

令和 2 年 9 月 11 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09675

研究課題名(和文) 肺線維化病態におけるエンドスタチンの作用機序の解明と新規バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Mechanisms of endostatin and microRNAs in pulmonary fibrosis

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではブレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスを用い、エクソソーム由来のmicroRNAと線維化との関連をmicroRNAアレイを用いて経時的に解析した。ブレオマイシン投与後7日目にmiR-22の有意な上昇を認めた。ヒト肺線維芽細胞を用いた検討では、miR-22はTGF- β 1により誘導される筋線維芽細胞への分化を抑制したが、ERK1/2経路の抑制による事が確認された。さらにmiR-22はTGF- β 1の存在下でCTGFの発現を抑制した。肺線維症モデルマウスに10日目に尾静脈よりmiR-22を投与した所、肺線維化は有意に抑制され、肺組織における α -SMAの低下を伴っていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性肺線維症は肺間質の線維化と共に進行性に呼吸機能の低下を来す呼吸器難病であり。現在2つの抗線維化薬が使用可能となったが、いずれも肺活量の低下抑制が主たる作用であり、疾患の進行を完全に停止せしめるものではないのが現状である。本研究ではエクソソーム由来のマイクロRNAにより、線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化が抑制されることが確認された。今後これらをターゲットとした特発性肺線維症の治療応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Numerous microRNAs (miRNAs) have been implicated in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF); however, miRNAs derived from exosomes and the relevance of such miRNAs to fibroblast-to-myofibroblast differentiation are not well understood.

Using miRNA array analysis, we profiled exosome-derived miRNA expression in sera of mice exhibiting bleomycin-induced pulmonary fibrosis. MiRNA array analysis revealed that miR-22 expression was increased on day 7 after bleomycin treatment compared with that in vehicle-treated mice. In vitro, miR-22 transfection to human lung fibroblasts suppressed TGF- β 1-induced α -SMA expression. This effect was mediated via inhibition of the ERK1/2 pathway. In vivo, administration of a miR-22 mimic on day 10 after bleomycin challenge ameliorated pulmonary fibrosis lesions accompanied by decreased α -SMA expression in the model mice. The present findings warrant further study, which could shed light on miR-22 as a novel therapeutic target in IPF.

研究分野：肺線維症

キーワード：エンドスタチン 筋線維芽細胞 上皮間葉転換 エクソソーム マイクロRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 特発性肺線維症 (**idiopathic pulmonary fibrosis; IPF**) は肺間質の線維化と共に進行性に呼吸機能の低下を来す呼吸器難病であり、診断からの生存期間の中央値は **2.5 ~ 3.5** 年である。**IPF** の病態には不明な部分が多いが、様々な要因による肺胞上皮細胞の障害に引き続いて起こる組織修復不全が想定され、筋線維芽細胞の異常な増殖から細胞外基質の過剰な沈着が起こり、線維化が進行するものと推定されている。現在作用機序の異なる **2** つの抗線維化薬 (ピルフェニドン、ニンテダニブ) が使用可能となったが、いずれも肺活量の低下抑制が主たる作用であり、疾患の進行を完全に停止せしめるものではないのが現状である。このため肺線維化病態の解明のための基礎研究と、さらなる病態への介入手段の開発は喫緊の課題である。

(2) **IPF** の病態において、肺線維芽細胞の異常な増殖と活性化は重要なメカニズムのひとつと考えられている。また、**IPF** の病態形成には多数の **microRNA (miRNA)** が関係している¹⁻³⁾ が、エクソソーム由来 **miRNA** と線維化病態形成との関連性について十分には解明されていない。

2. 研究の目的

(1) 本研究は肺線維化病態形成に関連するエクソソーム由来 **miRNA** を特定し、特発性肺線維症の治療戦略を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マウスは **C57BL/6** マウスを使用。浸透圧ポンプを用いてプレオマイシン **100 mg/kg** を投与し肺線維症モデルを作成した。

プレオマイシン投与開始後、**7** 日目、**14** 日目、**21** 日目、**28** 日目に採血を施行し、それぞれの血清から **exosome** を単離した。血清由来 **exosome** から **miRNA** を抽出し、**miRNA** アレイにより網羅的発現解析を行った。挙げられた候補 **miRNA** を **validation** したのち、その **miRNA** を用いてヒト肺線維芽細胞 (**HFL-1**) における線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化への影響を検討した。

