

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790374

研究課題名(和文)線維化モデルマウスの発症過程における細胞および分子基盤

研究課題名(英文)Molecular mechanism during development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis model

研究代表者

島岡 猛士 (SHIMAOKA, TAKESHI)

東京大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：90422279

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：ol1-2-GFP Tgマウス骨髄由来CD45(-)CD31(-)Ter-119(-)GFP(-)PDGFR(+)Scal(+)間葉系幹細胞(MSC)を単離し、さらにCTGF/bFGF/ascorbic acid存在下で培養することでGFP(+)線維芽細胞へ分化誘導する培養系を樹立した。トランスクリプト解析より線維芽細胞分化に関わる転写因子の候補を取得した。遺伝子導入等により線維芽細胞分化への関与を解析したところ、いくつかの遺伝子が線維芽細胞分化に関わることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We isolated CD45(-)CD31(-)Ter-119(-)GFP(-)PDGFR(+)Scal(+)Mesenchymal stem cells (MSC) from Col-GFP Tg mice bone marrow. We established GFP-positive fibroblast differentiation from MSC by CTGF, bFGF and ascorbic acid. We pared down the candidates by transcriptome analysis and confirmed the involvement in fibroblast differentiation. We observed that several genes play an important role in fibroblast differentiation from MSC.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：線維症 炎症

1. 研究開始当初の背景

間質性肺炎、肝硬変、腎不全などに深く関わっている線維化は I 型コラーゲンを中心とする細胞外基質が過剰沈着することにより重篤な臓器機能不全をもたらす。これらの病態の多くは不可逆であり、有効な治療性の乏しい予後不良の難治性疾患である。線維化発症の機序としては、外傷治癒に起因した慢性炎症部位に筋線維芽細胞が動員・誘導され、この筋線維芽細胞によって大量産生されたコラーゲンが沈着することによって線維化に至るというモデルが考えられている。近年、細胞系譜特異的に GFP や lacZ などの標識タンパクを発現させるレポーターシステムを用いた実験により筋線維芽細胞の前駆細胞が探索され、上皮・血管周囲細胞などが前駆細胞の候補としてあげられているが、線維症の病態形成におけるこれら前駆細胞候補の相対寄与度は未だ不明なままであり、線維芽細胞の起源についての理解は混沌としている。またマクロファージや T 細胞といった炎症性免疫細胞などによる線維化発症への関与も細胞除去実験等により示唆されている。また肺、肝臓、腎臓それぞれにマウス線維化発症モデルが確立されており、それらの間には線維化発症の機序に違いがあることもわかっているが、細胞、分子レベルでの理解はほとんど進んでいない。

PDGF 受容体を過剰発現させると線維症を自然発症することや、PDGF 受容体に対する阻害抗体や PDGF 受容体のチロシンキナーゼを阻害するイマチニブ (Imatinib) は、動物モデルでの肺線維症や皮膚線維症などを抑制することが知られている。これらの結果をうけて、現在イマチニブはヒト線維症において臨床試験段階で抗線維化効果が検討されているが、否定的な実験結果もありまだ線維化治療薬とし

ては確立していない。

2. 研究の目的

肺・肝臓・腎臓などの線維化症には現在根本的治療がなく、発症機序の解明とそれに基づく予防・治療法の確立が望まれている。治療候補薬として platelet-derived growth factor (PDGF) 受容体をターゲットとしたイマチニブが知られ臨床試験が進められているが、否定的な実験結果もあり、まだ線維化治療薬としては確立していない。本研究の目的は、様々なマウス線維症モデルにおいて、細胞系譜特異的に、かつ任意のタイミングで PDGF 受容体を欠失させ、線維化発症機序の時間軸に沿って細胞、分子レベルで解明することを目的とする。本研究によりどの細胞に発現している PDGF 受容体がどの時点で線維化を引き起こしているかといった細胞基盤についての理解を深めることによってより効率的な治療プロトコルを確立することが期待される。

3. 研究の方法

PDGF 受容体 α もしくは β を細胞系譜特異的に欠失させたマウスを作製し、線維症モデルにおいて PDGF 受容体がいづかの細胞において作用するのかを解明する。具体的には以下の 4 つにわけられる。

(1) *in vitro* における PDGF による各種細胞への細胞活性化、分化誘導などの影響の解明

線維化モデルマウス体内での各種細胞集団における PDGF 受容体の発現の有無と、各種細胞集団に対する *in vitro* での PDGF 添

加の効果を検討する。

(2) 細胞系譜特異的に PDGF 受容体 α もしくは β を欠失させたマウスの作製

各細胞系譜特異プロモータ特異的に Cre もしくは CreER タンパク (タモキシフェン誘導性に核内移行して Cre タンパクによる recombination を起こし、標的遺伝子の発現を時間的に制御できる) を発現したマウスと Cre タンパク発現細胞特異的に PDGF 受容体遺伝子を欠損させることができるマウスを準備し、交配することによって特定のタイミングで細胞系譜特異的に PDGF 受容体遺伝子を欠損したマウスを作製する。

