

令和元年6月18日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05203

研究課題名(和文) 臓器線維化をもたらす線維芽細胞活性化の転写ネットワーク制御

研究課題名(英文) Mechanisms of transcriptional regulation of fibroblast activation in pulmonary fibrosis

研究代表者

松島 綱治 (Matsushima, Kouji)

東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・教授

研究者番号：50222427

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：細胞間基質の主要な産生源である線維芽細胞は、肺線維化病態で中心的な役割を担っている。本研究では、肺線維症における線維芽細胞活性化を制御する転写制御ネットワークの実体とその肺線維症病態に対する意義解明を狙いとした。肺線維症マウスモデルを用いた、肺線維芽細胞の経時的トランスクリプトーム解析により、発現変動遺伝子群の中心に位置する17個の新規ハブ転写因子が見出され、脂質代謝のマスターレギュレーターであるSrebf1・LXR α が含まれていた。マウス線維症肺中の線維芽細胞におけるSrebf1の役割を解析すると、Srebf1・LXRは線維芽細胞の増殖・活性化・線維化病態を抑制することが見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、肺線維化病態における線維芽細胞の転写制御ネットワークの実体と、その中心となるハブ転写因子群が新たに同定された。肺線維芽細胞は脂肪滴を豊富に有していることが知られているが、本研究の成果はそれらの生理的意義を示唆したという点で学術的意義がある。また、LXRアゴニストの肺線維症治療効果が認められたことから、LXR-Srebf1経路は新たな肺線維症の治療標的になりうるという観点で、社会的意義を有すると言える。

研究成果の概要(英文)：Activated lung fibroblasts play important roles in the pathogenesis of pulmonary fibrosis by acting as major producers of extracellular matrix components. However, the regulatory mechanisms of fibroblast responses during PF progression remain elusive. To address these questions, we purified lung fibroblasts from fibrotic murine lungs at multiple time points, and performed global transcriptome analysis. We identified genes of which expression kinetics was associated with the pathological course of PF. Next, we identified 17 hub transcription factors, including Srebf1/LXR, as novel candidates that may contribute to lung fibroblast activation and PF pathology. We confirmed that modulation of Srebf1/LXR suppressed the activation state of lung fibroblasts and PF pathology. Collectively, our data provide novel insights into the transcriptional dynamics of fibroblasts during PF progression and suggests that lipid metabolism might contribute to lung fibroblast activation and PF pathology.

研究分野：炎症・免疫・がん

キーワード：肺線維症 転写因子 線維芽細胞 トランスクリプトーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

臓器線維化は、細胞外基質(ECM)の過剰沈着により、重篤な臓器障害に至る病態である。線維化は特発性肺線維症、肝硬変、糖尿病性腎不全など、数多くの慢性炎症性疾患で共通して見られ、有効な治療法に乏しく、多くが予後不良である (Wynn TA, Nat Med, 2012)。ゆえに、線維化の機序解明、新規治療法の創出は、医学的・社会的に極めて重大な課題である。

傷害に伴い活性化した組織(常在)線維芽細胞は、ECMの主要な産生源であることから、線維化病態における最終エフェクター細胞であると考えられている(Wynn TA, Nat Med, 2012)。上皮傷害などの組織傷害は、その周辺部の組織細胞由来の TGF-beta や PDGF、炎症細胞由来の IL-1 α や IL-13 などの成長因子やサイトカインの産生を誘導し、線維芽細胞の活性化を誘導する。代表的な線維芽細胞活性化として、1型コラーゲンを始めとする各種 ECM 関連分子や alpha-SMA の発現亢進が挙げられる。従来の線維症研究の多くにおいて、活性化線維芽細胞は『病的な』集団として画一的に捉えられてきた。一方で、線維芽細胞の活性化に伴う、傷害部位における足場形成は、組織の正常な修復に働くので (Forbes SJ et al, Nat Med 2014)、必ずしも全ての線維芽細胞活性化が線維化に繋がるわけではない。ゆえに、T細胞やマクロファージにおける TH1/TH2、M1/M2 パラダイムのような、活性化線維芽細胞間での機能的な heterogeneity の存在が想定される。しかしながら、様々な活性化線維芽細胞間での性質の違いとその分子制御機構は未だ不明である。

