

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08157

研究課題名(和文)線維芽細胞の酸性環境への耐性機構を標的にした肺線維症の治療法の開発

研究課題名(英文)A treatment strategy for pulmonary fibrosis targeting fibroblast adaptation to tissue acidosis

研究代表者

青柴 和徹 (Aoshiba, Kazutetsu)

東京医科大学・医学部・教授

研究者番号：60231776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：特発性肺線維症の肺組織は低酸素による解糖系亢進により酸性化していることから、線維芽細胞が生存、増殖、活性化するには細胞内外のpHを調節するCarbonic anhydrase IX (CA IX)が重要な役割を果たしているのではないかという仮説をたてた。Transforming growth factor (TGF $\beta$ )で刺激した肺線維芽細胞では解糖系が亢進し、細胞外液が酸性化した。ブレオマイシン肺線維症マウスにCA IX阻害薬(U-104)を投与したところ、肺コラーゲン量が減少し、肺コンプライアンスの低下が改善した。以上の結果からCA IXは肺線維症の治療標的になると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性肺線維症の治療成績は十分ではなく、新規治療薬の開発が望まれている。近年、線維化肺組織では解糖系が亢進して酸性化していることが報告されているが、本研究では肺線維芽細胞が線維化組織で生存、活性化するためには細胞内外のpHを調節するCarbonic anhydrase IX (CA IX)が重要な役割を果たしていることが示された。CA IXは肺線維症の新しい治療標的になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have shown that fibrotic tissue particularly in the lung is acidic because of enhancement of glycolysis due to tissue hypoxia. This study was aimed to determine whether carbonic anhydrase IX, which regulates extracellular and intracellular pH, plays an important role in the survival and activation of fibroblasts in pulmonary fibrosis. We found that treatment of normal human fibroblasts with transforming growth factor  $\beta$  induced extracellular acidification by stimulating glycolysis. We also found that treatment of bleomycin-exposed mice with U-104, a selective inhibitor of carbonic anhydrase IX, improved lung tissue accumulation of collagen and lung tissue stiffness. These results suggest that CA IX is a therapeutic target for pulmonary fibrosis.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：肺線維症 間質性肺炎 線維芽細胞 アシドーシス 炭酸脱水素酵素 IX

## 1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症の治療薬としてピルフェニドンやニンテダニブが相次いで上梓され、臨床的に広く使用されるようになったが、その治療成績は十分ではなく、新規治療薬の開発が望まれている。肺の気腫化と線維化には細胞傷害性物質や炎症性物質、線維芽細胞の活性化因子が複雑に関与しているが、最近、線維化肺では腫瘍の微小環境と同じように低酸素により解糖系が亢進して酸性化していることが注目されている。したがって癌細胞と同じように、酸性環境下にある線維芽細胞が増殖、分化、活性化するためには酸性環境への適応が必要と考えられるが、その機序は不明である。

## 2. 研究の目的

Carbonic anhydrase IX (CA IX)は一部の癌細胞に発現し、酸性化した腫瘍環境における癌細胞の生存を支持する役割が知られている。研究代表者は解糖系亢進により酸性化した肺線維化組織において線維芽細胞が生存、増殖、活性化するためには癌細胞と同じく細胞内外の pH 調節機構が必要であり、CA IX が線維化肺の間葉系細胞に発現しているのではないかという仮説をたて研究を行った。本研究に先行する予備研究においてヒトの特発性肺線維症の肺組織では抗 CA IX 抗体陽性の間葉系細胞が多数認められていた。

## 3. 研究の方法

### 1) 線維芽細胞の酸性微小環境における代謝リプログラミング

正常胎児肺線維芽細胞 (IMR-90) を培養し、Transforming growth factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) 刺激前後の酸素消費量 (OCR) および細胞外酸性化 (ECAR) を細胞外フラックスアナライザー XFp を用いて測定した。また TGF $\beta$  が IMR-90 細胞の CA IX 発現に与える影響および正常酸素、低酸素 (3%, 1% O<sub>2</sub>) 曝露下における CA IX 阻害薬 (U-104) による IMR-90 細胞の増殖への影響を検討した。

