

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2023

課題番号：18K08146

研究課題名（和文）新規サーファクタント遺伝子変異モデルを用いた肺線維化の分子機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanisms of lung fibrosis using a novel surfactant gene mutation model.

研究代表者

濡木 真一（Nureki, Shinichi）

大分大学・医学部・講師

研究者番号：50423702

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：肺線維症を自然発症するSftpcl73Tノックインマウスを用いて、オステオポンチン機能喪失の影響を解析した。Sftpcl73Tノックインマウスにおけるオステオポンチンの主な産生細胞は、マクロファージであり、肺病巣局所には、全長型・N末端型オステオポンチンが高濃度検出された。同マウスとオステオポンチン（Spp1）ノックアウトマウスを交配した、Sftpcl73Tノックイン・Spp1ノックアウトマウスを作成した。全長型オステオポンチンの機能喪失では、炎症期における炎症細胞浸潤の増加、サイトカイン・ケモカインの活性化を認めた。オステオポンチンノックアウトにより、肺線維化は改善しなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究では、従来の報告と異なり、「オステオポンチンの機能喪失は、肺の炎症を増悪させ、肺線維化を改善しない」ことが明らかになり、本研究成果は、「オステオポンチンを治療ターゲットにするためには、オステオポンチンの機能喪失ではなく、オステオポンチンの機能調節が必要である」という学術的意義を持つ。さらに、本研究成果は、「オステオポンチン機能調節機能を、肺線維症の創薬に発展できる」という社会的意義を持つ。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effect of loss of osteopontin function on the spontaneous development of pulmonary fibrosis in Sftpcl73T knock-in mice, in which the main osteopontin-producing cells were macrophages and high concentrations of full-length and N-terminal osteopontin were detected in the lung lesion area. We generated Sftpcl73T knock-in and Spp1 knock-out mice by crossing Sftpcl73T knock-in mice with osteopontin (Spp1) knock-out mice. Loss of function of full-length osteopontin increased inflammatory cell infiltration and activation of cytokines and chemokines during the inflammatory phase. Osteopontin knockout did not improve lung fibrosis.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺線維症

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症は、進行性・不可逆性に肺線維化を来す難治性疾患である。診断確定後の平均余命はわずか 2.5~5 年であり、予後を改善する治療法の開発が社会から求められている。特発性肺線維症の約 5~10% が、家族性に肺線維症を発症する。近年、家族性に肺線維症を発症するサーファクタント遺伝子の変異が同定された。サーファクタントタンパク質 C (SP-C) は、II 型肺胞上皮細胞のみから産生される。SP-C をコードする遺伝子である *Sftpc* の変異は、肺線維化の発症率が高い。最も頻度が高い *Sftpc* の変異は、アミノ酸のコドン 73 番目のイソロイシンがスレオニンに置き換わった *Sftpc*^{L73T} である。我々は、肺線維症を自然に発症する *Sftpc*^{L73T} ノックインマウスの作成に世界で初めて成功した。特発性肺線維症の治療ターゲットとなりうる分子を探索するために、スクリーニングとしてこのマウスの II 型肺胞上皮細胞のマイクロアレイでは、オステオポンチンの発現が著明に亢進していた。一方、オステオポンチンは、一般的に、(1) 慢性炎症を惹起し、さらには、(2) 線維芽細胞の遊走・増殖作用をもつため、オステオポンチンの発現上昇が肺の線維化機序にかかわっている可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*Sftpc*^{L73T} ノックインマウスを用いて、オステオポンチンの肺線維化における役割を明らかにし、さらには治療応用へと発展させるための基礎作りを行うことである。

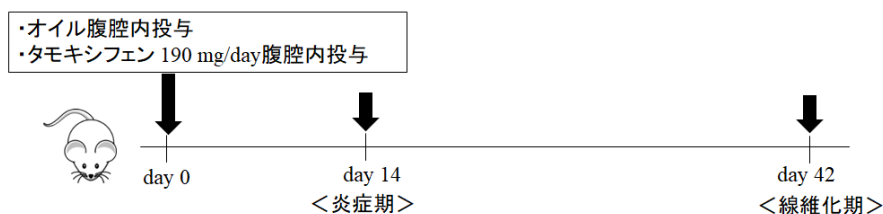
3. 研究の方法

(1) *Sftpc*^{L73T} ノックインマウスの炎症病態、及び肺線維化病態評価モデルの構築

肺炎症の評価モデル

8 週齢の *Sftpc*^{L73T} ノックインマウスに対して、タモキシフェンを腹腔内投与し、2 週間後に気管支肺胞洗浄液、肺病理組織、体重減少、死亡率について評価した。コントロール群に対しては、オイル腹腔内投与を行った (図 1)。

