

令和 2 年 5 月 18 日現在

機関番号：82690

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09634

研究課題名(和文) 特発性肺線維症に対する肺胞マクロファージ特異的抗IGF-1抗体療法の試み

研究課題名(英文) Therapeutic effect of alveolar macrophage-specific anti-IGF-1 antibody for idiopathic pulmonary fibrosis

研究代表者

大田 健(Ohta, Ken)

独立行政法人国立病院機構東京病院(臨床研究部)・臨床研究部・名誉院長

研究者番号：30160500

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)：本研究の目的は、正常ヒト肺線維芽細胞(NHLF)に対する肺胞マクロファージ由来 IGF-1の作用を明らかにすることとした。まず、ヒト末梢血から純化した単球からマクロファージに分化させる方法、および単芽球様細胞株U937細胞をマクロファージに分化させる方法を確認した。それらの細胞による IGF-1の産生を確認した上で、NHLFと共培養する系、マクロファージ培養上清を添加しNHLFを培養する系を確立した。抗IGF-1抗体およびIGF-1レセプター阻害薬であるLinsitinibを加え、共培養あるいはマクロファージ培養上清を加えてNHLFを培養すると、培養上清中の炎症性サイトカイン値が有意に低下した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IPFの根本治療は肺移植しか存在しないことから、IPFは呼吸器診療において最も新規治療薬の開発が待たれている疾患の一つであると言える。本研究から、マクロファージ由来のIGF-1が肺線維芽細胞に直接作用し、サイトカイン産生を誘導することが判明したが、IGF-1は肺以外にも生体維持機構で重要な役割を演じるため、治療標的にしにくい現状がある。本研究から、IGF-1がマクロファージ由来と考えられ、治療標的細胞を肺胞マクロファージに絞った上で治療標的にしうる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the effect(s) of pulmonary macrophage-origin IGF-1 on normal human lung fibroblasts (NHLF). First, methods were established to differentiate macrophages from human peripheral blood-derived monocytes as well as U937 cells. The macrophages derived from both monocytes and U937 cells produced IGF-1. We also established methods for co-culturing those macrophages with NHLF and for culturing NHLF in the supernatants of cultures of those macrophages. When the macrophages were co-cultured with NHLFs in the presence of anti-IGF-1 neutralizing antibody or linsitinib, an inhibitor of IGF-1 receptor, inflammatory cytokines in the supernatants of both culture systems were significantly suppressed. This study revealed that IGF-1 derived from macrophages acts via the IGF-1 receptor to induce cytokine production by NHLFs.

研究分野：呼吸器内科、間質性肺炎、アレルギー疾患

キーワード：IGF-1 肺線維芽細胞 マクロファージ 特発性肺線維症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症(IPF)は極めて予後不良な呼吸器疾患であり、進行性の呼吸困難により患者 QOL も大きく妨げられるため、新規の治療法開発が待たれている。IGF-1 はチロシンキナーゼレセプターを活性化し、線維芽細胞の増殖を促進することで IPF の慢性進行性の線維化に主体的に関与するため、IPF に対する治療標的となりうる。しかしながら、IGF-1 は他の生体恒常性維持に重要な細胞の増殖にも寄与するため、全身性に IGF-1 の機能を阻害すると副作用につながる可能性が高い。IPF において線維芽細胞に作用する IGF-1 の産生源であるマクロファージ特異的に IGF-1 機能を阻害できれば、治療応用の可能性が広がる。

2. 研究の目的

そこで本研究の目的は、IPF における肺泡マクロファージ由来 IGF-1 の作用を明らかにし、肺泡マクロファージ特異的に抗 IGF-1 抗体を作用させることによる IPF に対する治療応用の可能性を探求することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞

ヒト末梢血中CD14陽性単核球および単芽球様細胞株U937細胞をマクロファージに分化させ、使用した。また、正常ヒト肺線維芽細胞Normal Human Lung Fibroblasts(NHLF)を用いた。

(2) フローサイトメトリーによる解析

細胞表面発現は、Anti CD163-PE抗体およびAnti CD206-APC抗体で標識後、FACSVerse(BD Biosciences)で測定した。

(3) サイトカイン濃度の測定

分化させたマクロファージの上清、マクロファージまたはその上清とNHLFを共培養した上清中のサイトカイン濃度をELISAおよびMagpix法で測定した。

(4) Real-time PCR

細胞を刺激した後、細胞からtotal RNAを抽出した。その後mRNAからcDNAに逆転写を行い、レファレンス遺伝子を β -actinとして Ct法で相対定量した。

