様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４年　６月　９日現在

機関番号：１５３０１
研究種目：基盤研究(B)（一般）
研究期間：2019～2021
課題番号：１９Ｈ０３７４６

研究課題名（和文）ダメージ関連分子パターンに着眼した肺線維化関連疾患に対する新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of the novel therapy focused on damage-associated molecular patterns (DAMPs) for lung fibrosis-related diseases

研究代表者
豊岡　伸一（Toyooka, Shinichi）

岡山大学・医歯薬学域・教授

研究者番号：３０３９７８８０

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、特発性肺線維症（IPF）を中心とした肺線維化におけるDAMPs・線維化パスウェイの役割を解明し、肺の異常線維化疾患に対する新規治療法の開発を目的とした。IPF患者の肺組織・血漿ではDAMPsの代表的蛋白であるS100A8/A9の高発現を呈し、S100A8/A9刺激・炎症惹起による肺線維化促進の機序が示唆された。S100A8/A9蛋白はRAGEを介して線維芽細胞の増殖・炎症惹起・線維化を誘導し、さらに抗S100A8/A9中和抗体の投与によりこの線維化誘導は抑制された。そして、肺線維症マウスモデルにおいて、抗S100A8/A9中和抗体は肺線維化を抑制し、予後を改善することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
現在、IPFの治療薬として抗炎症作用や抗線維化作用を持つ薬剤が認可されているがその効果は限定的であり、有効性は確立していない。このような中、新しい切り口であるDAMPs→RAGE→線維化パスウェイに着目した本研究の成果は、重要な位置づけとなる。また、線維化はがんの発生母地であるだけでなく、薬剤の到達を妨げること、がんの転移を加速することなど知られている。本研究成果は、肺線維症に対する新規抗線維化治療として可能性を見出したのみでなく、がんに対する治療として、周囲の腫瘍関連線維芽細胞を標的とした次世代型の治療法の可能性を示すものであり、社会的意義は高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to elucidate the role of DAMPs-fibrosis pathways in lung fibrosis, especially idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), and to develop a novel therapy for abnormal pulmonary fibrosis. S100A8 / A9, which is a representative protein of DAMPs, was highly expressed in lung tissue and plasma of IPF patients, suggesting a mechanism of promoting lung fibrosis by inflammation via S100A8 / A9 stimulation. The S100A8 / A9 protein induces fibroblast proliferation, inflammation, and fibrogenic activity via RAGE, and administration of anti-S100A8 / A9 neutralizing antibody suppresses this induction of fibrosis. It was shown that anti-S100A8 / A9 neutralizing antibody suppresses pulmonary fibrosis and improves prognosis in a mouse model of pulmonary fibrosis.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：ダメージ関連分子パターン　RAGE　肺線維化

※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、研究者個人に帰属します。

様　式　C－19、F－19－1、Z－19（共通）

１．研究開始当初の背景

肺の異常な線維化は、特発性肺線維症（idiopathic pulmonary fibrosis: IPF）を代表とする難治性間質性肺疾患の基本的な病態である。肺線維化の機序については慢性炎症が一因と考えられるが、分子レベルでは十分に解明されていない。ダメージ関連分子パターン(damage-associated molecular patterns: DAMPs)は細胞障害・細胞死などのストレスに伴い細胞から放出され、様々な生体反応を惹起することが知られ、特に炎症性疾患への関与が注目されている。我々はこれまでに、肺の線維芽細胞に DAMPs の受容体である RAGE が発現していることを発見している。

２．研究の目的

本研究は、IPF を中心とした肺線維化の発症と増悪に導く DAMPs・RAGE・線維化パスウェイの中心的分子を同定し、肺の異常線維化に関連した疾患・病態に対する新規治療法の開発を目的とした。

