

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21197

研究課題名(和文) 線維細胞の遊走を標的とした新たな膠原病肺治療法の開発

研究課題名(英文) Novel strategy targeted for fibrocytes migration to treat connective tissue diseases related lung fibrosis

研究代表者

河野 弘 (KAWANO, Hiroshi)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：30771571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、線維細胞に発現する接着分子であるインテグリンCD49cの機能を明らかにし、インテグリンに着目し線維細胞の遊走能制御による新たな膠原病肺治療法の開発へ発展させることを目的とした。ヒト線維細胞におけるCD49cの発現を確認した後、マウス線維細胞におけるCD49cの発現様式についての検討を行ったが、フローサイトメトリーによる発現様式の解析が困難であった。マウス肺由来の線維細胞を生細胞として単離するために、新たな線維細胞同定法を見出した。今後は同細胞を単離し、CD49cの発現様式、機能を解析するとともに、線維細胞特異的な発現マーカーの同定、治療応用を目指した研究へと展開する予定である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to clarify the function of integrin CD49c, which is an adhesion molecule expressed on fibrocytes, and to develop new treatment for connective tissue diseases related lung fibrosis focused on controlling migration of fibrocytes. After confirming the expression of CD49c in human fibrocytes, the expression pattern of CD49c in mouse fibrocytes was examined, but it was difficult to analyze the expression pattern by flow cytometry. In order to isolate fibrocytes derived from mouse lungs as living cells, a new fibrocyte identification method was found. In the future, we will isolate these cells and analyze the expression pattern and function of CD49c, and further plan to identify fibrocyte-specific markers applied to novel treatment strategy.

研究分野：呼吸器膠原病内科

キーワード：線維細胞 インテグリン 膠原病肺 CD49c

1. 研究開始当初の背景

近年、肺線維症における新たなエフェクター細胞として報告された線維細胞は、骨髄由来の細胞でありながら、collagen I や vimentin などの細胞外基質を産生する。さまざまな臨床データから、肺線維症をはじめとする線維化疾患において重要な役割を持つ細胞である可能性が示されており、線維細胞の詳細な解析とともに、線維細胞をターゲットとした抗線維化薬の創薬は今後の重要な課題であるといえる。

2. 研究の目的

本研究では、線維細胞に発現する接着分子である CD49c の機能を明らかにし、インテグリンに着目した線維細胞の遊走能制御による新たな膠原病治療法の開発へ発展させることを目的とする。

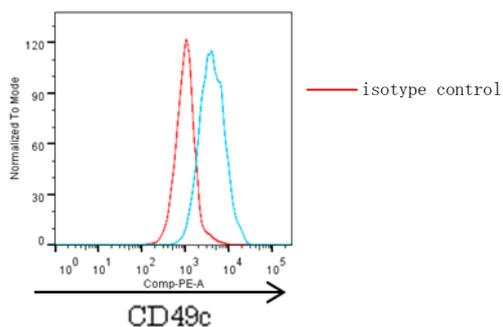
3. 研究の方法

ブレオマイシンを経気管的に投与し肺線維症を誘発したモデルマウス由来の線維細胞を同定、単離し、CD49c の発現様式を解析する。ヒト線維細胞においても同様の検討を行う。

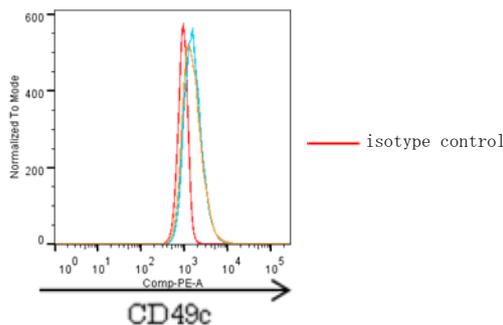
4. 研究成果

(1)ヒト線維細胞における CD49c の発現解析
ヒト末梢血由来の単核球細胞をフィブロネクチンでコーティングしたディッシュで培養し得られる接着細胞を線維細胞とみなし、同細胞における CD49c の発現をフローサイトメトリーにて解析した。コントロールのヒト単核球細胞株である THP-1 に比し、線維細胞では CD49c の発現が亢進していた。

(a) ヒト線維細胞



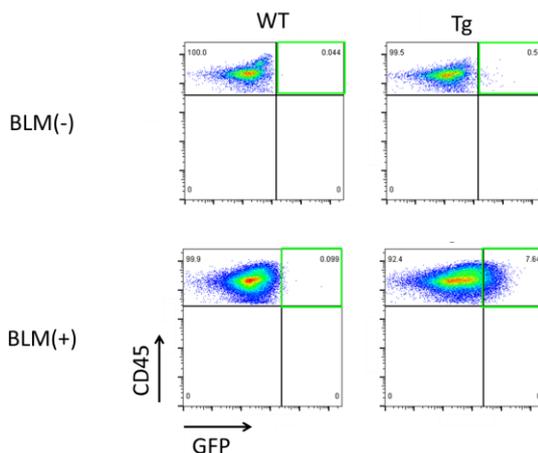
(b) THP-1 (ヒト単核球細胞株)



