

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09291

研究課題名(和文) プレオマイシン誘導性肺線維症モデルにおける骨髄由来VEGFR1陽性細胞の役割

研究課題名(英文) The role of vascular endothelial growth factor receptor 1 tyrosine kinase signaling in bleomycin-induced pulmonary fibrosis

研究代表者

松井 啓夫 (Mastui, Yoshio)

北里大学・医学部・助教

研究者番号：00365123

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)：特発性肺線維症は予後不良な疾患である。その肺組織で血管新生促進因子であるVEGFの発現増加を認め、病気の進行と相関関係があると考えられている。我々はVEGFR1-TK signalが血管新生に関与することを以前報告した。申請者はVEGFR1-TK signalが肺の線維化形成に関与するか否か野生型(WT)及びVEGFR1TK欠損マウス(TKKO)を用いてプレオマイシン誘発肺線維症モデルを作成し比較検討を行い、VEGFR1-TK signalを介し肺組織で発現したSDF-1はCXCR7/CXCR4経路で骨髄組織からVEGFR1陽性細胞を動員させることで肺の線維化を促進させることが明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性肺線維症(Idiopathic Pulmonary Fibrosis: IPF)は、特発性間質性肺炎の中で最も頻度が高く、かつ予後不良な疾患である。肺に不可逆的に進行する線維化をきたし呼吸機能が低下して致死的になる。IPFの肺組織では、Vascular Endothelial Growth Factor(VEGF)の発現増加を認め、病気の進行とそれらの発現に相関関係があると考えられている。LM誘発肺線維症モデルを用いて、肺線維症の病態進行にVEGFR1-TKシグナルが関与しているか解明することにした。本研究の成果は特発性肺線維症に対し新たな治療薬の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Idiopathic pulmonary fibrosis is a lethal lung disease with a poor prognosis. Fibroblast proliferation amplifies extracellular matrix deposition and increases angiogenesis. VEGF is one of the most potent angiogenic factors. VEGF interacts with VEGF receptors (VEGFR1 and VEGFR2). We hypothesized that VEGFR1-TK signaling might be related to pulmonary fibrosis. C57Bl/6 wild-type (WT) mice and VEGFR1 TK knockout mice (TKKO mice) were treated with bleomycin. The expression of type I collagen, S100A4, and TGF- $\beta$  was also significantly reduced in TKKO mice. TKKO mice also had significantly lower levels of SDF-1 in the lungs and plasma. Moreover, the CXCR7 and CXCR4, the receptors for SDF-1, was also suppressed in TKKO mice. Treatment with a CXCR4 antibody decreased the accumulation of VEGFR1+ cells in the lung in WT mice but not in TKKO mice. These results suggest that VEGFR1 TK signaling promotes BLM-induced pulmonary fibrosis by activating the SDF-1/CXCR4 axis in infiltrating VEGFR1+ cells.

