

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010年

課題番号：20390231

研究課題名（和文）

骨髄由来 fibrocyte の遊走阻害：PDGF の役割と肺線維症治療への展開

研究課題名（英文）

Inhibition of migration of bone marrow-derived fibrocytes: a role of PDGF and development of therapy for pulmonary fibrosis

研究代表者 西岡 安彦 (NISHIOKA YASUHIKO)

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授

研究者番号：70274199

研究成果の概要（和文）：

肺線維症研究として血小板由来増殖因子（PDGF）の fibrocyte に対する作用を検討した。マウスおよびヒト fibrocyte は PDGF レセプターを発現し、PDGF により遊走した。一方、抗 PDGFR 抗体あるいはイマチニブの投与は、マウスブレオマイシン肺線維症モデルにおける fibrocyte の増加を抑制した。以上から、PDGF 阻害による fibrocyte を介した肺線維症治療の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

We hypothesized that PDGF might directly contribute to the migration of fibrocytes to the injured lungs, which inhibited by the blocking of PDGF receptor. Both human and murine fibrocytes expressed PDGF receptors and PDGF proteins strongly stimulated the migration of both human and murine fibrocytes, and their migration was blocked by treatment with anti-PDGF receptor antibodies or imatinib *in vitro*. Furthermore, the number of fibrocytes in the lungs was significantly reduced by administration of anti-PDGFR antibody and imatinib in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. These results suggest that PDGF receptor expressed in circulating fibrocytes contribute to their trafficking into the lungs.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2009年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総計	11,800,000	3,540,000	15,340,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・呼吸器内科学

キーワード：①肺線維症 ②fibrocyte ③PDGF ④PDGF レセプター ⑤イマチニブ

1. 研究開始当初の背景

申請者らは特発性肺線維症（idiopathic pulmonary fibrosis: IPF）に対する分子標的治療法の開発を目的に、肺線維症モデル動物を用いた解析を進めている。その中でトランスレーショナル

リサーチの視点から、開発が先行しているがん分子標的治療薬の抗線維化効果についてスクリーニングすることは重要な抗線維化薬開発研究の重要課題であると考へた。その結果、血小板由来増殖因子（platelet-derived growth factor:

PDGF) のレセプター (PDGFR) 阻害薬であるイマチニブ (グリベック®) に注目し、ブレオマイシン肺線維症モデルを用いて抗線維化効果を検討した。その結果、イマチニブは肺線維芽細胞の増殖を抑制することにより強力な抗線維化作用を發揮することを報告した (*Am J Respir Crit Care Med* 171: 1279-1285, 2005)。一方、肺線維症における線維芽細胞の source として、骨髄由来の fibrocyte の役割が注目されている (*J Clin Invest* 114: 438-446, 2004)。

2. 研究の目的

Fibrocyte の遊走、特に PDGF-PDGFR 経路を介した遊走メカニズムの解明と、fibrocyte の遊走阻害という観点からみた抗線維化療法の可能性について検討するを目的とした。

3. 研究の方法

(1) In vitro 実験

① マウスおよびヒト fibrocyte の単離: マウス fibrocyte は、肺ホモジネートから付着細胞を回収し、CD45 陽性細胞をマグネチックビーズで純化する。ヒト fibrocyte は末梢血単核球よりフィブロネクチンをコートした培養フラスコで培養し、付着細胞を回収し、血球系細胞をマグネチックビーズで除去して純化する。

② PDGFR の発現をフローサイトメトリー法および RT-PCR 法にて検討する。

③ PDGF 刺激による fibrocyte の遊走および増殖反応とイマチニブによる抑制効果を検討する。

④ PDGFR α および β 特異的な阻害抗体の fibrocyte の遊走に及ぼす効果を検討する。

(2) In vivo 実験

① マウスブレオマイシン肺線維症モデルの作成: ブレオマイシン (BLM) 液を含むミニ浸透圧ポンプをマウス皮下に移植し、7日間かけて BLM を投与し、肺線維症モデルを作成する。

