

令和元年6月19日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09900

研究課題名(和文) 肺線維症の病因におけるAIF-1の役割の解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Role of AIF-1 in pathogenesis of pulmonary fibrosis and development of its treatment

研究代表者

川人 豊 (KAWAHITO, YUTAKA)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：50336731

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ブレオマイシン肺障害マウスモデルの急性期において、肺胞洗浄液中にAIF-1が発現し、AIF-1で刺激したマクロファージや肺線維芽細胞からTNF- $\alpha$ 、IL-6を分泌して炎症、組織破壊を、肺線維芽細胞からはKC (CXCL1)を分泌して、ケモタキシスを誘導した。慢性期では、マクロファージにAIF-1が発現して線維化に關与する増殖因子TGF- $\beta$ を分泌し、肺線維芽細胞の増殖・遊走能を有していた。また、AIF-1遺伝子をノックダウンさせたマクロファージ系の樹状細胞は、非特異的抗原刺激によるT細胞の増殖を抑制した。これらより、AIF-1が、肺線維症の急性期・慢性期の病態機序に關与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺線維化の免疫反応を含めたメカニズムは未だ不明であり、リウマチ性疾患合併症として間質性肺炎から生じる肺線維症有効な治療法がなく難治性であり、生命予後を悪化させる。近年、AIF-1は、ヒトの全身性硬化症の間質性肺病変や線維化皮膚病変での発現がみられているが、線維化に關わる機序は明らかにされていなかった。本研究では、AIF-1が、マクロファージや肺線維芽細胞からサイトカインやケモカインを誘導し、線維化に關与する増殖因子であるTGF- $\beta$ を分泌することにより、肺の線維化の病因に深く關与する事が明らかになり、肺線維化治療の新たなターゲット分子になる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：AIF-1 is expressed in BALF in acute phase of bleomycin induced lung injury mouse model. TNF- $\alpha$  and IL-6 secreted from AIF stimulated macrophages and lung fibroblasts caused inflammation and tissue destruction. KC (CXCL1) is secreted from AIF stimulated lung fibroblasts inducing chemotaxis. In the chronic phase, AIF-1 is expressed in macrophages, secreting TGF- $\beta$ , which is a growth factor involved in fibrosis. AIF-1 has the ability to proliferate and migrate lung fibroblasts. In addition, macrophage dendritic cells knockdown the AIF-1 gene were co-cultured with T cells, it was revealed that T cell proliferation due to nonspecific antigen stimulation was suppressed. Thus, it is suggested that AIF-1 is involved in the pathogenesis of acute and chronic stages of pulmonary fibrosis.

研究分野：膠原病・リウマチ性疾患

キーワード：AIF-1 肺線維症 ブレオマイシン

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

## 1. 研究開始当初の背景

Allograft-inflammatory factor-1(AIF-1)はラットの心移植に伴う慢性拒絶反応において移植片局所に浸潤するマクロファージから検出された分子で、17kDa の 143 のアミノ酸から構成される。interferon- $\gamma$  で誘導され、分子内に EF-hand like motif をもつ Ca binding protein であるため、cell cycle を含めた細胞増殖活性にも関与すると考えられている。近年、強皮症の皮膚や肺組織(Del Galdo F, et al Arthritis & Rheumatism 2006)などでの発現報告もあり、AIF-1 の rs2269475 TT genotype が強皮症の患者に高率に認められている (Otieno FG、Tissue Antigens 2007) AIF-1 はこれら病態に関係する免疫反応や線維化に重要な役割を果たしていると考えられているが、その病因機序は明らかにされていない。膠原病疾患では、その生命予後に関係する病態として臨床上大きな問題となる難治性の間質性肺炎に有効な薬剤の開発は困難を極めており、肺の線維化の機序を解明することは、臨床上最も重大な課題となっている。

