

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17638

研究課題名(和文)細胞外基質による線維細胞のmiRNA発現制御に着目した肺線維症の新規治療法開発

研究課題名(英文)The fibrotic extracellular matrix induces release of extracellular vesicles with pro-fibrotic miRNA from fibrocytes

研究代表者

佐藤 正大(SATO, Seidai)

徳島大学・病院・講師

研究者番号：80530899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では線維細胞の分泌するmiRNAが肺の線維化に与える影響について検討した。検討の結果、線維細胞は線維化促進性miRNAを内包した細胞外小胞の分泌を介して、周囲の線維芽細胞に線維化促進効果を与えている可能性が示された。更に、線維細胞は線維化肺組織内で構築された異常な細胞外基質の影響を受けて、線維化促進性miRNAの発現量を変化させている可能性も示唆された。これらの仮説についてより詳細なメカニズムを解明することができれば、線維細胞を介した新たな線維化促進性メカニズムを解明し、将来的な治療戦略に結び付けられる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの肺線維症治療は線維芽細胞の増殖に関わる増殖因子を標的としてきた。細胞外基質(ECM)成分が種々の細胞機能に影響を与えることは広く知られているが、ECMを標的とした治療戦略は、肺線維症分野において試みられたことがない。

本研究は、線維化肺組織におけるECMが、線維細胞のmiRNA発現を変化させて更なる線維化進行に寄与するというメカニズムを実証し、その制御による新たな治療戦略の開発を目指すことを目的としている。これにより新たな線維化促進メカニズムを同定できれば、肺線維症を含む各種線維性疾患において、従来の治療戦略とは重複しない新たな治療戦略の開発に結びつく可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Extracellular vesicles (EVs) are small lipid vesicles, and EV-coupled miRNAs are important modulators of biological processes. Fibrocytes are circulating bone marrow-derived cells that migrate into the injured lungs and contribute to fibrogenesis. The question of whether EV-coupled miRNAs derived from fibrocytes are able to regulate pulmonary fibrosis has not been addressed yet. In this study, we demonstrate that (1) fibrocytes exert pro-fibrotic effects on fibroblasts through secretion of EVs containing pro-fibrotic miRNA; and (2) that the abnormal ECM in fibrotic lung increases the expression of pro-fibrotic miRNA from fibrocytes. These findings suggest that abnormal ECM in pulmonary fibrosis is able to self-promote fibrosis by inducing fibrogenic miRNA from fibrocytes. This complex and dynamic process of the interaction between circulating fibrocytes with their cellular and molecular microenvironment in the lungs should be integrated into novel therapeutic strategies of fibrosis.

研究分野：呼吸器内科学分野

キーワード：fibrocyte 間質性肺炎 細胞外基質 microRNA miR-21 細胞外小胞

## 1. 研究開始当初の背景

これまでの IPF 治療は線維芽細胞の増殖に関わる増殖因子を標的としてきた。ニンテダニブは認可された治療薬の 1 つであり、幾つかの増殖因子受容体を標的とする。実際、研究代表者はニンテダニブが複数の増殖因子を阻害することで、肺内の線維芽細胞の増殖を阻害し、線維化抑制に働くことを報告した(Sato S, et al. *Respir Res.* 18:172, 2017)。これらの作用を介してニンテダニブは IPF 患者の年間努力性肺活量の低下を抑制することが複数の臨床試験で証明されている。しかしニンテダニブによる治療でも、IPF の病勢進行を完全に抑制することはできない。IPF の病態は非常に複雑であり、多様なメカニズムで制御されている可能性が考えられることから、「増殖因子以外の IPF 病態制御メカニズムとは何か？」を問うことで、従来の治療戦略とは重複しない新たな治療標的が同定できる可能性がある。

