

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08661

研究課題名（和文）肺線維症患者に対する間葉系幹細胞療法の臨床応用を目指した有効な新規マーカーの探索

研究課題名（英文）Search for effective new markers for clinical application of mesenchymal stem cell therapy in patients with pulmonary fibrosis

研究代表者

熊本 牧子（Kumamoto, Makiko）

奈良県立医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：10623522

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（以下IPF）は、徐々に肺の線維化が進行し呼吸不全に陥る予後不良の難治性疾患である。本研究にて、IPF患者由来の肺線維芽細胞の移入によって作成したIPFマウスモデルにおける、脂肪由来間葉系幹細胞（ASC）の抗線維化作用を見出した。肺線維芽細胞ではASCとの共培養にて筋線維芽細胞マーカーの発現が低下し、PTPRR（Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type R）の発現が上昇した。肺線維芽細胞にPTPRRを過剰発現させると線維化関連遺伝子の発現を抑制され、IPF治療のターゲットとなる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性肺線維症（IPF）の唯一の治療薬である抗線維化薬は、進行を抑制する効果に留まり、新規の有効な治療薬の開発が望まれている。我々は、これまでの動物モデルと比較して、実際のIPFの病態により即したモデルであるIPF患者由来の線維芽細胞を用いたIPFマウスモデルを作成し、脂肪由来間葉系幹細胞（ASC）の有効性を証明した。またASCの抗線維化作用の鍵となるPTPRRとその誘導を引き起こす液性因子を見出した。以上の結果は、肺線維症の発症機序とASCの標的因子の解明へと繋がる成果であり、IPFの新規治療戦略の基盤確立にも寄与するものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a refractory disease in which pulmonary fibrosis gradually progresses to respiratory failure. In this study, we found an anti-fibrotic effect of adipose-derived mesenchymal stem cells (ASCs) in an IPF mouse model created by transfer of IPF patient-derived lung fibroblasts. Co-culture with ASCs decreased expression of myofibroblast markers and increased expression of PTPRR (Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type R) in lung fibroblasts. Overexpression of PTPRR in lung fibroblasts suppressed expression of fibrosis-related genes, suggesting that PTPRR may be a target for IPF therapy.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：間葉系幹細胞治療 特発性肺線維症 PTPRR オーダーメイド治療

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (Idiopathic pulmonary fibrosis; IPF) は、慢性の経過をたどり、高度の線維化が進行し不可逆性の蜂巢肺形成をきたす予後不良の難治性疾患であり、診断時からの平均生存期間は5年に満たない。以前使用されていたステロイドと免疫抑制剤は、逆に予後を悪化させるといったエビデンスが蓄積され推奨されない治療となった。近年、抗線維化薬が承認されたが、その効果は病状の進行を遅らせるだけに留まっており (N Engl J Med 366:1968, 2012)、有効な新規 IPF 治療薬の開発が望まれている。

申請者らはこれまでに肺線維症に対する細胞療法に注目し、ブレオマイシン (BLM) 肺線維症モデルにおいて骨髄由来間葉系幹細胞 (MSC) の有効性を証明してきた (Eur Respir J 34:740, 2009)。さらに低侵襲で確保が容易で、免疫原性が低いヒト脂肪由来間葉系幹細胞 (ASC) に着目し、同モデルにおいて線維化抑制効果を確認した。一方、BLM 肺線維症モデルは病態の進行が一過性であることや、薬剤効果が病態進行のステージによって異なることなど、IPF の病態との矛盾も指摘されていた。そこで申請者らは、

(表) ヒトIPFとマウスモデルにおける肺線維症の病理像の比較

	ヒト	マウス	マウス
	IPF	BLMモデル	新規モデル
線維化	+++	+	+++
(急性)炎症	+/-	+++	+/-
可逆性	-	+	-

IPF 患者由来の肺線維芽細胞を免疫不全マウス (SCID-beige マウス) に移入することで肺線維症を発症させる新規マウスモデル (Am J Respir Cell Mol Biol, 50:985, 2014) を、当大学で肺切除

術を受けた IPF 患者由来の肺線維芽細胞を用いて確立させた。この新規ヒト化肺線維症マウスモデルは、急性炎症を引き起こし可逆的な BLM 肺線維症モデルと比較して、不可逆的でより IPF 患者の病態に近いモデルであることを確認した (表)。このヒト化肺線維症モデルに対して ASC を投与することで、一定の抗線維化効果が確認されたことから、新規の IPF 治療法として、ASC による幹細胞療法が期待できると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ASC の IPF に対する抗線維化作用の機序を解明することである。より IPF の病態に即したモデルである新規ヒト化肺線維症マウスに対して、ASC が抗線維化効果をもつことが確認できているが、モデル作成に用いた肺線維芽細胞の由来患者によっては、ASC の効果が認められない群も存在した。本研究では、ASC の臨床応用に向けて、IPF 患者に由来する多様な肺線維芽細胞を用いて ASC の有効性を検証する。それぞれの肺線維芽細胞の性質の違いや ASC の有効性の差異から、ASC の有効性に関連する新規マーカーを探索する。本解析は、ASC の抗線維化機序の解明のみならず、患者個々の病態の違いの解明につながり、新たな治療戦略の基盤が確立されることが期待される。