研究分野：薬理学、呼吸薬理学、分子標的治療薬

キーワード：肺線維症 プレオマイシン VEGFR1 TK SDF-1 CXCR4

### 1. 研究開始当初の背景

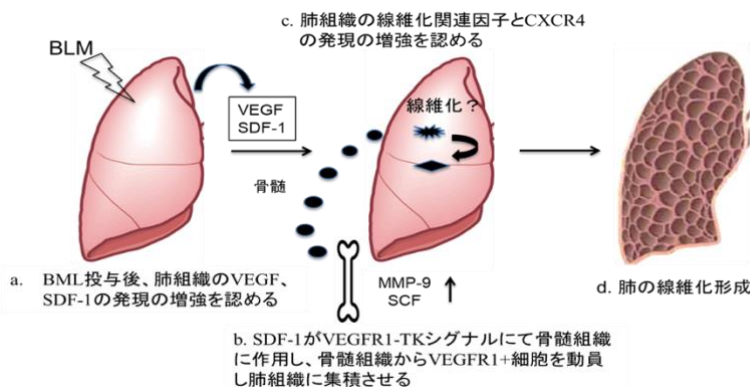
特発性肺線維症 (Idiopathic Pulmonary Fibrosis : IPF) は、特発性間質性肺炎の中で最も頻度が高く、かつ予後不良な疾患である。多くは 50 歳以降に発症し、肺に不可逆的に進行する線維化をきたし呼吸機能が低下して致死的になる。喫煙、慢性ウイルス感染症、胃食道反射や遺伝などが原因と考えられているが詳細は不明である。IPF の肺組織では、Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)、Platelet-Derived Growth Factor (PDGF)、Fibroblast Growth Factor (FGF) などの発現増加を認め、病気の進行とそれらの発現に相関関係があると考えられている (Chest. 2012)。VEGF は代表的な血管新生刺激因子の一つで、肺では正常肺組織を維持する役割があり、肺胞構造の維持に必要不可欠と考えられている。VEGF は、VEGF 受容体 (VEGF receptor; VEGFR) に結合し作用を惹起する。VEGFR には 3 種類 (VEGFR1-3) あり、受容体 Tyrosine Kinase (TK) に結合し活性化される。ブレオマイシン (BLM) 誘発性肺線維症モデルで形成される肺の線維化形成は VEGF 阻害薬で抑制を認めた (Proteomics. 2016)。この結果より、肺の線維化形成に VEGF が関与している事が考えられた。

更に我々は創傷治癒モデルを用いて骨髄由来の VEGFR1 陽性細胞が創傷治癒および線維化に関与することを報告した (Anat Sci Int. 2018)。肺の線維化形成に VEGFR1-TK シグナルは関与しているのか？骨髄由来の VEGFR1 陽性細胞は線維化細胞に分化していくのか？これらの疑問点が明らかになれば、新たな治療方法を見出す可能性がある。そこで申請者は BLM 誘発肺線維症モデルを用いて、肺線維症の病態進行に VEGFR1-TK シグナルが関与しているか解明することにした。本研究の成果は特発性肺線維症に対し新たな治療薬の開発につながる可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、新規治療薬の開発即ち VEGFR1-TK シグナルを阻害する薬物が IPF の治療薬となり得る可能性である。VEGFR1-TK シグナルによる VEGFR1<sup>+</sup>細胞の集積が肺の線維化形成を増強させるか否か解明することは、肺の線維化予防及び治療において非常に重要である。目的を実現するために以下に記したことを明らかにすることにした。

- ① BLM投与後、肺組織中のStromal Cell Derived Factor-1 (SDF-1)の発現の増強を認めるか。
- ② SDF-1が骨髄組織に作用し、末梢血液および肺組織中にVEGFR1<sup>+</sup>細胞を動員するか。
- ③ 肺組織中に線維化関連因子およびSDF-1の特異的受容体であるCXCR4の発現の増強を認めるか(下図)を解明することにした。



### 3. 研究の方法

#### (a)2019 年度

#### 肺線維化形成の過程における VEGFR1 シグナリングの関与の検討

##### 1.ブレオマイシン誘導性肺線維症モデルの作製

WT 及び VEGFR1-TKKO にブレオマイシン (20μg/ 50μl)を経気管的に散布(10μg/ g)し肺線維症モデルを作製した

##### 2.肺の線維化の評価

###### ①肺の機能的評価

WT 及び VEGFR1-TKKO で肺線維症モデルを作製し、28 日目に Flexivent を使用して肺の柔らかさ(コンプライアンス)と肺の弾性抵抗(エラスタンス)の評価を行った。

###### ②肺線維化領域の測定

摘出肺をヘマトキシリンエオジン染色(HE 染色)にて線維化部分の面積を NIH image ソフトを用いて計算し定量を行った。

### ③肺組織での SDF-1 の mRNA 発現効果の検討

ブレオマイシン曝露後、臓器中の SDF-1 や VEGF の発現の増強を認める。WT 及び VEGFR1-TKKO でモデル作製後、経時的に定量的 PCR を用いて肺組織中の SDF-1 及び VEGF の発現の測定を行った。

