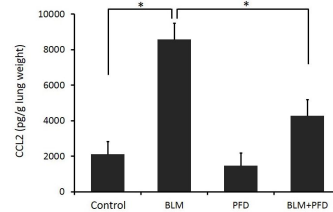


図 7. CCL2 濃度の比較

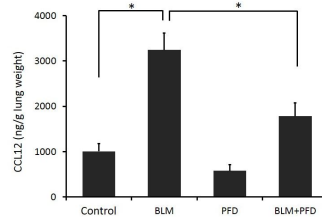


図 8. CCL12 濃度の比較

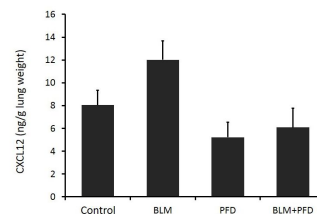


図 9. CXCL12 濃度の比較

(4) CCL2 免疫組織染色

BLM 単独群では、肺泡領域と細気管支領域において、特に肺泡上皮細胞、肺泡マクロファージ、細気管支上皮に発現の増強を認め、PFD 併用により CCL2 発現は減弱していた(図 10)。

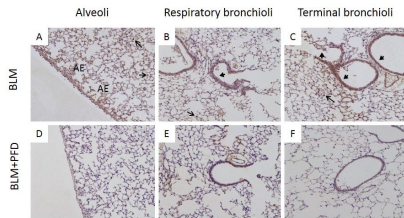


図 10. CCL2 の免疫組織染色

(5)気管支肺泡洗浄液中のマクロファージ PFD は気管支肺泡洗浄液中のマクロファージを減少させた(図 11)。

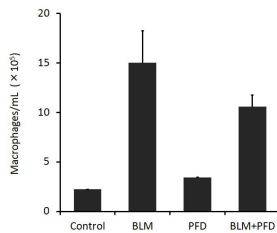


図 11. 気管支肺泡洗浄液中のマクロファージ数の比較

(6)治療モデルにおける PFD の fibrocyte に対する抑制効果
fibrocyteはコントロール群の10.1%からBLM群の29.9%へと増加し、PFD 併用群で22.1%まで減少した(図 12)。

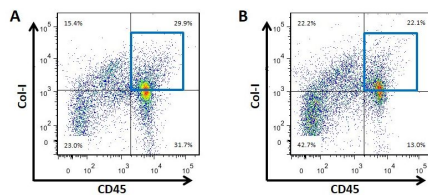


図 12. CD45, collagen I による FACS 解析。
A: プレオマイシン(BLM)単独群
B: BLM + pirfenidone(PFD)併用群

(7)CCL2 に対する fibrocyte の遊走能の抑制効果

CCL2 100ng/ml では fibrocyte の遊走は見られなかったが、CCL2 200ng/ml、500ng/ml

により fibrocyte の遊走が認められ、PFD 投与により有意に抑制された(図 13)。

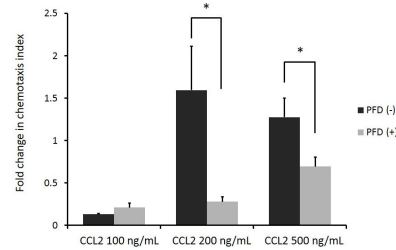


図 13. CCL2 に対する fibrocyte の遊走能

(8)Fibrocyte における CCR2 発現
単離 fibrocyte における CCR2 の発現は、PFD 投与により有意に抑制された(図 14)。

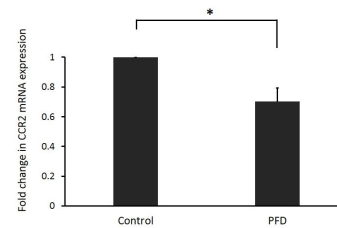


図 14. Fibrocyte における CCR2 発現の比較

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計1件)

著者名: Minoru Inomata, Koichiro Kamio, Arata Azuma, Kuniko Matsuda, Nariaki Kokuho, Yukiko Miura, Hiroki Hayashi, Takahito Nei, Kazue Fujita, Yoshinobu Saito and Akihiko Gemma

論文表題: Pirfenidone inhibits fibrocyte accumulation in the lungs in bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis

雑誌名: Respiratory Research

査読あり

巻: 15、doi:10.1186/1465-9921-15-16

発行年: 2014

〔学会発表〕(計2件)

2013年4月20日第53回日本呼吸域学会学術講演会

プレオマイシン誘発肺障害モデルマウスにおけるピルフェニドンの骨髄由来 fibrocyte 抑制効果に関する検討

猪俣 稔、神尾孝一郎、松田久仁子、國保成
暁、根井貴仁、三浦由記子、藤田和恵、齋藤
好信、弦間昭彦、吾妻安良太

()

研究者番号：

2013年5月22日
American Thoracic Society Conference 2013

Pirfenidone Inhibits Bone Marrow-Derived
Fibrocytes Influx Into The Lungs In
Bleomycin-Induced Murine Pulmonary
Fibrosis

Minoru Inomata, Koichiro Kamio, Kuniko
Matsuda, Nariaki Kokuho, Yukiko Miura,
Kazue Fujita, Yoshinobu Saito, Akihiko
Gemma, Arata Azuma

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
(吾妻安良太)

研究者番号：10184194

(2)研究分担者
(神尾孝一郎)

研究者番号：20465305

(3)連携研究者