## 2. 研究の目的

申請者らは、これまで AIF-1 についての研究と行い、以下の知見を得ている。

関節リウマチでの AIF-1 が関節滑膜の単核球や線維芽細胞に高発現し、培養滑膜細胞増殖能を有し、関節液中に AIF-1 が存在し IL-6 の濃度と相関する (J Immunol. 2007) の浸潤炎症細胞、線維芽細胞に IL-6 と AIF-1 の発現が亢進し、AIF-1 刺激した末梢血単核球(PBMCs)の上清がヒト培養線維芽細胞の遊走、増殖能を有していた。(Immunol Lett. 2011) 慢性 GVHD マウスモデルの硬化した皮膚の浸潤炎症細胞、線維芽細胞に IL-6 と AIF-1 の発現が亢進し、AIF-1 刺激した末梢血単核球(PBMCs)の上清がヒト培養線維芽細胞の遊走、増殖能を有していた。(Immunol Lett. 2011) AIF-1 で刺激した CD14 陽性 PBMCs では、CCL1, CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1a, CCL7/ MCP-3, CCL20/MIP-3a 及び IL-6 の mRNA が up-regulate される。また、AIF-1 刺激した CD14(+) PBMCs の上清は、PBMCs での CCL3/MIP-1 と IL-6 の産生を亢進する。(BBRC 2014) これらの結果は、AIF-1 が炎症病態のみならず、線維芽細胞での発現とその遊走能などの線維化の機序に関与が推定される。しかしながら、いまだに真の線維化の詳細な機序を説明できていない。皮膚の硬化のみならず、肺の線維化病態での AIF-1 の関与に焦点を移し、プレオマイシン誘導肺線維症マウスモデルを用い、そのメカニズムを本研究で明らかにしていく。AIF-1 の肺の線維化への関与が明らかになれば、この分子をターゲットとした新たな肺線維化の治療薬の開発につながる。

## 3. 研究の方法

### (1) リコンビナント AIF-1/抗 AIF-1 抗体の作成

リコンビナント AIF-1 は、ヒト AIF 遺伝子を末梢血リンパ球の cDNA より PCR 法にて増幅させ、得られた DNA fragment を、GST purification system と抗 AIF-1113-129 抗体をアフィニティークロマトグラフィーにより、融合タンパク質を精製した。モノクローナル抗体は、上記蛋白をウサギに免疫し血清を精製後、マウスの脾臓細胞とマウスミエロマ細胞を共存培養で細胞融合し、ハイブリドーマを作成して精製する。

### (2) プレオマイシン誘導肺線維症マウスモデルにおける AIF-1 の発現検討

8~10 週齢のオス C57/BL6 マウスに、プレオマイシン 2.15U/kg を 30ul、0.9 mm の feeding needle を用いて経気道散布し、プレオマイシン誘導性のマウス肺線維症モデルを作成する。肺胞洗浄液、肺組織の検体は、凍結切片、パラフィン切片を作成し、H&E 染色、抗 AIF-1 抗体、抗 CD68 抗体、抗 TGF- $\beta$  抗体、抗 S100A4 抗体染色を行う。線維化のスコアは Ashcroft スコアを

用いて、0-4 段階でブラインド評価する。また、凍結保存した肺胞洗浄液、組織検体を Western Blotting や ELISA で、ケモカインや AIF-1 の発現を確認する。

(3) 肺線維芽細胞における AIF-1 の肺線維化メカニズムの解析

初代肺線維芽細胞の抽出は、8-10 週齢のオス C57/BL6 マウスの肺組織を摘出し細片に切り刻んだ組織を 10%FBS 含有 RPMI1640 入り培養液で培養する。3-5 継代までの培養細胞を用い、AIF-1、LPS、negative control として生理食塩水を添加し、細胞数を経時的に測定し増殖能を、また、上清中の各サイトカイン、ケモカイン濃度を、ELISA 法で測定する。肺線維芽細胞の増殖、遊走については、コンフルエントになった培地 200ul チップでスクラッチ後 0.2%FBS 含有 RPMI で培養し、偏光顕微鏡を用いて縮まった部分の面積の割合を見て評価する (Wound Healing Assay)。