② BLM 投与後、経時的にマウス肺から fibrocyte を分離し、肺への集積を検討する。

③ fibrocyte の集積に対するイマチニブ投与効果を検討する。

④ fibrocyte の集積に対する抗 PDGFR 抗体投与効果を検討する。

⑤ 免疫2重染色を用いて、免疫組織学的にマウス肺への fibrocyte の集積を検討する。

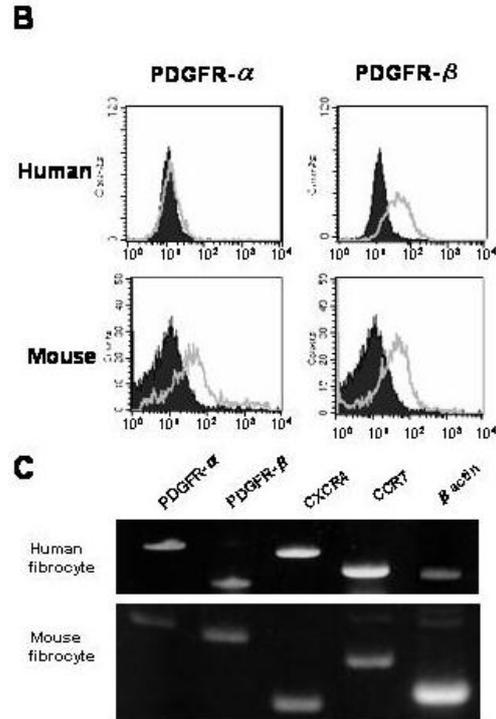
以上から、① fibrocyte の遊走における PDGF の役割、② 肺線維症における fibrocyte の役割が明らかとなることが予想される。

4. 研究成果

(1) マウスおよびヒト fibrocyte は、フ

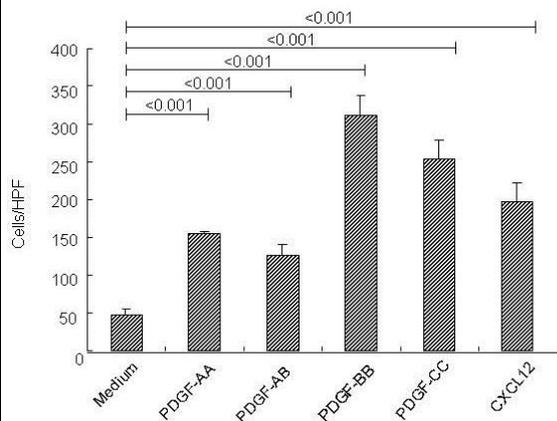
ローサイトメトリー法および RT-PCR 法により PDGF レセプター α および β を発現していた。

(図1 Fibrocyte の PDGFR 発現)



(2) fibrocyte は PDGF により遊走し、中でも PDGF-BB が最も強い遊走活性を示した。

(図2 PDGF に対する fibrocyte の遊走)



(3) fibrocyte の PDGF による遊走は、PDGFR のチロシンキナーゼ阻害薬であるイマチニブによる抑制された。

(4) fibrocyte の PDGF による遊走は、抗 PDGFR 抗体により抑制された。

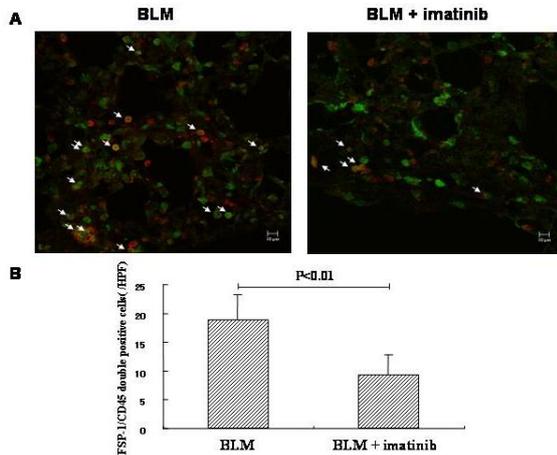
(5) マウスモデルでは、ブレオマイシン投与後 7~10 日目をピークに肺で fibrocyte の増加を認めた。

(6) このマウスモデルでの fibrocyte の

増加は、抗 PDGFR 抗体あるいはイマチニブの投与により抑制された。

(7) 免疫組織学的に、BLM 投与マウス肺では FSP-1+CD45+ の fibrocyte が増加し、その数はイマチニブ投与により減少した。

(図3 マウスモデルにおけるイマチニブの fibrocyte に対する遊走抑制効果)



以上から、fibrocyte の肺への遊走に PDGF が関与していることを示し、その阻害による肺線維症治療の可能性が示唆された。これらの結果は、PDGF の fibrocyte に対する直接の遊走作用を示しており、国内外においても初の成果である。また同時に今後 fibrocyte を標的とした治療法の開発に貢献しうる結果である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 25 件)

1. Kishi J, Nishioka Y, Kuwahara T, Kakiuchi S, Azuma M, Aono Y, Makino H, Kinoshita K, Kishi M, Batmunkh R, Uehara H, Izumi K, Sone S. Blockade of Th1 chemokine receptors ameliorates pulmonary granulomatosis in mice. *Eur Respir J.* 38: 1-10. 2011.
2. Ogawa H, Azuma M, Muto S, Nishioka Y, Honjo A, Tezuka T, Uehara H, Izumi K, Itai A, Sone S. I κ B kinase β inhibitor IMD-0354 suppresses airway remodelling in a *Dermatophagoides pteronyssinus*-sensitized mouse model of chronic asthma. *Clin Exp Allergy.* 41:104-115, 2010.
3. Taniguchi H, Ebina M, Kondoh Y, Ogura

T, Azuma A, Suga M, Taguchi Y, Takahashi H, Nakata K, Sato A, Takeuchi M, Raghu G, Kudoh S, Nukiwa T; Pirfenidone Clinical Study Group in Japan. Pirfenidone in idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J.* 35:821-829, 2010.