2. 研究の目的

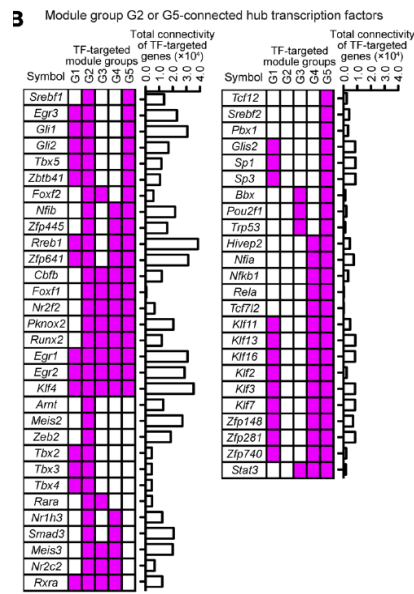
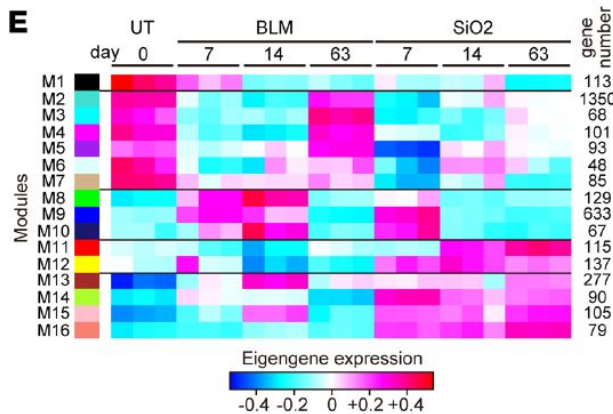
本研究では、肺線維症における線維芽細胞活性化を制御している転写制御ネットワークの実体、及びその肺線維症病態に対する意義を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

一過性に肺線維症が誘導されるプレオマイシン誘導肺線維症マウスモデル、慢性の肺線維症が誘導されるシリカ誘導肺線維症マウスモデルの両モデル、および主に線維芽細胞が特異的にラベルされる Col1a2-GFP トランスジェニックマウスを用い、急性期から寛解期または慢性期にいたるまで、経時的に Lineage-GFP+線維芽細胞をソーティング(day0, 7, 14, 63)し、トランスクリプトーム解析を実施した。本トランスクリプトームデータに対し、WGCNA による共発現ネットワーク解析・GeneXplain による転写因子ネットワーク解析を適用し、急性期・寛解期・慢性期特異的転写ネットワークの同定を試みた。さらにそれら in silico 解析にて同定されたハブ転写因子につき、その転写ネットワークに対する影響を、ハブ転写因子を強制発現させた線維芽細胞の経気道養子移入系・および薬剤による介入試験を用いて検証した。

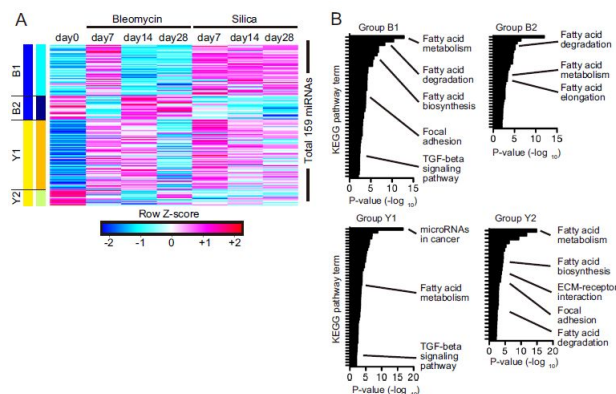
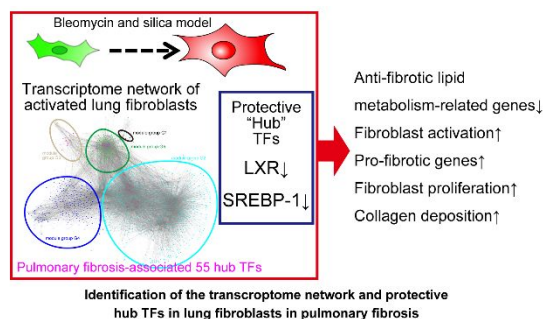
4. 研究成果

