

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17647

研究課題名（和文）肺線維症肺線維芽細胞の機能解析から新規抗線維化薬創薬への展開

研究課題名（英文）Functional Analysis of Pulmonary Fibrosis Pulmonary Fibroblasts for Novel Antifibrotic Drug Development.

研究代表者

小山 良（Koyama, Ryo）

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10365611

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：リゾホスファチジン酸は、LPA受容体を介したオートタキシンの作用により細胞外に生成され、特発性肺線維症患者において線維化を誘導することが知られている。肺線維症肺線維芽細胞の機能活性に關する網羅的Gene解析から新規線維化制御因子を探索し、Rho/ROCK経路を介した肺線維芽細胞の生理機能活性に着目した。肺線維芽細胞において、オートタキシン/リゾホスファチジン酸経路は、Rho/ROCKを介した線維化を制御する重要な治療標的となりうることを証明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺線維症の線維化のメカニズムの基礎的研究から創出される、新たな知見がこの未だ有効な治療法のない肺線維症患者のための革新的な新規薬剤への開発へとつながることが十分に期待される。本研究は、実際のヒト肺線維症の肺線維芽細胞を用いて検証する説得性と、肺線維芽細胞を介する直接的な線維化メカニズムの解明により、Rho/ROCK経路を介したオートタキシン/リゾホスファチジン酸経路の線維化を制御する重要な治療標的となりうることを証明した。本研究結果は更なる新規抗線維化薬の開発へ直結する、極めて医学的貢献度の高い研究である。

研究成果の概要（英文）：Lysophosphatidic acid (LPA), generated extracellularly by the action of autotaxin through LPA receptors (LPARs) to induce pro-fibrotic signaling in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. We hypothesized that the autotaxin/LPA axis-induced changes in human lung fibroblasts play an important role in the lung fibrosis. The ability of fibroblasts to mediate TGF- β 1 or LPA inducing migration and contraction of three-dimensional type I collagen gels was assessed in the presence of GLPG1690 and BMS-986020.

GLPG1690 and BMS-986020 significantly suppressed TGF- β 1 and LPA inducing collagen gel contraction, migration and the expression of α -SMA and fibronectin through Rho/ROCK signal ($p < 0.05$). The response to TGF- β 1 and LPA-stimulating collagen gel contraction and migration were greater in lung fibrosis fibroblasts than in normal lung fibroblasts. Autotaxin/LPA axis is the key therapeutic target to suppress Rho/ROCK signal mediated lung fibrosis in lung fibroblasts.

研究分野：間質性肺炎、肺がん、呼吸器疾患

キーワード：特発性肺線維症 肺線維芽細胞 トランスフォーミング増殖因子（TGF- β ）

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

1．研究開始当初の背景

特発性肺線維症（IPF/UIP）は、特発性間質性肺炎の中でも予後不良な疾患である。近年、慢性期においてはピルフェニドンやニンテダニブによる抗線維化療法が治療の主流となっているが、効果は十分といえるものではなく、新たな抗線維化薬の創薬が望まれている。現時点では生存率や健康関連 QOL に寄与する有効性を証明した薬物療法はなく治癒が期待出来ない。よって悪化を阻止することを治療目標とする慢性進行性の難治性肺疾患である。特発性肺線維症は癌に匹敵、あるいはそれ以上の難治性で予後不良の疾患であり、非可逆性の進行病態の解明が遅れているため、有効な治療法の開発は難しく遅れている。その背景には一過性可逆性のプレオマイシン投与による肺線維症動物モデルが旧態依然として使われていることが肺線維症モデルとしては不十分であると指摘されている。線維芽細胞は細胞外基質内に存在する最も基本的な間質細胞である。間質性肺炎では、様々な環境因子により肺胞上皮細胞が傷害され、基底膜が損傷すると、線維芽細胞が肺胞腔内へ遊走する。更に炎症局所で産生された TGF- β や LPA などの線維化促進因子により筋線維芽細胞への分化が促進され、フィブロネクチンなどの細胞外マトリックス産生が亢進し、線維化が進展していく。肺の線維化を強力に促進させる TGF β は強力に活性型の筋線維芽細胞に分化させて、線維化部位に遊走し、細胞外基質の産生と収縮性のストレスファイバーとして α 平滑筋アクチンを産生する。また、肺線維化リモデリングにおいて、LPA は線維芽細胞、上皮細胞に関与しており、特発性肺線維症患者では、気管支肺胞洗浄中の LPA が上昇している。更に、その受容体である LPAR₁ 依存性に線維芽細胞の遊走や血管漏出を引き起こし、LPA₁ 受容体ノックアウトマウスでは、プレオマイシンによる線維化が抑制されることが報告されている。肺線維症の線維芽細胞による線維化病態においては、主に LPA₁ 受容体に関与しているとされている。同時に線維化肺組織では LPA を産生させるオートタキシンが増加していることが確認されており、オートタキシン-LPA 経路が肺線維化病態に強く関与していることが報告されている。

