

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17234

研究課題名(和文) M2c-マクロファージの制御による特発性肺線維症に対する新規抗線維化療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel antifibrotic therapy for idiopathic pulmonary fibrosis via suppression of the activity of M2c-macrophages

研究代表者

柴田 英輔 (Shibata, Eisuke)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：00774613

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)：特発性肺線維症の進展につながる「炎症」と「線維化」の両方のregulatorとして組織修復に関わる細胞としてM2マクロファージ(M₂)について解析した。当初、転写因子活性化因子YAP/TAZが活性化し、誘導遺伝子CTGFの発現が増強し、線維化を誘導すると考えていた。M₂に分化させたTHP-1細胞を、種々のcytokineで刺激し、CTGFの発現を解析したが、その発現をYAP/TAZのknockdownで抑制できず、YAP/TAZの発現も低かった。そこで肺胞上皮細胞からの刺激がM₂を活性化していると考えた。現在、肺胞上皮型肺胞上皮細胞A549のYAP/TAZ誘導遺伝子の発現を検証している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IPFに対してはこれまで長きに渡りステロイドによる治療が行われてきたが、有害事象が必発な上、有用性を示唆する科学的根拠はなく、ステロイド治療に抵抗性である。その理由については分かっていないが、申請者はたとえ炎症を抑える事ができても、それに続く線維化を抑える事ができない事、すなわち、ステロイドによって誘導されるM2c-M₂が線維芽細胞を活性化させ、筋線維芽細胞の増殖を促進する事が理由の一つと考えている。型肺胞上皮細胞におけるYAP/TAZの不活化により、M2M₂を抑制し、「炎症」と「線維化」の両方を制御する事が可能となれば、IPF治療のbreakthroughとなると考えている。

研究成果の概要(英文)：Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is chronic progressive disease and is difficult to treat. In the present study, we investigated the role of alternatively activated M2 macrophages which supposed to be a regulator of both inflammation and fibrosis. At first, we speculated that activation of transcriptional co-factor YAP/TAZ caused fibrosis through the induction of the expression of profibrotic genes such as CTGF and TGF-beta. According to our hypothesis, we differentiated THP-1 cells into macrophages by PMA thereafter stimulated them with various cytokines, and analyzed the expression of CTGF. However, induction of CTGF expression in THP-1-derived macrophages was not inhibited by knockdown of YAP/TAZ. Moreover, only low level of gene expression of YAP/TAZ was observed in them. These results suggested that macrophages were activated through the secretory factors from alveolar epithelial type II cells. We currently examined the expression of YAP/TAZ inducible genes in A549 cells.

研究分野：間質性肺炎、胸部悪性腫瘍

キーワード：特発性肺線維症 M2マクロファージ 線維化 Hippo pathway

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

IPF は恒常的な「炎症」とその後の組織修復のための「線維化」の繰り返しのよって増悪していく。今回申請者は、マクロファージ (MΦ) がこの「炎症」と「線維化」の両方を担う鍵となる細胞と考えた。

IPF における線維化は活性化した線維芽細胞が大量の細胞外マトリックスを産生する事で引き起こされるが、M2-MΦ は TGF-β や PDGF を放出し、活性化した線維芽細胞である筋線維芽細胞の増殖を促進するとされている。IPF に対してはこれまで長きに渡りステロイドによる治療が行われ、また現在においても急性増悪の際にはステロイドパルス療法が実臨床では行われている。しかしながら、少なくとも慢性経過中の IPF 症例に対するステロイド加療は有害事象が必発な上、有用性を示唆する科学的根拠はなく (Raghu G et al. Am J Crit Care Med. 2011;183(6):788-824.) IPF の急性増悪時については、たとえステロイドパルス療法を行ったとしても、救命率は 20~30%程度と極めて低く、慢性期・急性期に関わらず IPF はステロイド治療に抵抗性である (Flaherty KR et al. Am J Med. 2001;110(4):278-82.)。

IPF に対してステロイドが無効な理由について、詳細は分かっておらず、申請者は、たとえ炎症は抑える事ができても、それに続く線維化を抑える事ができない事、すなわち、ステロイドによって誘導される M2c-MΦ が TGF-β や PDGF を放出し、線維芽細胞を活性化させ、筋線維芽細胞の増殖を促進するのが理由の一つと推測した。