## (b)2020 年度

VEGF や SDF-1 は、骨髄に作用し発生・分化促進因子である Stem Cell Factor (SCF)や Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)の発現を増強させ末梢血液に VEGFR1<sup>+</sup>細胞を動員させる作用が認められている。2020 年度は以下に記す 3 つを中に焦点に当て研究をすることにした。即ち、① Stem cell factor (SCF)、MMP-9 などの発生・分化促進因子の発現の違い②末梢血液及び肺組織での VEGFR1<sup>+</sup>細胞の発現の違い③肺組織での CXCR4 や線維関連因子の発現の違いを認めるか否かを検討することにした。

### 1.SCF 及び MMP-9 の発現効果の検討

末梢血液中の SCF 及び骨髄組織中の MMP-9 の前駆体である pro-MMP-9 濃度を経時的 ELISA kit を用いて測定を行った。

### 2.末梢血液及び肺組織での VEGFR1<sup>+</sup>細胞の発現の検討

末梢血液中の VEGFR1<sup>+</sup>細胞の発現は当学部の免疫学教室の江島准教授(現在北里大学理学部免疫学教室)と共同研究を行うことでフローサイトメトリーを用いて検討を行った。また、肺組織に集積した VEGFR1<sup>+</sup>細胞は免疫組織化学を用いて定量的評価を行った。

### 3.肺組織での CXCR4 及び線維関連因子の mRNA 発現効果の検討

WT 及び VEGFR1-TKKO でモデル作製後、経時的に CXCR4 及び線維関連因子の S100 calcium binding protein A4 (S100A4)、Type1 Collagen、Transforming Growth Factor- beta (TGF-β)の mRNA 発現について定量的 PCR を用いて評価した。

## ◎2021-22 年度

2021 年度は肺に集積した VEGFR1<sup>+</sup>細胞が本当に線維化に関与するか否か確認するために①CXCR4 中和抗体を投与後 VEGFR1<sup>+</sup>細胞の集積および肺の線維化に関与するか?②集積した VEGFR1<sup>+</sup>細胞が線維化のマーカーを発現しているか③WT に VEGFR1-TK の骨髄細胞を移植したマウスに肺の線維化が抑制されるか否かの 3 つを検討することにした。新型コロナウイルス感染症のため研究活動に占める時間が前年度と比較し少なくなったため研究費の延長を申請し、上記の研究を 2022 年度も行うことにした。

### 1.CXCR4 中和抗体による肺の線維化の抑制効果の検討

WT 及び VEGFR1-TKKO でモデル作製後、4 週間、隔日に CXCR4 中和抗体を腹腔内投与した。4 週間後に H.E 染色にて線維化の部分の面積を NIH image を用いて測定を行った。さらに、肺の機能的評価及び免疫組織化学にて肺組織に集積した VEGFR1<sup>+</sup>細胞数を測定した。

### 2. VEGFR1<sup>+</sup>細胞の線維化マーカーの発現効果の検討

WT 及び VEGFR1-TKKO でモデル作製後、4 週間後に肺組織を摘出。集積した VEGFR1<sup>+</sup>細胞に S100A4, type1 Collagen, TGF-β が免疫組織化学施行して染色されるか否かの検討を行った。

### 3.骨髄移植による肺の線維化の抑制効果の検討

WT に VEGFR1-TKKO の骨髄を移植後、モデルを作製。4 週間後、肺の機能的評価及び組織像で線維化の部分の面積の測定を行った。

### 4.SDF-1 を投与した時の肺組織に集積する VEGFR1<sup>+</sup>細胞数及び肺の線維化形成の検討

VEGFR1-TKKO でモデル作製後、SDF-1(400ng/day)を 7 日間投与し、4 週間後 H.E 染色にて線維化の部分の面積を NIH image を用いて測定を行った。また、肺組織に集積した VEGFR1<sup>+</sup>細胞は免疫組織化学を用いて定量的評価を行った。

