

令和 4 年 8 月 26 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07894

研究課題名（和文）VEGFR-3陽性単球系細胞を指標とした間質性肺炎の新規マーカーの開発と病態解明

研究課題名（英文）A novel maker for pulmonary fibrosis using VEGFR-3-positive monocyte-lineage cells.

研究代表者

山下 雅大（YAMASHITA, MASAHIRO）

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：10606685

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）：単球選択的VEGFR-3遺伝子欠損マウスを用いた薬剤誘発性肺線維症マウスモデル実験では、VEGFR-3シグナルは肺線維症に保護的に作用した。

単球選択的VEGFR-3遺伝子欠損マウスを用いたリポポリサッカライド（LPS）誘発性肺傷害モデル実験では、VEGFR-3シグナルは急性肺傷害に炎症の抑制と組織修復の促進などの役割が確認された。ヒト急性呼吸窮迫症候群ではマクロファージVEGFR-3細胞外ドメインの翻訳後修飾によりVEGFR-3機能が作用しないことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性肺線維症あるいは急性呼吸窮迫症候群は予後が悪く前者は国の難病に指定されている。現時点のところ保険収載されている治療薬は、前者は抗線維治療薬であり後者は好中球エラスターゼ阻害剤であるが効果が充分ではなく予後の改善に寄与し得ていない。本研究の結果は肺内のマクロファージに発現するVEGFR-3シグナルを指標として肺線維症やヒト急性呼吸窮迫症候群など肺傷害の新たな治療戦略の考案に寄与すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In a bleomycin (BLM)-induced pulmonary fibrosis mouse model, using myeloid cell-specific VEGFR-3 depleted mice and the littermates, VEGFR-3 signaling functions to protect the fibrogenesis.

In a lipopolysaccharide (LPS)-induced pulmonary fibrosis mouse model, VEGF-C/VEGFR-3 signaling ameliorates acute lung injury. In human acute respiratory distress syndrome, the ectodomain of VEGFR-3 on macrophage is interfered via post translational modification.

研究分野：呼吸器病学

キーワード：マクロファージ 肺傷害

1. 研究開始当初の背景

特発性間質性肺炎(IIPs)は9つの病型からなる原因不明の疾患群で特発性肺線維症(IPF/UIP)、非特異の間質性肺炎(NSIP)、器質化肺炎(COP)、急性間質性肺炎(AIP)などが頻度および予後の点で重要である。特にIPF/UIPは慢性進行性の経過をたどり5年生存率が30%以下と予後不良な疾患である。新たな抗線維療法が保険適応を受けているが効果が限局的かつ副作用が多く新たな治療戦略の考案が喫緊の課題である。NSIPやCOPと異なりIPF/UIPにはステロイドの効果が無いことから、慢性炎症がもたらす線維化ではなく何らかの組織傷害によって引き起こされた異常な組織修復過程が原因と考えられている。他方COPは予後良好で線維化病変はほぼ跡形なく治癒することからこのCOPとの違いがIPF/UIPの病態解明および治療戦略の考案に寄与すると目されてきた。さらにAIPは急性発症の間質性肺炎でその病理組織像はびまん性肺胞傷害(DAD)を呈する。急性呼吸窮迫症候群(ARDS)も同様に病理組織像でDADを呈するが、AIPが特に基礎疾患が無く原因不明で生じるのに対して、ARDSは敗血症や外傷などに続発して生じる点が違う。AIPもARDSもステロイドの治療反応に乏しく確立した治療薬は無く予後不良である。その病態生理は充分には解明されていない。最近、ARDSではマクロファージによる好中球のefferocytosisの傷害が報告されている。単球/マクロファージはM1型とM2型に代表されるように複数のサブセットを認め、表面マーカーや機能が異なる。マクロファージは活性酸素やERストレスなどの微小環境に適応し、メディエーター刺激などによってreprogrammingされその変化は可塑性をもつとされる。また肺線維症動物モデル実験などにおいて、マクロファージには病態を悪化させるサブセットと組織修復に貢献するサブセットは異なることが報告されているが、組織修復に関与するマクロファージの制御因子は明らかにされていない。他方、我々の免疫組織化学的方法を用いた先行研究においてヒトIIPsではM2型マクロファージの表面マーカーであるCD163の発現がIPF/UIPとNSIP/COPとの際立った違いが確認された。また別の先行研究では同じM2マーカーであるCD206ノックアウトマウスを用いた肺線維症モデルにおいてノックアウトマウス群で有意に線維化が悪化させた。さらに別の先行研究では、末梢血単球におけるCD14強陽性集団におけるS100A9/CD163細胞数比はNSIPに比較してIPF/UIPで有意に上昇していた。これら一連の研究結果からは、やはり単球/マクロファージは肺線維症の病態形成や予後に重要な関与をもつことが再確認された。