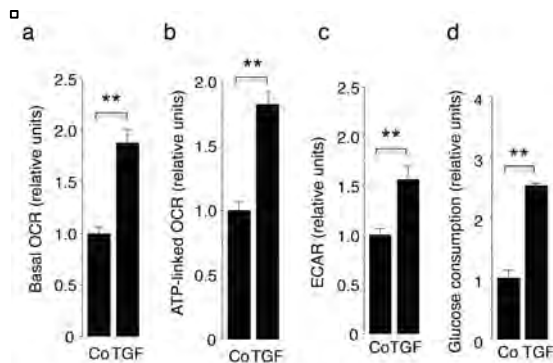
### 2) CA IX 阻害薬 (U-104) 投与によるマウスブレオマイシン肺線維症の抑制効果

8 週齢 C57BL/6J 雌マウスにブレオマイシン (BLM, 1 mg/kg) を気管内に単回投与し肺線維症モデルを作製した。U-104 (32 mg/kg) は Day 0~Day 20 まで 3 回/週 (Day 0 は BLM 投与の 1 時間後) に腹腔内投与した。デキサメサゾン (DEX, 0.25 mg/kg) およびピルフェニドン (PFD, 200 mg/kg) は Day 0~Day 20 (Day 0 は BLM 投与の 1 時間後に投与) まで 21 日間胃ゾンデを用いて経口投与した。Day 21 に麻酔下に気管にカニューレを挿入固定し、高性能呼吸機能解析システム (FlexiVent) を用い、肺機能 (Compliance, Cs, Est, H, G, etc) を測定した。その後麻酔下で放血致死させ、肺を摘出して左右の肺に分離し、左肺をホモジナイズしてハイドロキシプロリンの測定に供し、右肺は 10% 中性緩衝ホルマリン液に浸漬して固定し、組織標本作製した。

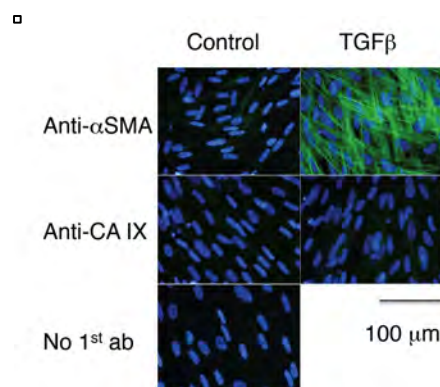
## 4. 研究成果

### 1) 線維芽細胞の酸性微小環境における代謝リプログラミング

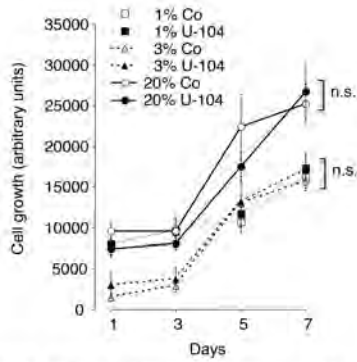
IMR-90 細胞を TGF $\beta$  で刺激したところミトコンドリア酸素消費量と解糖系の亢進が認められた (Fig. 1)。一方、CA IX 阻害薬である U-104 は IMR-90 細胞の  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) の発現を亢進させたが、CA IX の発現は刺激しなかった (Fig. 2)。また正常酸素 (20% O<sub>2</sub>)、低酸素 (3% O<sub>2</sub>、1% O<sub>2</sub>) のいずれの条件においても IMR-90 細胞の増殖には影響を与えなかった (Fig. 3)。



**Fig. 1.** Effects of TGF $\beta$  on bioenergetic metabolism in normal human lung fibroblasts (IMR-90). **a.** Basal oxygen consumption rate (OCR). **b.** ATP-linked OCR. **c.** Extracellular acidification rate (ECAR). **d.** Glucose consumption rate. N=3 in each group of experiments. \*\*P<0.01.



