

令和 6 年 7 月 3 日現在

機関番号：87109

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20774

研究課題名（和文）肺高血圧合併肺線維症モデル樹立とその解析手法の確立

研究課題名（英文）Establishment and Analysis of a Pulmonary Hypertension-Associated Pulmonary Fibrosis Model

研究代表者

柳原 豊史（Yanagihara, Toyoshi）

独立行政法人国立病院機構福岡病院（臨床研究部）・その他部局等・医師

研究者番号：40778841

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：特発性肺線維症における肺血管リモデリングが、肺線維症の病態進行に関与しているとの仮説を証明するため、本研究では、ブレオマイシン反復投与による肺高血圧合併肺線維症マウスモデルを樹立することを目的とした。ブレオマイシン2回投与群では1.2mg/kgを気管内投与し、2週間後にブレオマイシン2mg/kgを気管内再投与し3週間後にsacrificeした。マッソントリクローム染色で肺線維化を評価したところ、ブレオマイシン1回投与群に比べ、2回投与群はより強い線維化を呈していた。更に、2回投与群で肺動脈壁肥厚が認められた。肺高血圧合併肺線維症モデルとして使用できる状態と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立した肺高血圧合併肺線維症マウスモデルは、安価で普遍的に利用可能な研究ツールとなる。このモデルにより、予後不良な特発性肺線維症における血管リモデリングと線維化進行の関連性を詳細に調査できる。複雑な病態メカニズムの解明が進み、血管と線維化の両面に着目した新たな治療法開発の可能性が広がる。結果として、患者の予後改善と生活の質向上に貢献する研究基盤となるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：This study aims to establish a mouse model of pulmonary hypertension-associated pulmonary fibrosis to investigate the hypothesis that pulmonary vascular remodeling contributes to the progression of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). We developed a model using repeated intratracheal bleomycin administration in C57BL6 female mice. The double-dose protocol involved an initial 1.2mg/kg dose, followed by a 2mg/kg dose two weeks later, with sacrifice three weeks after the second dose. Masson's trichrome staining revealed that the double-dose group exhibited more severe fibrosis compared to the single-dose group. Importantly, the double-dose group also showed pulmonary artery wall thickening. These findings suggest that our repeated bleomycin administration protocol successfully created a mouse model that mimics both pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension. This model provides a valuable tool for studying the complex interplay between pulmonary fibrosis and vascular remodeling in IPF.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：間質性肺炎 肺線維症 血管リモデリング

1 . 研究開始当初の背景

間質性肺炎とは、肺間質を炎症や線維化病変の主座とする疾患で、原因は多岐にわたり、職業(じん肺)・環境性(過敏性肺炎)や薬剤など原因の明らかな場合や、膠原病・サルコイドーシスなどの全身性疾患に付随して発症する場合と、原因が特定できない場合がある。とりわけ、最も患者数の多い特発性肺線維症は、平均生存年数が 3-4 年と予後不良な慢性進行性疾患であり、指定難病に認定されている。現在、ビルフェニドンとニンテダニブの 2 種類の抗線維化薬が認可されているが、線維化の進行を停止するには至っておらず、その病態解明及び新規の治療戦略開発は喫緊の課題である。

特発性肺線維症は肺高血圧症を合併することが多く、肺高血圧症を合併した場合の生命予後は更に不良であることが知られている。2021 年に、血管作動薬の Treprostinil 吸入が肺高血圧を合併した特発性肺線維症の運動耐容能改善、呼吸機能改善を示したことが報告された。これらの背景から、申請者は「特発性肺線維症における肺血管リモデリングが、肺線維症の病態進行に関与している」と仮説を立て、本研究を立案した。

2 . 研究の目的

本研究の目的は、特発性肺線維症における肺血管リモデリングの役割を解明し、新たな治療法開発への基盤を構築することである。具体的には、以下の 3 点を達成することを目指す：

1. ブレオマイシン反復投与による肺高血圧合併肺線維症マウスモデルの確立
2. 肺血管構成細胞と繊維芽細胞の共培養系を用いた相互作用の解析
3. マウスモデル肺の薄切または脱細胞化組織を用いた血管構成細胞の性質変化の解析

これらの実験を通じて、肺線維症の進行における血管リモデリングの機序を明らかにし、血管と線維化の両面にアプローチする新規治療法開発の可能性を探索する。

3 . 研究の方法

a. 肺高血圧合併肺線維症マウスモデルの樹立

- ・ C57BL/6 マウスにブレオマイシンを経気管投与 (1-4 mg/kg) 投与量を調整
- ・ 3-9 週後に再度経気管投与
- ・ 肺線維症の確認：Masson-Trichrome 染色、コラーゲン、SMA、Hydroxyproline 解析
- ・ 肺高血圧の確認：肺動脈壁厚解析、右心カテーテル検査での肺動脈圧測定

b. 肺血管構成細胞と繊維芽細胞の単離と共培養系の確立

- ・ 肺血管内皮細胞：CD31 標識磁気ビーズを用いて単離
- ・ 繊維芽細胞：残りの細胞を 2 週間培養して単離
- ・ 血管平滑筋細胞：肺動脈を単離、酵素処理後 10 日間培養
- ・ 細胞純度の確認：CD31, Sm22, vimentin などの表面マーカーを使用
- ・ 共培養：CellTrace で事前染色した肺血管構成細胞と繊維芽細胞を共培養
- ・ クロストーク解析：フローサイトメトリー、マイクロアレイ、質量解析

c. 薄切肺・脱細胞化肺での血管構成細胞の培養と解析

- ・薄切肺：ビブラトームを用いて作製
- ・血管構成細胞を薄切肺または脱細胞化肺内で培養（2-7 日間）

4 . 研究成果

プレオマイシン反復投与による肺高血圧合併肺線維症マウスモデルの樹立を試みた。プレオマイシン投与量を調整し、単回投与群では、C57BL/6 10 週齢雌マウスにプレオマイシン 2mg/kg を気管内投与し、3 週間後に sacrifice した。2 回投与群では 1.2mg/kg を気管内投与し、2 週間後にプレオマイシン 2mg/kg を気管内再投与し 3 週間後に sacrifice した。マッソントリクローム染色で肺線維化を評価したところ、プレオマイシン 1 回投与群に比べ、2 回投与群はより強い線維化を呈していた。更に、2 回投与群で肺動脈壁肥厚が認められた。肺高血圧合併肺線維症モデルとして使用できる状態と考えられた。

このマウスモデルの肺組織より、肺線維芽細胞、肺動脈平滑筋細胞、肺血管内皮細胞の単離を試みたが、困難であった。一方、肺組織のビブラトームによる薄切培養系については樹立できたため、今後の実験系に応用する予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------