

機関番号：16101

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009~2010

課題番号：21790772

研究課題名 (和文) CCNファミリー分子を標的とした肺線維症の病態解析と新規治療法への展開

研究課題名 (英文) The role of CCN family signaling in pulmonary fibrosis, and CCN pathway may be an effective molecular therapeutic strategy for fibrotic lung disease

研究代表者 東 桃代 (AZUMA MOMOYO)
徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：10403750

研究成果の概要 (和文)：難治性肺疾患である特発性肺線維症では CTGF 以外で線維化に関する CCN ファミリーの検討は少なく、その役割は不明であった。今回の研究により CCN6 という分子が $\beta 1$ インテグリンを介し線維芽細胞の増殖やフィブロネクチンの産生を促進することが示された。 $\beta 1$ 中和抗体である抗 CD29 抗体など、CCN6 をターゲットにした治療が肺線維症の新たな分子標的となる可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：Idiopathic pulmonary fibrosis is a progressive and lethal disease of the lung. Here, we demonstrated that CCN6 induced the proliferation of lung fibroblasts by binding to integrin Furthermore, CCN6 showed ability to stimulate the expression of fibronectin. Our results suggest that CCN6 is a potential target for the treatment of pulmonary fibrosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床学 呼吸器内科学

キーワード：肺線維症 CCN インテグリン FAK

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (IPF: Idiopathic pulmonary fibrosis) は、極めて予後不良の難治性疾患であり、5 年生存率は 50% 以下で未だ明らかな生命予後を延長する治療法は確立されておらず、さらなる病態解明と新規抗線維化薬の開発が重要な課題となっている。これまで CCN2 である CTGF は以外で線維化に関する CCN ファミリーの線維化へのメカニズムへの関与の検討は少なく、その役割は不明であった。

CCN ファミリーは CYR61/ cysteine-rich 61; CCN1, CTGF/connective tissue growth

factor; CCN3, NOV/nephroblastoma overexpressed gene の 3 つの頭文字をとって命名された CCN1~CCN6 の現在 6 種類からなる一群のタンパク質であり、細胞表面のインテグリンに結合する事によってシグナル伝達をなされ細胞の接着、遊走、血管新生など多様な機能を発揮することが知られている。

これまで CCN ファミリーのなかでも CCN2 は肺線維症に関連の深い TGF- β のシグナルの下流にありブレオマイシン肺線維症マウスモデルで CCN2 の発現が亢進し CCN2 の中和抗体で線維化モデルでの抗線維化作用が証明されている。また最近の報告では

CCN4/Wnt-induced secreted protein 1 (WISP1)がII型肺胞上皮の上皮-間葉細胞分化転換 epithelial-mesenchymal transition (EMT) を促進し線維化の悪化に関与しており、その CCN4 シグナルの抑制がブレオマイシン肺線維症マウスモデルで線維化を改善したと報告された。しかし CCN2 である CTGF や CCN4 以外で線維化に関する検討は少なく、その役割は不明であった。

今回、我々の検討により、CCN6/WISP-3 が $\beta 1$ インテグリンを介し線維芽細胞で FAK のリン酸化を介しフィブロネクチンの産生を促進する可能性が示唆された。またマウス肺線維症モデルを用いた Western blotting の検討では線維化肺では有意に CCN6 が発現していた。また *In Vitro* の実験で $\beta 1$ 中和抗体である抗 CD29 抗体で処理することにより線維芽細胞増殖が有意に抑制された。

これらの結果から本研究では CCN ファミリーのなかでも新たに CCN6 が肺線維症に関与する新たな分子標的となる可能性が示されたので詳細に報告する。

2. 研究の目的

今回の研究では肺線維症での新たな CCN シグナルの関与を明らかにし、新たな抗線維化療法のターゲットとしての可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