4. Sugita A, Ogawa H, Azuma M, Muto S, Honjo A, Yanagawa H, Nishioka Y, Tani K, Itai A, Sone S. Antiallergic and anti-inflammatory effects of a novel I κ B kinase β inhibitor, IMD-0354, in a mouse model of allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol.* 148:186-198, 2009.
5. Wang W, Nishioka Y, Ozaki S, Jalili A, Verma VK, Hanibuchi M, Abe S, Minakuchi K, Matsumoto T, Sone S. Chimeric and humanized anti-HM1.24 antibodies mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity against lung cancer cells. *Lung Cancer.* 63:23-31, 2009.
6. Kishuku M, Nishioka Y, Abe S, Kishi J, Ogino H, Aono Y, Azuma M, Kinoshita K, Batmunkh R, Makino H, Ranjan P, Minakuchi K, Sone S. Expression of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in human monocyte-derived mature dendritic cells contributes to their antiangiogenic property. *J Immunol.* 183:8176-8185, 2009.

[学会発表] (計 86 件)

1. 西岡安彦. 肺線維症における細胞分子病態研究の進歩と臨床. 第 31 回日本呼吸器学会生涯教育講演会 (秋季セミナー) 「呼吸器疾患のめざましい進歩」. 広島. 2010 年 10 月 30 日.
2. M. Azuma, Y. Nishioka, R. Mohammed El-Morshedy, J. Kishi, M. Kishi, H. Uehara, K. Kinoshita, K. Izumi, S. Sone. Effects of the novel immunomodulator sphingosine 1-phosphate (S1P) receptor agonist FTY720 in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. 105th American thoracic society (ATS) (New Orleans, USA), 2010 年 5 月 16 日.
3. M. Kishi, Y. Nishioka, M. Azuma, Y. Aono, B. Rentsenkhand, R. M.