肺線維症マウスモデルを用いた、肺線維芽細胞の経時的トランスクリプトーム解析により、急性・慢性・寛解期特異的に変動する遺伝子クラスターが同定された(右図)その中心に位置する90個のハブ転写因子が見出され、そのうちの55個はプレオマイシン・シリカ両モデルに共通して線維症と相関する遺伝子モジュールと結びついていた(右図)。それら55個の転写因子の機能検索を行うと、脂質代謝に関連する転写因子(Srebf1, Lxra, Rxra など)が有意に濃縮されていた。肺胞領域の肺線維芽細胞は脂肪滴を豊富に有していることが知られているが、Srebf1 や、その上流に位置する Lxra の発現は線維芽細胞活性化とともに低下していた。肺線維芽細胞の経気道的養子移入法と、時期特異的 Srebf1 過剰発現系を組み合わせ、マウス生体の線維症肺中の線維芽細胞における Srebf1 の役割を解析した。その結果、in vivo において Srebf1 は線維芽細胞の増殖・活性化を抑制することが見出された。さらに、移入した線維芽細胞のトランスクリプトーム解析により、Srebf1 は線維化を増悪させる遺伝子群の発現変動を広範に抑制していることが明らかとなった。実際に、Srebf1 を全身で欠損したマウスにおいては線維芽細胞の活性化が増強され、線維化病態も増悪することが見出された。さらに、Srebf1 の上流の LXR に対するアゴニストを治療的に投与すると、線維芽細胞の



活性化および線維化病態が抑制されることも明らかとなった。これらの結果より、Srebf1は *in silico* で示唆されたのと同様に、線維化肺線維芽細胞の転写制御ネットワークにおいて防御的なハブ遺伝子として機能していることが示唆された (JCI Insight 2019)。

プレオマイシン及びシリカ肺線維症マウスモデルの線維芽細胞を経時的に取得し、転写ネットワークのさらなる解明のため、miRNome解析を実施した。WGCNAによる共発現ネットワーク解析により、両モデルに共通し、線維化病態と相関して発現変動するmiRNAが見出された。それらmiRNAのなかで、線維化の進展とともに発現が上昇するmiRNAの下流には、線維化で中心的な役割を果たしているTGF- β 関連の分子が濃縮されていることが *in silico* 解析で見出された。それら発現上昇していたmiRNA群のなかの一つmiR-19a-19b-20aサブクラスターがあり、その発現は、線維芽細胞の活性化に伴い増加していることも見出された。当該サブクラスターは、TGF- β 依存的な線維芽細胞の活性化 phenotype (Col1 プロモーター活性増強や収縮能増強) を抑制していることが *in vitro* で見出された。さらに、当該サブクラスターを過剰発現させた肺線維芽細胞の、プレオマイシン傷害肺への経気道的移入実験により、線維化促進的にはたらく遺伝子群の、線維芽細胞における発現変動をmiR-19a-19b-20aサブクラスターは抑制していることを見出した (Sci Rep 2018)。



5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 15 件)

1. Transcriptome network analysis identifies protective role of the LXR/SREBP-1c axis in murine pulmonary fibrosis. Shichino S, Ueha S, Hashimoto S, Otsuji M, Abe J, Tsukui T, Deshimaru S, Nakajima T, Kosugi-Kanaya M, Shand FH, Inagaki Y, Shimano H, Matsushima K. JCI Insight. 4(1), 2019. (査読あり)
2. Lung fibroblasts express a miR-19a-19b-20a sub-cluster to suppress TGF- β -associated fibroblast activation in murine pulmonary fibrosis. Souma K, Shichino S, Hashimoto S, Ueha S, Tsukui T, Nakajima T, Suzuki HI, Shand FHW, Inagaki Y, Nagase T, Matsushima K. Sci Rep. 8(1):16642, 2018. (査読あり)
3. Reduction of Proliferating Olfactory Cells and Low Expression of Extracellular Matrix Genes Are Hallmarks of the Aged Olfactory Mucosa. Ueha R, Shichino S, Ueha S, Kondo K, Kikuta S, Nishijima H, Matsushima K, Yamasoba T. Front Aging Neurosci. 10:86, 2018. (査読あり)
4. Single blood transfusion induces the production of donor-specific alloantibodies and regulatory T cells mainly in the spleen. Ueta H, Kitazawa Y, Sawanobori Y, Ueno T, Ueha S, Matsushima K, Matsuno K. Int Immunol. 30:53-57, 2018. (査読あり)
5. Increased diversity with reduced "diversity evenness" of tumor infiltrating T-cells for the successful cancer immunotherapy. Hosoi A, Takeda K, Nagaoka K, Iino T, Matsushita H, Ueha S, Aoki S, Matsushima K, Kubo M, Morikawa T, Kitaura K, Suzuki R, Kakimi K. Sci Rep. 8:1058, 2018. (査読あり)
6. The HIV co-receptor CCR5 regulates osteoclast function. Lee JW, Hoshino A, Inoue K, Saitou T, Uehara S, Kobayashi Y, Ueha S, Matsushima K, Yamaguchi A, Imai Y, Iimura T. Nat Commun. 8:2226, 2017. (査読あり)
7. Long-Lasting Graft-Derived Donor T Cells Contribute to the Pathogenesis of Chronic Graft-versus-Host Disease in Mice. Kosugi-Kanaya M, Ueha S, Abe J, Shichino S, Shand FHW, Morikawa T, Kurachi M, Shono Y, Sudo N, Yamashita A, Suenaga F, Yokoyama A,