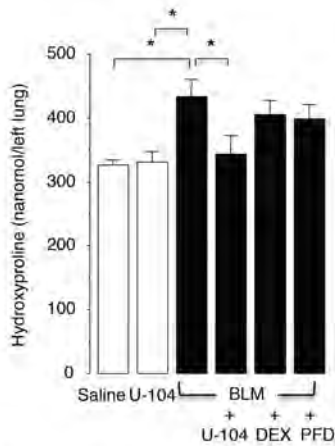
**Fig. 2.** Effects of TGF $\beta$  on expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and carbonic anhydrase IX (CA IX) in IMR-90 cells.



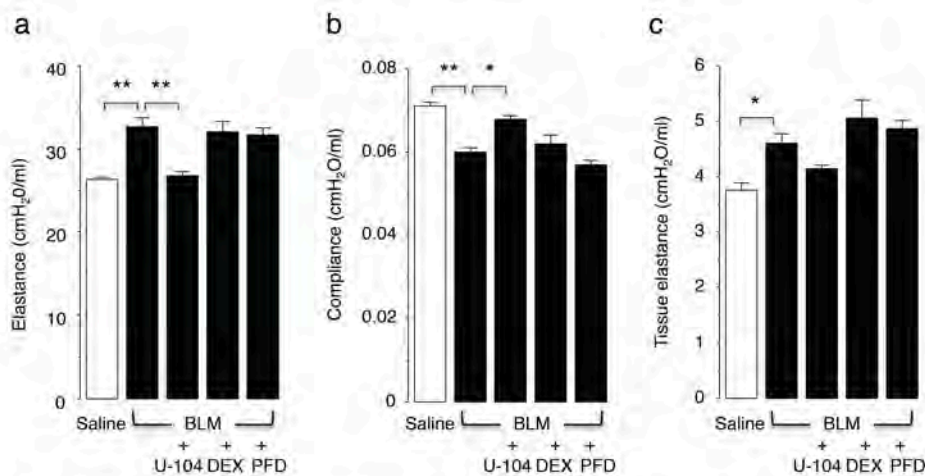
**Fig. 3.** Effects of U-104, a selective CA IX inhibitor, on growth of IMR-90 cells exposed to normoxia (20% O<sub>2</sub>) or hypoxia (3% or 1% O<sub>2</sub>). n.s., not significant.

## 2) CA IX 阻害薬 (U-104)投与によるマウスブレオマイシン肺線維症の抑制効果

ブレオマイシン肺線維症マウスに U-104 を投与したところ、U-104 投与群ではコントロール群に比べてブレオマイシン投与 21 日目のヒドロキシプロリン量が有意に低下し (Fig. 4)、肺のエラスタンスの有意な低下とコンプライアンスの有意な上昇が認められた (Fig. 5)。一方、デキサメサゾンやピルフェニドンはブレオマイシン肺線維症マウスのヒドロキシプロリン量や呼吸機能に影響を与えなかった (Figs. 4, 5)。



**Fig. 4.** Effect of U-104, dexamethasone (Dex) or pirfenidone (PFD) on collagen accumulation in the lungs of mice receiving an intratracheal injection of bleomycin (BLM). N = 8-10 in each group of experiments. \* P<0.05.



**Fig. 5.** Effect of U-104, dexamethasone (Dex) or pirfenidone (PFD) on lung function deterioration in mice receiving an intratracheal injection of bleomycin (BLM).  
**a.** Elastance. **b.** Compliance. **c.** Tissue elastance. N = 8-10 in each group of experiments. \* P<0.05, \*\*P<0.01.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Okuda R, Aoshiba K, Matsushima H, Ogura T, Okudela K, Ohashi K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Cellular senescence and senescence-associated secretory phenotype: comparison of idiopathic pulmonary fibrosis, connective tissue disease-associated interstitial lung disease, and chronic obstructive pulmonary disease.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Thorac Dis	6. 最初と最後の頁 857-864
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------