(5) 統計解析

連続変数の二群間比較はMann-Whitney's U検定で、多群間比較はKruskal-Wallis検定で評価し、統計学的有意差は $P < 0.05$ とした。

4. 研究成果

(1) 単核球からマクロファージの分化

同意を得た健常人の末梢血から MACS cell separation を用いて高純度に CD14 陽性単核球を単離し、M-CSF 添加メディウムで6日間培養することにより、単球をマクロファージに分化させた。M-CSF を加えていない細胞(Fig. 1A)と比較すると、M-CSF を添加し培養したマクロファージ(Fig. 1B)は、M2 マクロファージの細胞表面マーカーである CD163 および CD206 の発現が増強し、M2 マクロファージに分化していることが確認できた。また、100nM PMA で U937 細胞を3日間培養し、マクロファージに分化させた。

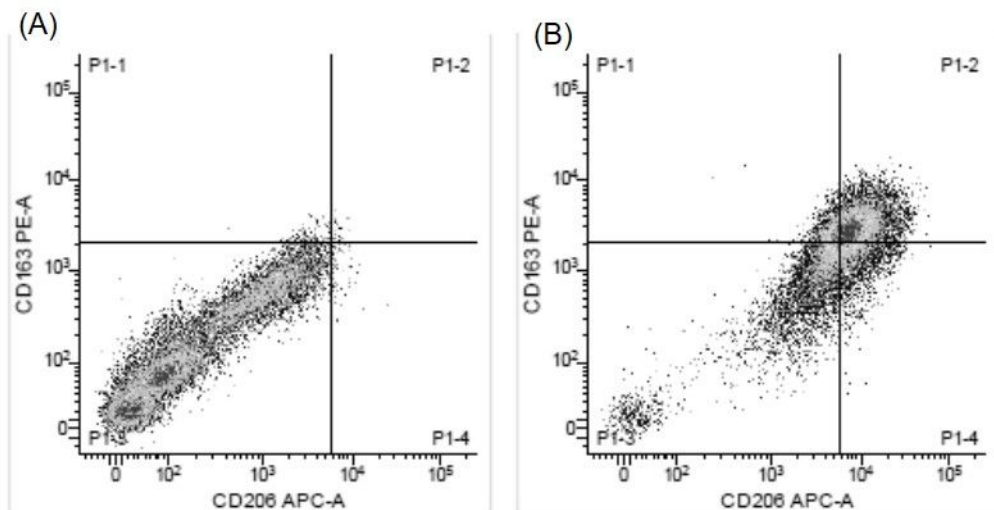


Fig. 1 末梢血単核球から分化誘導したマクロファージの細胞表面マーカー発現
末梢血 CD14 陽性単核球を M-CSF 無(A)、M-CSF 有(B)で 6 日間培養し、Anti CD163-PE 抗体および Anti CD206-APC 抗体で標識し、フローサイトメトリーで測定した。

(2) マクロファージによる IGF-1 産生

まず、マクロファージの IGF-1 発現を確認した。末梢血由来マクロファージは mRNA レベルで IGF-1 を発現していた。シリカ 0.1、0.5mg/ml を加え、マクロファージに貪食させることにより、IGF-1 mRNA の発現量は増強した(Fig.2)。マクロファージへの分化後、末梢血由来マクロファージのメディアムを M-CSF を除いたものに置換し、24 時間後の IGF-1 濃度を ELISA で測定したところ、 176.8 ± 29.82 pg/ml, n=6 であり、IGF-1 のタンパクレベルでの発現も確認された。一方、U937 細胞由来マクロファージにおいては、シリカ 0.1mg/ml で IGF-1 の産生が有意に上昇した(Fig.3)。

