

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06947

研究課題名（和文）IPFと非IPF-ILDとの鑑別に有用なバイオマーカーのスクリーニングと機能解析

研究課題名（英文）Screening and Functional Analysis of Biomarkers Useful for Differentiating Between IPF and Non-IPF-ILD

研究代表者

岩下 寿秀（Iwashita, Toshihide）

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：00283432

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,800,000円

研究成果の概要（和文）：間質性肺疾患（ILD）は、治療法の観点から特発性肺線維症（IPF）と非IPF-ILDに分類され得るが、IPFと非IPF-ILDとの鑑別診断が困難な場合がある。申請者らは、マウスブレオマイシン誘発性肺線維症のmyofibroblastと肺の正常fibroblastのgene profilingの比較を行った結果見出したGREM1の血清濃度が、IPF患者群で有意に高く、次いで、非IPF-ILD患者群、健常対照群であった。IPF対非IPF-ILDsのROC曲線下面積は0.759であり、臨床上で汎用されている3つの血清マーカー（KL6、SP-D、LDH）よりも優れていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

間質性肺疾患（ILD）は、多様な疾患群である。ILDの中で、予後不良である特発性肺線維症（IPF）に対しては抗線維化薬を用いた治療が行われているのに対し、非IPF-ILDに対しては、主に免疫抑制療法が行われている。このように、IPFと非IPF-ILDに対する治療法は大きく異なるので、IPFと非IPF-ILDを正確に診断することは極めて重要である。このような背景から、IPFと非IPF-ILDとの鑑別診断に有用な非侵襲的な血清バイオマーカーであるGREM1の発見は学術的および社会的に意義があると思われる。

研究成果の概要（英文）：Interstitial lung disease (ILD) can be classified into idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and non-IPF-ILD from a treatment perspective, but it can be challenging to differentiate between IPF and non-IPF-ILD. The applicants conducted a comparison of gene profiling between myofibroblasts in mouse bleomycin-induced pulmonary fibrosis and normal lung fibroblasts, finding that serum levels of GREM1 were significantly higher in the IPF patient group, followed by the non-IPF-ILD patient group, and the healthy control group. The area under the ROC curve for IPF versus non-IPF-ILDs was 0.759, which was superior to the three commonly used serum markers (KL6, SP-D, LDH) in clinical practice.

研究分野：実験病理学

キーワード：間質性肺疾患 特発性肺線維症 筋線維芽細胞 線維芽細胞

1. 研究開始当初の背景

間質性肺疾患 (ILD) は、多様な疾患群である。ILDの中で、予後不良であるIPFに対しては抗線維化薬を用いた治療が行われているのに対し、非IPF-ILDに対しては、主に免疫抑制療法が行われている。このように、IPFと非IPF-ILDに対する治療法は大きく異なるので、IPFと非IPF-ILDを正確に診断することは極めて重要である。IPFの診断には、放射線診断学的または病理診断学的に典型的な「通常の間質性肺炎 (UIP)」パターンの証拠が必要であり、かつ非IPF-ILDの可能性を除外する必要がある。しかし、膠原病疾患関連のILDや多種類の線維性ILDを含む非IPF-ILDは、UIP様のパターンを示すことがあるため、ILDの専門家であっても、高い確実性をもってIPFの診断を行うことは時に困難である。このような背景から、IPFと非IPF-ILDとの鑑別診断に有用な非侵襲的な血清バイオマーカーの開発が必要であると考えられる。IPFの病理組織は非IPF-ILDのそれと比較して、fibroblastic foci が有意に多いとされている (Enomoto et al. Chest 2006; 130: 22-9)。Fibroblastic foci は主としてmyofibroblast と細胞外マトリックスで構成され、myofibroblast から分泌された過剰のcollagen などの細胞外マトリックスがfibroblastic foci などに沈着し、肺の構築改変に深く関与している。申請者らは、以前、肺myofibroblastが分泌するタンパク質として、潜在性TGF-結合タンパク質-2 (LTBP2) を同定した。そして、LTBP2のIPF患者群および健常対照群の血清濃度を検討したところ、IPF患者血清中のLTBP2が健常対照群のそれと比較して、有意に上昇していたことを明らかにした。さらに、血清LTBP2値がIPF患者の予後を予測できることを示し、myofibroblastが分泌するタンパク質が、IPF予後に関する血清バイオマーカーになり得ることを示唆した (Enomoto et al. Clinical Science 2018; 132: 1565-1580)。このようなIPFに関する血清バイオマーカーは今までいくつか見出されている。しかし、IPFと非IPF-ILDとの鑑別診断に有用な血清バイオマーカーはほとんど見つかっていない。