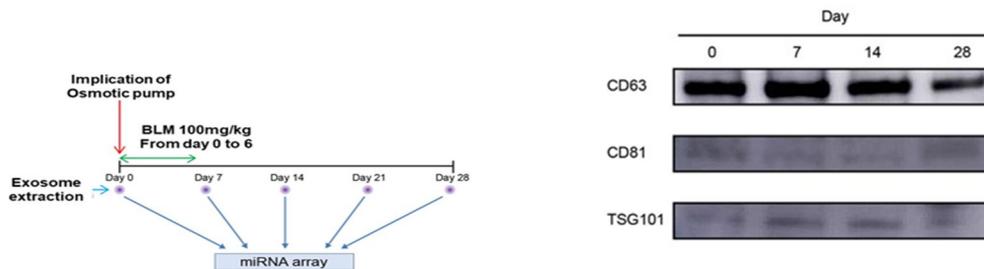
(2) **C57BL/6** マウスにプレオマイシンを投与し肺線維症モデルマウスを作成、**10** 日目にマウス尾静脈より目的の **miRNA** を投与した。**28** 日目に **sacrifice** し肺組織を採取した。肺組織は α -**SMA** の免疫組織染色、**HE** ならびに **Masson trichrome** 染色を行い、**Ashcroft score** とコラーゲン定量を行い線維化の程度を評価した。

4. 研究成果

(1) プレオマイシン誘発肺線維症の血清由来 **exosome** からの **miR22** の発現亢進を同定

C57BL/6 マウスに浸透圧ポンプを用いてプレオマイシン **100 mg/kg** を投与。投与後 **7** 日目、**14** 日目、**21** 日目、**28** 日目に採血を行い、血清中より **exosome** を単離した (図 1)。

図 1 miRNA アレイ測定プロトコール



単離した **exosome** 中から抽出した **miRNA** を用いて **3D-GENE® miRNA oligo chip** (Toray Industries Inc., Tokyo, Japan) で **miRNA** アレイを施行した。プレオマイシン投与 **14** 日目に **exosome** 中の **miR22** の発現が亢進していることを同定した。**validation** を行い、プレオマイシン投与 **7** 日目に **miR22** の発現が亢進することが確認でき、**miR22** が肺線維化形成に関与することが推測された (図 2)。

(2) ヒト肺線維芽細胞 (**HFL-1**) における線維芽細胞から筋線維芽細胞分化への **miR22** の効果

HFL-1 に **TGF- β 1 (5ng/mL)** の刺激を加え、 α -**SMA** 発現が上昇することで筋線維芽細胞への転換を示すことを確認した。**miR22 (50nM)** を **HFL-1** にトランスフェクションしたうえで、**TGF- β 1 (5ng/mL)** の刺激を加え α -**SMA** 発現変化をウエスタンブロットにより解析した。**miR22** が **TGF- β 1** による α -**SMA** 発現を抑制することを示した (図 3)。また、免疫細胞染色においても同様の結果を示した (図 4A-C)。

つぎに、**miR22-inhibitor (50nM)** を **HFL-1** にトランスフェクションすることで α -**SMA** の発現が亢進することを認めた (図 5)。以上より、**miR22** が **HFL-1** の線維芽細胞-筋線維芽細胞分化抑制に関与することが考えられた。

