

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K17886

研究課題名（和文）免疫担当細胞の細胞代謝を利用した自己免疫疾患の新規治療

研究課題名（英文）cellar metabolism is the target of immune mediated lung fibrosis

研究代表者

岡野 隆一（Okano, Takaichi）

神戸大学・医学部附属病院・特定助教

研究者番号：40816039

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）：膠原病関連肺線維症において確実に効果を見込める治療効果は多くはない。特に、難病とされるヒトの全身性強皮症において、炎症を止めるとされる副腎ホルモン剤などの治療が線維化になら効果がなく、予後改善効果に乏しいことが知られている。申請者らは肺線維症が発症する過程において、線維芽細胞が形質変化する際、細胞代謝が著しく変化することに着目し新たな治療法を探索する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在も肺線維症は治療法が乏しく、膠原病における死亡理由の一つを占めている。特に難病である全身性強皮症に対して確立された肺線維症の治療法はあまりない。様々な炎症を対象とした治療法がなされてきたが、いずれも芳しい効果は上げてこなかった。近年線維化そのものを対象とした治療が開発されつつあるが、いまだ十分な予後改善効果のある薬剤は同定されていない。我々は細胞代謝に着目し、新たな治療選択肢を探索する目的で研究を開始した。

研究成果の概要（英文）：The collagen associated lung disease often become the cause of death in collagen tissue disease patient. Lung fibrosis is especially fatal because there are few therapies for improving lung fibrosis. Fibroblasts, which play a key role in lung fibrosis, have dramatically changed their property in fibrosis process. The fibroblast increased glycolysis for activation and switch their cellular metabolism. Therefore, we focused on cellular metabolism in fibroblast. The purpose of our research is the development of new treatment via modulating cellular metabolism in lung fibroblast.

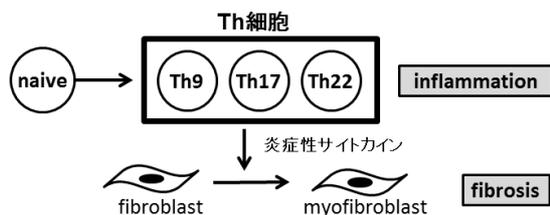
研究分野：免疫学

キーワード：細胞代謝 線維芽細胞 T細胞 膠原病

## 1. 研究開始当初の背景

### Th細胞と強皮症

ブレオマイシン誘導性強皮症モデルマウスは全身の慢性炎症を引き起こし、間質性



Ssc1においてTh細胞は筋線維芽細胞を誘導し線維化を促進する

肺炎、皮膚硬化、腸管の線維化を起こす強皮症モデルマウスである。しかし、強皮症患者において、なぜ慢性炎症から線維化へ至るかは明らかでない。慢性的な炎症から線維化へ至る過程において、様々なTh細胞により繊維芽細胞が活性化した

筋繊維芽細胞に分化し、線維化を促進するとされている[1]。本研究ではTh細胞活性化を阻害し、強皮症を治療するものである。

### 細胞代謝とT細胞分化

T細胞はナイーブT細胞から活性化したのち、様々なエフェクターThに分化し、はじめて機能する。通常、炎症性サイトカイン(IFN、IL-12など)によりTh1細胞やTh17細胞に、抑制性サイトカイン(TGF- $\beta$ 、IL-10など)によりTreg細胞に分化する。Th1細胞やTh17細胞へ分化する際、細胞代謝が変わることが必要であり(Warburg効果)、解糖系が著名に亢進し、脂肪酸酸化が低下する必要がある[2]。

他臓器の免疫性疾患である自己免疫性脳脊髄炎でも別の細胞代謝阻害剤でTh17細胞への分化を抑制し、かつ、Treg細胞を増やすことが報告されており[3]、細胞代謝の調整は自己免疫性疾患全般に応用できる可能性が高い。

### 細胞代謝を阻害する薬剤

細胞代謝の経路はいままで生化学の研究において微細な領域まで研究されてきている。しかし、Th細胞が分化する際代謝プロファイルが変わることが必要である事実は近年明らかとなったばかりである。しかし、細胞内代謝は相互的であり、解糖系が亢進する事実そのものが酸化的リン酸化や脂肪酸酸化の代謝に影響を及ぼしうる。そのため、どの代謝経路を抑えることで、Th細胞にどのような影響がでるのかはあまり明らかにされていない。特に正常なTh細胞と違い、強皮症患者では疾患特異的Th細胞は異常な代謝プロファイルを持ち、一つの経路を阻害するだけでは不十分である可能性が予想される。

