

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08778

研究課題名（和文）ドーパミン受容体を介する肺線維化の病因機序の解明と新規治療薬の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenesis of pulmonary fibrosis mediated by dopamine receptors and development of novel therapeutic agents

研究代表者

川人 豊（Kawahito, Yutaka）

京都府立医科大学・医学（系）研究科（研究院）・准教授

研究者番号：50336731

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）：本研究では、マウスの経気管支的ブレオマイシン肺線維症モデルを用いて、肺線維化進行時の気管支肺胞洗浄液でドーパミン産生が増加し、また、肺線維化組織にドーパミン合成酵素とその受容体が存在し、病因に関与することを示した。また、線維芽細胞株を用いて、TGF- $\beta$  刺激により SMA発現する Myofibroblastへの分化を抑制するドーパミン受容体を介する天然由来成分を特定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでドーパミンの肺での存在やその受容体の肺組織での局在は明らかにされておらず、ドーパミン受容体を介した肺線維化抑制の詳細な作用機序は不明であった。本研究では、ブレオマイシン肺線維症マウスモデルで、肺の線維化病態でのドーパミンとその受容体の存在を明らかにし、培養肺線維芽細胞を用いて、ドーパミンの受容体を介した線維芽細胞から筋繊維芽細胞の分化抑制する物質を特定した。これら知見と単離物質は今後、肺線維症の治療薬の開発につながる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this investigation, utilizing a murine model of transbronchial bleomycin-induced pulmonary fibrosis, we demonstrated an elevation in dopamine production within bronchoalveolar lavage fluid during the progression of lung fibrosis. Furthermore, we discovered the presence of dopamine synthase and its corresponding receptors within lung fibroblastic tissue, implicating their involvement in the pathogenesis. Through the use of fibroblast cell lines, we identified a naturally occurring component mediated by dopamine receptors that inhibits the differentiation of TGF- $\beta$ -stimulated cells into SMA-expressing myofibroblasts.

研究分野：膠原病・リウマチ性疾患

キーワード：肺線維症 ブレオマイシンマウスモデル ドーパミン

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

組織の線維化は臓器不全の共通な病態であるが、その病因には不明な部分が多い。リウマチ性疾患の難治性病態としては間質性肺炎がある。様々な疾患に合併し、しばしば進行性、難治性で肺線維症に移行し、その病因と分子病態については十分解明されていない。近年臨床上問題となっている病態は、皮膚筋炎合併間質性肺炎で、ステロイドや免疫抑制剤の併用でも難治性で致死率が高く、感染症の合併も多くなるため、有効性の高い治療法が必要とされている。強皮症においても同様で、患者の予後不良に最も関与する合併症となっている。関節リウマチ患者の死因では、健常人と比較し感染症が多い特徴があるが、大きく異なるのは間質性肺炎の割合が高いことである。保険承認されている進行性の線維化を伴う間質性肺炎の抗線維化薬は現在でも 1 剤のみで、有効性の高い治療薬が少なく難治性である間質性肺炎は、現状の日常臨床で予後不良の臓器障害として大きな解決すべき課題になっている。肺線維化の病因機序を解明し関連分子を明らかにして、肺線維症治療の新たな分子ターゲットを検出することは急務で、治療薬の開発が待たれる。

### 2. 研究の目的

神経伝達物質、ホルモン、サイトカインが結合することによって標的細胞に様々な刺激を伝えることのできる受容体が生体内で数多く存在する。Lipopolysaccharide (LPS) やインターフェロンによる全身性の炎症状態では、ドーパミンなどの神経伝達物質は生体内で増幅する。これまで神経でしか作られないと思われていた神経伝達物質が免疫細胞でも作られ、その受容体も免疫細胞が持っており、様々な免疫現象に関与していることが近年明らかになった。ドーパミン受容体では、DRD1 ファミリーとして DRD1、DRD5、DRD2 ファミリーとして DRD2、DRD3、DRD4 の計 5 種類が存在する。このなかで、DRD2 のアンタゴニストである Haloperidol や Spiperone がブレオマイシン誘導肺線維症マウスモデルで肺線維症を抑制することを示したとの報告があるが、ドーパミンの存在や DRD2 の肺組織での局在など明らかにされておらず、その詳細な作用機序は不明である。これらを背景に、本研究では肺の線維化病態でのドーパミンとその受容体の関与に着目し、線維化のメカニズムを解明してその関連分子を明らかにし、間質性肺炎の治療薬の開発につながる事を目的として研究を実施した。