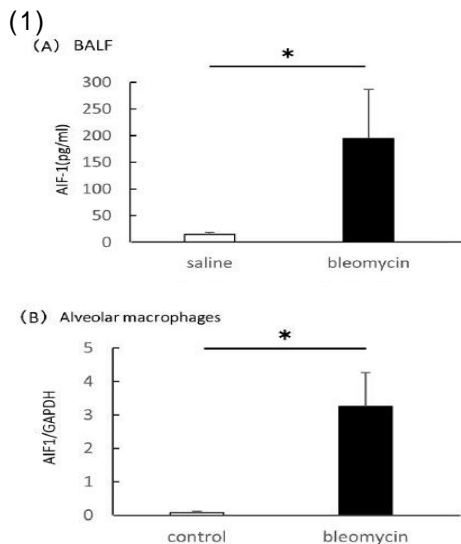
(4) マクロファージへの AIF-1 生物活性

AIF-1 によるマクロファージの RAW264.7 cell の TGF- $\beta$  産生能を経時的に測定する。

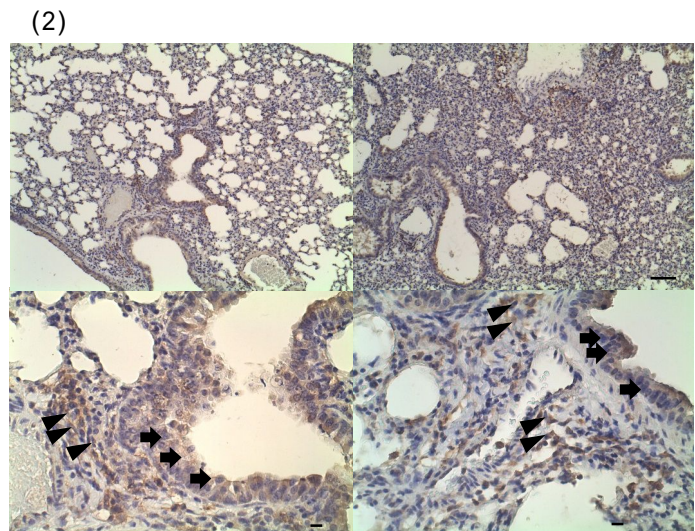
4 . 研究成果

プレオマイシンによる急性期肺障害期における AIF-1 の発現

- (1) プレオマイシンの気道散布投与 1 日目で、real time PCR により (A) 肺胞洗浄液 (BALF) と (B) 肺胞マクロファージに AIF-1 mRNA の発現が見られた。
- (2) プレオマイシンの気道散布投与 1 日目で肺組織のマクロファージに AIF-1 の存在を免疫染色法で確認した。



Each bar represents the mean  $\pm$  SE. \* $p < 0.05$

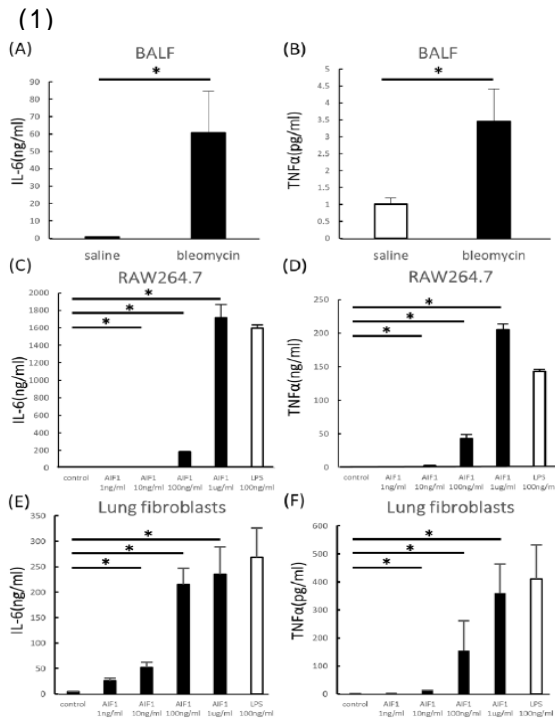


右 : AIF-1 左 : F4/80 (マクロファージ)

