

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19434

研究課題名(和文) ミクロダイセクションによる間質性肺炎の早期線維化巣からの病態関連因子の抽出と応用

研究課題名(英文) Analysis of predisposing factors on early fibrotic focus in interstitial pneumonia using microdissection

研究代表者

漆山 博和 (URUSHIYAMA, HIROKAZU)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：20725303

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：特発性肺線維症は活動性の高い早期線維化巣を多数形成し、細胞外基質の沈着から呼吸不全を呈し予後不良である。細胞外基質は細胞の支持機能のみならず、細胞表面の基質受容体を介し細胞の機能調節に重要な役割を果たしている。本研究は特発性肺線維症の早期線維化巣では、線維芽細胞はIV型コラーゲンを産生しており、線維芽細胞の遊走や新生血管の形成を抑制していることを示した。特発性肺線維症の早期線維化巣は血管形成が乏しく、形態的特徴に合致しており、線維芽細胞遊走を阻害して早期線維化巣を維持する一つの要因がIV型コラーゲン沈着と推察され、特発性肺線維症の予後予測因子や新規治療標的として研究が進むことが期待される。

研究成果の概要(英文)：Idiopathic pulmonary fibrosis is a poor prognosis lung fibrosis with a lot of active fibrotic lesions (i.e., fibroblastic foci). Fibroblasts in fibroblastic foci produced a large amount of extracellular matrix and led the destruction of lung architecture. Extracellular matrix acted as not only supporting material of tissues, but also regulatory factor of cellular function through receptors for extracellular matrix. This study showed that fibroblasts secreted type IV collagen in fibroblastic foci of idiopathic pulmonary fibrosis. Type IV collagen decreased the migration of lung fibroblasts and angiogenesis. These functions of type IV collagen were consistent with morphological characteristics of fibroblastic lesions such as poor vascularization and with the persistence of progressive fibrosis of idiopathic pulmonary fibrosis. Type IV collagen may be a prognosis prediction of idiopathic pulmonary fibrosis and a new therapeutic target of lung fibrosis.

研究分野：間質性肺炎

キーワード：間質性肺炎 細胞外基質 線維芽細胞 IV型コラーゲン ミクロダイセクション 免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

特発性間質性肺炎は機序不明の肺障害によりおこる肺の線維性疾患で通常型間質性肺炎(IPF/UIP)、非特異の間質性肺炎(NSIP)、特発性器質性肺炎(COP)などが臨床病理学的分類されている。細胞外基質産生の中心的病巣であり線維芽細胞・筋線維芽細胞の集簇巣である早期線維化巣は病理学的にも特に重要な特徴であり、慢性で予後の悪いIPF/UIPでは早期線維化巣の数が多く、病勢が強く予後が不良であることが報告されている(Am J Respir Crit Care Med 164:1025-32;2001, Am J Respir Crit Care Med 166:173-7;2002)。

我々もIPF/UIPや急速に発症し進行するびまん性肺泡傷害の早期線維化巣では、線維芽細胞がより筋線維芽細胞化し細胞外基質の産生が亢進していること(Am J Pathol 118:452-75;1985, Am J Pathol 137:415-424;1990)早期線維化巣のMMPsとその阻害因子(TIMPs)のインバランスがみられ、IPF/UIPではTIMPs優位で新生血管はみられず、治療反応性の良いNSIP、COPの早期線維化巣ではMMPs優位であり、血管形成が見られることなどを報告してきた(Lab Invest 78:687-9;1998, Hum Pathol 40:1618-27; 2009, Pathol Int 63:237-44;2013)。

一方近年では、細胞外基質は細胞を支持する機能のみでなく、細胞表面にある細胞外基質受容体を介し様々な細胞の機能調節に重要な役割を果たす事が判明している。コラーゲンにおいては、その分解産物のC末端側フラグメントにおいて血管内皮細胞の遊送を抑制し、血管新生抑制作用を有するポリペプチドが多数発見されている。悪性腫瘍領域では治療的な血管新生抑制剤としての臨床応用が進んでおり、主にはXVIII型コラーゲンC末端側フラグメントであるendostatin(Cell 88: 277-285;1997)やIV型コラーゲン $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 鎖のC末端側フラグメントであるarresten(Cancer Res 60:2520-6;2000)、canstatin(J Biol Chem 275:1209-15; 2000)がある。