図 2 miRNA アレイ結果とバリデーション

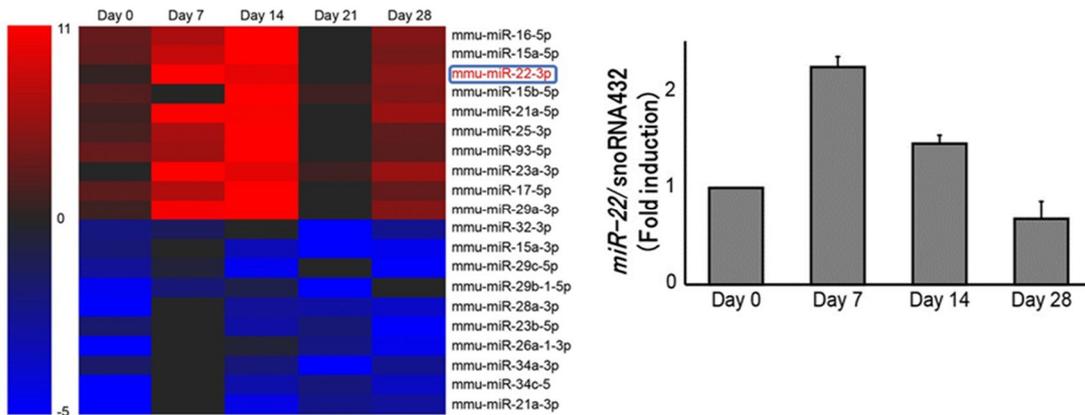


図 3 miR22 による TGF-β1 誘発 α-SMA 発現抑制効果

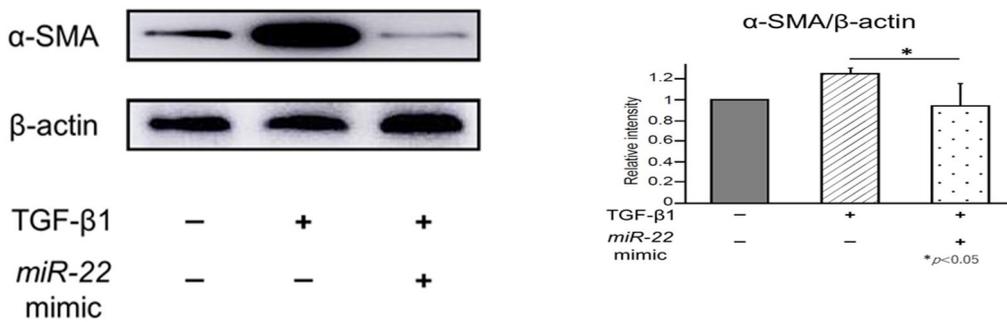


図 4 A-C 免疫細胞染色による TGF-β1 誘発 α-SMA 発現変化

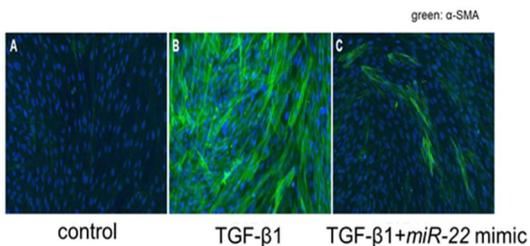
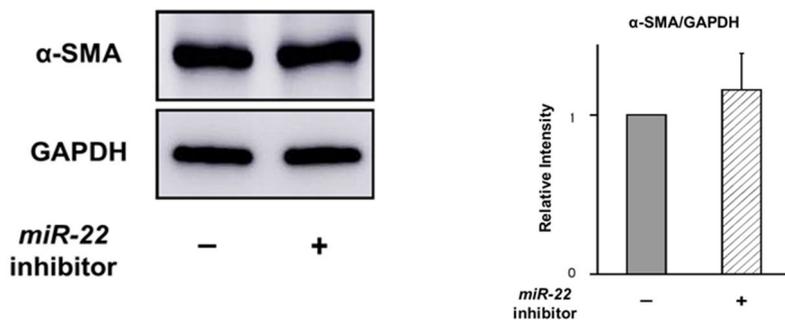


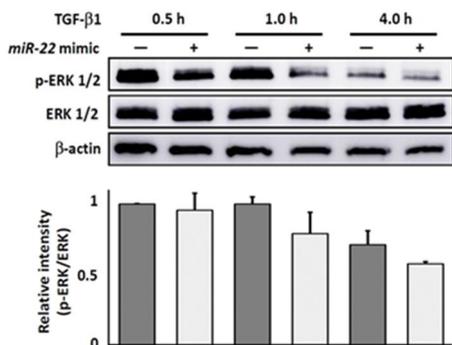
図 5 miR22 inhibitor の HFL-1 への効果



(3) miR22 の線維芽細胞から筋線維芽細胞分化抑制効果を示す作用機序の同定
miR22 の ERK1/2 経路抑制効果

つぎに miR22 の線維芽細胞から筋線維芽細胞分化抑制効果を示す作用機序を調べるために TGF-β1 シグナルの下流に位置する ERK1/2 の発現をウエスタンブロットで検討した。miR22 が ERK1/2 のリン酸化を抑制することを示した(図 6)。

