

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09546

研究課題名(和文) 肺線維症に対する新しい抗炎症治療戦略に関する基礎的研究

研究課題名(英文) Research for anti-inflammatory therapeutic strategy against pulmonary fibrosis

研究代表者

久田 剛志 (HISADA, Takeshi)

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：10344938

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肺線維症に対する有効な治療が望まれている。Resolvinは、3脂肪酸由来の抗炎症性脂質メディエーターであり、炎症収束作用も有している。マウス肺線維症モデルを作成し、17(R)-Resolvin D1の効果を確認した。その結果、線維化抑制効果を示すこと、レセプターと考えられているALX/FPR2を介して作用すること、惹起された好中球浸潤や炎症性サイトカインの産生増加等の急性炎症の収束を促進しつつ肺線維化形成の抑制に寄与することが示された。ひとたび形成された線維化病変が改善されることを示唆する結果も得られた。以上より、Resolvinは肺線維症に有用な治療戦略となり得ることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Pulmonary fibrosis is a destructive inflammatory disease with limited therapeutic options. Resolvin D1 (RvD1) displays potent anti-inflammatory, pro-resolving activity. We tested the hypothesis that 17(R)-RvD1 can provide a therapeutic benefit by reducing inflammation and pulmonary fibrosis. Mice were exposed to bleomycin (BLM) to induce pulmonary fibrosis, and were then treated with 17(R)-RvD1. Administration of 17(R)-RvD1 from the start of BLM treatment attenuated neutrophil alveolar infiltration, lung collagen content, and IL-1 β , TGF- β 1, CTGF, and type I collagen mRNA expression, along with subsequent reduction in histologically detectable fibrosis. The administration of 17(R)-RvD1 at the later fibrotic stage also improved the lung failure. These results suggest that 17(R)-RvD1 attenuates pulmonary fibrosis by promoting the resolution of neutrophilic inflammation and also provides pulmonary restoration. These data highlight the therapeutic potential of 17(R)-RvD1.

研究分野：アレルギー・膠原病

キーワード：肺線維症 脂質メディエーター resolvin 炎症収束 動物モデル - 3脂肪酸

1. 研究開始当初の背景

肺線維症は、膠原病関連や特発性などに分類されるが、進行性の疾患であり、十分な治療法がない。肺線維症の詳細な病因、病態は不明であるが、炎症による気道上皮障害とそこで生じた組織損傷に対する修復機能不全のために線維芽細胞増殖と活性化、コラーゲンの沈着が生じ、疾患が発症、進展するという仮説が唱えられている。胃内容物の気道への aspiration (胃・食道逆流症など) により直接的に気道上皮障害が惹起され、病態に関与しているという報告がある。さらに気道局所では aspiration 以外でも様々な原因によって起こった炎症により、pH は 5.5 まで低下するという報告もある。慢性気道炎症が病態の本質である肺線維症患者の気道では pH 低下が疾患の発症、進展に関与することが予想される。現在、予後を改善させるに十分な治療法のない本疾患に対する新しい治療法の開発は急務である。我々が考えている、細胞外 pH を感知するプロトン感知性 G 蛋白共役受容体が pH 微小環境のセンサーとして肺線維症の発症、進展に関与するという新しい仮説は、実証されれば新規の治療法の開発につながる可能性がある。気道の炎症性疾患の一つである気管支喘息の病態へのプロトン感知性 G 蛋白共役受容体の関与については、我々が論文において発表している。また我々は、気管支喘息に対して、3 系脂肪酸由来脂質メディエーター (Resolvin E1) の喘息モデルにおける有用性に関して報告してきた。

6 系脂肪酸であるアラキドン酸由来のプロスタグランジンやロイコトリエンなどの起炎症性脂質メディエーターの作用とは反対に、炎症反応を収束することで恒常性を維持しようと働く 3 系脂肪酸 EPA や DHA 由来メディエーターである Resolvin や Protectin は抗炎症作用を有している。慢性炎症により惹起される組織損傷の修復が、何らかの理由で不十分である場合に線維化が進行する可