以上のことより、間質性肺炎の線維化の中心的病巣である早期線維化巣にて、線維芽細胞が産生する細胞外基質は肺構造を改変することのみならず、細胞外基質受容体を介して細胞機能を調節し、各種間質性肺炎の病態の違いに関与していると考えられるが、これまで十分な解析が行われていない。

2. 研究の目的

近年はパラフィン切片標本からでも質量分析器(LC/MS)を用いた病変局所でのタンパクの抽出解析が可能となった。本研究で

は特発性間質性肺炎病変サンプルを用い、マイクロダイセクション法にて早期線維化巣だけを分離・抽出し、沈着している細胞外基質を質量分析の手法を用いて解析し、間質性肺炎の種類ごとに沈着している細胞外基質の違いの解析を通じてその機能を解析し、新たな治療標的や疾患管理バイオマーカーの確立を目指す。

3. 研究の方法

免疫組織化学・マイクロダイセクション法を用いた線維芽細胞巣に沈着する細胞外基質の解析：
特発性間質性肺炎の組織型の中で、予後不良なIPF/UIPと予後良好なCOPのヒト肺組織の早期線維化巣をマイクロダイセクション法にて分離抽出し、質量分析法を用いて沈着する細胞外基質を解析する。沈着が認められた細胞外基質は免疫組織化学を用いて、早期線維化巣における形態などを評価する。

RNA干渉法を用いた沈着細胞外基質の産生抑制による線維芽細胞への影響についての解析：

早期線維化巣は線維芽細胞と筋線維芽細胞が集簇し、それらが産生する細胞外基質が沈着して構成されていることから、沈着している細胞外基質の線維芽細胞からの産生をRNA干渉にて抑制し、線維芽細胞に与える影響について精査する。

リコンビナントタンパクを用いた線維芽細胞へ与える影響についての解析：

早期線維化巣に沈着している細胞外基質を発現するプラスミドを作成し、大腸菌へトランスフェクションして、沈着細胞外基質のリコンビナントタンパクを作成する。リコンビナントタンパクと線維芽細胞を共培養して、与える影響について検証する。

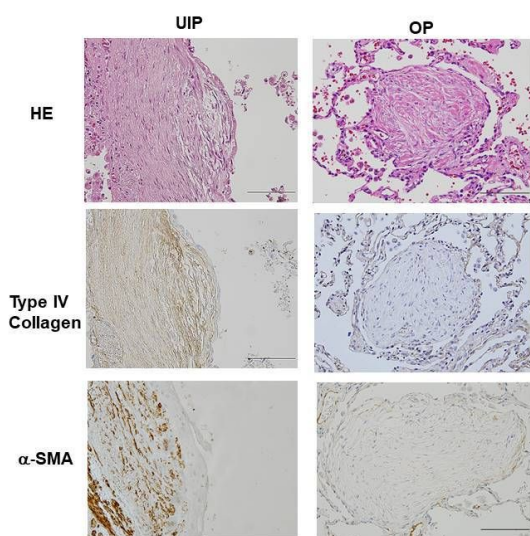
4. 研究成果

マイクロダイセクション法・免疫組織化学を用いた線維芽細胞巣に沈着する細胞外基質の解析：

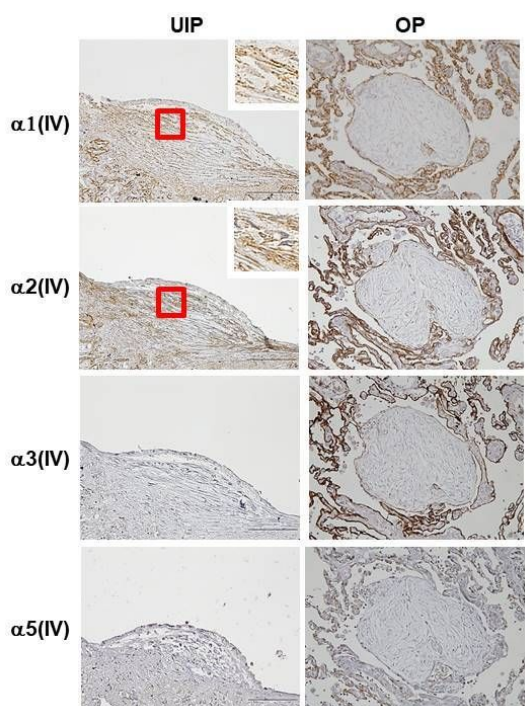
免疫組織化学を用いてヒト特発性間質性肺炎の線維芽細胞巣に沈着する細胞外基質を解析したところ、基底膜の主要構成成分の一つであるIV型コラーゲンが、予後不良である筋線維芽細胞(線維芽細胞の活性型とされる)を多く含んだ、IPF/UIPの早期線維化巣に強く沈着しており、予後良好であるCOP/OIPの早期線維化巣では筋線維芽細胞が乏しく、IVコラーゲンもほとんど沈着を認めないことを見出した(図1)。