### 3. 研究の方法

#### ○肺線維症マウスモデルでのドーパミンの産生とその産生細胞の同定

8~10 週齢のオス C57/BL6 マウスに、ブレオマイシン 2.15U/kg を 30ul、0.9 mm の feeding needle を用いて経気道散布し、ブレオマイシン誘導性のマウス肺線維症モデルを作成した。肺胞洗浄液、肺組織の検体は、凍結切片、パラフィン切片を作成し、H&E 染色、L-dopa からドーパミンが合成される酵素の一つである Aromatic L-amino acid decarboxylase (AADC) の抗体と上皮細胞、線維細胞、筋線維芽細胞、マクロファージのマーカーである e-cadherin、Collagen 1、SMA (smooth muscle actin)、Fibroblast specific protein-1 (FSP1)、CD68 などの抗体でそれぞれ蛍光免疫染色を行った。線維化のスコアは Ashcroft スコアを用いて、0-4 段階でプライ

ンド評価した。また、。肺胞洗浄液を採取し、Elisa kit を用いて BALF 液中の dopamine 濃度を測定した。

#### ○ドーパミンの筋線維芽細胞誘導に対する影響

初代肺線維芽細胞の抽出は、8-10 週齢のオス C57/BL6 マウスの肺組織を摘出し、細片に切り刻んだ組織を 10%FBS 含有 RPMI1640 入り培養液で培養した。3-5 継代までの培養細胞を用いて、筋線維芽細胞( SMA)誘導能のある TGF を添加し、同細胞での DRD の発現を蛍光免疫染色で検討した。

#### ○筋線維芽細胞における cAMP の蛍光イメージング培養細胞の構築

ドーパミン受容体作動物質をスクリーニングするために、培養細胞株を用いた in vitro 系のシステム構築をした。まず、TGF- 刺激により SMA とドーパミン受容体を発現する培養細胞株の選定を行い、Myofibroblast に分化した同細胞を用いて cAMP イメージング蛍光( flamingo2 ) プラスミドをトランスポゾンシステムで遺伝子導入にし、クローニングをして cAMP の蛍光イメージング可能な培養細胞を構築した。

#### ○筋線維芽細胞の増殖抑制物質の探索

cAMP の蛍光イメージング可能な上記の培養細胞に、京都薬科大学の中村誠宏博士が分離・精製した天然薬物や薬用食品の植物資源ライブラリーから DRD に作用する候補物質を添加し、筋線維芽細胞の cAMP を制御する物質を探索した。

### 4 . 研究成果

#### ○プレオマイシン肺線維症マウスモデルでのドーパミンが産生

プレオマイシン誘導肺線維症モデルで、ドーパミンが肺組織での存在報告がなく、ドーパミン受容体の発現の詳細が不明であった。本研究では、プレオマイシンを気管内投与した肺胞洗浄液でドーパミン濃度を測定した所、下記のようにコントロールと比較して、プレオマイシン投与7日以降にドーパミン濃度の上昇を認めた( 図 1 )。また、E-cadherin 陽性の肺上皮細胞組織にドーパミン合成酵素である AADC の共発現がみられ、プレオマイシン肺線維症マウスモデルでのドーパミンが産生を確認した。

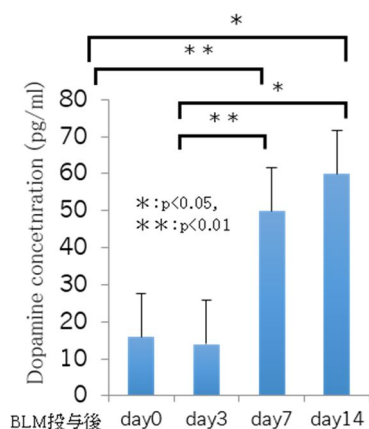


図 1 肺胞洗浄液中のドーパミン濃度(ELISA)