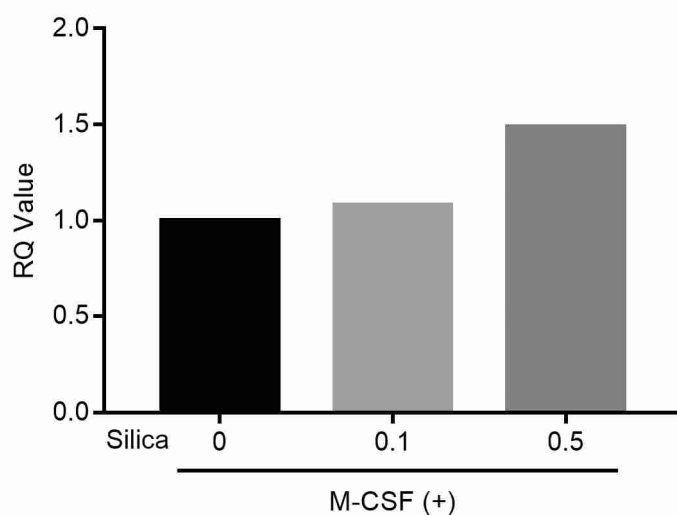


Fig. 2 シリカによるマクロファージ IGF-1mRNA 発現増強

末梢血単核球を M-CSF で 6 日間培養し、マクロファージに分化させた後、M-CSF 添加メディアムとシリカを加えて 24 時間培養し、RNA を抽出した。cDNA に逆転写し、IGF-1 の発現につき、real-time PCR で解析した。

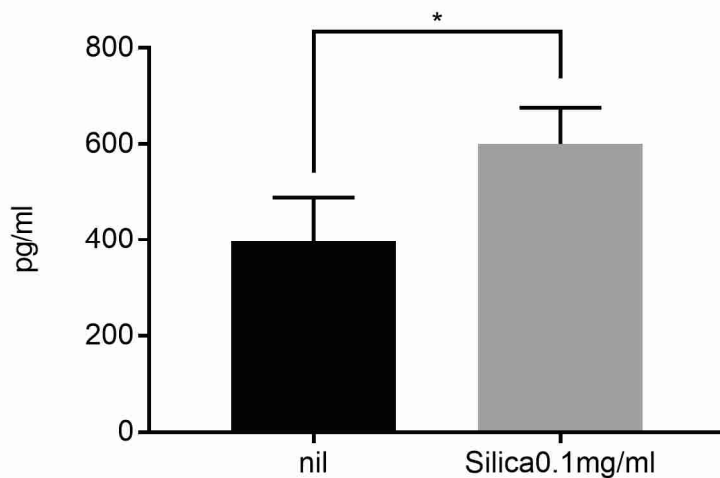


Fig. 3 U937 細胞由来マクロファージのシリカによる IGF-1 産生

U937 細胞を 100nM PMA と共に 72 時間培養し分化させたマクロファージにシリカ 0.1 mg/ml を加え 24 時間培養し、上清中の IGF-1 濃度を測定した(n = 3)。

*P < 0.05 vs. Nil.

(3) マクロファージに分化させた U937 細胞と NHLF の共培養

マクロファージから産生された IGF-1 を阻害するために、抗 IGF-1 抗体および IGF-1 レセプター阻害薬である Linsitinib を加え、U937 細胞由来マクロファージと NHLF を共培養した後、培養上清中のサイトカイン値を Magpix で解析した。結果、抗 IGF-1 抗体 6 ug/ml の添加で培養上清中 IP-10 値が抑制された。Linsitinib 10uM の添加によっても培養上清中 IP-10 および MMP-12 値が有意に抑制されたが、IL-6 値は上昇した。一方、U937 細胞由来マクロファージと共培養した NHLF は Linsitinib 10uM で、IP-10 および MMP-2 の mRNA 発現レベルが増強した。

(4) ヒト末梢血由来マクロファージ培養上清と NHLF の培養

まず末梢血由来マクロファージのメディアウムから M-CSF を除き、24 時間後に培養上清を回収した。NHLF を先に得た末梢血由来マクロファージ培養上清存在下で培養し、さらに抗 IGF-1 抗体を添加して培養し、上清中のサイトカイン値を測定した。結果、抗 IGF-1 抗体 20ug/ml 存在下で、MIP-1 値が有意に抑制された(Fig.4A)。一方、Linsitinib 10uM を加えると、IL-13 の産生が有意に抑制され(Fig.4B)、ST2 の産生も低下傾向を認めた(Fig.4C)。