IV型コラーゲンは、シート形成型コラーゲンに分類され、他のコラーゲンと同様にポリ

ペプチド鎖3本から3重らせん構造を形成しており、 $\alpha 1$ - $\alpha 6$ の6種類のポリペプチド鎖が存在する。6種類のポリペプチド鎖に対するラットモノクローナル抗体を用いて、早期線維化巣に対して免疫組織化学を実施したところ、IPF/UIPの早期線維化巣に沈着しているIV型コラーゲンは $\alpha 1$ 鎖および $\alpha 2$ 鎖から構成されていることを見出した。また沈着しているIV型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖は形態的に基底膜様の構造を呈さず、小線維様の形態であった(図2)。



(図1: UIPの早期線維化巣は α -平滑筋アクチン(α -SMA)陽性の筋線維芽細胞が多く認められ、IV型コラーゲンが沈着している。OPの早期線維化巣は筋線維芽細胞が乏しく、IV型コラーゲンの沈着も認めない。)



(図2: UIPの早期線維化巣に沈着しているIV型コラーゲンは、ポリペプチド $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖

から構成されていた。沈着しているIV型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖は形態的に基底膜様の構造を呈さず、小線維様の形態を示していた(右拡大図)。

免疫染色の結果、UIPの早期線維化巣に沈着しているIV型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖は基底膜構造を呈しておらず、C末端側フラグメントが露出しており、細胞表面に存在するインテグリンと結合し生理活性を示している可能性を推測した。

この仮説を検証するためレーザーマイクロダイセクションを用いてUIPの早期線維化巣のみを分離・抽出し、沈着している細胞外基質を質量分析法を用いて、精査したところIV型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖のC末端側フラグメントであるarrestenとcanstatinを検出することができた。UIPの早期線維化巣はOPの早期線維化巣と比較して、新生血管に乏しくUIPの治療反応性の低下の一因である可能性が推測されている。arrestenやcanstatinは血管新生を阻害する作用を有していることから、UIPの早期線維化巣の形態的な特徴と合致していると考えられた。

RNA干渉法を用いた沈着細胞外基質の産生抑制による線維芽細胞への影響についての解析:

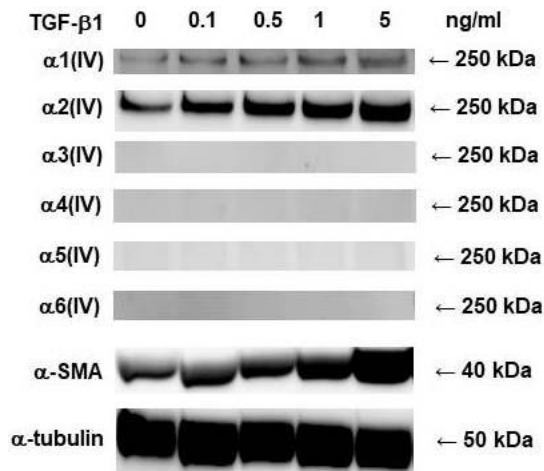
上記のヒト肺組織での結果を踏まえて、IV型コラーゲンは、線維芽細胞が細胞外基質産生能が高く活動性の高い、筋線維芽細胞化することによって産生されることが推察された。我々は代表的な線維化促進因子であるTGF- $\beta 1$ を添加しヒト肺線維芽細胞を培養すると筋線維芽細胞化するとともに、IV型コラーゲンを産生し、そのIV型コラーゲンは $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖であることを、生体外の実験にて確認した(図3)

さらにIV型コラーゲンの線維芽細胞に対する作用を検証するためRNA干渉法によりIV型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖の産生を抑制したところ、線維芽細胞の遊走能が増大することが確認できた(図4)。