3. 研究の方法

(1) ヒト化肺線維症モデルマウスにおける ASC の効果検討

奈良県立医科大学医の倫理審査委員会の承認を受け (承認番号: 1009、1973)、肺がん合併肺線維症患者から同意を得て、当院呼吸器外科で肺切除術を行った摘出肺のうち、非癌部位の線維化領域および非線維化領域の一部を提供いただき、それぞれの領域から肺線維芽細胞を培養・増殖させた。肺線維芽細胞の性質は定量的 PCR ならびに DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析により検討した。線維化領域由来の線維芽細胞を免疫不全マウス SCID-beige に移入し、

ヒト化肺線維症モデルマウスを作成し、各患者由来の細胞が引き起こす線維化の程度と病態の違いを組織学的に解析した。一部の検体に関してはシングルセル遺伝子発現解析を実施し、肺中の細胞集団の変動を解析した。IPF 患者由来の肺線維芽細胞により本モデルの作成に成功した群に対して ASC を投与し、線維化に対する影響を組織学的ならびにコラーゲンアッセイにて評価した。

(2) ASC による肺線維化抑制の分子機序の解明

(1) で得られた各患者の線維化領域ならびに非線維化領域の肺線維芽細胞と ASC を共培養し、線維化関連遺伝子の発現を検討した。また、ASC による標的遺伝子を探索するために、DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を実施した。同定した標的遺伝子の発現プラスミドを導入し、ASC 標的遺伝子の過剰発現が線維化に与える影響を解析した。さらに、ASC の培養上清の成分を分析し、その成分により肺線維芽細胞を刺激することで線維化抑制が可能であるかを検討した。

4. 研究成果

(1) ヒト化肺線維症モデルマウスにおける ASC の効果検討

様々な背景をもつ肺がん合併肺線維症患者から肺検体を提供いただき、線維化領域ならびに非線維化領域由来の線維芽細胞の樹立に成功した。線維化領域由来の線維芽細胞は、非線維化領域の細胞と比較して、I 型コラーゲンなどの線維化関連因子の発現が高い傾向にあったことから、線維化部の細胞はより活性化した状態にあると考えられた。そこで、IPF 患者の線維化領域と非線維化領域の線維芽細胞の性質の違いを DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析により比較し、線維化領域の線維芽細胞に高発現する遺伝子 ANGPTL4 を同定した。肺線維芽細胞を用いた *in vitro* 解析ならびに BLM 肺線維症モデルマウスの解析から、ANGPTL4 は線維芽細胞の活性化を促進すること、その発現調節によって線維化を制御できることを明らかにした (Am J Respir Cell Mol Biol. 2023, In press)。

次に、各肺線維症患者の線維化領域由来の肺線維芽細胞を SCID-beige マウスに移入し、肺線維化が誘導されるかをマッソン・トリクローム染色により検討した。肺線維症患者の背景に関わらず、17 例中 14 例の線維芽細胞の投与によって肺中にコラーゲン結合組織線維が検出され、肺線維症を発症することを確認した。投与する線維芽細胞によってコラーゲンの沈着量、すなわち線維化の程度に差が見られた。そこで、線維化誘導能が異なる 3 例の IPF 患者由来の線維芽細胞を用いてヒト化肺線維症モデルマウスを作製し、肺中の細胞のシングルセル遺伝子発現解析を実施した。線維化誘導能が高い線維芽細胞を投与した個体の肺の細胞集団は、線維化誘導能が低い線維芽細胞を投与した個体と大きく異なっていることが確認された。これらの結果から、ヒト化肺線維症マウスモデルでは、投与したヒト線維芽細胞が肺中の種々の細胞に影響を与え、線維化を誘導していることが示唆され、IPF 治療においては肺内での多様な細胞間相互作用を制御することの重要性が考えられた。

次に、肺線維芽細胞によって誘導したヒト化肺線維症マウスモデルに対して ASC を投与し、線維化が抑制できるかを、肺組織のマッソン・トリクローム染色ならびに肺中コラーゲン量測定により評価した。本実験は、IPF 患者として診断された 9 例の肺線維芽細胞を用いて行い、6 例で ASC 投与による線維化抑制が認められた。この結果から、ASC に対して反応性が低い患者が存在するものの、一定の患者に ASC の治療効果が期待できると考えられた。