Fibrocyte は血球系と間葉系の性質を併せ持つ単球由来の間葉系前駆細胞である(Nat Rev Immunol. 11:427-435, 2011)。その発見後、fibrocyte は、組織線維化を誘導することで創傷治癒に貢献する細胞と認識されてきた。しかし近年、血中 fibrocyte 数と IPF 患者の早期死亡率との間の相関が報告されるなど (Am J Respir Crit Care Med. 179:588-594, 2009)、線維化肺における fibrocyte は、肺の病的線維化を促進する負の側面を持つことが認識されるようになった。しかし実際に fibrocyte がどのようなメカニズムをもって肺の線維化促進に関与しているかは未だ不明な点が多い。

近年、様々な miRNA が IPF の病態に関わっている可能性が報告されている(Transl Res. 157:191-199, 2011)。miRNA は細胞間情報伝達に関わる重要な傍分泌因子の一つとされているが、fibrocyte の分泌する miRNA が肺の線維化に与える影響については報告がない。研究代表者は fibrocyte 由来の miRNA が肺線維化に与える影響に着目し、既に幾つかの知見を得た。

44 例のヒトの気管支肺泡洗浄液中から単離した fibrocyte における miRNA の発現量を検討したところ、胸部 HRCT 上において通常型間質性肺炎(UIP)パターンや線維性非特異性間質性肺炎(fNSIP)パターンを示す、より肺線維化の進行した症例において、miR-21 の発現量が高い傾向が認められた。この miR-21 は IPF の肺組織で高発現されており、コラーゲンなどの細胞外基質の分泌を促すことで線維化促進に働く miRNA として報告されている (J Exp Med.207:1589-1597, 2010)。

更に TGF-beta1 強制発現ベクターの経気管支投与により線維症を惹起させたラット肺から fibrocyte を単離したところ、線維化肺より単離された fibrocyte は、健常肺から単離された fibrocyte に比べて、多量の miR-21 を発現していることがわかった。更にこの傾向は細胞内発現の比較のみならず、単離された fibrocyte の細胞上清から抽出した細胞外小胞内での発現比較においても同様の傾向が認められた。

miRNA は細胞外小胞に内包されて細胞外へ分泌され、他細胞の遺伝子発現を調節している。そこで線維化肺由来の fibrocyte の培養上清を用いて線維芽細胞を培養したところ、正常肺由来 fibrocyte の培養上清と比較して、線維芽細胞の分化マーカーである Acta2 (alpha-SMA)や、ECM の 1 つである Col1a1 (1 型コラーゲン) の発現が著しく増加した。また、培養上清中に細胞外小胞取り込み阻害薬である EIPA を加えたところ、この効果は抑制された。

これらの結果から、研究代表者は以下の 2 つの仮説を立てた。

仮説 1: Fibrocyte は線維化促進性 miRNA を内包した細胞外小胞の分泌を介して、周囲の線維芽細胞に線維化促進効果を与えている。

仮説 2: Fibrocyte は線維化肺組織内で構築された異常な ECM の影響を受けて、線維化促進性 miRNA の発現量を変化させている。

以上の 2 点について解明することができれば、fibrocyte を介した新たな線維化促進性メカニズムを解明し、将来的な治療戦略に結び付けられる可能性があると考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究では線維化肺組織に含まれる特定の ECM 成分が fibrocyte の miRNA 発現調節を介して肺の線維化促進に働いていることを証明し、これに基づく新たな治療標的候補の発見を目的とする。ECM 成分が分化を始めとした種々の細胞機能に影響を与えることは広く知られているが、ECM 成分を標的とした治療戦略は、肺線維症分野において今まで試みられたことがない。

## 3. 研究の方法

(1) 線維化肺組織の ECM が fibrocyte の miRNA 発現に与える影響の検討

ラットあるいはマウス正常肺組織、または健常人の末梢血から単離される正常 fibrocyte を用いて、ラット正常肺または線維化肺から作成された脱細胞肺組織を再細胞化し、培養する。培養後の fibrocyte の miR-21 発現を比較し、ECM による miRNA 発現への影響を検討する。