Yong W, Imamura M, Teshima T, Matsushima K. Front Immunol. 8:1842, 2017 (査読あり)

8. Comprehensive single-cell transcriptome analysis reveals heterogeneity in endometrioid adenocarcinoma tissues. Hashimoto S, Tabuchi Y, Yurino H, Hirohashi Y, Deshimaru S, Asano T, Mariya T, Oshima K, Takamura Y, Ukita Y, Ametani A, Kondo N, Monma N, Takeda T, Misu S, Okayama T, Ikeo K, Saito T, Kaneko S, Suzuki Y, Hattori M, Matsushima K. Sci Rep. 7:14225, 2017 (査読あり)

9. Combination of anti-CD4 antibody treatment and donor lymphocyte infusion ameliorates graft-versus-host disease while preserving graft-versus-tumor effects in murine allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Ueha S, Yokochi S, Ishiwata Y, Kosugi-Kanaya M, Shono Y, Shibayama S, Ito S, Matsushima K. 108:1967-1973, 2017. (査読あり)

10. Simian Immunodeficiency Virus Targeting of CXCR3(+) CD4(+) T Cells in Secondary Lymphoid Organs Is Associated with Robust CXCL10 Expression in Monocyte/Macrophage Subsets. Fujino M, Sato H, Okamura T, Uda A, Takeda S, Ahmed N, Shichino S, Shiino T, Saito Y, Watanabe S, Sugimoto C, Kuroda MJ, Ato M, Nagai Y, Izumo S, Matsushima K, Miyazawa M, Ansari AA, Villinger F, Mori K. J Virol 91, e00439-17 (2017). (査読あり)

11. Identification and Preparation of a Novel Chemokine Receptor-Binding Domain in the Cytoplasmic Regulator FROUNT. Sonoda A, Yoshinaga S, Yunoki K, Ezaki S, Yano K, Takeda M, Toda E, Terashima Y, Matsushima K, Terasawa H. Mol Biotechnol. 59(4-5):141-150, 2017. (査読あり)

12. Laryngeal mucus hypersecretion is exacerbated after smoking cessation and ameliorated by glucocorticoid administration. Ueha R, Ueha S, Kondo K, Nito T, Fujimaki Y, Nishijima H, Tsunoda K, Shand FH, Matsushima K, Yamasoba T. Toxicol Lett. 265:140-146, 2016 (査読あり)

13. Corrigendum to 'Phagocytic cells contribute to the antibody-mediated elimination of pulmonary-infected SARS coronavirus. Yasui F, Kohara M, Kitabatake M, Nishiwaki T, Fujii H, Tateno C, Yoneda M, Morita K, Matsushima K, Koyasu S, Kai C. Virology, 499:397-398, 2016. (査読あり)

14. Choroidal Neovascularization Is Inhibited in Splenic-Denervated or Splenectomized Mice with a Concomitant Decrease in Intraocular Macrophage. Tan X, Fujiu K, Manabe I, Nishida J, Yamagishi R, Terashima Y, Matsushima K, Kaburaki T, Nagai R, Yanagi Y. PLoS One, 11:e0160985, 2016. (査読あり)

15. Cigarette Smoke Delays Regeneration of the Olfactory Epithelium in Mice. Ueha R, Ueha S, Sakamoto T, Kanaya K, Suzukawa K, Nishijima H, Kikuta S, Kondo K, Matsushima K, Yamasoba T. Neurotox Res. 30:213-224, 2016. (査読あり)

〔学会発表〕(計 28 件)