- El-Morshedy, K. Kinoshita, J. Kishi, H. Uehara, K. Iiumi, S. Sone. Antifibrotic effects of APA5 and APB5, blocking antibodies specific for PDGF receptors on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. 105th American thoracic society (ATS) (New Orleans, USA), 2010年5月16日.
4. 岸 昌美, 西岡安彦, 東 桃代, 木下勝弘, 岸 潤, 曾根三郎. プレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスにおけるPDGFレセプター α 、 β 阻害抗体の抗線維化効果. 第50回日本呼吸器学会学術講演会. 2010年4月26日.
 5. 西岡安彦, 岸 潤, 豊田優子, 曾根三郎. 関節リウマチの治療中に発生する肺病変の鑑別診断. 第50回日本呼吸器学会学術講演会シンポジウム. 日本呼吸器学会・日本リウマチ学会共同企画プログラム「新規抗リウマチ薬の諸問題」. 2010年4月24日.
 6. 東 桃代, Elmorshedy Reham Mohammed, 岸 潤, 木下勝弘, 岸 昌美, 西岡安彦, 曾根三郎. 新規免疫抑制薬フィンゴモリド (FTY720) のマウスプレオマイシン誘発肺線維症に及ぼす効果の検討. 第50回日本呼吸器学会学術講演会. 2010年4月24日.
 7. 西岡安彦. 肺線維症における細胞分子病態研究の進歩と臨床. 第31回日本呼吸器学会生涯教育講演会(春季セミナー)「呼吸器疾患のめざましい進歩」. 京都. 2010年4月22日.
 8. Nishioka Y. Growth factors and growth factor receptors in IPF: Implication for the novel therapy. 14th congress of the APSR (Asian Pacific Society of Respiriology). Symposium 17 Interstitial lung disease. Seoul, Korea. 2009年11月17日.
 9. Kishi M, Nishioka Y, Aono Y, Azuma M, Batmunkh R, El-Morshedy R, Makino H, Kinoshita K, Sone S. Antifibrotic effects of APA5 and APB5, blocking antibodies specific for PDGF receptors on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. 14th congress of the APSR (Asian pacific society of respiriology) 2009年11月16日.
 10. Aono Y, Nishioka Y, Kishi M, Azuma M, and Sone S. Inhibition of PDGF-mediated recruitment of fibrocytes by imatinib in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. 104th American thoracic society (ATS) (San Diego, USA), 2009年5月18日.
 11. Kataoka M, Aono Y, Azuma M, Handa, Reham, Kinoshita K, Kishi J, Nishioka Y, and Sone S. Anifibrotic effects of blocking antibody specific for PDGF receptor \cdot or \cdot on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. 104th American thoracic society (ATS) (San Diego, USA), 2009年5月18日.
 12. 小川博久, 吾妻雅彦, 本浄晃史, 楊河宏章, 西岡安彦, 曾根三郎. 気道リモデリングに対するIKK β 阻害薬IMD-0354の投与効果. 第48回日本呼吸器学会学術講演会ミニシンポジウム. 神戸. 2008年6月17日.
 13. 青野純典, 西岡安彦, 東 桃代, 上原久典, 泉 啓介, 曾根三郎. イマチニブ. 第48回日本呼吸器学会学術講演会シンポジウム6-間質性肺炎の治療法をめぐる臨床研究の展望-. 神戸. 2008年6月16日.
 14. Batmunkh Rentsenkhand, Yasuhiko Nishioka, Momoyo Azuma, Yoshinori Aono, Jun Kishi, Katsuhiro Kinoshita, Saburo Sone. The effects of CCN family proteins on lung fibroblasts. 第48回日本呼吸器学会学術講演会 English Mini-symposium. 神戸. 2008年6月16日.
 15. 西岡安彦, 青野純典, 東 桃代, 木下勝弘, 片岡昌美, 曾根三郎. 骨髄由来fibrocyteとPDGFシグナル. 第48回日本呼吸器学会学術講演会シンポジウム4社会のニーズに応える呼吸器学の展開-肺損傷から線維化へのパラダイムとその制御-. 神戸. 2008年6月15日.
- [図書] (計11件)
1. 西岡安彦, 曾根三郎. ARDS(急性呼吸窮迫症候群)の診断と治療のすすめかた. Medical Practice 27(4): 619-622, 2010.
 2. 西岡安彦, 青野純典, 東 桃代, 岸 潤. 「間質性肺炎の治療法の展開」-イマチニブ-. 呼吸と循環 58: 389-395. 2010.

3. 西岡安彦. 肺線維症に対する分子生物学的アプローチ. 呼吸と循環. 58: 179-187, 2010.
4. 西岡安彦, 曾根三郎. 疾患と治療薬改訂第6版－医師・薬剤師の為のマニュアル「肺サルコイドーシス」「過敏性肺炎」「肺胞蛋白症」「じん肺」. 南江堂. 大内耐義, 伊賀立二, 小龍 一編. 2010年4月15日発行. pp132-134.
5. 西岡安彦, 青野純典, 岸 潤, 東 桃代. 線維化病変に対するイマチニブの効果. 血液・腫瘍科. 59: 181-188, 2009.
6. 青野純典, 西岡安彦. Goodpasture 症候群. まんがで読み解く呼吸器症例 100. メディカルビュー社. 河野修興監修, 横山彰仁, 服部 登編. 2009年11月25日発行. pp180-182.
7. 青野純典, 西岡安彦. 過敏性肺炎. まんがで読み解く呼吸器症例 100. メディカルビュー社. 河野修興監修, 横山彰仁, 服部 登編. 2009年11月25日発行. pp183-185.
8. 西岡安彦, 柿内聡司, 曾根三郎. 肺がんを標的とした分子標的治療薬の効果予測マーカー. がん分子標的治療研究実践マニュアル. 金芳堂. 日本がん分子標的治療学会編. 2009年7月10日発行. pp286-291.
9. 曾根三郎, 西岡安彦. 胸水貯留. 新臨床内科学(第9版). 医学書院. 高久史麿, 尾形悦郎, 黒川 清, 矢崎義雄編. 2009年1月1日発行. pp146-148.
10. 西岡安彦, 曾根三郎. 呼吸器症候群(第2版)－特発性肺線維症. 別冊 日本臨床 領域別症候群シリーズ 31. 日本臨床社. 工藤翔二編. 2008年12月28日発行. pp416-420.
11. 西岡安彦. 内科診療ガイドライン活用法. 特発性間質性肺炎. 内科 102(6): 1174-1180, 2008.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西岡安彦 (NISHIOKA YASUHIKO)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授
研究者番号：70274199

(2) 研究分担者

柿内聡司 (KAKIUCHI SOJI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・特任准教授
研究者番号：50380100

青野純典 (AONO YOSHINORI)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号：50398004
(H20, H21)