３．研究の方法

① S100A8/9 蛋白および抗 S100A8/A9 中和抗体が線維芽細胞に及ぼす作用の検証
S100A8/9 蛋白が線維芽細胞に及ぼす作用（細胞増殖、コラーゲン分泌能、筋線維芽細胞マーカー、炎症マーカー）、さらにそれらの抗 S100A8/A9 中和抗体による抑制作用に関する in vitro 実験で検証する。
② 肺線維症モデルマウスを用いた、抗 S100A8/A9 中和抗体の抗線維化作用の評価
ブレオマイシンによる肺線維症モデルマウスを用いて、抗 S100A8/A9 中和抗体の抗線維化作用を検証。
③ IPF 臨床検体を用いた S100A8/A9 発現の解析
IPF 患者の肺組織・血漿検体における S100A8/A9 の発現を免疫染色およびウエスタンブロット、ELISA 法で評価した。
④ HMGB1 が線維芽細胞に及ぼす作用の検証
代表的 DAMPs の一つである HMGB1 蛋白が肺の異常線維化に与える影響について、肺線維芽細胞を用いた in vitro 実験で検証する。

４．研究成果

① S100A8/9 蛋白および抗 S100A8/A9 中和抗体が線維芽細胞に及ぼす作用の検証
in vitro において、S100A8/9 蛋白および抗 S100A8/A9 中和抗体が線維芽細胞に及ぼす作用を検証した。マウス線維芽細胞およびヒト線維芽細胞 MRC-5 に S100A8/9 蛋白刺激を加えると、濃度依存性の細胞増殖の上昇を認めた。一方で RAGE ノックアウトマウスから分離した RAGE-/- 線維芽細胞では細胞増殖の上昇は認めなかった（図 1A）。同様に、S100A8/9 蛋白刺激による、代表的炎症バイオマーカーである NFκB の活動性に及ぼす作用を Electrophoretic mobility shift assay（EMSA）で（図 1B）、線維芽細胞の活動性を筋線維芽細胞マーカーであるα-SMA 蛋白の発

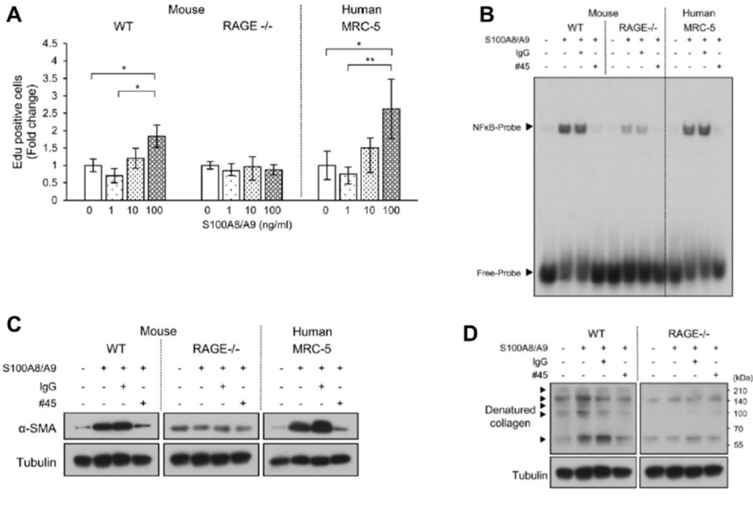

図１．S100A8/9蛋白および抗S100A8/A9中和抗体が線維芽細胞に及ぼす作用

現（図 1C）およびコラーゲン分泌能（図 1D）をウェスタンブロットで評価した。いずれのマー

カーも S100A8/9 蛋白刺激により WT 線維芽細胞では活性化され、RAGE-/- 線維芽細胞では活性上昇は認めなかった。さらにそれらの S100A8/9 蛋白刺激により誘導される活性は抗 S100A8/A9 中和抗体＃45 投与により抑制されることが示された。