能性がある。本研究では、炎症による組織損傷に対する修復機能改善を治療戦略とする、肺線維症に対する全く新しいアプローチからの治療法の開発を目指す。

2. 研究の目的

進行性の疾患であり、十分な治療法のない肺線維症に対して、新しい治療法の開発を目指して基礎的研究を行う。本研究の目的としては、我々を含むグループによって発見された細胞外 pH を感知するプロトン感知性 G 蛋白共役受容体が、pH 微小環境のセンサーとして肺線維症の発症、進展に関与するという仮説を実証すること、炎症収束作用を持つ 3 系脂肪酸由来メディエーターが組織修復に働き線維化を抑制するという仮説を実証すること、そして新規治療法開発を目的として解析をおこなうこととした。

3. 研究の方法

本研究では、(1) 慢性炎症による組織損傷修復機能不全として惹起された肺線維化反応を抑制する 17(R)-RsolvinD1 の効果の全体像を明らかにしていく。具体的には、肺線維症モデルマウスを用いた *in vivo* の解析として、ブレオマイシン (BLM) を持続皮下投与することにより、慢性曝露による気道炎症を惹起させる。組織像やコラーゲン産生量、気道炎症の程度などを検討し、17(R)-RsolvinD1 の作用を確認する。また、*in vitro* の解析として、17(R)-RsolvinD1 の線維芽細胞への直接作用の確認を行う。(2) 炎症局所の低 pH が肺線維化反応に及ぼす役割について、各種 OGR1 ファミリー分子の欠損マウス (ダブル欠損マウスを含む) の肺線維化モデルを用いプロトン感知性受容体の気道炎症反応における作用を明らかにする。

In vivo 解析では、C57BL/6J 8 週齢マウスを用い BLM 肺線維症モデルを作成し、17(R)-ResolvinD1 の効果について検討する。

BLM モデルは、osmotic pump を用い、安定的に BLM を皮下投与することによって作成する。day28 に肺組織を回収し、組織のヘマトキシリン-エオジン染色、肺線維化のスコアリング(Ashcroft score)を行って評価する。また、day28 に回収した肺組織を用いて、hydroxyproline の定量解析を行い、コラーゲン量の分析をする。さらに、回収した肺組織の一部から線維化に重要なサイトカインである TGF- β 1 や CTGF を Real-time PCR 法により定量的に測定する。次に、気道炎症についての解析を行う。気道炎症を経時的に観察する目的で、BLM 誘発肺線維症モデルマウスを day3, 7, 14, 28 に気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い、総細胞数、細胞分画を測定する。また、各炎症相の経時的变化も観察する。BAL 液中の炎症性サイトカインの産生を ELISA 法により分析し、BAL 液中に回収された cytokine profile を検討する。肺組織中のサイトカインの産生に関しては、RT-PCR 法を用いて、メッセージレベルの発現も検討する。17(R)-ResolvinD1 は、 ω -3 不飽和脂肪酸である DHA 由来抗炎症性脂質メディエーターであり、他の Resolvin 群のメディエーターよりも生体内で安定である。本研究では炎症収束に作用するメディエーターとして 17(R)-ResolvinD1 を用いる。5日間連続腹腔内投与群と vehicle 群に分け、BLM が誘発する肺線維化に対する抑制効果を検討する。次に、*in vitro* の解析による 17(R)-ResolvinD1 のサイトカイン産生抑制効果を検討する。各種 OGR1 ファミリー分子の欠損マウス (ダブル欠損マウスを含む) の肺線維化モデルを用いたプロトン感知性受容体の気道炎症反応における役割を検討する。OGR1、TDAG8、GPR4、G2A からなる OGR1 ファミリーのそれぞれの分子に対するノックアウトマウスを用いる。OGR1、TDAG8、GPR4、G2A 欠損、またはそれらのダブル欠損マウスと野生型マウスに対し、BLM を持続皮下投与