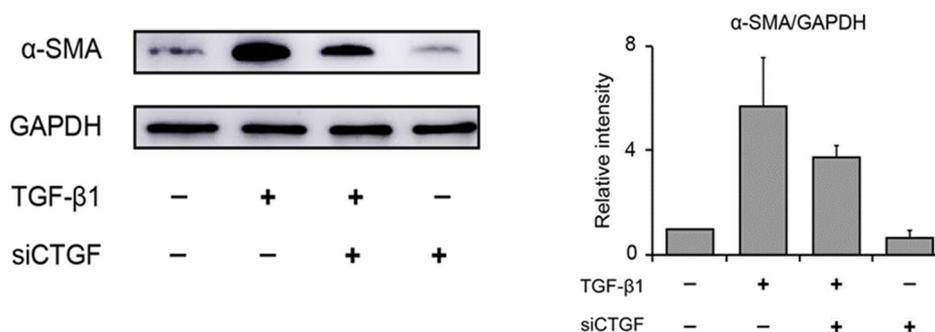
図 6 miR22 による ERK1/2 のリン酸化抑制効果



miR22 の CTGF(connective tissue growth factor)発現抑制効果

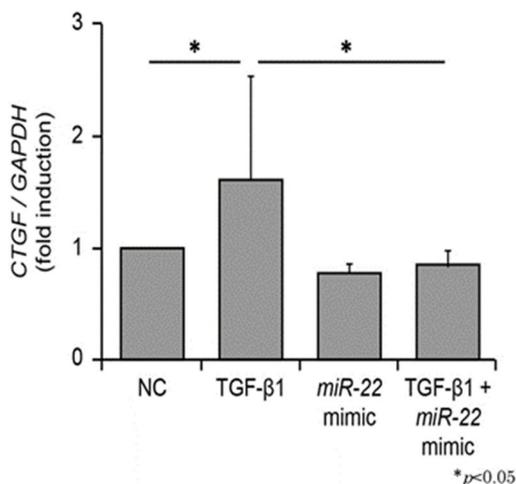
肺線維芽細胞において CTGF が α-SMA の発現を亢進させ筋線維芽細胞への分化と関与することがすでに報告されている。siCTGF(50nM)を用いて、TGF-β1 刺激による α-SMA の発現に CTGF が関与することを確認した (図 7)。

図 7 CTGF と TGF-β1 による α-SMA 発現との関連性



つぎに、miR22(50nM)をトランスフェクションしたうえで TGF-β1 刺激による CTGF の発現を RT-PCR により解析をした。miR22 が TGF-β1 刺激による CTGF の発現を抑制することが示された (図 8)。

図 8 miR22 による TGF-β1 刺激 CTGF 発現抑制効果



以上より、miR22 は ERK1/2 のリン酸化抑制および CTGF 発現抑制を介して線維芽細胞から筋線維芽細胞分化抑制効果を示すと考えられた。

(4) プレオマイシン誘発肺線維症マウスモデルでの miR22 の線維化抑制効果

in vitro の結果から miR22 が抗線維化効果を有することが推測されたため、プレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスを用いて、miR22 の抗線維化作用を検討した。C57BL/6 マウスに浸透圧ポンプを用いてプレオマイシン 100 mg/kg を投与。プレオマイシン投与後 10 日目に miR22(1nM)を投与した (図 9)。28 日目に肺組織を摘出し、HE 染色および Masson trichrome 染色、α-SMA の免疫組織染色を行った。Ashcroft score とコラーゲン定量を行い線維化の程度を評価した。組織学的に、miR22 の投与によりプレオマイシン (BLM) 誘発の線維化が軽減される事が確認された (図 10, 11)。