## 2. 研究の目的

### 強皮症モデルマウスにおける代謝阻害剤の効果検討

現在各種細胞代謝阻害剤が見出されている。申請者らは特に、解糖系を阻害するBromopyruvate(BrPA)、グルタミンオリシスを阻害する6-diazo-5-oxo-L-norleucine(DON)を用いた。これら細胞代謝阻害剤をもちいて間質性肺炎にどのような影響を与えるかをモデルマウスを用いて検討し、その機序を明らかにすることを目的とす。

### 3. 研究の方法

8-10 週齢の BL/6 マウスを実験に用いた。Osmotic pump を用いてあらかじめ調整したブレオマイシンを 1 週間持続皮下投与して間質性肺炎を発生させた。BrPA、DON、その両者を用いた群について、間質性肺炎の程度を比較検討した。マウスは無治療群(Ctrl)、BrPA 120 mg 皮下投与群(B)、DON 18ug 皮下投与群(D)、および併用群(BD)の 4 群を比較した。間質性肺炎の程度については、炎症については HE 染色を、線維化については MT 染色をもちいて、半定量スコアをもって評価した。具体的には右肺上葉について長軸にそって病理標本を作製し、ランダムで 20 視野を選択し、各々のスコアの平均値を用いて検討した。また、左上葉を用いて線維化について Collagen assay で線維化について評価を行った。さらに、残りの肺葉を用いて TH 17 細胞の割合を検討した。

### 4. 研究成果

申請者らは BrPA 単独でも炎症を阻害することを見出した(図 1)。また、同様に BrPA は単独で線維化を阻害することも証明した(図 2)。しかしながら、BrPA に加え DON を併用した群では BrPA 単独に加えて顕著に炎症および線維化を抑える結果となった(図 1 および図 2)。興味深いことに、炎症スコアについては BrPA 単独、DON 単独でもある程度抑えられることが見出されたが、DON 単独では線維化スコアは無治療群と比較して変化は認められなかった。このことから DON は本来直接線維化を止める力はない、もしくは弱いと推察される。しかしながら、BrPA および DON の併用群では明らかに BrPA 単独より線維化を抑制することから、線維化抑制効果については BrPA と DON は synergistic な作用があると示唆された。

