

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17221

研究課題名（和文）特発性肺線維症における線維芽細胞巣形成のメカニズム解明：患者肺検体の解析から

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of fibroblastic foci formation in idiopathic pulmonary fibrosis: from analysis of patient lung tissues

研究代表者

西村 知子（Nishimura, Tomoko）

奈良県立医科大学・医学部附属病院・研究員

研究者番号：70812353

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（IPF）は予後不良な進行性難治性疾患である。本研究では、IPF患者の肺組織の遺伝子解析を行い、線維芽細胞巣形成に関与する因子、及びその発現調整機構の解明を目指した。線維芽細胞巣が形成される線維化部の線維芽細胞で選択的にIGF-1の発現が亢進すること、IGF-1と線維化マーカーは正の相関を示すこと、が明らかとなった。またIGF-1の産生は線維化の中心分子であるTGF- $\beta$ 依存性であること、IGF-1シグナルによって制御される因子としてCalmodulin-1を見出した。以上の結果からIGF-1は線維芽細胞巣の形成に深く関与しており、その分子機序の一端が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、IPF患者と健常者との比較ではなく、同一IPF患者内の線維化部と非線維化部の組織および細胞の遺伝子発現を比較することにより、遺伝的なバックグラウンドの影響を排除し、真に線維芽細胞巣の形成、ひいては線維化に関与する因子を探索したものである。我々は、その重要な因子としてIGF-1を同定し、さらに発現誘導機序ならびにIGF-1の下流因子を示したことで、未解明な点が多く残されている線維芽細胞巣形成の分子機序の一端を明らかにした。また、IPFは難治性かつ進行性で、診断からの余命は平均数年で有効な治療法がないが、IGF-1がIPFに対する新たな治療ターゲットとなり得ることを示した。

研究成果の概要（英文）：Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive and refractory disease with poor prognosis. In this study, we analyzed lung tissues from IPF patients to identify factors involved in the accumulation of activated fibroblasts called as fibroblastic foci and to elucidate the regulatory mechanism of their expression to understand the pathogenesis of IPF. We identified IGF-1 as a factor that is upregulated in fibrotic regions compared to non-fibrotic regions. Single-cell RNA sequencing revealed that IGF-1 is selectively upregulated in lung fibroblasts in fibroblastic areas. In addition, IGF-1 expression positively correlated with the expression of collagen markers in the lung. We also showed that IGF-1 is produced in a TGF- $\beta$ -dependent manner, and found Calmodulin-1 as a regulatory molecule by IGF-1. These results suggest that IGF-1 is closely involved in the formation of fibroblastic foci.

研究分野：免疫学、呼吸器内科学

キーワード：特発性肺線維症 IGF-1 線維芽細胞巣 fibroblastic foci

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 肺の間質を炎症や線維化病変の主座とする疾患である間質性肺炎のうち、原因を特定しえないものは、特発性間質性肺炎 (IIPs) と総称される。その中で、特発性肺線維症 (Idiopathic Pulmonary Fibrosis : IPF) は、病理組織的・画像的に UIP (usual interstitial pneumonia) パターンを特徴とする、最も頻度が高い病型である。世界で約 3 百万人が罹患しており、発生率は年齢とともに増加する。IPF は難治性かつ進行性で、有効な治療法がない。ステロイドは効果がなく、ピルフェニドンやニンテタニブなどの抗線維化薬もわずかに進行を抑制するに過ぎず、診断からの余命は平均数年と IIPs の中でも非常に予後不良で致命的な経過をたどる。

(2) IPF の原因は解明されていないが、多様な遺伝的背景に加え、環境因子の影響を受ける慢性的な肺の炎症や、繰り返す肺胞上皮傷害の関与が想定されており、慢性的な組織損傷と修復・治癒過程の異常により線維化をきたし、細胞外マトリックス (ECM) の合成・蓄積により進行するとされる (*Nat Rev Dis Primers*.2017;3:17074)。また IPF は、線維化部の辺縁の線維芽細胞巣 (Fibroblastic foci) の形成を特徴とし、数が多いほど進行が早く、肺線維化進展に強く関連するとされる。IPF の根治治療の確立には、線維化に関与する因子や線維化の機序の解明が喫緊の課題である。

(3) 肺線維症の検討の際に、動物モデルとして、ブレオマイシン肺線維症モデルマウスが用いられることが多い。しかし、ブレオマイシンによる急激な肺の炎症および線維化は、正確に IPF の病態を反映しているとは言い難く、またヒトとマウスでは一概に比較できない。IPF 患者と健常者を比較した検討も行われるが、遺伝的背景が異なっており、線維化に関与する因子のみを同定することは困難である。そのため申請者らは、IPF 患者において真に線維化に関与する因子を検討するために、同一患者内で遺伝子発現を比較する本研究を着想した。