(3) プレオマイシン誘導性肺線維症における様々な細胞系譜特異的 PDGF 受容体欠損マウスの解析

コラーゲン沈着などの線維化発症の有無だけでなく、細胞移動・細胞周期・アポトーシス等の可視化ツールマウスを用いて詳細に PDGF 受容体発現細胞の働きを明らかにする。

(4) (3)で得られた知見について他の肺線維症モデルや肝臓、腎臓線維症モデルでの検証

(3)の解析において線維化の重篤度や PDGF 受容体発現細胞の動態に変化が認められた細胞系譜特異的 PDGF 受容体欠損マウスについて線維化の誘導因子や標的臓器の異なる様々な線維化モデルでの解析を行うことで、(3)で得られた知見の一般性や、線維化誘導分子特異性、臓器特異性などを解明する。

4 . 研究成果

Col1 2-GFP Tg マウス 骨髄由来 CD45(-)CD31(-)Ter-119(-)GFP(-)PDGFR (+)ScaI(+)MSC を単離し、さらに CTGF/bFGF/ ascorbic acid 存在下で培養すること

で GFP(+)線維芽細胞へ分化誘導する培養系を樹立した。今年度は、同培養系で線維芽細胞への分化に伴い発現変動する遺伝子を明らかにするため、transcriptome 解析を行い、線維芽細胞分化に関わる転写因子の候補を取得した。得られた転写因子群について、retrovirus および lentivirus vector を用いて MSC 株への過剰発現または shRNA knockdown を行った後、線維芽細胞分化誘導を行い、線維芽細胞分化への関与を解析したところ、いくつかの遺伝子が線維芽細胞分化に関わることが示唆された。この結果により、臓器線維化病態への関与に重要な因子を分子レベルで解明し、臓器線維化病態に対する新しい診断・治療に関する基礎的理解を得ることにつながると考えられる。もうひとつの研究計画の間葉系幹細胞特異的プロモーターである nestin プロモーターを用いた NES-Cre/esr と PDGF 受容体 または の遺伝子領域を Cre リコンビナーゼ標的配列 loxP ではさんだ flox マウスを掛け合わせたマウス系統を樹立し、nestin 発現細胞特異的に PDGF 受容体を欠損させてプレオマイシン誘導性肺線維症における役割を解析したが有意な差を見出すことはできなかった。

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2件)

1. Tatsuya Tsukui, Satoshi Ueha, Jun Abe, Shin-ichi Hashimoto, Shigeyuki Shichino, Takeshi Shimaoka, Francis H.W. Shand, Yasuka Arakawa, Kenshiro Oshima, Masahira Hattori, Yutaka Inagaki, Michio Tomura, Kouji Matsushima. Qualitative

Rather than Quantitative Changes Are Hallmarks of Fibroblasts in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis. Am J Pathol. 183(3):758-73, 2013 (doi: 10.1016/j.ajpath.2013.06.005).

2. Yasushi Mandai, Daisuke Takahashi, Koji Hase, Yuuki Obata, Yukihiro Furusawa, Masashi Ebisawa, Tomoo Nakagawa, Toru Sato, Tatsuro Katsuno, Yasushi Saito, Takeshi Shimaoka, Osamu Yokosuka, Kotaro Yokote, Hiroshi Ohno Distinct Roles for CXCR6+ and CXCR6- CD4+ T Cells in the Pathogenesis of Chronic Colitis. PLoS One. 2013 Jun 19;8(6):e65488. (DOI: 10.1371/journal.pone.0065488).

[学会発表](計2件)

- 1 Shimaoka Takeshi, Arakawa Yasuka, Ueha Satoshi, Tsukui Tatsuya, Shichino Shigeyuki, Matsushima Kouji. CXCL16 shows protective role in alpha-galactosylceramide suppression of pulmonary fibrosis development. Keystone Symposia, Fibrosis: From bench to bedside. Colorado, USA, 2014. March 23-27.
- 2 Shimaoka Takeshi, Arakawa Yasuka, Ueha Satoshi, Tsukui Tatsuya, Shichino Shigeyuki, Matsushima Kouji. CXCL16 shows protective role in alpha-galactosylceramide suppression of pulmonary fibrosis development. 第42回日本免疫学会学術集会、千葉、2013年12月11-13日.

[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

島岡 猛士 (TAKESHI SHIMAOKA)
東京大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：90422279

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：