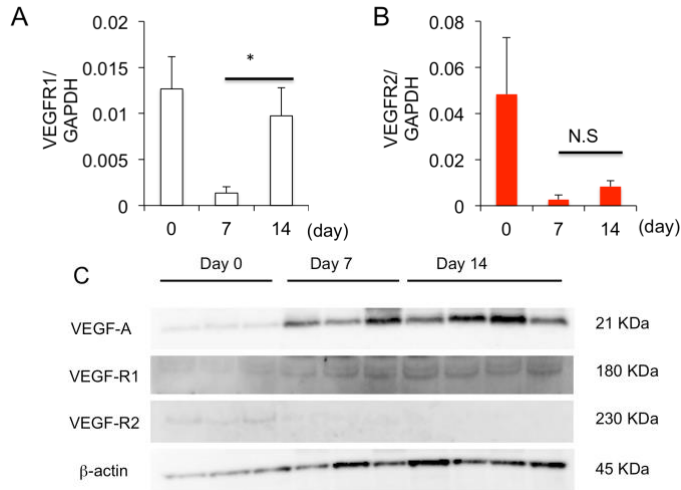
### 5.VEGFR1-TKKO に SDF-1 投与後の肺の機能評価の検討

VEGFR1-TKKO でモデル作製後、SDF-1(400ng/day)を 7 日間投与し、4 週間後に Flexivent を使用して肺の柔らかさ(コンプライアンス)と肺の弾性抵抗(エラストランス)の評価を行った。

## 4. 研究成果

### 1. VEGFR1-TK signal の肺線維化の形成効果の検討

WT に BLM 投与後、肺組織における VEGFR1 及び 2 の発現を定量的 PCR とウエスタンブロットを用いて経時的に検討すると 14 日目まで VEGFR2 と比較し VEGFR1 の発現の著明な増強を認めた(次頁の図)。この結果より肺の線維化に VEGFR1-TK signal が重要な役割を担っていることが推測された。



内因性に VEGFR1-TK signal が欠損している VEGFR1-TKKO と WT で BLM 誘発とを比較検討することにした。

## 2. 肺の線維化の評価

WT に BLM 投与後、4 週目に Flexivent を用いて肺の機能評価を行ったところ、VEGFR1-TKKO は WT と比較し有意に肺の弾性抵抗(エラストランス)の減弱また反対に有意に肺の柔らかさ(コンプライアンス)の増強を認めた。また肺の線維化部分の面積も WT と比較し VEGFR1-TKKO は有意に低下を認めた。この結果より VEGFR1-TK signal が肺の線維化形成に重要な役割を担っていることが示唆された。

## 3. BLM 投与後の肺組織での SDF-1 の発現の検討

WT 及び VEGFR1-TKKO に BLM 投与後、継時的に肺組織における SDF-1 の発現をタンパクレベル及び mRNA レベルで検討すると VEGFR1-TKKO は WT と比較し有意に SDF-1 の発現の低下を認めた。VEGF-A の発現は WT 及び VEGFR1-TKKO で有意差が認められなかった。

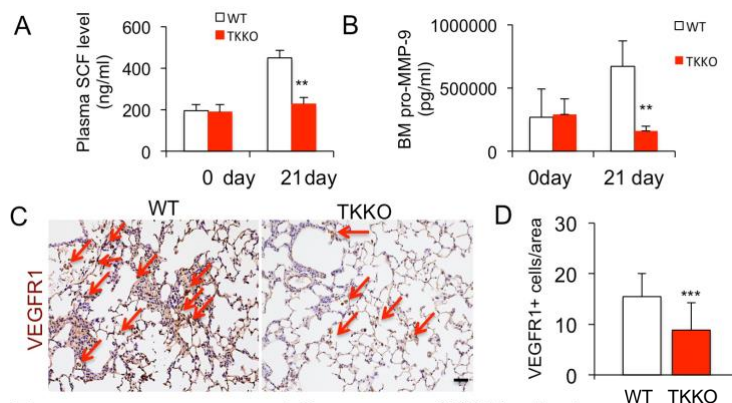
VEGF や SDF-1 は、骨髄に作用し発生・分化促進因子である Stem Cell Factor (SCF) や Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) の発現を増強させ末梢血液に VEGFR1<sup>+</sup>細胞を動員させる作用が認められている。上記で記したように、WT 及び VEGFR1-TKKO の間で SDF-1 の発現に差が認められてことで SDF-1 の発現が VEGFR1-TK signal に依存していることが考えられ、WT よ VEGFR1-TKKO で SCF 及び MMP-9 の発現に差があるか否かまた肺組織に集積する VEGFR1 陽性細胞に差が生じるか否か検討することにした。