## 2. 研究の目的

(1) IPF 患者の肺組織の遺伝子解析を行い、線維化に関与する因子を検索する。患者間の比較ではなく、同一患者の非線維化部と線維化部の遺伝子発現を比較することにより、遺伝的なバックグラウンドの影響を排除し、真に線維化に関与する遺伝子の特定を試みる。

(2) 検索した因子の発現調整機構を明らかにし、Fibroblastic foci 形成をはじめとした線維化メカニズムとの関連を検討することで、IPF の病態解明を目指す。

## 3. 研究の方法

(1) 肺線維症合併肺癌患者の手術の際に、患者の同意のもとに非癌部の非線維化領域、線維化領域の肺組織の提供を受け、肺組織から線維芽細胞を分離・培養した。得られた肺線維芽細胞を用いて DNA マイクロアレイ解析を行って遺伝子発現を比較し、非線維化領域由来肺線維芽細胞と比較して線維化領域由来線維芽細胞で、発現が亢進している因子を検索した。

(2) 患者由来肺線維芽細胞を用いて、特定した因子 IGF-1 が非線維化領域と比較して線維化領域で発現が亢進しているかを、定量的逆転写 PCR 法 (RT-qPCR) で確認した。またこれらの細胞において IGF-1 と線維化マーカーの発現量に関連があるかを確認した。

(3) IGF-1 の線維化への関与を調べるため、IGF-1 リコンビナントタンパク質や中和抗体を添加し、線維化マーカーの発現量の変化を検索した。また患者由来の肺検体を用いてシングルセル遺伝子発現解析を行い、IGF-1 の産生細胞を探索した。

(4) 線維化に関与すると考えられる IGF-1 の発現調整機序を明らかにするため、患者由来肺線維芽細胞の他に、型肺胞上皮細胞株である A549 細胞やヒト由来肺線維芽細胞も用いて検討を行った。

(5) IGF-1 の線維化促進に対する分子機序を調べるため、IGF-1 の発現量を RNA 干渉により抑制することで発現量が変化する因子を DNA マイクロアレイ解析にて網羅的に探索した。

## 4. 研究成果

(1) 非線維化領域由来肺線維芽細胞と線維化領域由来線維芽細胞で発現する遺伝子を比較するため、3 人分の患者由来肺線維芽細胞を用いて、DNA マイクロアレイ解析を行った。合計 58201 個の遺伝子から、非線維化領域由来の線維芽細胞と比較して、線維化領域の線維芽細胞にて発現が亢進している遺伝子を検索し、IGF-1 を見出した。さらに 11 人の患者肺検体 (肺線維芽細胞・全肺組織) を用いて、RT-qPCR で IGF-1 の発現を確認したところ、非線維化部と比して線維化部

の肺線維芽細胞・全肺組織で IGF-1 の発現が有意に亢進していた。IGF-1 は成長ホルモンの刺激によって産生され、インスリンに類似した効果に加え、細胞成長・増殖やアポトーシス抑制に関与するとされる。以上より線維化に関与する因子として、IGF-1 に着目して検討を進めた。

(2) 合計 26 人分の患者由来肺線維芽細胞を用いて、IGF-1 と線維化マーカー (collagen 、 collagen 、 -smooth muscle actin、fibronectin) の発現量を RT-qPCR で調べたところ、程度の差はあるものの、非線維化領域、線維化領域のいずれにおいても、線維化マーカーと IGF-1 の発現量は正の相関を示した。また、ヒト肺線維芽細胞にリコンビナント IGF-1 を添加すると線維化マーカーの発現量は増加し、抗 IGF-1 抗体を添加すると線維化マーカーの発現量は低下した。これらの結果より、IGF-1 と線維化との強い関連が示唆された。

(3) IPF 患者由来の肺組織を用いてシングルセル解析を行った。その結果、IGF-1 の発現は主に線維芽細胞に認め、特に線維化領域由来線維芽細胞にて IGF-1 の高発現を認めた。以上より、IGF-1 は線維化領域の線維芽細胞に選択的に発現することが明らかとなり、Fibroblastic foci の形成にも深く関与することが示唆された。

(4) IPF 患者由来肺線維芽細胞と 型肺胞上皮細胞株である A549 細胞を用いて、IGF-1 の発現調整の機序について検討を行った。A549 細胞を様々な炎症関連因子やサイトカインなどで刺激した結果、線維化の主要なエフェクターとして機能する TGF- $\beta$  で刺激すると、経時的に IGF-1 の発現が亢進した。次に、IPF 患者由来肺線維芽細胞を TGF- $\beta$  で刺激すると、同じく経時的に IGF-1 の発現が亢進した。一方、TGF- $\beta$  受容体シグナルの阻害薬である SB431542 を IPF 患者の線維化領域由来肺線維芽細胞に添加すると、DMSO を添加したコントロールと比較して、IGF-1 の発現が有意に抑制された。以上の結果より、IGF-1 は TGF- $\beta$  によって発現が制御され、TGF- $\beta$  は IGF-1 の発現誘導を介して線維化に寄与する可能性が示唆された。