し肺線維症モデルを作製する。肺病理組織学的線維化の評価、コラーゲン産生量測定、肺胞洗浄液中のサイトカイン測定等をおこなう。炎症局所の低 pH が肺線維化に及ぼす影響についての新しい知見を得る。

4. 研究成果

BLM 誘発肺線維症 *in vivo* モデルを作製し 17(R)-ResolvinD1 (以下、RvD1 と略す) の効果を解析し、検討した。C57BL/6J 8 週齢マウスに、osmotic pump を用い安定的に BLM を皮下投与することによって作製することができた。day28 に肺組織を回収し、組織のヘマトキシリン-エオジン染色、肺線維化のスコアリングを行い、回収した肺組織を用いて、ハイドロキシプロリンの定量解析を行い、コラーゲン量の分析をした。さらに、回収した肺組織の一部から線維化に重要なサイトカインである TGF- β 1 や CTGF を Real-time PCR 法により定量的に測定した。気道炎症を経時的に観察する目的で、BLM 誘発肺線維症モデルマウスを day3, 7, 14, 28 に気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い、総細胞数、細胞分画を測定した (図 1)。また、各炎症相の経時的变化も観察した。BAL 液中の炎症性サイトカインの産生を ELISA 法により分析し、BAL 液中に回収された cytokine profile を検討した (図 2)。本研究においては、RvD1 が本肺線維化モデルに効果的に抑制を示すこと (図 3)、レセプターと考えられている ALX/FPR2 を介して作用すること (ALX/FPR2 に阻害作用を有する Boc-PLPLP を用いての研究)、BLM により惹起された好中球浸潤や炎症性サイトカインの産生増加等の急性炎症の収束を促進しつつ肺線維化形成の抑制に寄与することを示唆する結果が得られた (図 4)。また、一度形成された線維化病変が改善されたことを示唆する結果も得られ、RvD1 投与後の、肺組織中の MMP-9 の有意な改善及び TIMP-1 の低下傾向を確認した。

ここまでの成果を論文化して米国生理学会誌に掲載することができた。RvD1の抗線維化作用のメカニズムをさらに追求することを目標として、*in vitro*の実験を進めた。肺線維症の進行に関与するとされる転写因子に関しての研究を行った。IL-1 や IL-4 は、Fos/AP-1 に調節される線維化形成因子であり、RvD1 は Fos/AP-1 を含むシグナル経路を介して線維化抑制に寄与する可能性を示唆する結果が得られた。抗炎症作用を持つ resolvin は、肺線維症に対する新しい治療に結びつく可能性を持った脂質メディエーターであり、さらに応用していくことで有用な治療戦略となり得るものと思われた。

細胞外 pH を感知するプロトン感知性 G 蛋白共役受容体が pH 微小環境のセンサーとして肺線維症の発症、進展に重要な関与をしているか否かを実証するための研究は、現在進行中である。肺の炎症性疾患である喘息の動物実験モデルにおいては、OGR1 ファミリー欠損マウスを使って研究成果を発表済みであるが、本研究期間内では肺線維症に関する成果をあげることは不十分であった。今後も検討していく予定である。