1. 七野成之, 中島拓弥, 上羽悟史, 松島綱治. マウス肺線維症モデルへの移入ルートおよびドナーによる移入効率と治療効果の解析 第 18 回分子予防環境医学研究会大会 2019.
2. 七野成之, 橋本真一, 上羽悟史, 松島綱治. プレオマイシン誘導マウス肺線維症モデルにおける経時的 1 細胞トランスクリプトーム解析. 第 18 回分子予防環境医学研究会大会 2019.
3. 七野成之, 橋本真一, 上羽悟史, 松島綱治. Single-cell transcriptome によるマウス線維化肺のサイトカイン・ケモカイン発現プロファイルの解明 第 83 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会 2018.
4. Shigeyuki Shichino, Shin-ichi Hashimoto, Satoshi Ueha, Kouji Matsushima. Single-cell transcriptome identifies cytokine/chemokine expression signatures of lung cell subsets in murine pulmonary fibrosis. 第 47 回日本免疫学会学術集会 2018.
5. 中島拓弥, 七野成之, 上羽悟史, 松島綱治. マウス肺線維症モデルへの間葉系幹細胞の移入ルートおよびドナーによる移入効率と治療効果の解析 第 39 回日本炎症・再生医学会 2018.
6. Satoshi Ueha, Aoki Hiroyasu, Shigeyuki Shichino, Ogiwara Haru, Shinichi Hashimoto, Kazuhiro Kakimi, Kouji Matsushima. TCR sequencing reveals the generation and expansion of tumor-specific CD8+ T cell clones after anti-CD4 antibody treatment in tumor-bearing mice Keystone Symposia 2018.
7. Satoshi Ueha, Yasuhiro Aoki, Shigeyuki Shichino, Haru Ogiwara, Shinichi Hashimoto, Kazuhiro Kakimi, Satoru Ito, Kouji Matsushima. TCR sequencing reveals the generation and expansion of tumor-specific CD8+ T cell clones after anti-CD4 antibody treatment in tumor-bearing mice 第 21 回日本がん免疫学会総会 2017.