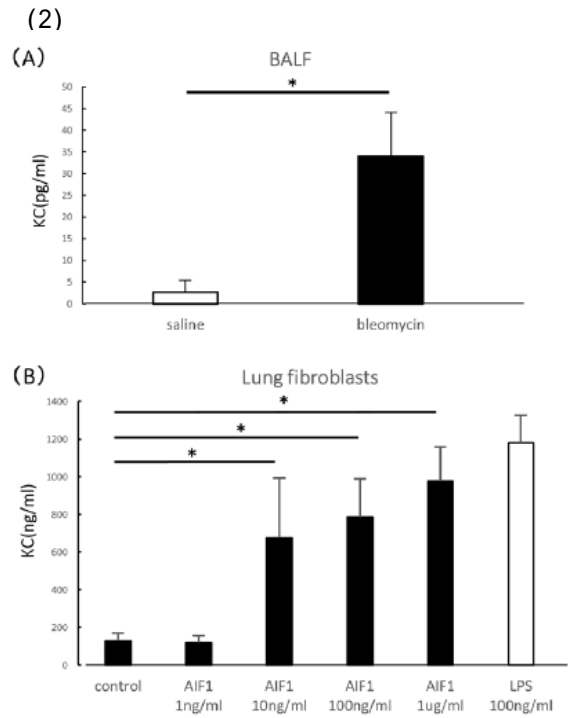
上弱 : 強拡 下段 : 弱拡

AIF-1 刺激でマクロファージや肺線維芽細胞がサイトカインやケモカインを誘導する

- (1) プレオマイシンの気道散布投与 1 日目の BALF (A,B)、AIF-1 で刺激後の RAW264.7 cells (C,D)、AIF-1 で刺激後正常肺組織由来の肺線維芽細胞 (E,F) でコントロールと比較し、TNF- $\alpha$ 、IL-6 の産生が増加している事が ELISA 法を用いて明らかにした (下左図)
- (2) プレオマイシンの気道散布投与 1 日目の BALF (A) に KC (CXCL1) が分泌され、AIF-1 刺激で用量依存的に正常肺組織由来の肺線維芽細胞 (B) から KC が有意に分泌される事が明らかになった (下右図)。



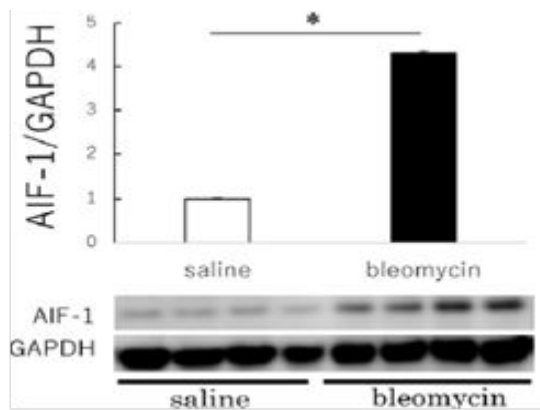
Each bar represents the mean ± SE. \**p* < 0.05.



Each bar represents the mean ± SE. \**p* < 0.05

これらの事より、プレオマイシン投与により急性期肺障害モデルで、マクロファージ、肺線維芽細胞に AIF-1 が発現し、AIF-1 刺激で TNF- $\alpha$ 、IL-6、KC が分泌誘導され、AIF-1 がプレオマイシンによる急性期肺障害に関与していることが示された。