## 4. SCF 及び MMP-9 の発現効果の検討

WT と比較し、VEGFR1-TKKO で末梢血液中の SCF 濃度及び骨髄組織中の pro-MMP-9 濃度の有意な低下を認めた(下図 A,B)。この結果より WT 及び VEGFR1-TKKO で骨髄機能の差つまり末梢血液に骨髄由来の細胞を動員する機能に差があることが推測された。

## 5. 末梢血液及び肺組織での VEGFR1<sup>+</sup>細胞の発現の検討

末梢血液中の VEGFR1<sup>+</sup>細胞の発現は当学部の免疫学教室の江島准教授(現在北里大学理学部免疫学教室)と共同研究を行うことでフローサイトメトリーを用いて検討を行い、VEGFR1-TKKO で有意に VEGFR1 陽性細胞の低下を認めていることを突き詰めた。また、肺組織に集積した VEGFR1<sup>+</sup>細胞も WT と比較し VEGFR1-TKKO で肺組織に集積する VEGFR1 陽性細胞数の低下を認めた(下図 C,D)。この結果より VEGFR1-TK signal を介して肺組織に VEGFR1 陽性細胞を集積することで肺の線維化を促進していることは考えられた。



#### 5. 肺組織での CXCR4, CXCR7 及び線維関連因子の mRNA 発現効果の検討

SDF-1 は CXCR4 と CXCR7 の 2 つの受容体を介し作用を惹起する。BLM 投与後の肺組織で VEGFR1-TKKO は WT と比較し CXCR7 は 7,14 日、CXCR4 は 14,21 日で有意に発現の低下を認めた。この結果より CXCR7 は CXCR4 より早期に発現し、線維化形成に関与する因子であることが推測された。CXCR7 から CXCR4 の発現 switch の機序の詳細は今回の研究から明らかにすることができなかった。CXCR7 抗体を使用する実験を行うなど今後の更なる探究が必要である。

線維関連因子である TNF-alpha, S100A4, Type 1 Collagen, TGF-beta の発現も WT と比較し、VEGFR1TKKO では有意に低下を認めた。以上のことから VEGFR1-TK signal は SDF-1-CXCR7/CXCR4 を介し線維化関連因子の発現を増強していることが示唆された。

#### 6. CXCR4 中和抗体による肺の線維化の抑制効果の検討

SDF-1-CXCR7/CXCR4 経路が線維化に関連しているか検討するために WT 及び VEGFR1-TKKO に BLM 投与後、CXCR4 中和抗体を投与し、肺の線維化形成について検討を行った。WT で CXCR4 抗体投与群は対象群(IgG)と比較し有意に肺の線維化の抑制を認めた。一方、VEGFR1-TKKO では CXCR4 抗体投与群と対象群(IgG)では変化は認められなかった。更にその時に肺組織に集積する VEGFR1 陽性細胞数も WT では CXCR4 抗体を投与すると対象群と比較し有意に集積数の低下を認めたが、VEGFR1-TKKO では変化が認められなかった。このことから SDF-1/CXCR4 経路を介し肺に VEGFR1 陽性細胞が集積することで肺の線維化形成が促進されそれが VEGFR-1 TK signal に依存していることが明らかになった。

#### 7. 骨髄移植による肺の線維化の抑制効果の検討

WT に VEGFR1-TKKO の骨髄を移植後、モデルを作製。4 週間後、肺の機能的評価及び組織像で線維化の部分の面積の測定を行ったところ、肺の線維化の形成が WT に WT の骨髄組織移植群と比較し抑制傾向を示した。個体により数値のばらつきを認めたため、同様な実験を施行するも統計学的に有意差を認めることができなかった。