8. Satoshi Ueha, Yasuhiro Aoki, Shigeyuki Shichino, Haru Ogiwara, Shinichi Hashimoto, Kazuhiro Kakimi, Satoru Ito, Kouji Matsushima TCR sequencing reveals the generation and expansion of tumor-specific CD8+ T cell clones after anti-CD4 antibody treatment in tumor-bearing mice 第76回日本癌学会学術総会 2017.
9. 上羽 悟史、石渡 義郎、横地祥司、伊藤哲、松島綱治 抗CD4抗体とDLIを併用した同種造血幹細胞移植による低免疫原性固形がん治療の可能性 第26回日本癌病態治療研究会 2017.
10. 青木 寛泰、七野 成之、橋本 真一、上羽 悟史、松島 綱治 担がんマウスにおけるCD8+ T細胞レパトアの臓器別解析 第3回日本骨免疫学会 2017.
11. Shigeyuki Shichino, Satoshi Ueha, Naoto Sudo, Mizuha Kosugi-Kanaya, Francis HW Shand, Teppei Morikawa, Shin-ichi Hashimoto, Takanori Teshima, Kouji Matsushima. Transcriptome analysis reveals PDGF signaling-dependent regulation of myelofibrosis in murine chronic graft-versus-host diseases, 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society 2017.
12. Shigeyuki SHICHINO, Satoshi UEHA, Shin-ichi HASHIMOTO, Inagaki YUTAKA, Kouji MATSUSHIMA An organ-wide transcriptome of stromal cells identifies the core signature of steady-state murine fibroblasts, 4th Lymphoid tissue meeting, 2017.
13. 七野 成之、津久井 達也、橋本 真一、大辻 幹哉、上羽 悟史、稲垣 豊、島野 仁、松島 綱治 細胞と分子の動きから観る臓器線維化 「炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出」研究開発領域公開シンポジウム 2018.
14. 松島 綱治 炎症の遷延化・不可逆に伴う臓器線維症の細胞基盤 第17回分子予防環境医学研究会大会 2018.
15. 七野 成之、青木 寛泰、橋本 真一、荻原 春、上羽 悟史、松島 綱治 担がんマウスにおけるCD8+ T細胞レパトアの臓器別解析 第17回分子予防環境医学研究会大会 2018.
16. 七野 成之、上羽 悟史、橋本 真一、松島 綱治 肺線維症における活性化線維芽細胞の起源とその活性化制御機構 第38回日本炎症・再生医学会 2017.
17. 七野 成之、上羽 悟史、須藤 直人、小杉 瑞葉、松島 綱治 慢性GVHDにおける骨髄線維化の分子メカニズムの検討 第3回日本骨免疫学会 2017.
18. Satoshi Ueha, Haru Ogiwara, Shoji Yokochi, Yoshiro Ishiwata, Francis Shand, Shohei Hori, Kazuhiro Kakimi, Satoru Ito, Kouji Matsushima. An anti-CD4 depleting antibody reverses regulatory T cell-induced suppression of dendritic cells while preventing nonspecific CD4+ T cell responses in tumor-bearing mice. 36th Sapporo International Cancer Symposium 2017.
19. Satoshi Ueha, Haru Ogiwara, Shoji Yokochi, Yoshiro Ishiwata, Francis Shand, Shohei Hori, Kazuhiro Kakimi, Satoru Ito, Kouji Matsushima. An anti-CD4 depleting antibody reverses regulatory T cell-induced suppression of dendritic cells while preventing nonspecific CD4+ T cell responses in tumor-bearing mice. AACR Annual Meeting 2017.
20. Satoshi Ueha, Haru Ogiwara, Shigeyuki Shichino, Jun Abe, Francis Shand, Shinichi Hashimoto, Kouji Matsushima. Identification of a functional and transcriptional signature for tumor-infiltrating dendritic cells in mouse. 5th Annual Meeting of the International Cytokine and Interferon Society 2017.
21. Satoshi Ueha, Aoki Hiroyasu, Shigeyuki Shichino, Ogiwara Haru, Shinichi Hashimoto, Kazuhiro Kakimi, Kouji Matsushima, TCR sequencing reveals the generation and expansion of tumor-specific CD8+T cell clones after anti-CD4 antibody treatment in tumor-bearing mice. The 46th Japanese Society for Immunology 2017.
22. Shigeyuki Shichino, Satoshi Ueha, Inagaki Yutaka, Shin-ichi Hashimoto, Hitoshi Shimano, and Kouji Matsushima Transcriptome network analysis reveals lipid-related transcription factors as hubs for fibroblast activation in murine pulmonary fibrosis. The 19th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience : Chronic Inflammation - initiation, Progression and Resolution 2017
23. Kouji Matsushima Cellular and molecular mechanisms of chronic inflammation-associated organ fibrosis The 19th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience : Chronic Inflammation - initiation, Progression and Resolution 2017
24. 上羽悟史、津久井達哉、七野成之、松島綱治 肺線維症における細胞動態 第40回日本リンパ学会総会 2016.
25. Shigeyuki Shichino, Francis HW Shand, Satoshi Ueha, and Kouji Matsushima Intravascular staining identifies tissue compartment of myeloid cell subsets in fibrotic and cancer-bearing murine lungs. 第24回マクロファージ分子細胞生物学国際シンポジウム 2016.
26. 七野成之、上羽悟史、橋本真一、松島綱治 多臓器間網羅的トランスクリプトーム解析による線維芽細胞 core transcriptomic signature の同定 第2回日本骨免疫学会 2016
27. Satoshi Ueha, Shigeyuki Shichino, Kouji Matsushima Macrophage regulation of inflammation and tissue remodeling in pulmonary fibrosis. 第89回生化学学会大会 2016.

28. Shigeyuki SHICHINO, Satoshi UEHA, Shin-ichi HASHIMOTO, Inagaki YUTAKA and Kouji MATSUSHIMA An organ-wide transcriptome of collagen-producing cells identifies the core signature of steady-state murine fibroblasts. 第 45 回日本免疫学会学術集会 2016.

〔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〕

ホームページ等

<https://k-matsushimalab.org/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 橋本 真一

ローマ字氏名: Hashimoto Shinichi

所属研究機関名: 金沢大学

部局名: 医薬保健学総合研究科

職名: 特任教授

研究者番号(8桁): 00313099

研究分担者氏名: 上羽 悟史

ローマ字氏名: Ueha Satoshi

所属研究機関名: 東京理科大学

部局名: 生命医科学研究所

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 00447385

研究分担者氏名: 島岡 猛士

ローマ字氏名: Shimaoka Takeshi

所属研究機関名: 東京理科大学

部局名: 生命医科学研究所

職名: 助教

研究者番号(8桁): 90422279

研究分担者氏名: 七野 成之

ローマ字氏名: Shichino Shigeyuki

所属研究機関名: 東京理科大学

部局名: 生命医科学研究所

職名: 助教

研究者番号(8桁): 70822435

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 中島 拓弥

ローマ字氏名: Nakajima Takuya

研究協力者氏名: 青木 寛泰

ローマ字氏名: Aoki Hiroyasu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。