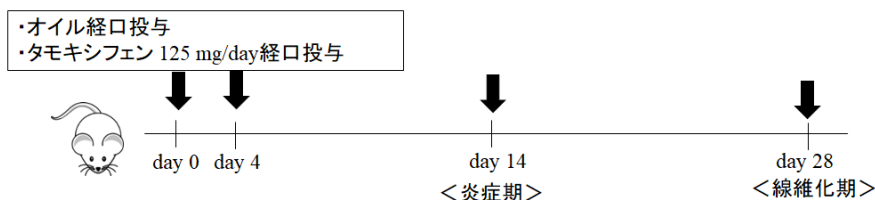
図1. 投与スケジュール(炎症評価用)



肺線維化の評価モデル

10-12 週齢の *sftpc*^{L73T} ノックインマウスに対して、タモキシフェンを day0 及び day4 に経口投与し、4 週間後に気管支肺胞洗浄液、肺病理組織、体重減少、死亡率、肺のコラーゲン量を評価した。コントロール群に対しては、オイル経口投与を行った (図 2)。

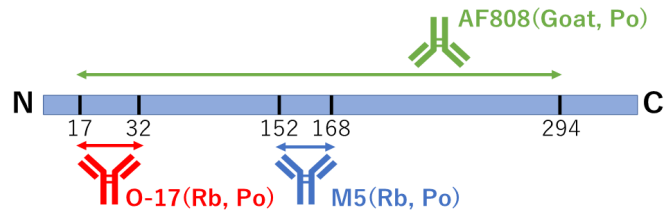
図2. 投与スケジュール(肺線維化評価)



(2) *Sftpc*^{L73T} ノックインマウスの肺におけるオステオポンチンの発現評価

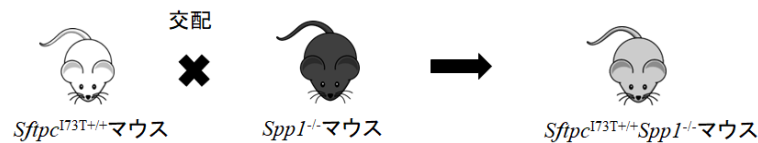
8 週齢の *Sftpc*^{L73T} ノックインマウスに対して、タモキシフェンを腹腔内投与し、2 週間後に肺組織をホルマリン固定し、肺組織切片に対して 3 種類のエピトープ違いの抗オステオポンチン抗体 (図 3) を用いて免疫染色を行った。マウスに対して気管支肺胞洗浄を行い、マウスの気管支肺胞洗浄液上清中の全長型オステオポンチン、及び N 末端型オステオポンチン濃度を ELISA 法にて測定した。

図3. 抗オステオポンチン抗体のエピトープ



(3) *Sftpc*^{d73T} ノックインマウスに対するオステオポンチンノックアウトマウスの作成
Sftpc^{d73T} ノックインマウスとオステオポンチン (*Spp1*) ノックアウトマウスを交配したマウスを作成した (図4)。

図4. *Sftpc*^{I73T/+}*Spp1*^{-/-}マウスの作成



(4) *Sftpc*^{d73T} ノックインマウスにおけるオステオポンチンノックアウトの炎症に対する影響
 8 週齢の *sftpc*^{d73T} ノックインマウス, 及び *sftpc*^{d73T} ノックイン *Spp1* ノックアウトマウスに対して, タモキシフェンを腹腔内投与し, 2 週間後に気管支肺胞洗浄液, 肺病理組織, 体重減少, 死亡率について評価した。

(5) *Sftpc*^{d73T} ノックインマウスにおけるオステオポンチンノックアウトの肺線維化に対する影響

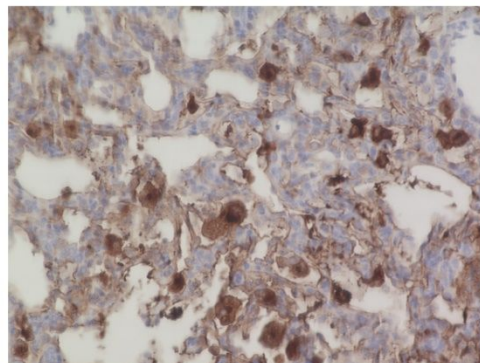
10-12 週齢の *sftpc*^{d73T} ノックインマウス, 及び *sftpc*^{d73T} ノックイン *Spp1* ノックアウトマウスに対して, タモキシフェンを day0 及び day4 に経口投与し, 4 週間後に気管支肺胞洗浄液, 肺病理組織, 体重減少, 死亡率, 肺のコラーゲン量を評価した。