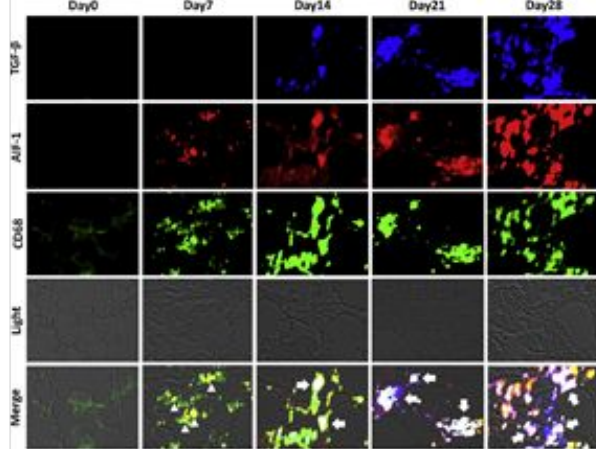
### プレオマイシンによる慢性期肺障害期における AIF-1 の発現



#### (1) プレオマイシン投与 28 日目の肺線維期の肺組織での AIF-1 の蛋白と mRNA の発現

肺組織から蛋白、mRNA を抽出して、real time PCR と Western blot 法を用いて、AIF-1 の存在を確認した。

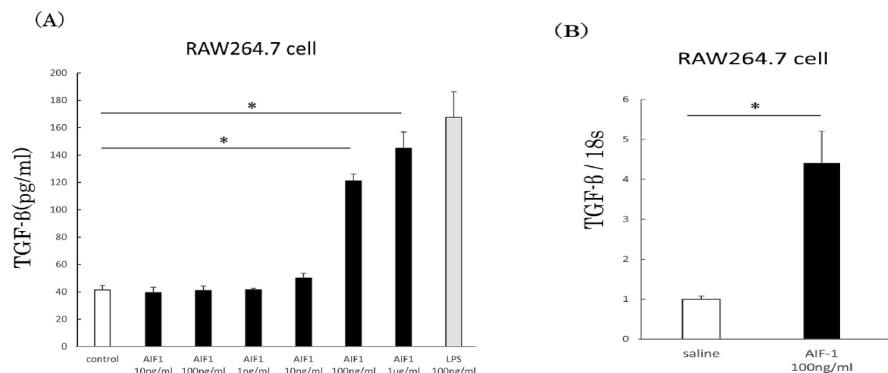
Each bar represents the mean ± SE. \**p* < 0.05



#### (2) プレオマイシン投与後の AIF-1、TGF- $\beta$ 、CD68 の発現

AIF-1 はマクロファージに DAY 7 より発現し、DAY 14 からは、線維化に関連する TGF- $\beta$  発現と同期した。

AIF-1 刺激でマクロファージに線維化に關与する増殖因子である TGF- $\beta$  を誘導するマクロファージの cell line である RAW264.7 細胞に AIF-1 を添加すると濃度依存的に TGF- $\beta$  蛋白(A)と mRNA(B)の産生が分泌された。



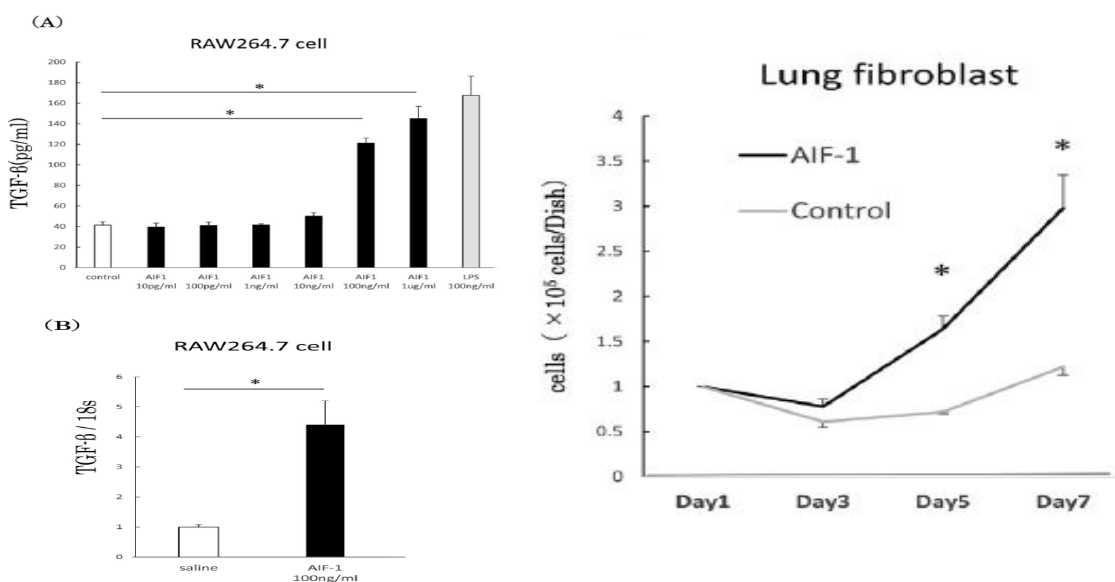
Each bar represents the mean  $\pm$  SE. \*p < 0.05