リンパ管システムは、抗原提示細胞の所属リンパ節への移動、間質の水分のドレナージおよび脂肪の吸収などを主たる生理機能とする。リンパ管新生は癌、炎症あるいは創傷治癒など様々な病態で生じる。血管内皮細胞増殖因子(VEGF)受容体-3(VEGFR-3)は主にリンパ管内皮に発現し内皮細胞の増殖を介してリンパ管新生を促す。リンパ管新生が病態の進行を助長するのがあるいは抑制に作用するのかは、その基礎疾患の病態生理に依拠する。肺線維症は異常な創傷治癒と仮定されておりリンパ管新生が病態形成関与すると考えることは合理的であるが、これまでリンパ管新生がヒトIIPsの病型や予後との関連に明確な結論は報告されていない。他方、VEGFR-3は単球/マクロファージにも発現することが知られている。単球/マクロファージにおけるその役割は、①獲得免疫の場において抗原提示細胞におけるCCR7の発現を亢進させ同時に生じるリンパ管内皮細胞におけるCCL21の発現亢進に呼応して抗原提示細胞の所属リンパ節へのtraffickingを助長する、②急性炎症においてIL-10の発現を亢進させ炎症を軽減させる、などが報告されている。

以上考え合わせると、「VEGFR-3陽性マクロファージとVEGFR-3/-C/-Dシグナルはリンパ管内皮細胞とは異なる独自の機能を持ち肺傷害の組織修復に関与する」と仮説することが可能である。

2. 研究の目的

そこで本研究は、①薬物誘発性肺線維症動物モデルの病態形成および組織修復におけるVEGFR-3陽性単球/マクロファージの病因論的意義とその具体的な役割を明らかにすること②Pathogen-associated molecule patterns (PAMPs)誘発性急性肺傷害動物モデルの病態形成および組織修復におけるVEGFR-3陽性単球/マクロファージの病因論的意義とその具体的な役割を明らかにすること③ヒト肺疾患検体を用いたマクロファージVEGFR-3発現の修飾性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

①肺線維症マウスモデルにおける単球/マクロファージに発現するVEGFR-3シグナルの意義を明らかにする 手持ちのC57BL/6J背景のVEGFR-3^{flox/flox}; LysM-Cre マウスとlittermateをブレオマイシンの気道注入した肺線維症モデルに用いる。ブレオマイシンモデルでは投与後2週から3週間後に線維化病変のピークを迎える。その後、投与6週に至るまでの間に線維化病変は吸収されて回復する。生存曲線解析およびハイドロキシプロリン定量や病理標本における線維スコアを用いた定時線維成分定量解析を第2および5週で行い、マクロファージにおけるVEGFR-3シグナルが肺線維症モデルを悪化させるのがあるいは改善させるのかその意義を明らかにする。

②PAMPsとしてLPSの気道注入モデルを用いた。マウスにはC57BL/6JおよびC57BL/6J背景のVEGFR-3^{flox/flox}; LysM-Cre マウスとlittermateを用いた。Gain- or loss- of function test

として可溶性 VEGFR-3 Fc および VEGF-C アデノウイルスベクター、抗 VEGFR-3 阻害抗体、myeloid cell 選択的 VEGFR-3 遺伝子欠損マウスを用いた。これらのモデル実験により VEGF-C/VEGFR-3 シグナルの病因論的意義を検討した

③末梢血 VEGFR-3 陽性単球の IIPs 診断マーカーあるいは予後予測マーカーとして有用性の検討
未治療の IPF/UIP、NSIP、COP 患者から採取された末梢血を比重遠心法分離された単球を、CD14、CD16、VEGFR-3 に対する一次抗体を用い各 subset の発現性が、各病型間に違いがあるか FACS にて検討する。