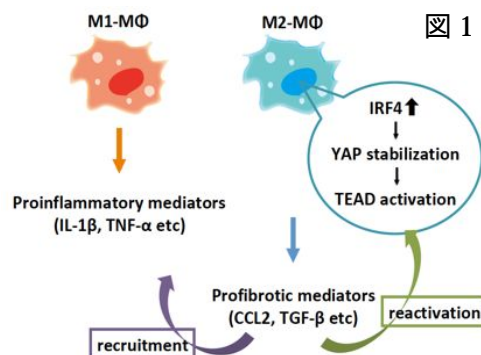
2. 研究の目的

本研究の目的は、M2-MΦ の動きを制御する事で、IPF に対する新たな治療の開発に繋げる事である。

3. 研究の方法

IPF において M2c-MΦ を標的とした治療により、線維化の進行を抑制できるかを検討する。

今回申請者が着目している M2-MΦ の分化誘導については、転写因子である Interferon regulatory factor 4 (IRF4) の活性化が不可欠であると報告されているが (Satoh T et al. Nat Immunol. 2010;11(10):936-44.) 申請者は特に M2c-MΦ では、IRF4 が関連遺伝子の直接の転写因子として働いているだけでなく、転写因子活性化因子 YAP/TAZ の核内での安定性を高め、転写因子 TEAD の誘導遺伝子で、MΦ の recruitment に関与する CCL2 や profibrotic factor である TGF-β の産生が高まっていると考え (図 1)、ヒト単球系白血病細胞 (THP-1) 細胞やマウス MΦ 様細胞 (RAW264.7 細胞) を用いて、Lipopolysaccharide (LPS) や IL-6, adenosine receptor agonist の NECA 等による刺激を行なった。THP-1 細胞での YAP/TAZ の knockdown (KD) には viromer green を用いて siRNA を transfection して行なった。YAP/TAZ の誘導遺伝子である CCL2 や CTGF, TGF-β の発現は real time PCR 法で測定した。



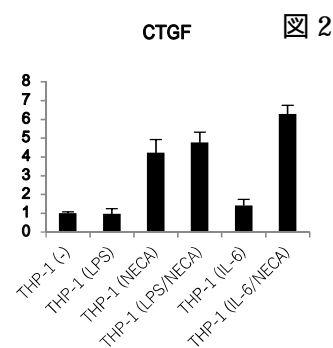
4. 研究成果

<結果>

THP-1 細胞を Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) で MΦ 様細胞に分化誘導し、LPS, IL-6, NECA で刺激した所、主に NECA の刺激で、CTGF の発現が誘導されることが分かった。Adenosine シグナルは MΦ を M2 様に分化させると報告されており (Ferrante CJ et al. Inflammation. 2013;36(4):921-931.)、M2 が profibrotic factor である CTGF の発現の source である可能性が示された。そこで、CTGF の発現誘導が標的分子である YAP/TAZ に dependent かを調べるため、THP-1 細胞の YAP/TAZ を siRNA で KD した上で、NECA の刺激が cancel されるかを検証したが、CTGF の発現にほぼ変化は認められなかった。

RAW264.7 細胞を用いて同様の実験を行なったがこの場合も、CTGF の発現が YAP/TAZ の KD で抑制されることはなかった。その

後、Balb/c マウスの骨髄から単離し、Macrophage colony stimulating factor を豊富に含む



L929 細胞の上清で分化誘導した bone marrow derived macrophage (BMDM) を用いた実験では、NECA の刺激による、CTGF の発現誘導が弱かった。結果として、3 種類の M を使用し、一定の傾向は得られるものの、著明な差を見出すことはできなかった。