② 肺線維症モデルマウスを用いた、抗 S100A8/A9 中和抗体の抗線維化作用の評価
ブレオマイシンによる肺線維症モデルマウスを用いて、抗 S100A8/A9 中和抗体の抗線維化作用を検証した。まずブレオマイシン肺線維症モデルマウスでは、ブレオマイシン投与後 7 日目をピークにマウス肺・血漿中 S100A8/A9 濃度、および炎症マーカーが上昇することが確認された（図２A および B）。次にブレオマイシン暴露から 1-2 時間後に、抗 S100A8/A9 中和抗体＃45 を投与することにより、抗体の投与量依存性にマウス肺の線維化が抑制され、体重減少は低下、生存曲線が改善することが示された（図２C-F）。

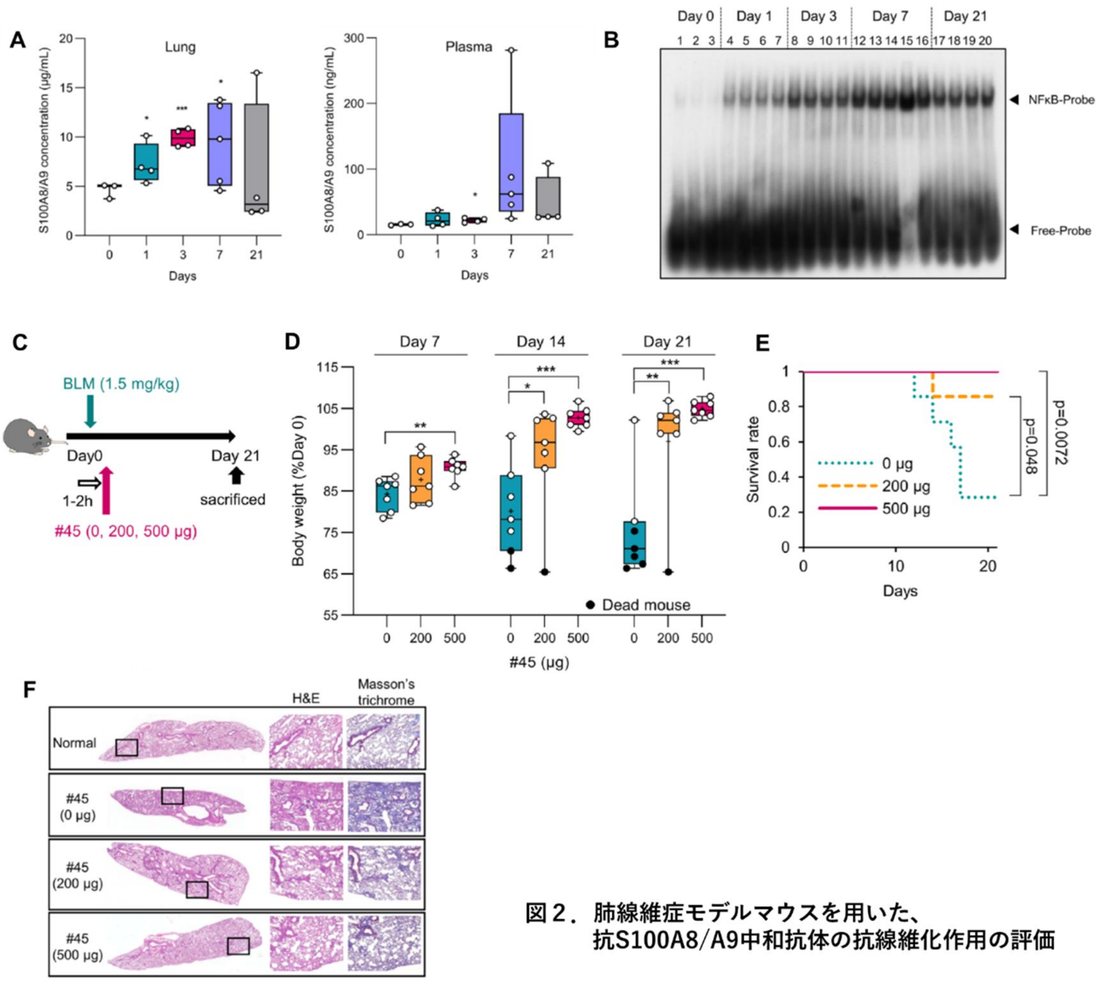

図２．肺線維症モデルマウスを用いた、
抗S100A8/A9中和抗体の抗線維化作用の評価

③ IPF 臨床検体を用いた S100A8/A9 発現の解析
IPF 患者の肺組織・血漿検体における S100A8/A9 の発現を免疫染色およびウエスタンブロット、ELISA 法で評価した。S100A8/A9 は肺の間質領域で発現を認め（図３A）、正常肺組織と比較して、IPF の肺組織では S100A8/A9 の発現が上昇していた（図３B）。