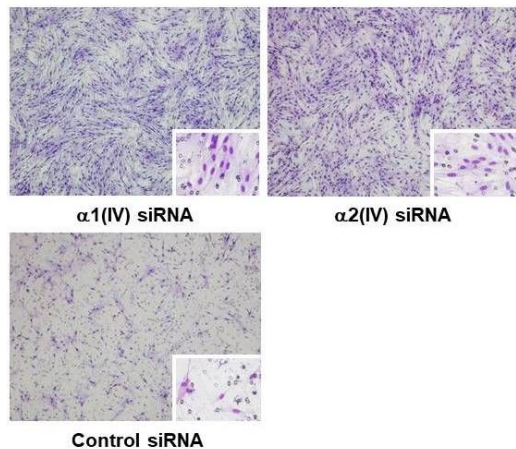
加えてRNA干渉によりIV型コラーゲンの産生が抑制された線維芽細胞はfocal adhesion kinase(FAK)のリン酸化が増強された。FAKリン酸化増強を介して線維芽細胞の遊走能が増大することが推察された。そして、このFAKのリン酸化の増強はRNA干渉を受けていない、IV型コラーゲンを産生していると考えられる、別の線維芽細胞より産生されたIV型コラーゲンを含む培養液を添加することによりFAKリン酸化が低下した。

以上より、予後不良なIPF/UIPの早期線維化巣を形成する線維芽細胞は、活動性の高い筋線維芽細胞に変化するとともにIV型コラーゲンを産生し、筋線維芽細胞の周囲に沈着した、基底膜を形成しない細線維状のIV型コラーゲン、特にその $\alpha 1$ 鎖と $\alpha 2$ 鎖の沈着は

筋線維芽細胞を線維化病変局所に留まらせ、早期線維化巣の形成を促進し、さらなる肺線維化を引き起こすことに寄与しているものと考えられた。以上の所見をまとめ、英文学術誌に投稿した(論文1)。



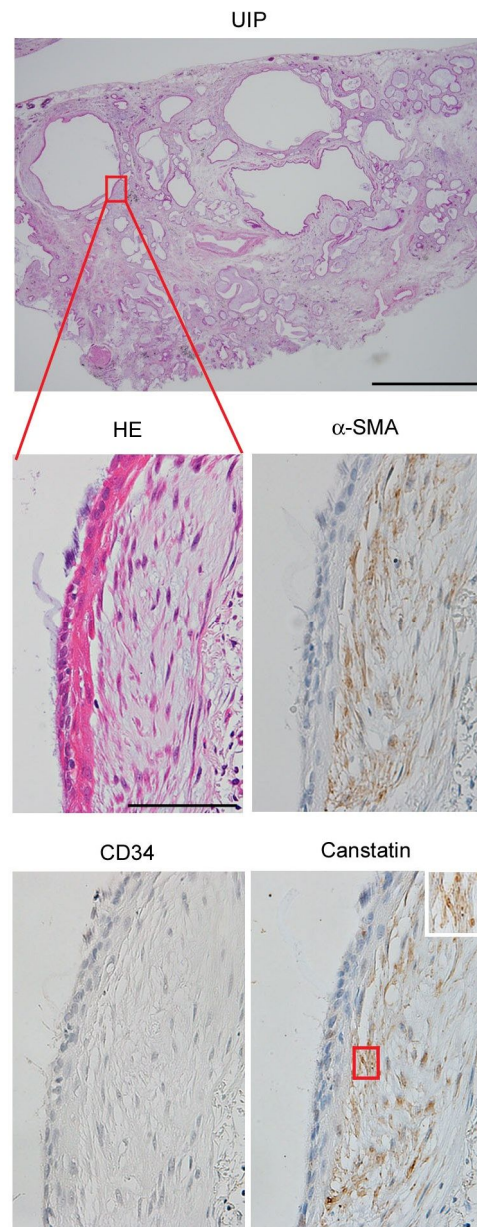
(図3:ヒト肺線維芽細胞はTGF-beta1刺激により、容量依存的にα-平滑筋アクチン(SMA)を発現し筋線維芽細胞化するとともに、IV型コラーゲンα1鎖とα2鎖を産生分泌した。)



(図4:ヒト肺線維芽細胞はRNA干渉(small interfering RNA(siRNA))にてIV型コラーゲンα1鎖[α1(IV)]とIV型コラーゲンα2鎖[α2(IV)]の発現を抑制すると、遊走能が増大することがポイデンチャンパー法にて確認された。各写真は遊走した線維芽細胞をDiff-Quik法にて染色した。)