肺線維芽細胞はマウス C57BL/6 の肺から得られた細胞株と、ATCC から購入した MLg 肺線維芽細胞株の2種類を用いて実験を行った。マウス肺線維芽細胞の増殖は3H-チミジン取り込み試験で、また細胞表面のインテグリンレセプターはFACSで検討した。細胞シグナルはFAKのリン酸化をWestern blottingを用いて確認し、ブレオマイシン肺線維症モデルは7週齢C57BL/6マウスにBLMをmini-osmotic pumpにて持続皮下投与し作成した。タイムコースではRT-PCR、Western blottingを用いて線維化肺組織のCCNの発現を検討した。

4. 研究成果

(1)CCN6 の肺線維芽細胞に対する増殖促進作用と細胞外マトリックス (Extracellular Matrix) 産生促進作用の検討; ①Fig1-AではC57BL/6線維芽細胞株を、また Fig1-BではMLg肺線維芽細胞株を用いて増殖への影響を検討した結果リコンビナントのCCN6が100ng/ml以上の濃度で増殖促進作用を認めた。②この結果を再度確認する目的でCCN6 200ng/mlで培養し細胞をカウントした結果 Fig1-CではC57BL/6線維芽細胞株を、また Fig1-DではMLg肺線維芽細胞株を用いて検討したが3日目、7日目で有意な細胞数の増加を確認した。③また細胞外マトリックスの蓄積は線維化の進行に重要な因子でありCCN6のフィブロネクチンと type I コラーゲンの

影響をC57BL/6線維芽細胞株を用い検討した結果、わずかではあるが有意な差をもって Fig1-Eではfibronectin mRNAの発現の亢進を確認できたが、Fig1-Fでは明らかな type I コラーゲン mRNAの亢進は確認出来なかった。

(2)マウス肺線維芽細胞のインテグリン発現; C57BL/6線維芽細胞株とMLg肺線維芽細胞株を用いて細胞表面のインテグリン発現を検討したところ Fig2で示されるように $\beta 1$ 、 αV 、 $\alpha 6$ 、 $\alpha 5\beta 1$ インテグリンの発現が確認された。

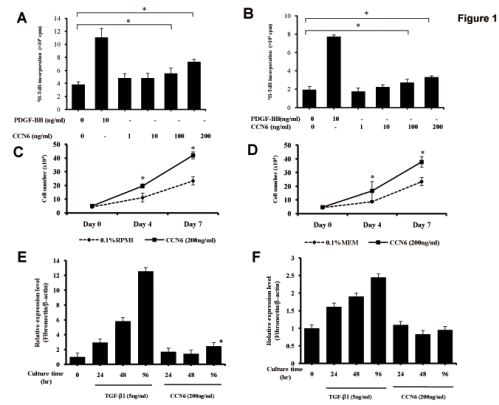


Figure 1

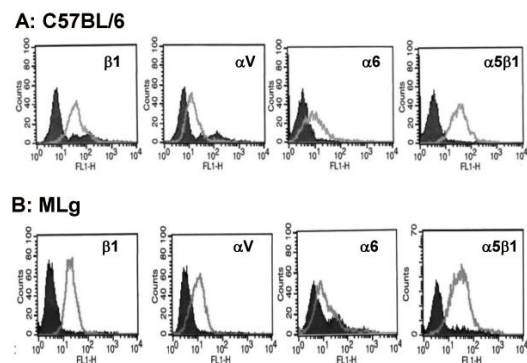
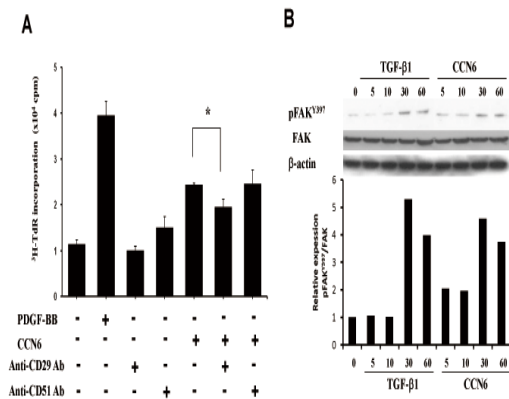