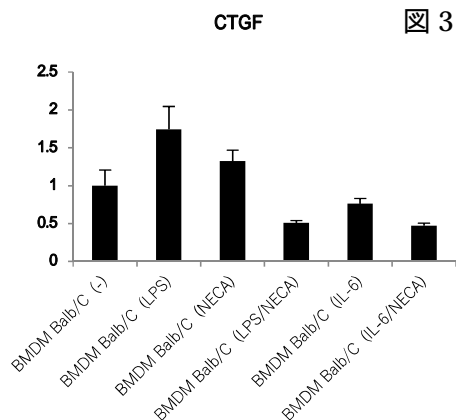
< 考察 >

今回 THP-1 細胞、RAW 264.7 細胞、BMDM を使用して解析を行なったが、何れの細胞でも YAP/TAZ の発現そのものが低かった。特に primary の細胞である BMDM での YAP/TAZ の発現は低く、確かに種々の刺激に対する CTGF の発現誘導は弱かった。以上の結果から、M の CTGF は YAP/TAZ の regulation を受けていないと推測され、当初想定していたように M そのものの YAP/TAZ が線維化に関わっているとするのは難しいと考えられた。

そこで、現在は、喫煙や外界からの刺激に最初に反応し、最初に障害を受ける肺胞上皮細胞からの刺激が M を活性化するきっかけとなり、M 由来の「炎症」と「線維化」を惹起していると考え、肺胞上皮 型様細胞 A549 細胞の YAP/TAZ を CRISPR-Cas9 システムを用いて knockout した細胞を用いて、M を活性化する因子が抑制されるかを検証している。

< 結語 >

M における YAP/TAZ は発現量、活性ともにやや弱く、これを標的とした IPF の新規治療法の開発は難しいと思われるが、IPF において M が「炎症」と「線維化」の両方を介在している可能性は十分に考えられ、M 活性化のきっかけとなるシグナルの解明が IPF 治療の発展には不可欠である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Horio Daisuke, Minami Toshiyuki, Kitai Hidemi, Ishigaki Hirotooshi, Higashiguchi Yoko, Kondo Nobuyuki, Hirota Seiichi, Kitajima Kazuhiro, Nakajima Yasuhiro, Koda Yuichi, Fujimoto Eriko, Negi Yoshiki, Niki Maiko, Kanemura Shingo, Shibata Eisuke, Mikami Koji, Takahashi Ryo, Yokoi Takashi, Kuribayashi Kozo, Kijima Takashi	4. 巻 111
2. 論文標題 Tumor associated macrophage derived inflammatory cytokine enhances malignant potential of malignant pleural mesothelioma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2895 ~ 2906
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14523	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Akifumi, Okumura Yoshitomo, Hashimoto Masaki, Kondo Nobuyuki, Shibata Eisuke, Kijima Takashi, Hasegawa Seiki	4. 巻 109
2. 論文標題 Right Lower Lobectomy for an Aberrant Mediastinal Inferior Lobar Artery	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Annals of Thoracic Surgery	6. 最初と最後の頁 e415 ~ e417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.athoracsur.2019.10.021	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 柴田 英輔、横井 崇、亀井 貴雄、東山 友樹、多田 陽郎、石垣 裕敏、 祢木 芳樹、堀尾 大介、二木 麻衣子、大搦 泰一郎、三上 浩司、南 俊行、高橋 良、栗林 康造、木島 貴志
2. 発表標題 クリゾチニブによる薬剤性肝障害後、エヌトレクチニブで治療継続が可能であった肺腺癌の1例
3. 学会等名 第113回日本肺癌学会関西支部学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Otsuki T, Mikami K, Shibata E, Horio D, Niki M, Negi Y, Tada A, Tokuda M, Kiyota J, Morishita M, Minami T, Takahashi R, Yokoi T, Kuribayashi K, Kijima T.
2. 発表標題 Bone Metastasis in Malignant Pleural Mesothelioma.
3. 学会等名 The 25th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology (APSR 2021)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴田 英輔、清田 穰太郎、森下 実咲、徳田 麻佑子、多田 陽郎、柊木 芳樹、堀尾 大介、二木 麻衣子、大搦 泰一郎、三上 浩司、南 俊行、高橋 良、横井 崇、栗林 康造、木島 貴志
2. 発表標題 FoundationOne CDxにてEGFR遺伝子マイナー変異を認め、アファチニブが奏功した肺癌の1例
3. 学会等名 第62回日本肺癌学会学術集会
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
---------	---------