#### 8. SDF-1 を投与した時の肺組織に集積する VEGFR1<sup>+</sup>細胞数及び肺の線維化形成の検討

実際 SDF-1-CXCR7/CXCR4 経路が VEGFR1 陽性細胞を肺に集積することで肺の線維化を促進するか否か VEGFR1TKKO でモデル作製後、SDF-1(400ng/day)を 7 日間投与し、4 週間後、肺組織を摘出したところ、対象群と比較し肺の線維化面積の増大を認めた。更に、肺組織に集積する VEGFR1 陽性細胞数の増加を認めた。この結果より SDF-1 が CXCR7/CXCR4 経路を介し VEGFR1 陽性細胞を肺に集積することが示唆された。

今回の研究結果より BLM 誘発モデルで VEGFR1-TK signal を介し肺組織で発現した SDF-1 は CXCR7/CXCR4 経路で骨髄組織から VEGFR1 陽性細胞を動員させ肺組織に集積させることで肺の線維化を促進させることが明らかになった。VEGFR1-TK 阻害薬が今後、特発性肺線維症に対する新たな治療薬の一つになりうることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Amano Hideki, Matsui Yoshio, Hatanaka Ko, Hosono Kanako, Ito Yoshiya	4. 巻 41
2. 論文標題 VEGFR1-tyrosine kinase signaling in pulmonary fibrosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	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） 10.1186/s41232-021-00166-7	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 Satoh Y, Matsuo Y, Kuba T, Yamashita K, Sawano M, Tozaka S, Yamazaki H, Sonoda D, Mikubo M, Naito M, Matsui Y, Shiomi K, Yoshida T, Murakumo Y.	4. 巻 476
2. 論文標題 EGFR mutation genotyping and ALK status determination in liquid-based cytology samples of non-small cell lung cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virchows Arch	6. 最初と最後の頁 753-762
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00428-019-02692-9	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 Matsushima K, Ono M, Hayashi S, Sonoda D, Matsui Y, Shiomi K, Satoh Y, Ohbu M.	4. 巻 68
2. 論文標題 Resection of intra-pulmonary endometriosis by video-assisted thoracoscopic surgery under pre-operative CT-guided marking synchronized with menstrual cycle	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gen Thorac Cardiovasc Surg	6. 最初と最後の頁 549-553
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11748-019-01175-7	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 Satoh Y, Hayashi S, Naito M, Matsui Y.	4. 巻 73
2. 論文標題 Introduction of Minimally Invasive Thoracoscopic Surgery for the Anterior Mediastinum;Subxiphoid Video-assisted Thoracoscopic Thymectomy and Robot-assisted Thymectomy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Kyobu Geka	6. 最初と最後の頁 274-279
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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松島 圭吾, 三井 愛, 玉川 達, 林 祥子, 内藤 雅仁, 松井 啓夫, 塩見 和, 栃本 昌孝, 一戸 昌明, 蔣 世旭, 佐藤 之俊
2. 発表標題 術後21年目に胸膜播種再発を認めた胸腺原発粘表皮癌の1例
3. 学会等名 肺癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丸山 来輝, 松島 圭吾, 三窪 将史, 松井 啓夫, 塩見 和, 佐藤 之俊
2. 発表標題 無汗性外胚葉形成不全症に伴う感染性肺嚢胞の1切除例
3. 学会等名 呼吸器外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三井 愛, 松島 圭吾, 玉川 達, 林 祥子, 内藤 雅仁, 松井 啓夫, 塩見 和, 佐藤 之俊, 一戸 昌明
2. 発表標題 右肺中葉低形成に発生した定型カルチノイド3例の検討
3. 学会等名 肺癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 玉川 達, 三井 愛, 林 祥子, 内藤 雅仁, 松井 啓夫, 塩見 和, 佐藤 之俊
2. 発表標題 肺癌術前における耐術能検査としての負荷心電図検査適応の検討
3. 学会等名 呼吸器外科学会
4. 発表年 2020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	江島 耕二  (Eshima Koji)  (30327324)	北里大学・医学部・准教授   (32607)	
研究 分担者	天野 英樹  (Amano Hideki)  (60296481)	北里大学・医学部・教授   (32607)	

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