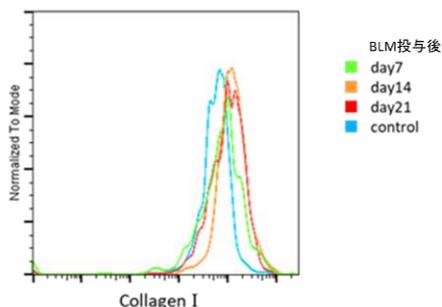
(2)マウス線維細胞における CD49c の発現解析

フローサイトメトリーでの解析により、ブレオマイシンで炎症を誘導したマウス肺組織由来の線維細胞と思われる CD45⁺CollagenI⁺細胞を同定したが、入手可能なマウス CD49c に対する抗体はポリクローナル抗体であり、フローサイトメトリーによる CD49c 発現様式の解析が困難であった。ウェスタンブロット法による検出のため、マウス肺由来の線維細胞を生細胞として単離する必要性が生じた。Col1a2-GFP レポーターマウスを用いることとし、同マウスにおける CD45⁺GFP⁺細胞が線維細胞と考えられたためその同定を試みた。しかしながら、自家蛍光として GFP シグナルを発する肺マクロファージとの厳密な区別が困難であった。

既報告を参考に検討を重ねた結果、特に肺マクロファージは自家蛍光として Phycoerythrin (PE) シグナルを発することを利用し、CD45⁺autofluorescent PE GFP⁺細胞を線維細胞として検出しうる可能性を見出した。



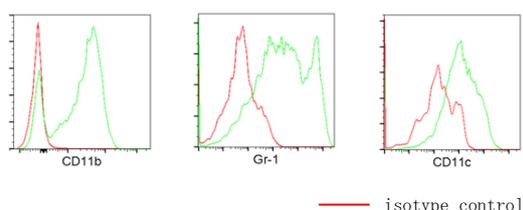
実際に同細胞は collagenI を発現していた。



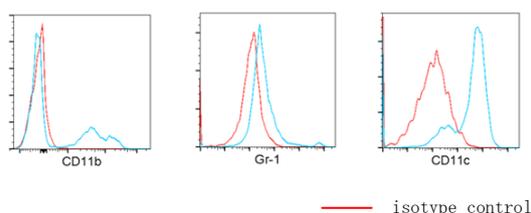
次に、既存の各種血球系細胞表面マーカーの発現様式に関して、CD45⁺autofluorescent PE⁻GFP⁺細胞と肺胞マクロファージの表現型を示す CD45⁺autofluorescent PE⁺細胞との間で比較した。

CD45⁺autofluorescent PE⁻GFP⁺細胞は CD11b⁺-Gr-1^{intermediate}CD11c^{intermediate} の発現パターンを示し、マクロファージと区別できる可能性が示された。

CD45⁺autofluorescent PE⁻GFP⁺細胞

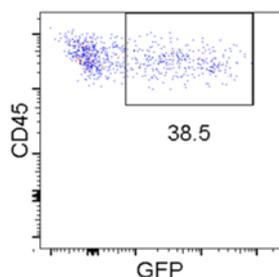


CD45⁺autofluorescent PE⁺細胞

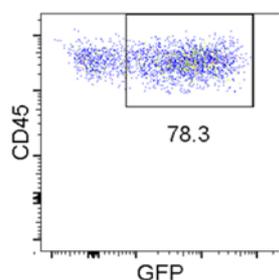


Gated on CD45⁺autofluorescent PE⁻CD11b⁺Gr-1^{intermediate}CD11c^{intermediate} cells

BLM(-)



BLM(+)



近年、慢性炎症とその結果生じる臓器線維症のメカニズム解明、治療法開発を目指した研究は世界中で盛んに行われている。臓器線維化における線維細胞の役割の詳細な解析とともに、線維細胞をターゲットとした抗線維化薬の創薬は今後の重要な課題であるといえる。

本研究は、線維細胞の機能抑制法として遊走能の制御に視点を向け、線維細胞の遊走に関わる因子として、インテグリンの機能解析に着目したものであり、特発性肺線維症のみならず慢性炎症の代表的疾患である膠原病肺も対象疾患とした研究である点に特徴がある。

特に、全身性強皮症は全身の諸臓器に線維化をきたす原因不明の難治性膠原病であり、肺のみならず多臓器に線維化をきたすため、末梢血中を循環する線維細胞の病態形成への関与が示唆されている。また、全身性強皮症の発症のトリガーは血管内皮傷害であると考えられていることから、慢性炎症初期段階におけるインテグリンを介した線維細胞と血管内皮細胞とのクロストーク、及び慢性炎症後期に臓器線維症へ進展するメカニズムを解析するのに適した疾患モデルである。本研究においては、マウス肺由来の線維細胞を同定、単離する方法を見出すのに時間を要し、当初の計画どおりに進まなかった。今後は同細胞を単離し、各種インテグリンの発現様式、及び機能を解析するとともに、線維細胞特異的な発現マーカーの同定を目指した研究へと展開する予定である。

本研究を継続することにより、クラリスロマイシンによる線維細胞の CD49c 発現抑制効果を示す結果が予想されるが、申請者らが所属する研究グループは、マクロライドはイマチニブの薬剤耐性をもたらす α_1 -Acid Glycoprotein の機能を阻害することにより、イマチニブの肺線維症モデルにおける抗線維化作用を促進することを報告している。本研究により、マクロライドの新たな抗線維化機序のひとつとして CD49c の発現制御が明らかとなる可能性がある。マクロライドは抗菌薬としてすでに安全性が確立されており、本研究の結果は IPF のみならず全身性強皮症をはじめとした膠原病肺に対する有望な治療法の開発に貢献するものと考えられる。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 弘 (KAWANO, Hiroshi)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：30771571