図9 miR22投与実験計画

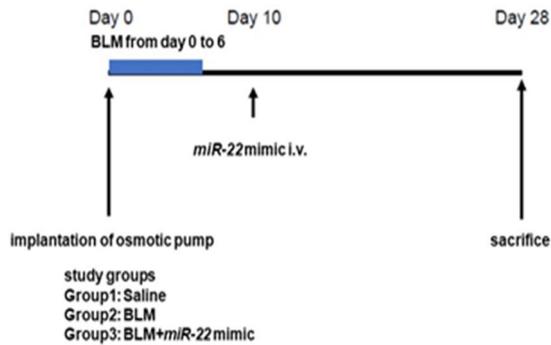


図10-a 肺組織標本

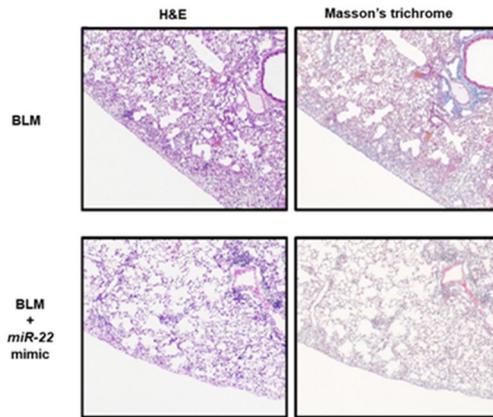


図10-b 線維化評価

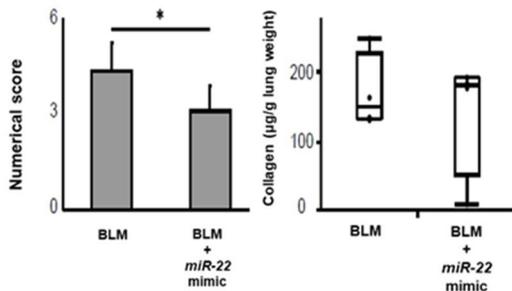
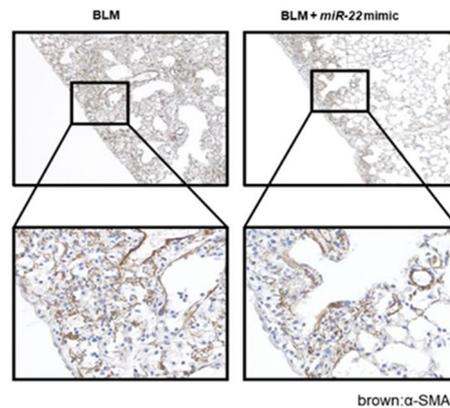


図11 肺組織でのα-SMAの免疫組織染色



(5) 得られた成果の位置づけと今後の展望

本研究では、miR22が肺線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化を抑制し肺線維化を抑制することをHFL-1でのin vitroおよびブレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスを用いたin vivoにより示した。本研究成果はJournal of Nippon Medical Schoolに掲載された。(Exosome-derived microRNA-22 ameliorates pulmonary fibrosis by regulating fibroblast-to-myofibroblast differentiation both in vitro and in vivo. Kuse N, Kamio K, Azuma A, et al.)

本研究においてはmiR22の血行動態や肺への集積についての詳細な解析までは至らなかった。またmiR22は単回投与であり、その抗線維化作用が十分に引き出せていない可能性がある。今後の研究においてはmiR22の効果的投与方法の解明が課題であり、この解析は肺線維化病態の解明に繋がるものと考えられる。以上の研究を通じて、miRNAのIPFに対する臨床応用の可能性を模索したい。

<引用文献>

- 1) Xie T, Liang J, Guo R, Liu N, Noble PW, Jiang D. Comprehensive microRNA analysis in bleomycin-induced pulmonary fibrosis identifies multiple sites of molecular regulation. *Physiol Genomics* 2011; 43: 479-487.
- 2) Yamada M, Kubo H, Ota C, Takahashi T, Tando Y, Suzuki T, Fujino N, Makiguchi T, Takagi K, Suzuki T, Ichinose M. The increase of microRNA-21 during lung fibrosis and its contribution to epithelial-mesenchymal transition in pulmonary epithelial cells. *Respir Res* 2013; 14: 95.
- 3) Liu G, Friggeri A, Yang Y, Milosevic J, Ding Q, Thannickal VJ, Kaminski N, Abraham E. miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *J Exp Med* 2010; 207: 1589-1597.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kuse N, Kamio K, Azuma A, Matsuda K, Inomata M, Usuki J, Morinaga A, Tanaka T, Kashiwada T, Atsumi K, Hayashi H, Saito Y, Seike M, Gemma A	4. 巻 87
2. 論文標題 Exosome-derived microRNA-22 Ameliorates Pulmonary Fibrosis by Regulating Fibroblast-To-Myofibroblast Differentiation Both in Vitro and in Vivo	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Nippon Med Sch	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） 10.1272/jnms.JNMS.2020_87-302	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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 分 担 者	神尾 孝一郎 (Kamio Koichiro) (20465305)	日本医科大学・医学部・講師 (32666)	