また S100A8/A9 は IPF 患者の血漿中でも上昇が認められた（図３C）。さらに、IPF 肺組織では正常肺と比較して炎症マーカーである NFκB の活動性が高いことを示した（図３D）。

以上の研究結果より、IPF 患者の肺組織・血漿における S100A8/A9 の高発現が判明し、S100A8/A9 刺激・炎症惹起による肺線維化促進の機序が示唆された。さらに S100A8/A9 蛋白は RAGE を介して線維化誘導を促進され、抗 S100A8/A9 中和抗体の投与によりこの線維化誘導は抑制されることが示された。この研究成果は Journal of Molecular Medicine 誌に掲載された。

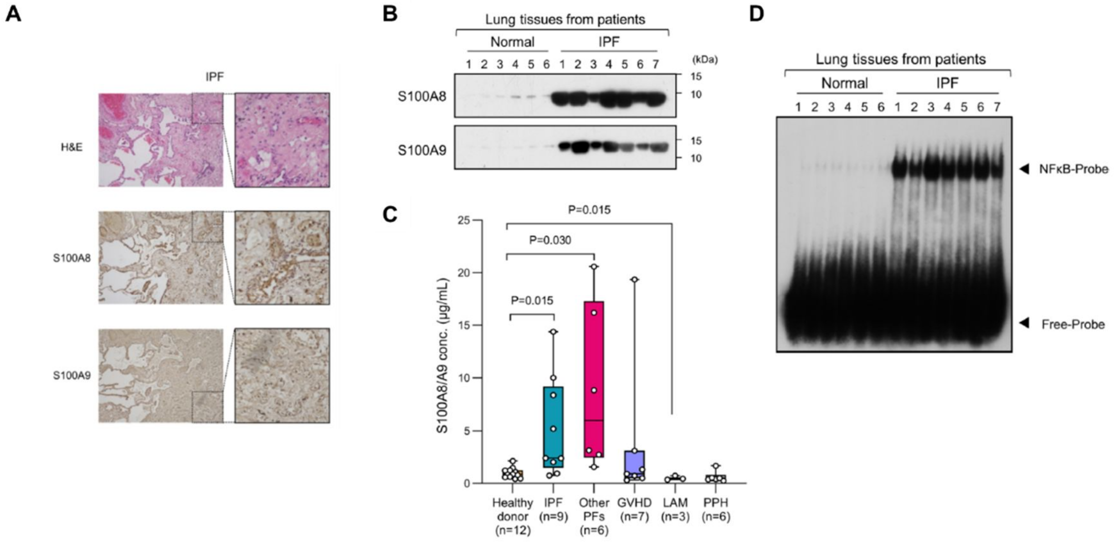

図３．IPF臨床検体を用いたS100A8/A9発現の解析

④　HMGB1が線維芽細胞に及ぼす作用の検証
S100蛋白と共に、RAGEをレセプターとする代表的なDAMPs蛋白の一つであるHMGB1蛋白が肺の異常線維化に与える影響について、肺線維芽細胞を用いたin vitro実験を行った。HMGB1蛋白を肺線維芽細胞に投与すると、線維芽細胞の増殖能は濃度依存性に増加し（図４A）、筋線維芽細胞マーカーα－SMAの上昇を認めた（図４B）。