Figure 2

(3)CCN6 の中和抗体での細胞増殖抑制の検討; ①次に2種類のインテグリンの中和抗体を用い増殖抑制効果につき検討を行った。Fig3Aで示されるようにインテグリン $\beta 1$ (CD29)に対する中和抗体では細胞増殖抑制効果が認められたがインテグリン αV (CD51)に対する中和抗体では、その抑制効果が認められなかった。これらの結果からCCN6からの細胞増殖作用は $\beta 1$ を介していることが示唆された。②次に下流シグナルの検討で、インテグリンからの細胞増殖や遊走に重要なシグナル分子であるFAK:Focal adhesion kinaseのリン酸化につき検討した。その結果、Fig3Bで示されるようにCCN6の刺激によって

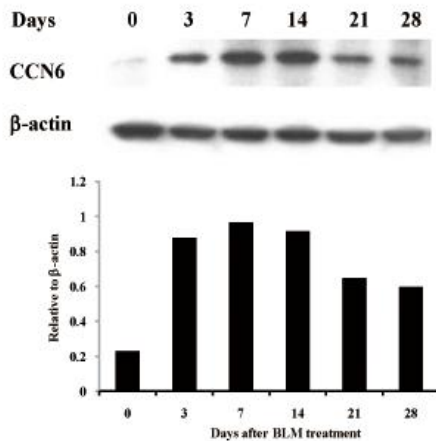
FAKのリン酸化が確認された。

Figure 3



(4)プレオマイシン肺線維症マウスモデルでのCCN6発現の検討；最後に、プレオマイシン肺線維症マウスモデルを用い Fig4 で示されるように CCN6 の発現をタイムコースで Western blotting にて検討した。その結果、3日目から14日目までCCN6の発現が亢進し線維化期にある28日目まで発現が維持されていた。

Figure 4



(5)まとめ；今回、我々の検討により、CCN6/WISP-3がβ1インテグリンを介し線維芽細胞でFAKのリン酸化を介し線維化を促進する可能性が示唆された。またマウス肺線維症モデルを用いた Western blotting の検討では線維化肺では有意にCCN6が発現していた。また *In Vitro* の実験でβ1中和抗体である抗CD29抗体で処理することにより線維芽細胞の増殖が抑制された。これらの結果から本研究ではCCNファミリーのなかでも新たに

CCN6が肺線維症に関与する新たな分子標的となる可能性が示唆された。

今回の研究で得られた成果は、国内外において新たな知見となるものであり英文の雑誌に投稿予定である。また、今後の展望としては、この成果をもとに肺線維症患者でのCCN6の解析を行っていく意義は十分にあると考えられ、ヒトでの病態への関与と治療応用に発展させ寄与できればと考えられる。

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3件)

1. Kishi, J. Nishioka, Y. Azuma, M.: Blockade of Th1 chemokine receptors ameliorates pulmonary granulomatosis in mice. *Eur Respir J* inpress 査読有

2. 西岡安彦、東 桃代: 間質性肺炎の治療法の「展開」-イマチニブ- *Vol158* 389-395 2010 査読無

3. 西岡安彦、東 桃代: 線維化病変に対するイマチニブの効果 *血液・腫瘍科 Vol159* 181-188 2009 査読無

[学会発表] (計2件)

1. Nishioka, Y. Azuma, M. Effects of the novel immunomodulator sphingosine 1-phosphate(SIP) receptor agonist FTY720 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *American Thoracic Society, USA* 2010. 5. 19

2. 東 桃代: 新規免疫抑制薬フィンゴリド (FTY720) のマウスプレオマイシン誘発肺線維症に及ぼす効果の検討 *日本呼吸器学会* 東京, 2010. 4. 23

[図書] (計1件)

1. 西岡安彦、東 桃代: 厚生労働科学研究難治性疾患克服研究事業 びまん性肺疾患に関する調査研究班 平成20年度報告書

[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

東 桃代(AZUMA MOMOYO)
徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：10403750

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：