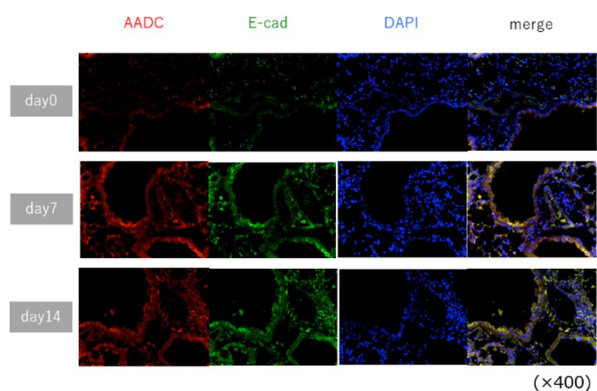


図 2 ドーパミン合成酵素 AADC の肺上皮細胞での発現( 蛍光免疫染色 )

### ○プレオマイシン肺線維症マウスモデルでのドーパミン受容体の発現

ドーパミン受容体抗体である抗 DRD1 と抗 DRD2 抗体を用いて、プレオマイシン誘導性のマウス肺線維症の肺組織の免疫蛍光染色を行った。プレオマイシン投与前の正常肺においてドーパミン受容体は確認できず、肺線維症が完成するプレオマイシン day14 日の肺線維化組織で、線維芽細胞のマーカーである Collagen1 や FSP-1 と DRD 1、DRD2 の共発現が増強していることを蛍光免疫染色で確認した。(図 3, 図 4)

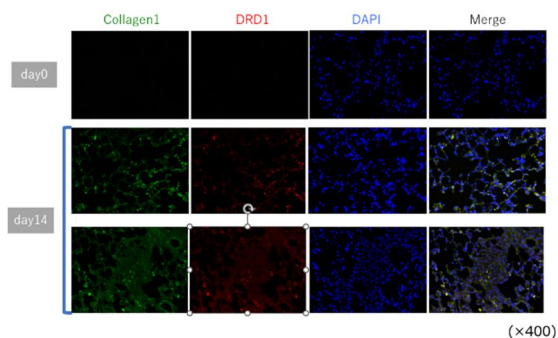


図 3 ドーパミン受容体 DRD1 発現

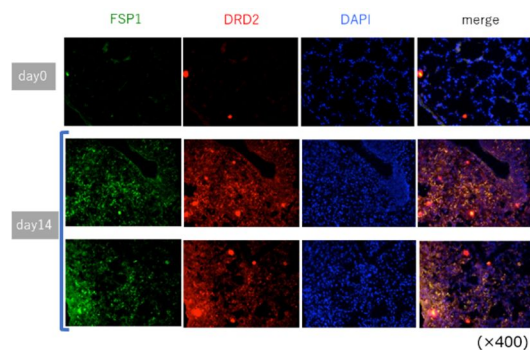


図 4 ドーパミン受容体 DRD2 発現

### ○ドーパミン受容体の筋線維芽細胞での発現

肺組織の培養繊維細胞に TGF- $\beta$ 1 を添加することで、SMA 発現する筋線維芽細胞が誘導され、その細胞にドーパミン受容体が発現することが示された。(図 5)

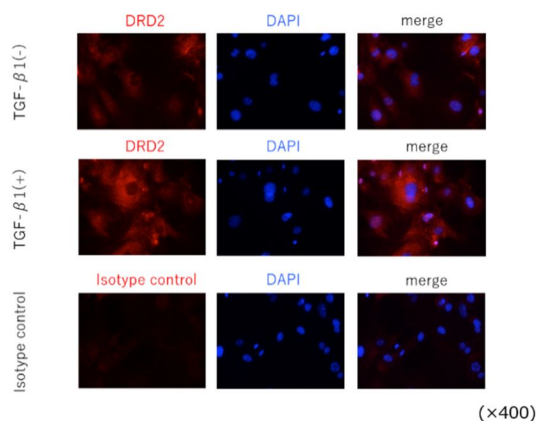


図 5 TGF- $\beta$ 1 刺激による肺培養繊維細胞での DRD2 の発現

### ○ドーパミン受容体作動物質のスクリーニングシステムの構築

ドーパミン受容体作動物質をスクリーニングするために、培養細胞株を用いた in vitro 系のシステム構築をめざした。まず、使用するドーパミン受容体発現培養株の選定を行った。様々な培養細胞株にドーパミン受容体リガンドを添加し、マウスの線維芽細胞株である NIH3T3 細胞で、免疫染色などの手法でドーパミン受容体の発現を確認した(図 6)。次に、cAMP イメージング蛍光タンパク発現(Pinkflamindo)プラスミドをトランスポゾンシステムで遺伝子導入した。その後、クローニングをして cAMP の蛍光イメージング可能な NIH3T3 細胞を作成した(図 7)。