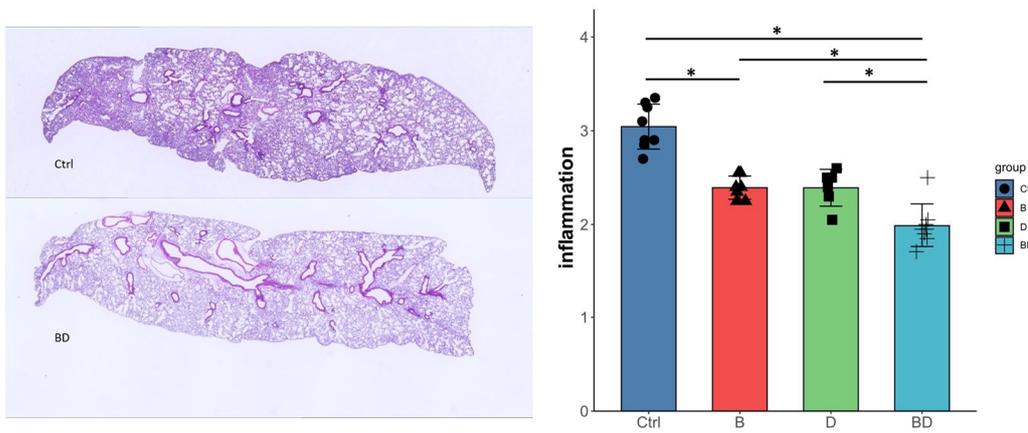


図 1 肺病理と炎症スコア

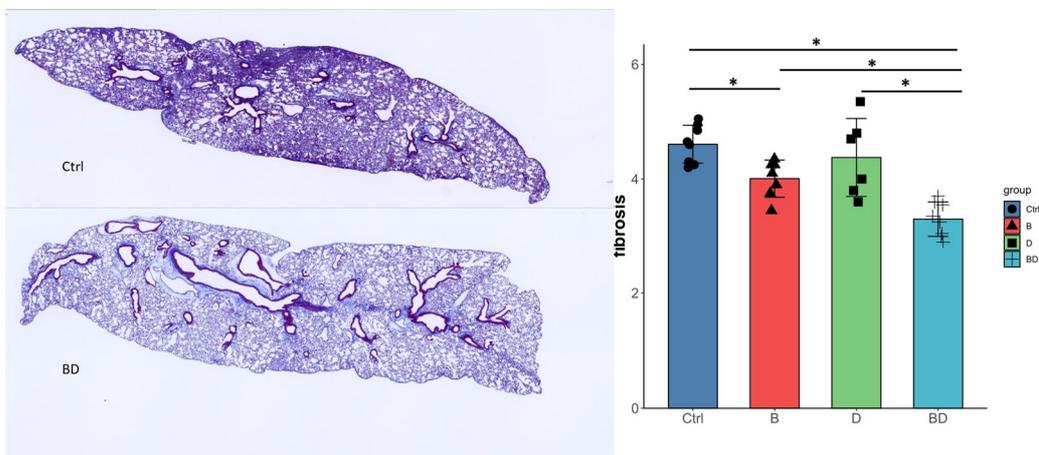


図 2 肺病理と線維化スコア

間質性肺炎を誘導した際、いずれの群も1週間は体重減少傾向を認めた。しかしながらいずれの群でも体重の推移に変化はなかった。代謝阻害剤を使用した群、極端なるい痩はじめ明らかな全身状態の変化は認めなかった(図3)。

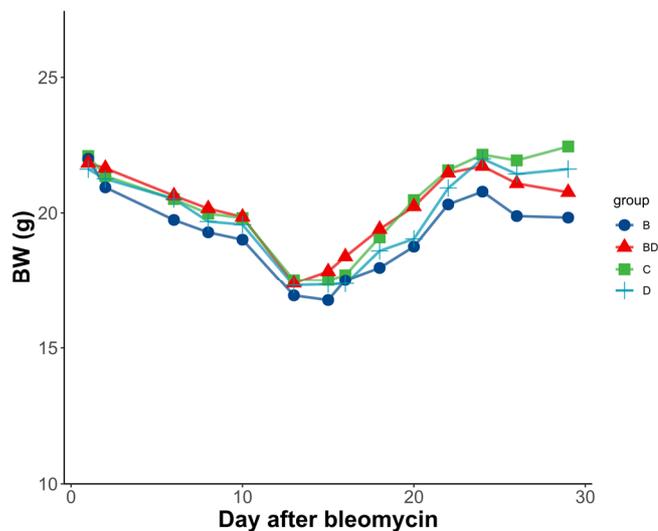


図3

評価した。無治療群ではTH17細胞のが5%±2.1認められていたが併用群では0.9%±2.4有意に減少していた。これらのことから細胞代謝治療剤はTh細胞分化にかかわること、および線維化を阻害することがしめされた。既知の報告からBrPAがTh17細胞分化を阻害することは示されており、今回の実験と合わせてTH17細胞分化が抑制され、肺線維症が軽減したものと推察される。もし仮に線維芽細胞のみに作用した場合、図1で示されたような炎症スコアの改善は見られないことが推察される。この現象は抗線維化剤としてしられるVEGF阻害剤の先行研究でも示されている[4]。炎症および線維化に対して細胞代謝阻害剤が有効であった本研究は炎症および線維化両病態に対しての有効な治療選択となることが推察される。

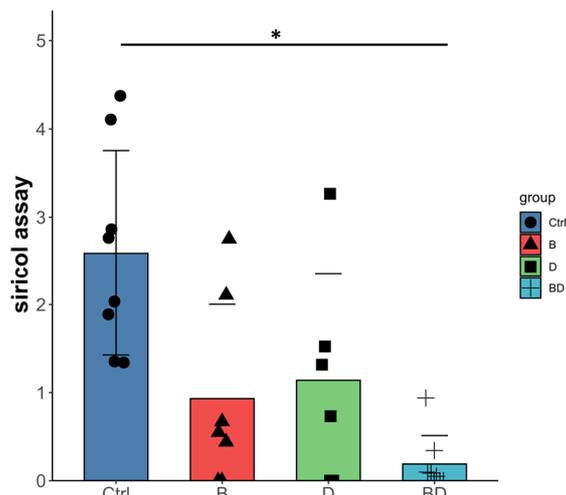


図4

さらに我々はもう一度同じ実験を繰り返して再現性を確認するとともに、肺組織のコラーゲン含有量をCollagenase Assayによって測定した。BrPA単独群、DON単独群と比較し併用群は明らかに線維化を抑えることが示された(図4)。

我々はさらに無治療群および併用群について肺組織をFACSで

参考文献)

[1] Liu M et al. Cytokine Growth Factor Rev. 2016 Apr;28:31-6  
 [2] Ghesquière B et al. Nature. 2014 Jul 10;511(7508):167-76.  
 [3] Shi LZ et al. J Exp Med. 2011 Jul 4;208(7):1367-76  
 [4] J Cell Biochem. 2015 Nov; 116(11): 2484-2493.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------