④急性呼吸窮迫症候群患者における同シグナルの病因論的意義を検討する為、同疾患患者および対照疾患として特発性器質化肺炎患者の気管支肺胞洗浄液 (BALF) を用いて特にマクロファージにおける efferocytosis 能に注目して検討を行った。

4. 研究成果

①vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3)floxed; Cre-LysM マウス littermate を用いて Bleomycin 誘発性肺線維症モデル実験を行った。Kaplan-meier 曲線解析、定時線維化スコアなどからマクロファージに発現する VEGFR-3 が病態形成に保護的に作用していることが判明した。FITC-collagen を用いたマクロファージ貪食アッセイを flow cytometer で解析したところを、VEGFR-3 の機能はマクロファージによる collagen の貪食に関与している可能性が考えられた。

②VEGFR-3floxed; Cre-LysM マウスと littermate を用いてリポポリサッカライド (LPS) 誘発性肺傷害モデル実験を行った。Kaplan-meier 曲線解析、定時肺傷害スコア、浸潤炎症 (特に好中球数) 細胞数などから VEGFR-3 陽性マクロファージがリンパ管新生とは独立して肺傷害の修復に関与していることが明らかとなった。VEGFR-3 陽性細胞は特に肺胞マクロファージに多く認められ、それらは修復期において肺胞マクロファージにおける CD51(Integrin $\alpha 5$: efferocytosis への関与が既に報告されている) の発現を制御することで efferocytosis を制御していた。また、ヒト急性呼吸窮迫症候群患者および対照疾患 (特発性器質化肺炎) 患者および健常人コントロールの気管支肺胞洗浄液に肺胞マクロファージを培養したところ、急性呼吸窮迫症候群では他の二群に対してマクロファージに発現する VEGFR-3 が低下していた。加えて、急性呼吸窮迫症候群患者および対照疾患 (特発性器質化肺炎) 患者および健常人コントロールの気管支肺胞洗浄液に肺胞マクロファージを培養したところ、急性呼吸窮迫症候群における efferocytosis の phagocytic index が低下していた。以上の結果からはマクロファージ VEGFR-3/VEGF-C シグナルが急性肺傷害に重要な役割を果たし、そのシグナルの阻害が human ARDS における修復障害の一因になっていることを解明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Masahiro Yamashita, Yuh Utsumi, Hiromi Nagashima, Hiroo Nitani, Kohei Yamauchi	4. 巻 11
2. 論文標題 Distinct S100A9/CD163 expression profiles in classical monocytes as biomarkers to discriminate IPF from INSIP	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 12135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-91407-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Masahiro Yamashita, Yuh Utsumi, Kohei Yamashita	4. 巻 17
2. 論文標題 S100A9/CD163 Expression in Circulating Classical Monocytes in Chronic Obstructive Pulmonary Disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease	6. 最初と最後の頁 587-594
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15412555.2020.1793925	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yamashita Masahiro, Niisato Miyuki, Kawasaki Yasushi, Karaman Sinem, Robciuc Marius R., Shibata Yuji, Ishida Yoji, Nishio Ryosuke, Masuda Tomoyuki, Sugai Tamotsu, Ono Masao, Tuder Rubin M., Alitalo Kari, Yamauchi Kohei	4. 巻 59
2. 論文標題 VEGF-C/VEGFR-3 signalling in macrophages ameliorates acute lung injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Respiratory Journal	6. 最初と最後の頁 2100880 ~ 2100880
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1183/13993003.00880-2021	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山下雅大 内海裕 山内広平
2. 発表標題 COPD診断マーカーとしての末梢血単球S100A9/CD163
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山下雅大 前門戸任
2. 発表標題 マクロファージIGF-1シグナルの急性肺傷害修復機能
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yamashita M
2. 発表標題 Distinctive polarization of circulating classical monocytes between idiopathic pulmonary fibrosis and idiopathic nonspecific interstitial pneumonia.
3. 学会等名 European Respiratory Society2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山下雅大 山内広平
2. 発表標題 ARDSにおけるマクロファージVEGFR-3機能の低下
3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会総会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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			
フィンランド	Helsinki University			