肺線維症の病態において特に活性化された筋線維芽細胞は肺の線維化の病態の悪化に極めて中心的な役割を担っており、遊走、増殖、細胞外基質(ECM)の産生を亢進させて肺線維化を促進する。筋線維芽細胞を介する肺線維化促進から収縮能を持つことで気道腔内の線維化から気道径の狭小化をもたらしその収縮性病態は肺機能や肺構造の維持に致命的な影響を与え肺活量の低下から呼吸不全死の経過に至る。肺線維症患者において肺線維化を促進させる主要な原因である肺線維芽細胞の活性の抑制により、肺機能の悪化を阻止出来れば身体活動の継続可能期間が長くなり予後の改善が十分に期待される。本研究は肺線維

症の革新的な病態の解明及び肺線維芽細胞の機能活性の制御可能な、新たな線維化標的因子の同定を行い、より効果的な新規抗線維化薬剤創薬への開発へとつながるものである。

2．研究の目的

本研究では肺線維症の肺線維芽細胞の特性を健常の肺線維芽細胞と比較検討し肺線維芽細胞を通した肺線維症の病態の解明及び新規治療薬の開発につながる抗線維化作用を検討する事を目的とする。従来までに、様々な肺疾患の肺組織から分離培養された肺線維芽細胞の生理機能解析により、新たな抗線維化標的の探索結果から新規抗線維化薬創薬に結びついた多くの報告がある。この事実はヒト肺線維芽細胞の生理機能は生体外培養環境下においてもその表現型が維持されていることが示唆される。本研究は実際のヒト肺線維症患者の肺線維芽細胞を用いて生理機能活性と表現型を正常肺線維芽細胞と比較検討し、新たな創薬標的となりうる線維化促進因子を探索する先進的なプロジェクトである。

3．研究の方法

(1)肺線維芽細胞を介する線維化制御 Gene の網羅的探索

本研究ではまず、肺の線維化に重要な役割を担う線維芽細胞における 遺伝子レベル 転写プロモーター活性レベルの網羅的プロファイリング解析を行い、肺線維芽細胞の線維化に関わる生理機能活性制御因子の探索を行った。では肺線維芽細胞の生理機能活性を強力に促進させる TGF- β 1 刺激、肺線維化リモデリングに作用する LPA 刺激を正常線維芽細胞に行い、非刺激下と比較して変動する Gene を線維化にかかわる制御候補因子としてマイクロアレイを用いて探索した。では、正常肺線維芽細胞/肺線維症肺線維芽細胞の両群間の転写プロモーター活性の表現型解析として CAGE を導入した。正常肺線維芽細胞と比較して肺線維症肺線維芽細胞において変動する転写活性制御 Gene を肺線維症の病態形成にかかわる制御候補因子として探索した。

(2)線維化制御因子の肺線維芽細胞生理機能活性の解析

上記、 の手法を用いて新たな線維化促進制御因子が実際に肺線維芽細胞の生理機能活性どう関わっているか検討を行った。肺線維芽細胞の生理機能解析として以下の解析を行った。遊走能及び、コラーゲンゲル収縮能に着目し in Vitro による TGF- β 1 や LPA 刺激に対する生理機能活性解析を行った。肺線維芽細胞の Fibronectin に対する遊走能を Boyden chemotaxis chamber 法を用いて評価した。コラーゲンゲル収縮能はゲル中の肺線維芽細胞が細胞外基質の産生と収縮性ストレスファイバーとして α 平滑筋アクチンの産生により誘導されるゲルの収縮の程度を測定する。ゲルの収縮の程度が強ければ線維芽細胞の活性化が亢進したと考えられ in vitro における、肺の線維化に関与する肺線維症肺線維芽細胞の分化及び活性化の仮想モデルとして採用した。また、非小細胞肺癌の手術症例より、正常肺線維芽細胞(Control 群)及び 肺線維症肺線維芽細胞 の分離培養を行った。正常肺 線維芽細胞