図 1

17(R)-RvD1は炎症細胞の集積を減少

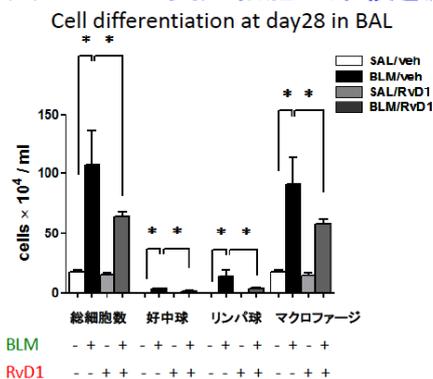


図 2

17(R)-RvD1は抗炎症作用を有する

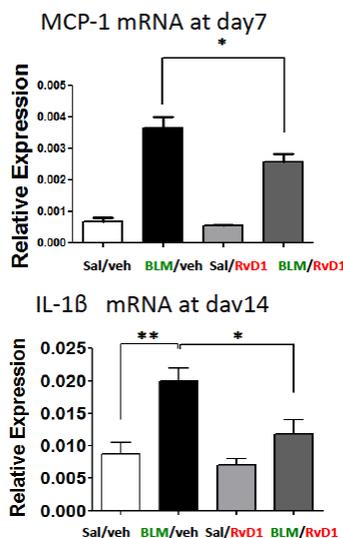


図 3

17(R)-RvD1投与後肺線維化が減弱

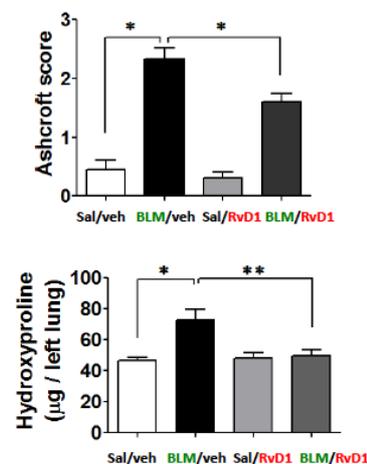
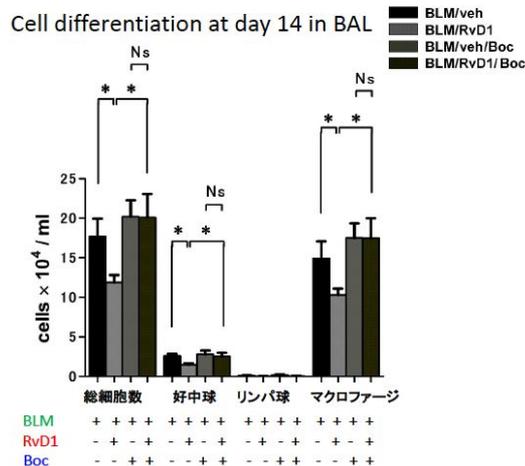


図 4

Boc-PLPLP は、17(R)-RvD1の抗炎症作用を阻害する



(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 5 件)

- (1) Hisada T, Saito-Aoki H, Koga Y. Are specific pro-resolving mediators promising therapeutic agents for severe asthma? *J Thoracic Dis.* 9(11):4266-4269, 2017 査読あり
- (2) Koga Y, Satoh T, Kaira K, Koka M, Hisada T, Hirato J, Altan B, Yatomi M, Ono A, Kamide Y, Shimizu Y, Aoki-Saito H, Tsurumaki H, Shimizu K, Mogi A, Ishizuka T, Yamada M, Dobashi K. Elemental and immune -histochemical analysis of the lungs and hilar lymph node in a patient with asbestos exposure, a pilot study. *Environ Health Prev Med.* 21(6):492-500, 2016. 査読あり
- (3) Koga Y, Hisada T, Ishizuka T, Utsugi M, Ono A, Yatomi M, Kamide Y, Aoki-Saito H, Tsurumaki H, Dobashi K, Yamada M. CREB regulates TNF- α -induced GM-CSF secretion via p38 MAPK in human lung fibroblasts. *Allergol Int.* 65(4):406-413, 2016. 査読あり
- (4) Tsurumaki H, Mogi C, Aoki-Saito H, Tobo M, Kamide Y, Yatomi M, Sato K, Dobashi K, Ishizuka T, Hisada T, Yamada M, Okajima F. Protective Role of Proton-Sensing TDAG8 in Lipo-polysaccharide-Induced Acute Lung Injury. *Int J Mol Sci.* 16(12):28931-42. 2015. 査読あり
- (5) Yatomi M, Hisada T, Ishizuka T, Koga Y, Ono A, Kamide Y, Seki K, Aoki-Saito H, Tsurumaki H, Sunaga N, Kaira K, Dobashi K, Yamada M, Okajima F. 17(R)-resolvin D1 ameliorates bleomycin-induced

pulmonary fibrosis in mice. *Physiol Rep.* 3(12). pii: e12628. 2015. 査読あり

〔学会発表〕(計 9 件)