(2) Fibrocyte の miR-21 発現に影響を与える線維化肺組織中 ECM 成分の同定

脱細胞化組織のホモジネートから、ECM 成分を抽出し、正常肺組織と線維化肺組織での成分の相違について検討する。液体クロマトグラフィータンデム質量分析装置(LC-MS/MS)を用いること

で、網羅的なプロテオーム解析が可能である(Proteomics. 26:5868-5879, 2006)。治療標的候補とした ECM 成分については ELISA を用いて発現量の検討を個々に行う。候補とされた ECM 成分の組換え体タンパク質を fibrocyte に投与し、miR-21 発現に与える影響を検討する。

(3) 線維化肺組織の弾性が fibrocyte の miRNA 発現に与える影響の検討

線維化肺組織における ECM は、その成分構成のみならず、組織の弾性をも変化させている。Matrigen Softwell®のような柔らかい細胞培養用ハイドロゲル上で fibrocyte を培養し、通常の硬性培養皿上での培養と比較することで、弾性の変化が miR-21 発現に与える影響を検討する。

#### 4 . 研究成果

ラット正常肺、あるいは TGFbeta1 強制発現ベクターを用いて作成したラット線維化肺から脱細胞化組織を作成した。それら剛性の異なる脱細胞化肺組織をラット正常肺組織由来の fibrocyte で再細胞化し培養したところ、線維性脱細胞化肺組織での培養は、正常脱細胞化肺組織での培養と比較して fibrocyte の miR-21 発現を増加させた。更に線維性肺脱細胞化肺組織のホモジネートから作成した細胞外基質(ECM)抽出物は fibrocyte の miR-21 発現を増加させた。

線維性肺脱細胞化肺組織のホモジネートと、正常肺脱細胞化肺組織のホモジネートに含まれている既知の ECM 成分を比較したところ、線維化肺由来のホモジネートにはより多くのヒアルロン酸が含まれていた。FACS で検討したところヒアルロン酸の受容体である CD44 が fibrocyte には発現していることが判った。ヒアルロン酸を fibrocyte に投与したところ、miR-21 発現が増加し、CD44 の中和抗体によってその効果が抑制されたことから、線維性肺組織により多く含まれるヒアルロン酸が fibrocyte の miR-21 発現の増高に寄与している可能性が考えられた。

また、線維化肺組織における ECM は、その成分構成のみならず、組織の弾性をも変化させている。そのため、柔らかい細胞培養用ハイドロゲル上(matrigen softwell)で fibrocyte を培養して、通常の硬性培養皿上での培養と比較したところ、硬性の培養皿上での培養は fibrocyte の miR-21 発現を増加させた。

これらの結果は、fibrocyte が線維化肺組織内で構築された異常な ECM の影響を受けて、線維化促進性 miRNA の発現量を変化させている、という研究代表者の仮説を支持する結果であった。現在、追加研究を行うと同時に、既存の結果をまとめたものを論文化し投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 佐藤正大, 西岡安彦, Martin Kolb.	4. 巻 24
2. 論文標題 線維化肺組織の細胞外基質が線維細胞のmiR-21発現に及ぼす影響の検討.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 分子呼吸器病	6. 最初と最後の頁 76-79
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Seidai Sato, Chandak Upagupta, Toyoshi Yanagihara, Martin RJ Kolb, Yasuhiko Nishioka.
2. 発表標題 Expression of pro-fibrotic microRNA of fibrocytes in bronchoalveolar lavage fluid.
3. 学会等名 ATS 2019 International Conference. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤正大, 西岡安彦, Martin Kolb.
2. 発表標題 線維化肺組織の細胞外基質が線維細胞のmiR-21発現に及ぼす影響の検討.
3. 学会等名 第18回肺サーファクタント分子病態研究会.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Seidai Sato, Chandak Upagupta, Toyoshi Yanagihara, Martin RJ. Kolb, Yasuhiko Nishioka.
2. 発表標題 Fibrotic extracellular matrix upregulates pro-fibrotic miRNA expression of fibrocytes.
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会学術講演会.
4. 発表年 2019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
---------	---------