4. 研究成果

Sftpc^{d73T} ノックインマウスにおけるオステオポンチンの発現

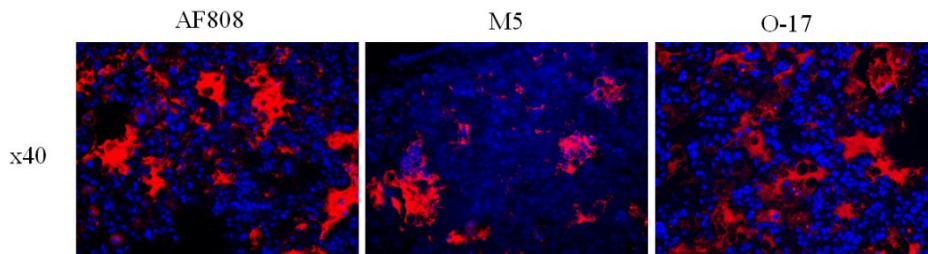
以前の解析で, 同マウスの肺組織, II 型肺胞上皮細胞において, オステオポンチンの mRNA 発現が亢進していることを明らかにしている。今回は, オステオポンチンの蛋白発現を調べた。免疫染色では, オステオポンチンは肺胞腔内のマクロファージに強陽性であった (図5)。

図5. 抗オステオポンチン抗体 (AF808) を用いた免疫染色



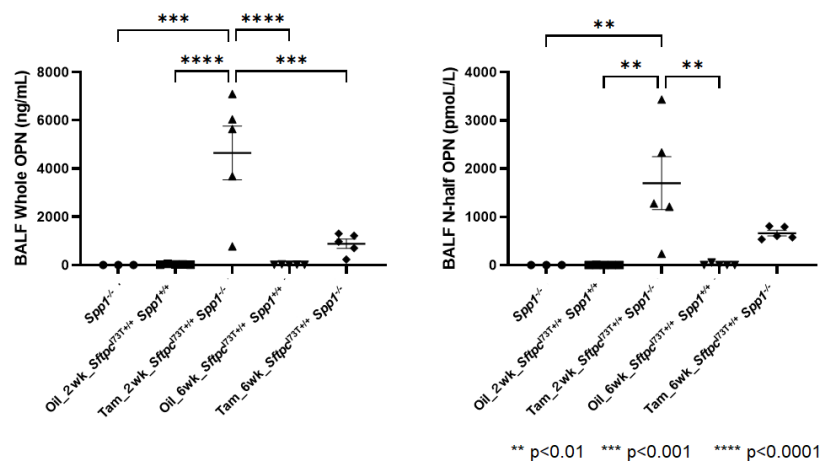
3 種類の抗オステオポンチン抗体を用いた評価では, オステオポンチンは同様に肺胞腔内のマクロファージとその周囲の肺胞腔に強陽性であった (図6)。

図6. エピトープ違いの抗オステオポンチン抗体を用いた免疫染色



気管支肺胞洗浄液中には、全長型オステオポンチン、切断型オステオポンチンの濃度は、コントロール群と比較して有意に亢進していた（図7）。

図7. 気管支肺胞洗浄液中のオステオポンチン濃度

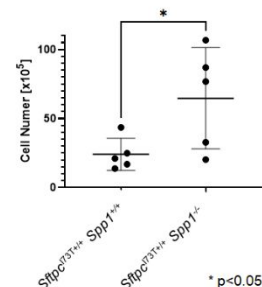


Sftpc^{I73T} ノックイン・*Spp1* ノックアウトマウスの樹立
Sftpc^{I73T} ノックインマウスとオステオポンチン(*Spp1*)ノックアウトマウスを交配し、*Sftpc*^{I73T} ノックイン・*Spp1* ノックアウトマウスの樹立に成功した。