慢性期の肺線維芽細胞に AIF-1 が発現し、肺線維芽細胞に AIF-1 を添加すると濃度依存的その遊走増殖能が増強されることが示された。

(A) DAY28 日での肺線維芽細胞上での AIF-1 の発現

(B) 肺線維芽細胞の増殖・遊走能力

肺線維芽細胞に刺激で添加すると濃度依存的その増殖・遊走能力が増強される。Wound Healing Assay では、経時的に AIF-1 添加で、肺線維芽細胞の増殖・遊走能力の増強が示された。



以上より、プレオマイシン気道散布による肺障害急性期において BALF 中に AIF-1 が発現し、AIF-1 刺激しマクロファージや肺線維芽細胞から TNF- $\alpha$ 、IL-6 は分泌して炎症、組織破壊を、肺線維芽細胞からは KC (CXCL1) を分泌して、ケモタキシスを誘導する事が示唆された。慢性期においてもマクロファージに AIF-1 が発現し、線維化に關与する増殖因子である TGF- $\beta$  を分泌し、肺線維芽細胞の増殖・遊走能を有していた。また、AIF-1 遺伝子をノックダウンさせたマクロファージ系の樹状細胞を T 細胞と共培養した系では、非特異的抗原刺激による T 細胞の増殖を抑制する事が明らかになった (未発表データ)。これらの事から、AIF-1 が、肺線維症の急性期・慢性期の病態機序に關与していることが推察された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

1. Nagahara H, Seno T, Yamamoto A, Obayashi H, Inoue T, Kida T, Nakabayashi A, Kukida Y, Fujioka K, Fujii W, Murakami K, Kohno M, Kawahito Y. Role of allograft inflammatory factor-1 in bleomycin- induced lung fibrosis. Biochem Biophys Res Commun. 495(2):1901-1907,2018. 査読有り DOI:[10.1016/j.bbrc.2017.12.035](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.12.035)
2. Nagahara H, Yamamoto A, Seno T, Obayashi H, Kida T, Nakabayashi A, Kukida Y, Fujioka K, Fujii W, Murakami K, Kohno M, Kawahito Y. Allograft inflammatory factor-1 in the pathogenesis of bleomycin- induced acute lung injury. Biosci Trends 10(1):47-53, 2016. 査読有り DOI:[10.5582/bst.2016.01027](https://doi.org/10.5582/bst.2016.01027)

〔学会発表〕(計4件)

1. 永原秀剛, 金下峻也, 井上拓也, 木田 節, 中林 周, 荃田祐司, 藤岡数記, 和田 誠, 河野正孝, 川人 豊. プレオマイシン誘導肺線維症における AIF-1 の役割. 第62回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2018年4月28日; 東京.
2. 永原秀剛, 妹尾高宏, 井上拓也, 木田 節, 中林 周, 荃田祐司, 藤岡数記, 和田 誠, 河野正孝, 川人 豊. マウスプレオマイシン誘導肺線維症における AIF-1 の役割. 第61回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2017年4月22日; 福岡
3. 永原秀剛, 山本相浩, 妹尾高宏, 尾林 博, 木田 節, 中林 周, 荃田祐司, 藤岡数記, 藤井 涉, 村上 憲, 河野正孝, 川人 豊. プレオマイシン誘導急性肺障害モデルにおける AIF-1 の役割. 第37回日本炎症・再生医学会 . 2016年6月26日; 京都
4. 永原秀剛 (京都府立医科大学 大学院医学研究科免疫内科学), 山本相浩, 木田 節, 中林 周, 荃田祐司, 藤岡数記, 藤井 涉, 村上 憲, 妹尾高宏, 河野正孝, 川人 豊. プレオマイシン誘導肺線維症モデルにおける AIF-1 の役割. 第60回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2016年4月21日; 横浜.

〔図書〕該当なし

〔産業財産権〕該当なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：河野 正孝

ローマ字氏名：KOHNO MASATAKA

所属研究機関名：京都府立医科大学

部局名：医学研究科

職名：講師

研究者番号：60405256

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：永原 秀剛

ローマ字氏名：NAGAHARA HIDETAKE

研究協力者氏名：木田 節

ローマ字氏名：KIDA TAKASHI

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。