(2) ASCによる肺線維化抑制の分子機序の解明

肺線維症患者の線維芽細胞のうち、ASCが有効な線維芽細胞と不応答性の線維芽細胞を用いてASCとの共培養を行い、変動する遺伝子をDNAマイクロアレイにより網羅的に解析した。患者および由来する領域の違いによってASCに反応する遺伝子群が大きく異なっていたが、共通して筋線維芽細胞マーカーであるalpha-smooth muscle actin (ACTA2)の発現がASCとの共培養によって低下した。一方、ASCとの共培養によりIPF患者の線維化領域由来の線維芽細胞に選択的に発現上昇する遺伝子としてPTPRR (Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type R)を見いだした。PTPRRは細胞の増殖や活性化に関わるMAP kinaseシグナル伝達経路においてERK1/2の脱リン酸化を誘導することが知られている。実際に肺線維芽細胞とASCとの共培養により、肺線維芽細胞におけるERK1/2のリン酸化が抑制された。また、肺線維芽細胞にPTPRRを過剰発現させることで、ERK1/2のリン酸化と線維化関連遺伝子の発現が抑制された。これらの結果から、ASCの作用で発現が促進されたPTPRRにより、リン酸化ERKの脱リン酸化が起こり、線維化に参与する細胞の増殖や活性化が抑制できることが示唆された。

間葉系幹細胞(MSC)による組織修復には、MSCの標的臓器の細胞への分化、細胞融合、サイトカインやexosomeの分泌といった様々な機序が報告されている(Stem Cell Res Ther 7:125, 2016)。申請者らによる*in vitro*実験において、ASCは細胞接触なしに抗線維化作用を示したことから、ASCの培養上清中に分泌される有効成分を分析し、高濃度で分泌されている物質Xを特定した。物質Xはそのシグナル伝達経路からASCによる線維化抑制成分ではないかと推測し、患者由来線維芽細胞を物質Xで刺激した。その結果、線維芽細胞は物質Xの刺激によってPTPRRの発現が上昇し、筋線維芽細胞マーカーであるACTA2やI型コラーゲンの発現が低下した。これらの結果から、物質XはASCが産生する線維化抑制分子の一つであることが示唆された。

以上に示したように、本研究において、ASCはIPFの病態に類似したヒト化肺線維症モデルにおいて、様々なIPF患者由来の細胞に対して肺線維化抑制効果を持つことを明らかにした。その抗線維化作用の機序としては、ASCから分泌される物質Xが線維芽細胞にPTPRRの発現を誘導し、MAP kinase経路を阻害することで線維芽細胞の機能を抑制することが示唆された。本成果は、ASCのIPFモデルに対する治療効果の実証に加え、ASCの有効性のマーカーとして、血中の物質Xの濃度や、肺線維芽細胞におけるPTPRRの発現誘導レベルが応用可能となると考えられ、IPFに対するASCを用いた幹細胞療法確立へと発展が期待できる。また、本研究は、個々のIPF患者に由来する線維芽細胞の性質(特にそれぞれの患者由来細胞の遺伝子発現やASC応答性遺伝子)や線維化誘導における肺内の細胞の相互影響の理解、新規の線維化増悪化因子の同定に繋がっており、IPFの病態理解や新規治療法の開発に対しても発展が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 Shoichiro Saito, Masahiro Kitabatake, Noriko Ouji-Sageshima, Tatsuro Ogawa, Akihisa Oda, Tomoko Nishimura, Tatsuki Nishioka, Satoki Fushimi, Atsushi Hara, Shigeyuki Shichino, Makiko Kumamoto, Shigeto Hontsu, Takeshi Kawaguchi, Satoshi Ueha, Noriyoshi Sawabata, Shigeo Muro, Kouji Matsushima, Toshihiro Ito	4. 巻 -
2. 論文標題 Angiopoietin-like 4 is a critical regulator of fibroblasts during pulmonary fibrosis development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Am J Respir Cell Mol Biol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1165/rcmb.2022-03040C	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 Makiko Kumamoto, Kaoru Hamada, Chiho Ohbayashi, Shinji Tamaki, Shigeo Muro	4. 巻 15
2. 論文標題 Difficulties in Differentiating Osteosclerosis in Patients With Multifocal Micronodular Pneumocyte Hyperplasia and Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cureus	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7759/cureus.35659.	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 熊本 牧子, 室 繁郎	4. 巻 36
2. 論文標題 【特発性間質性肺炎:臨床診断の現状と課題】気腫合併間質性肺炎(CPFE)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 呼吸器内科	6. 最初と最後の頁 131-136
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 無
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 齊藤正一郎, 北畠正大, 王寺典子, 熊本牧子, 西村知子, 本津茂人, 安川元章, 川口剛史, 澤端章好, 谷口繁樹, 室繁郎, 伊藤利洋
2. 発表標題 特発性肺線維症におけるAngiopoietin-like 4の役割-ヒト肺検体とマウスモデルでの検討
3. 学会等名 第61回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2021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	伊藤 利洋 (Ito Toshihiro) (00595712)	奈良県立医科大学・医学部・教授 (24601)	
研究分担者	室 繁郎 (Muro Shigeo) (60344454)	奈良県立医科大学・医学部・教授 (24601)	
研究分担者	北畠 正大 (Kitabatake Masahiro) (60457588)	奈良県立医科大学・医学部・講師 (24601)	

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