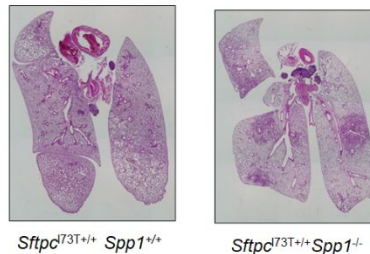
Sftpc^{I73T} ノックインマウスにおけるオステオポンチンノックアウトの炎症病態における影響
Sftpc^{I73T+/+} マウスと比較して *Sftpc*^{I73T+/+} *Spp1*^{-/-} マウスでは、気管支肺胞洗浄液細胞数は有意に増加し、肺病理組織では、*Sftpc*^{I73T+/+} マウスと比較して、*Sftpc*^{I73T+/+} *Spp1*^{-/-} マウスでは、肺炎症細胞病変の増悪を認めた（図8）。

図8. 炎症期におけるオステオポンチンノックアウトの影響

オステオポンチンノックアウトにより、
気管支肺胞洗浄液中総細胞数増加



オステオポンチンノックアウトにより、
肺組織の炎症は増悪



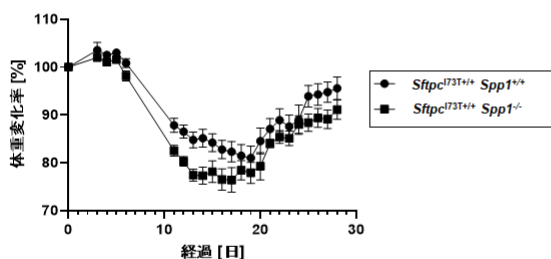
Sftpc^{I73T} ノックインマウスにおけるオステオポンチンノックアウトの肺線維化病態における影響
Sftpc^{I73T+/+} マウスと比較して *Sftpc*^{I73T+/+} *Spp1*^{-/-} マウスでは、経時的に有意な体重減少を認めた。肺組織中可溶性コラーゲン濃度は、両マウス群において有意差を認めなかった（図9）。

Gene Chip 解析では、*sftpc*^{I73T+/+} マウスと比較して *sftpc*^{I73T+/+} *Spp1*^{-/-} マウスでは、主に炎症性パスウェイ（IL-17 signaling pathway, Cytokine-cytokine receptor interaction, Chemokine signaling pathway）な

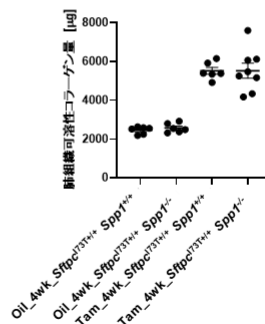
ど)の亢進を認めた。

図9. 肺線維化期におけるオステオポンチンノックアウトの影響

オステオポンチンノックアウトにより、
有意な体重減少を認めた



オステオポンチンノックアウトによる肺
組織中可溶性コラーゲン量は変化なし



これまでの報告では、ブレオマイシン誘発肺線維症モデルにおいて、オステオポンチンノックアウトは、肺の炎症、及び肺線維化を改善するとの報告がされるが、我々の検討では相反する結果が得られた。

我々の検討では、オステオポンチンの完全欠損により、炎症性パスウェイの亢進を認め、肺の炎症は増悪した。線維化期での、肺のコラーゲン沈着の程度に差はなかった。生体内でのオステオポンチンの完全欠損は、オステオポンチンを介さない別の炎症性パスウェイの代償性活性化により、肺の炎症を抑制することができず、むしろ肺の炎症を増悪させる可能性がある。

オステオポンチンを肺線維症の治療ターゲットとするためには、オステオポンチンの機能を完全に抑制するのではなく、肺線維症で増加しているオステオポンチンの機能を、生体機能維持に必要な範囲に戻してやることが重要と考えられ、今後の検討課題とする。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 濡木真一，平山文博，岩田通夫，山西芳裕，平松和史，Michael F. Beers
2．発表標題 SFTPC変異マウスにおけるオステオポンチンの機能抑制の解析
3．学会等名 第64回日本呼吸器学会学術講演会
4．発表年 2024年

1．発表者名 濡木真一
2．発表標題 SFTPC Non-BRICHOSドメイン変異に伴う肺線維症マウスモデルにおけるオステオポンチン発現解析
3．学会等名 日本肺サーファクタント・界面医学会 第55回学術研究会
4．発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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
研究 分 担 者	山末 まり (Yamasue Mari) (40555174)	大分大学・医学部・講師 (17501)	

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------