- (1) Tsurumaki H, Mogi C, Saito-Aoki H, Sato K, Nakakura T, Yatomi M, Koga Y, Hachisu Y, Ono A, Dobashi K, Okajima F, Hisada T. Absence of proton-sensing TDAG8 protects against ovalbumin-induced allergic airway inflammation. European Respiratory Society (ERS) International Congress 2017, Milan, Italy, 2017年9月
- (2) Hisada T. Treatment of severe asthma, BT and Phenotype-targeted therapy. Chinese Association of Chest Physician (CACP) 2017, Annual Congress, Chendu, Sichuan, China, 2017年6月
- (3) Hisada T. Bronchial thermoplasty ~from the perspective of basic research. The 27th Congress of Interasma Japan/North Asia, Kumamoto, Japan, 2017年10月
- (4) 矢富正清、齋藤 悠、佐藤真季子、鶴巻寛朗、笠原礼光、蜂巢克昌、塚越優介、原 健一郎、小野昭浩、古賀康彦、解良恭一、砂長則明、前野敏孝、土橋邦生、久田剛志. 17(R)-Resolvin D1 の肺線維症モデルにおける線維化抑制作用の検討. 第58回日本呼吸器学会学術講演会 2018年4月
- (5) Yatomi M, Hisada T, Hachisu Y, Saito Y, Tsurumaki H, Kamide Y, Saito-Aoki H, Koga Y, Ono A, Dobashi K, Ishizuka T, Yamada M, Okajima F. 17(R)-resolvin D1 improves MMP-9/TIMP-1 imbalance leading to amelioration of pulmonary fibrosis in mice. European Respiratory Society (ERS) International Congress 2016, London, United Kingdom, 2016年

9月

- (6) Saito-Aoki H, Hisada T, Mogi C, Tsurumaki H, Yatomi M, Kamide Y, Ono A, Koga Y, Dobashi K, Ishizuka T, Okajima F, Yamada M. Absence of proton-sensing OGR1 protects against house dust mite-induced allergic airway inflammation. European Respiratory Society (ERS) International Congress 2016, London, United Kingdom, 2016年9月
- (7) Tsurumaki H, Hisada T, Mogi C, Saito-Aoki H, Yatomi M, Kamide Y, Tobo M, Sato K, Koga Y, Ono A, Dobashi K, Ishizuka T, Yamada M, Okajima F. Proton-sensing TDAG8 exhibits the protective role in lipopolysaccharide-induced acute lung injury. European Respiratory Society (ERS) International Congress 2016, London, United Kingdom, 2016年9月
- (8) Yatomi M, Hisada T, Koga Y, Ono A, Kamide Y, Saito-Aoki H, Tsurumaki H, Seki K, Sunaga N, Kaira K, Ishizuka T, Dobashi K, Yamada M, Okajima F. 17(R)-resolvin D1 ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice via decreasing MCP-1 mRNA. European Respiratory Society (ERS) International Congress 2015, Amsterdam, Netherlands, 2015年9月
- (9) Hisada T. resolvins and Allergic inflammation. The 25th Congress of Interasma Japan/North Asia, Yokohama, Japan. 2015年9月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

久田 剛志 (HISADA, Takeshi)
群馬大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 10344938

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

岡島 史和 (OKAJIMA, Fumikazu)
青森大学・薬学部・教授
研究者番号: 30142748

(4)研究協力者

矢富 正清 (YATOMI, Masakiyo)
群馬大学・医学部附属病院・助教
研究者番号: 60784105

齋藤 悠 (SAITO, Haruka)

群馬大学・医学部附属病院・医員
研究者番号: 80447268