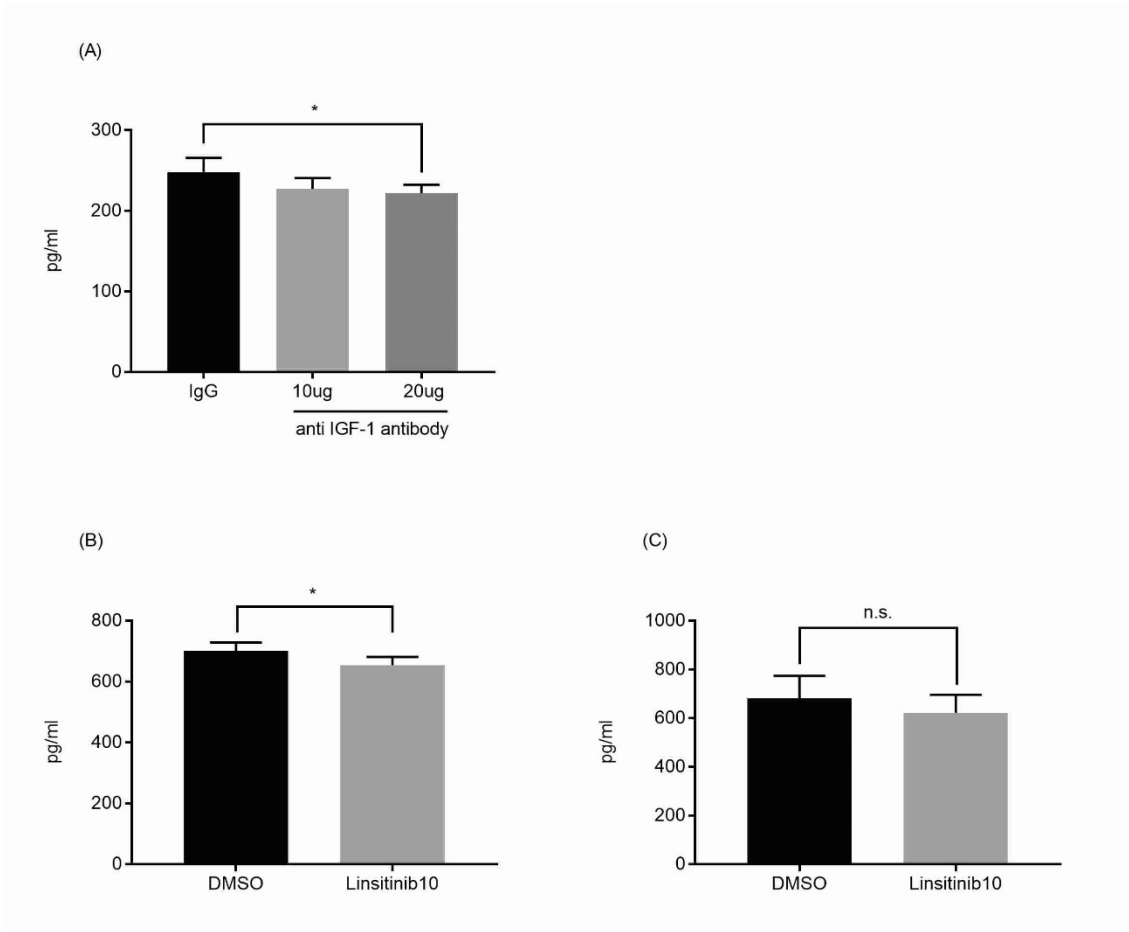


Fig. 4 末梢血由来マクロファージ培養上清の IGF-1 阻害効果

抗 IGF-1 抗体を 20 ug/ml となるように末梢血由来マクロファージの培養上清に加え、NHLF と 24 時間培養し、上清を Magpix で測定した。

(A) IgG, mouse IgG; anti-IGF-1 antibody, monoclonal antiIGF-1 antibody

*P < 0.05 vs. IgG.

(B) DMSO, Dimethyl sulfoxide; Linsitinib 10, Linsitinib 10 uM

*P < 0.05, n.s., not significant vs. DMSO.