リコンビナントタンパクを用いた線維芽細胞へ与える影響についての解析:
 レーザーマイクログライセクション法を用い分離・抽出されたIPF/UIPの早期線維化巣から質量分析法にてリコンビナントタンパクであるcanstatinを抽出できたことから、canstatinを認識する抗体を用いて、UIP/IPFのヒト肺組織の免疫染色を実施したところ、UIP/IPFの早期線維化巣にcanstatinの陽性所見を認めた。またIPF/UIPの早期線維化巣は血管新生に乏しく、内因性血管新生阻害ペ

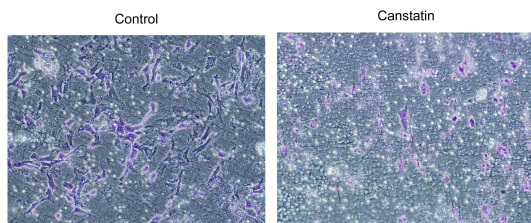
プチドであるcanstatinの生理作用とも合致すると考えられた(図5)



(図5:IPF/UIPの早期線維化巣はCD34免疫染色にて示される新生血管に乏しく、IV型コラーゲンα2鎖のC末端部分のポリペプチドであるcanstatinが細胞外基質に沈着している所見が認められる。)

さらにcanstatinの肺線維化に与える影響を精査するため、canstatin遺伝子を組み込んだ発現ベクターを作成し、タンパク発現用の大腸菌に遺伝子を導入することで、リコンビナントタンパクであるcanstatinを生成した。リコンビナントcanstatinを添加された肺線維芽細胞は、ポイデンチャンパー法を用いた細胞遊走能の評価にて、その遊走能が低下した(図6)。RNA干渉にてIV型コラーゲンα2鎖の発現を抑制された線維芽細胞がその遊走能を増加させることと反対の結果となり、IPF/UIPの早期線維化巣に沈着してい

る IV 型コラーゲン、特にポリペプチド $\alpha 2$ 鎖は C 末端側の作用部位である canstatin 領域を介して線維芽細胞の遊走を制御しており、線維芽細胞を肺線維化領域局所に留めることにより、肺の線維化を促進している可能性を見出した。上記の結果をまとめて英文学術誌に投稿した(論文 2)。



(図 6: canstatin を添加した線維芽細胞は遊走能が低下することをポイデンチャンパー法にて確認した。各写真は遊走した線維芽細胞を Diff-Quik 法にて染色した。)

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 2 件)

論文 1:

Urushiya H, Terasaki Y, Nagasaka S, Terasaki M, Kunugi S, Nagase T, Fukuda Y, Shimizu A.

Role of $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains of type IV collagen in early fibrotic lesions of idiopathic interstitial pneumonias and migration of lung fibroblasts.

Lab Invest. 2015;95(8):872-85.

doi: 10.1038/labinvest.2015.66.

論文 2:

Urushiya H, Terasaki Y, Nagasaka S, Kokuho N, Terasaki M, Kunugi S, Mikami Y, Noguchi S, Horie M, Nagahama K, Yamauchi Y, Shimizu A, Nagase T.

Role of canstatin in early fibrotic lesions of idiopathic interstitial pneumonias and migration of lung fibroblasts

Int J Clin Exp Pathol

2016;9(12):12714-12722.

ISSN:1936-2625

[学会発表](計 2 件)

漆山博和, 寺崎泰弘, 國保成暁, 寺崎美佳, 功刀しのぶ, 清水章

間質性肺炎の早期線維化巣における IV 型コラーゲンの沈着と線維芽細胞遊走についての解析

第 55 回日本呼吸器学会学術講演会

2015 年 4 月

漆山博和, 寺崎泰弘, 國保成暁, 功刀しのぶ,

山内康宏, 長瀬隆英

間質性肺炎の線維芽細胞巣における IV 型コラーゲン由来血管新生抑制因子(Canstatin)の産生と, その機能についての解析

第 56 回日本呼吸器学会学術講演会

2016 年 4 月

[図書](計 0 件)

[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]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

漆山 博和(U^RUSHIYAMA Hirokazu)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号: 20725303

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号:

(4)研究協力者

()