に対する 肺線維症肺線維芽細胞 の生理活性機能を行った。また、肺線維芽細胞を介する線維化を制御する、 α 平滑筋アクチンや ECM 産生能、制御シグナル等の解析も行った。

(3)肺線維芽細胞生理機能活性制御因子の機序の解明から抗線維化作用候補薬の機能を検証

肺線維芽細胞の機能活性制御 Gene 及び肺線維症肺線維芽細胞の特異的マーカーとしての Gene の網羅的解析結果から、線維化に関与するシグナルを探索した。TGF- β 1 や LPA 刺激下での遊走能やコラーゲンゲル収縮能の抗線維化作用につながるシグナル阻害剤の抑制効果を検証した。

4 . 研究成果

本研究では、肺線維芽細胞の網羅的制御 Gene の探索結果から、Rho シグナル関連 Gene の発現が亢進していることに着目した。TGF- / LPA 刺激によるゲル収縮・遊走は、Fasudil (Rho キナーゼ阻害剤)により抑制された。肺線維芽細胞における Rho シグナルを介するオートタキシン、リゾホスファチジン酸との関連について解析を行った。TGF- / LPA 刺激で亢進したゲル収縮・遊走は、GLPG1690(ATX 阻害剤)、BMS986020(LPA1 拮抗薬)で抑制された。GLPG1690(ATX 阻害剤)・BMS986020(LPA1 拮抗薬)は、TGF- / LPA 刺激により増強した SMA・Fibronectin 発現を抑制した。TGF- / LPA 刺激により細胞内の ATX 発現が増強すること、両刺激により活性化した RhoA は各阻害剤により抑制された。肺線維症由来線維芽細胞は正常肺線維芽細胞と比較して、TGF- / LPA 刺激でゲル収縮能・遊走能が亢進し、GLPG1690(ATX 阻害剤)・BMS986020 (LPA1 拮抗薬)で抑制される傾向を認めた。これらの結果より、LPA/TGF 刺激による細胞内オートタキシン発現の亢進、LPA や TGF 刺激による Rho/ROCK シグナルの亢進を確認した。LPA または TGF- による Rho/ROCK 経路を介した肺線維芽細胞の生理活性は、オートタキシン阻害剤と LPA1 受容体拮抗薬により抑制された。肺線維芽細胞において、オートタキシン/リゾホスファチジン酸経路は、Rho/ROCK を介した線維化を制御する重要な治療標的と考えられた。本研究成果は現在論文投稿準備中である。

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 Iwai M, Tulafu M, Togo S, Kawaji H, Kadoya K, Namba Y, Jin J, Watanabe J, Okabe T, Hidayat M, Sumiyoshi I, Itoh M, Koyama R, Ito Y, Orimo A, Takamochi K, Oh S, Suzuki K, Hayashizaki Y, Yoshida K, Takahashi K.	4. 巻 15
2. 論文標題 Cancer-associated fibroblast migration in non-small cell lung cancers is modulated by increased integrin 11	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mol Oncol.	6. 最初と最後の頁 1507-1527
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/1878-0261.12937.	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3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Issei Sumiyoshi, Shinsaku Togo, Kotaro Kadoya, Izumi Kaneko, Tomoya Komatsu, Motoyasu Kato, Shun Nakazawa, Hiroaki Motomura, Yusuke Ochi, Junko Watanabe, Moe Iwai, Ryota Kanemaru, Yuichiro Honma, Ryo Koyama, Kazuhisa Takahashi.
2. 発表標題 The lung fibroblast-mediated antifibrotic effects of extracellular vesicles derived from bone marrow mesenchymal stem cells.
3. 学会等名 The 63rd annual meeting of the Japanese Respiratory Society
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yusuke Ochi, Shinsaku Togo, Motoyasu Kato, Issei Sumiyoshi, Junko Watanabe, Moe Iwai, Ryota Kanemaru, Ryo Koyama, Yuichiro Honma, Shun Nakazawa, Hiroaki Motomura, Hitomi Yoshikawa, Kengo Koike, Kazuhisa Takahashi.
2. 発表標題 NOX4-Brd4 interaction induced lung fibroblast-mediated lung fibrosis.
3. 学会等名 The 63rd annual meeting of the Japanese Respiratory Society
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 渡邊純子, 十合晋作, 住吉一誠, 越智裕介, 金丸良太, 加藤元康, 小山良, 高橋和久
2. 発表標題 肺線維芽細胞におけるRho/ROCKシグナルを介したオートタキシン-リゾホスファチジン酸経路による肺線維化機序の解明
3. 学会等名 第63回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2023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
---------	---------