以上、本研究においてヒト末梢血単核球からマクロファージの分化に成功した。

抗 IGF-1 抗体でマクロファージ由来 IGF-1 を中和することにより、NHLF からの MIP-1 産生が抑制された。また、Linsitinib で IGF-1 レセプターを阻害することにより、NHLF からの IL-13 および ST2 の産生が抑制された。本研究から、マクロファージ由来 IGF-1 が線維芽細胞の活性化を引き起こすことが示唆された。今後、IPF 患者由来マクロファージを作成し同様の検討を行い、IPF 病態形成におけるマクロファージ由来 IGF-1 の影響を解析する方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計15件（うち査読付論文 15件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Osumi Mika, Yamaguchi Masao, Sugimoto Naoya, Suzukawa Maho, Arai Hidenori, Akiyama Hiroshi, Nagase Hiroyuki, Ohta Ken	4. 巻 9
2. 論文標題 Allergy to carminic acid: in vitro evidence of involvement of protein-binding hapten	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Asia Pacific Allergy	6. 最初と最後の頁 e2 ~ e2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5415/apallergy.2019.9.e2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ujino Mariko, Miyoshi Shoki, Sugimoto Naoya, Arai Hidenori, Ota Yasunori, Sasajima Yuko, Kawamura Masafumi, Nagase Hiroyuki, Yamaguchi Masao, Ohta Ken	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Methotrexate-associated Lymphoproliferative Disorder: A Rare Differential Diagnosis of Wheezes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.2080-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ando Takahiro, Kawashima Masahiro, Masuda Kimihiko, Takeda Keita, Okuda Kenichi, Suzuki Junko, Ohshima Nobuharu, Horibe Mitsuko, Tamura Atsuhisa, Nagai Hideaki, Matsui Hirotooshi, Ohta Ken	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Exacerbation of chronic pulmonary aspergillosis was associated with a high rebleeding rate after bronchial artery embolization	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Respiratory Investigation	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2018.12.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tomyo Fuminori, Sugimoto Naoya, Kawamoto Masashi, Nagase Hiroyuki, Yamaguchi Masao, Ohta Ken	4. 巻 7
2. 論文標題 Anti-interleukin 5 antibody is effective for not only severe asthma and eosinophilic pneumonia but also eosinophilic bronchiolitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Respirology Case Reports	6. 最初と最後の頁 e00397 ~ e00397
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/rcr2.397	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Bosnic Anticevich Sinthia, Costa Elisio, Menditto Enrica, Ohta Ken, et al.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 ARIA pharmacy 2018 “Allergic rhinitis care pathways for community pharmacy”	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Allergy	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/all.13701	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ando Takahiro, Kawashima Masahiro, Matsui Hirotoishi, Takeda Keita, Sato Ryota, Ohshima Nobuharu, Nagai Hideaki, Kitani Masashi, Hebisawa Akira, Ohta Ken	4. 巻 96
2. 論文標題 Clinical Features and Prognosis of Nontuberculous Mycobacterial Pleuritis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Respiration	6. 最初と最後の頁 507 ~ 513
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000490548	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Bousquet Jean, Hellings Peter W., Agache Ioana, Ohta Ken, et al.	4. 巻 143
2. 論文標題 Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) Phase 4 (2018): Change management in allergic rhinitis and asthma multimorbidity using mobile technology	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 864 ~ 879
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2018.08.049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugimoto Naoya, Suzukawa Maho, Nagase Hiroyuki, Koizumi Yuta, Ro Shoki, Kobayashi Konomi, Yoshihara Hisanao, Kojima Yasuhiro, Kamiyama-Hara Asae, Hebisawa Akira, Ohta Ken	4. 巻 60
2. 論文標題 IL-9 Blockade Suppresses Silica-induced Lung Inflammation and Fibrosis in Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 232 ~ 243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2017-02870C	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Adachi Mitsuru, Kozawa Masanari, Yoshisue Hajime, Lee Milligan Ki, Nagasaki Makoto, Sasajima Takayoshi, Miyamoto Terumasa, Ohta Ken	4. 巻 141
2. 論文標題 Real-world safety and efficacy of omalizumab in patients with severe allergic asthma: A long-term post-marketing study in Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Respiratory Medicine	6. 最初と最後の頁 56 ~ 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.rmed.2018.06.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shimada Masahiro, Tamura Atsuhisa, Yokosuka Kyoko, Kusaka Kei, Matsui Hirotohi, Nagai Hideaki, Ohta Ken	4. 巻 56
2. 論文標題 A successful pembrolizumab treatment case of lung adenocarcinoma after becoming resistant to ALK-TKI treatment due to G1202R mutation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Respiratory Investigation	6. 最初と最後の頁 365 ~ 368
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2018.04.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arakawa Sayaka, Suzukawa Maho, Ohshima Nobuharu, Tashimo Hiroyuki, Asari Isao, Matsui Hirotohi, Kobayashi Nobuyuki, Shoji Shunsuke, Nagase Takahide, Ohta Ken	4. 巻 67
2. 論文標題 Expression of Siglec-8 is regulated by interleukin-5, and serum levels of soluble Siglec-8 may predict responsiveness of severe eosinophilic asthma to mepolizumab	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 S41 ~ S44
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2018.03.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokoyama Akira, Tamura Atsuhisa, Miyakawa Kazuko, Kusaka Kei, Shimada Masahiro, Hirose Takashi, Matsui Hirotohi, Kitani Masashi, Hebisawa Akira, Ohta Ken	4. 巻 57
2. 論文標題 Pulmonary Adenocarcinoma, Harboring Both an <i>EGFR</i> Mutation and <i>ALK</i> Rearrangement, Presenting a Stable Disease to Erlotinib and a Partial Response to Alectinib	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 2377 ~ 2382
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.0383-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohta Ken, Adachi Mitsuru, Tohda Yuji, Kamei Tadashi, Kato Motokazu, Mark Fitzgerald J., Takanuma Masayuki, Kakuno Tadahiro, Imai Nobuyuki, Wu Yanping, Aurivillius Magnus, Goldman Mitchell	4. 巻 67
2. 論文標題 Efficacy and safety of benralizumab in Japanese patients with severe, uncontrolled eosinophilic asthma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Allergology International	6. 最初と最後の頁 266 ~ 272
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.alit.2017.10.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzukawa Maho, Matsumoto Hisako, Ohshima Nobuharu, Tashimo Hiroyuki, Asari Isao, Tajiri Tomoko, Niimi Akio, Nagase Hiroyuki, Matsui Hirotoishi, Kobayashi Nobuyuki, Shoji Shunsuke, Ohta Ken	4. 巻 134
2. 論文標題 Baseline serum CXCL10 and IL-12 levels may predict severe asthmatics' responsiveness to omalizumab	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Respiratory Medicine	6. 最初と最後の頁 95 ~ 102
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.rmed.2017.12.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohta Ken, Nagase Hiroyuki, Suzukawa Maho, Ohta Shin	4. 巻 29
2. 論文標題 Antibody therapy for the management of severe asthma with eosinophilic inflammation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 337 ~ 343
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxx045	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大田 健
2. 発表標題 高用量ICS/LABAでコントロール不良な日本人喘息患者を対象としたベンラリズマブの有効性
3. 学会等名 第58回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Ken Ohta
2. 発表標題 EPD2-4 Benralizumab Reduces Exacerbations in Japanese Patients With Severe, Uncontrolled Asthma : Subgroup Analysis of the CALIMA Trial
3. 学会等名 第57回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計6件