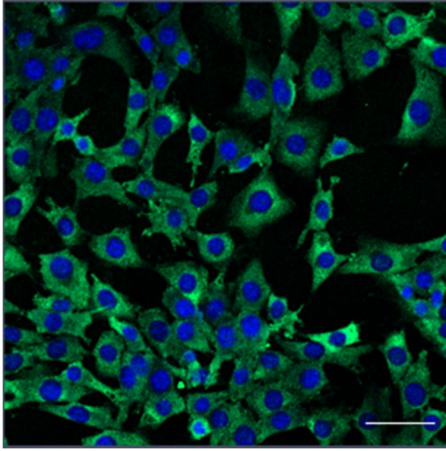


図 6 NIH3T3 細胞の免疫染色  
(DRD1 受容体: alexa488、  
nuclear : Hoechst33342)

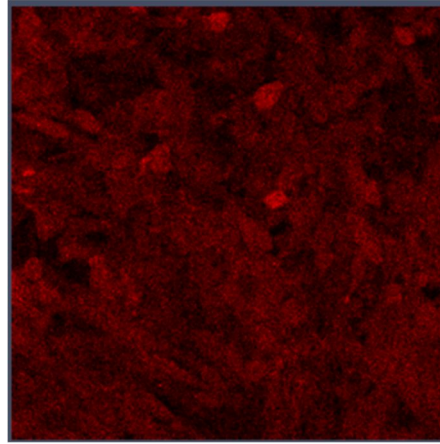


図 7 cAMP 感受性タンパク導入 NIH3T3 細胞

### ○ドーパミン受容体作動物質のスクリーニング

ドーパミン受容体を発現し cAMP の蛍光イメージング可能な NIH3T3 細胞も用いて、cAMP を増加させる天然由来成分 (化合物 1) を特定した (図 8)。他にも同様の化合物があり、TGF- 刺激により SMA を発現する Myofibroblast 分化を効率よく抑制する物質を選定中である。

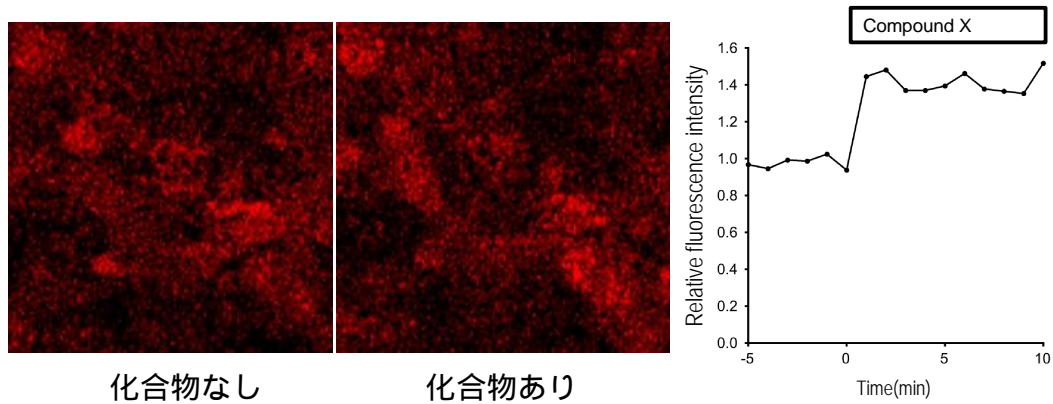


図 8 化合物により NIH3T3 細胞での cAMP の増加を確認した。

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
研究分担者	中村 誠宏  (Nakamura Seikou)  (20411035)	京都薬科大学・薬学部・准教授   (34306)	
研究分担者	細木 誠之  (Hosogi Shigekuni)  (30433254)	京都薬科大学・薬学部・准教授   (34306)	
研究分担者	河野 正孝  (Kohno Masataka)  (60405256)	京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師   (24303)	

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