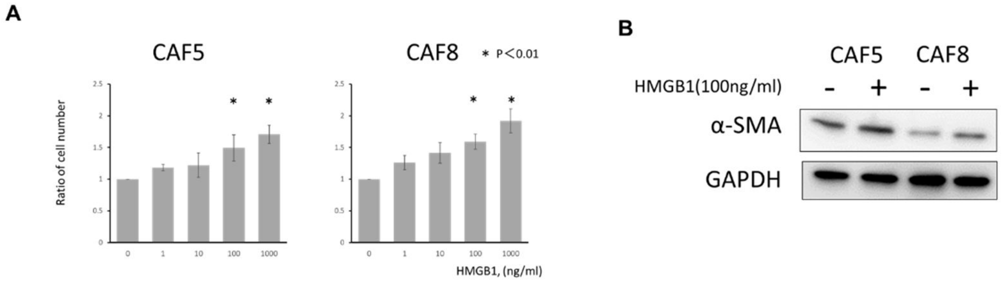

図４．HMGB1蛋白が線維芽細胞に及ぼす作用

最後に、IPFにおける線維芽細胞の活性化・炎症を伴う線維化病変は肺がんの発生母地にもなっている。特に、線維化はがんの発生母地であるだけでなく線維化がバリアーとなり薬剤の到達を妨げること、がんの転移を加速すること、が問題視されている。したがって、本研究成果は、肺線維症に対する新規抗線維化治療として可能性を見出したのみでなく、がんに対する治療として、がん細胞のみならず周囲の線維芽細胞、さらには腫瘍関連線維芽細胞を標的とした次世代型の治療法の可能性を示すものであり、社会的意義は高いと考えられる。

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	4．巻
Araki K, Kinoshita R, Tomonobu N, Gohara Y, Tomida S, Takahashi Y, Senoo S, Taniguchi A, Itano J, Yamamoto KI, Murata H, Suzawa K, Shien K, Yamamoto H, Okazaki M, Sugimoto S, Ichimura K, Nishibori M, Miyahara N, Toyooka S, Sakaguchi M	99
2．論文標題 The heterodimer S100A8/A9 is a potent therapeutic target for idiopathic pulmonary fibrosis	5．発行年 2021年
3．雑誌名 J Mol Med (Berl)	6．最初と最後の頁 131-145
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00109-020-02001-x.	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1件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

1．発表者名
豊岡伸一
2．発表標題 がん研究シーズの肺障害治療への応用
3．学会等名 第72回日本胸部外科学会定期学術集会
4．発表年 2019年

〔図書〕　計0件

〔出願〕　計1件

産業財産権の名称	発明者	権利者
炎症性肺疾患の予防及び／又は治療剤	阪口政清、豊岡伸一、木下理恵、荒木恒太	国立大学法人岡山大学　新潟大学　群馬大学
産業財産権の種類、番号 特許、2019-197222	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕　計0件

〔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	冨田　秀太 (Tomida Shuta) (10372111)	岡山大学・大学病院・准教授 (15301)	

６．研究組織（つづき）

	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	山本　寛斉 (Yamamoto Hiromasa) (40467733)	岡山大学・大学病院・助教 (15301)	
研究分担者	宮原　信明 (Miyahara Nobuaki) (70335610)	岡山大学・保健学域・教授 (15301)	
研究分担者	阪口　政清 (Sakaguchi Masakiyo) (70379840)	岡山大学・医歯薬学域・教授 (15301)	
研究分担者	宗　淳一 (Soh Junichi) (90559890)	近畿大学・医学部・准教授 (34419)	
研究分担者	諏澤　憲 (Suzawa Ken) (90839713)	岡山大学・大学病院・助教 (15301)	

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