(5) siRNA を用いて、ヒト肺線維芽細胞における IGF-1 の発現抑制による遺伝子発現変化を DNA マイクロアレイ解析により網羅的に解析し、IGF-1 によって発現制御を受ける遺伝子として Calmodulin-1 を同定した。Calmodulin-1 は細胞内のカルシウムイオンと結合し、さらにカルモジュリン結合タンパク質との結合を通じて、細胞機能を制御するとされる。

(6) 本研究は、同じ IPF 患者の非線維化領域と線維化領域の肺組織の遺伝子発現を比較することで、遺伝的なバックグラウンドの影響を排除し、真に線維化に関与する因子を推測することが可能であった。またプレオマイシン肺線維症モデルマウスではなく、実際の IPF 患者の肺組織を用いての検討であり、本研究はより正確に IPF の病態をとらえることが出来たと考える。

(7) 今回の研究で、IGF-1 が TGF- $\beta$  シグナル伝達経路の下流のターゲットであり、TGF- $\beta$  によって発現が制御されることが明らかとなった。IGF-1 シグナル伝達経路は、TGF- $\beta$  シグナル伝達経路の構成要素と複数のレベルでクロストークするとされており (Cytokine & Growth Factor Rev. 2006;17:59-74) 具体的な発現制御メカニズムの解明は今後の課題である。ヒトの肺線維芽細胞を TGF- $\beta$  で刺激すると細胞内カルシウムイオン濃度が増加し、カルシウムが Calmodulin-1 と結合して、細胞外マトリックス (ECM) 構成タンパク質の産生を促進するとの報告がある (J Biol Chem. 2004;279:15561-70) 。今回の研究で、IPF 患者由来肺線維芽細胞にて、TGF- $\beta$  により細胞内のカルシウム濃度が上昇し、TGF- $\beta$  シグナル伝達経路の下流に位置する IGF-1 の発現が亢進し、さらに IGF-1 で発現制御を受ける Calmodulin-1 と細胞内のカルシウムが結合して ECM 構成タンパク質の産生を亢進し、線維化が進行することが推測された (図 1) 。IGF-1 の制御で線維化が改善する可能性があり、IGF-1 は、IPF に対する新たな治療ターゲットとして期待される。

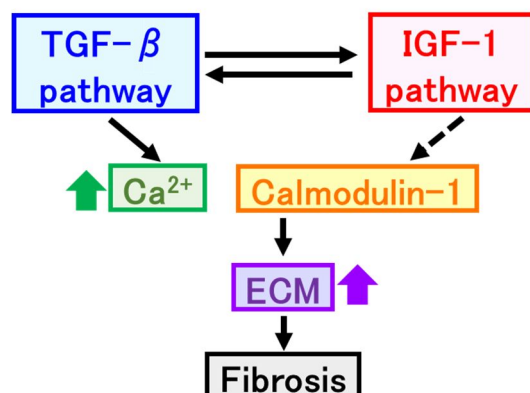


図 1. TGF- $\beta$  と IGF-1 のクロストークから想定される肺線維症発症の分子メカニズム

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 西村 知子、北畠 正大、齊藤 正一郎、王寺（下嶋） 典子、七野 成之、上羽 悟史、松島 綱治、本津 茂人、室 繁郎、川口 剛史、澤端 章好、伊藤 利洋
2 . 発表標題 特発性肺線維症における、IGF-1を中心とした線維化メカニズムの検討：患者肺検体の解析から
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

1 . 発表者名 西村 知子、北畠 正大、王寺（下嶋） 典子、 齊藤 正一郎、古川 龍太郎、 本津 茂人、川口 剛史、澤端 章好、室 繁郎、伊藤 利洋
2 . 発表標題 特発性肺線維症における、IGF-1（Insulin-like growth factor 1）を 中心とした線維化メカニズムの検討：患者肺検体の解析から
3 . 学会等名 第62回 日本呼吸器学会学術講演会
4 . 発表年 2022年

1 . 発表者名 Tomoko Nishimura、Masahiro Kitabatake、Shoichiro Saito、Noriko Ouji-Sageshima、Shigeyuki Shichino、Satoshi Ueha、Kouji Matsushima、Toshihiro Ito
2 . 発表標題 Role of IGF-1 in idiopathic pulmonary fibrosis: Analysis of patient lung specimens
3 . 学会等名 The 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology（国際学会）
4 . 発表年 2021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
---------	---------