1. 著者名 酒瀬川 裕一, 小林 このみ, 小泉 佑太, 田中 祐輔, 三好 昭暉, 杉本 直也, 倉持 美知雄, 新井 秀宜, 長瀬 洋之, 山口 正雄, 大田 健	4. 発行年 2019年
2. 出版社 (株)北隆館	5. 総ページ数 4
3. 書名 アレルギーの臨床 (0285-6379)39巻1号 内服及び吸入用のセフェム系抗菌薬がアナフィラキシーの原因と考えられた一例(原著論文/症例報告)	

1. 著者名 大田 健, 佐々木 絢子, 江本 夏伯	4. 発行年 2018年
2. 出版社 (株)北隆館	5. 総ページ数 6
3. 書名 アレルギーの臨床 (0285-6379)38巻9号 「特集/アレルギー疾患における最新の治療」に寄せる 重症喘息の治療コンセプト(解説)	

1. 著者名 三好 昭暉[路], 小林 このみ, 新井 秀宜, 長瀬 洋之, 山口 正雄, 大田 健	4. 発行年 2018年
2. 出版社 (株)北隆館	5. 総ページ数 3
3. 書名 アレルギーの臨床 (0285-6379)38巻6号 【アレルギーマーチ予防の考え方】 反復する腹痛を主訴とする遺伝性血管性浮腫の1例(原著論文/症例報告/特集)	

1. 著者名 大田 健	4. 発行年 2018年
2. 出版社 (株)医学通信社	5. 総ページ数 2
3. 書名 保険診療 (0385-8588)73巻7号 こうして医療機関を変えてきた!療養所を母体とする公的病院の一般病院への転換と経営改善への道のり(4)(解説)	

1. 著者名 大田 健	4. 発行年 2018年
2. 出版社 (株)医学通信社	5. 総ページ数 2
3. 書名 保険診療 (0385-8588)73巻6号 こうして医療機関を変えてきた! 療養所を母体とする公的病院の一般病院への転換と経営改善への道のり(3)(解説)	

1. 著者名 大田 健	4. 発行年 2018年
2. 出版社 (株)医学書院	5. 総ページ数 5
3. 書名 総合診療 (2188-8051)28巻8号 【80歳からの診療スタンダードUp to Date-Silver Standard】80歳以上の高齢者の外来診療 ここがポイント! COPD/喘息診療スタンダードUp to Date(解説/特集)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----