2. 研究の目的

(1) 本研究の目的：IPFと非IPF-ILDとの鑑別診断に有用な血清バイオマーカーのスクリーニングとその血清バイオマーカータンパク質の機能解析。

(2) 本研究の学術的独自性と創造性：申請者らは プレオマイシン誘発性肺線維症の組織から、線維化に極めて重要な役割を果たすmyofibroblastのみをFACSによって単離することに世界で初めて成功し (Akamatsu T et al. Fibrogenesis and Tissue Repair. 2013; 8: 15)、複数のサブクラスの肺fibroblastを容易にFACSによって単離する方法を開発した (Matsushima S et al. BMC Pulm Med.2020; 20: 21)。これらの独自開発の手法を用いて、IPFと非IPF-ILDを鑑別に有用な新規血清バイオマーカーを見出すことは、臨床的に意義が高いと考えられる。

3. 研究の方法

(1) プレオマイシン誘発性肺線維症のmyofibroblastと正常の肺fibroblastのgene profiling 解析およびIPFと非IPF-ILDとの鑑別診断に有用な新規血清バイオマーカーの同定

(2) IPF患者群50名、非IPF-ILD患者群42名および健常対照群30名 (浜松医科大学附属病院) を対象に、臨床上で汎用されている3つの血清マーカー (Krebs vonden Lungen-6 [KL6]、

Surfactant protein-D [SP-D]、乳酸脱水素酵素 [LDH])と新規血清バイオマーカーの血清濃度を測定する。

4 . 研究成果

申請者らはマウス正常肺 (normal lung) のfibroblast (Fig.1: Steady-state fibroblast (FB)) と、ブレオマイシン誘発性肺線維症の SMA陽性myofibroblast (Fig.1:Myofibroblast (MFB)) をFACSで単離し、gene profiling解析 (microarray) を行った (Accession No.GSE111043) 。そして、クラスタリング解析を行い、myofibroblastに発現する SMAをコードするActa2の発現パターンと類似している20個の遺伝子を抽出した (Fig. 2) 。

Fig.1 Steady-state fibroblastとmyofibroblastの単離方法

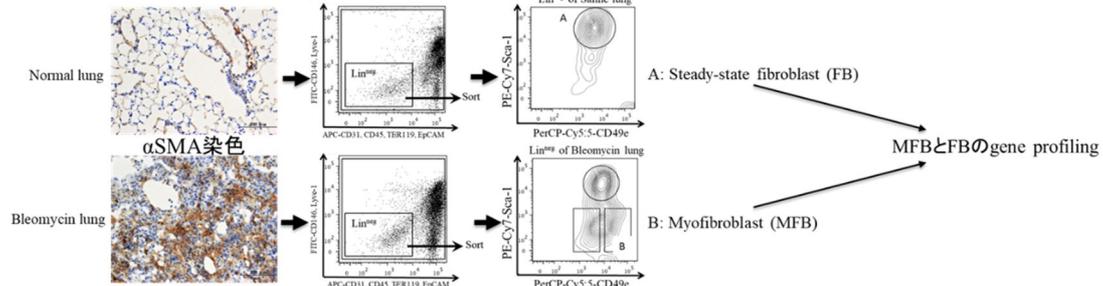
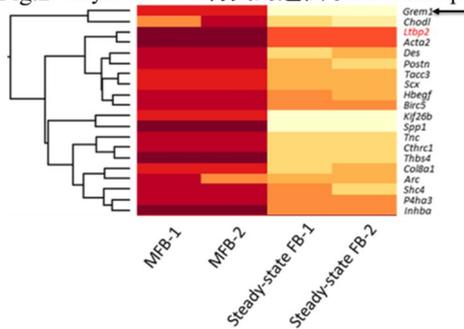


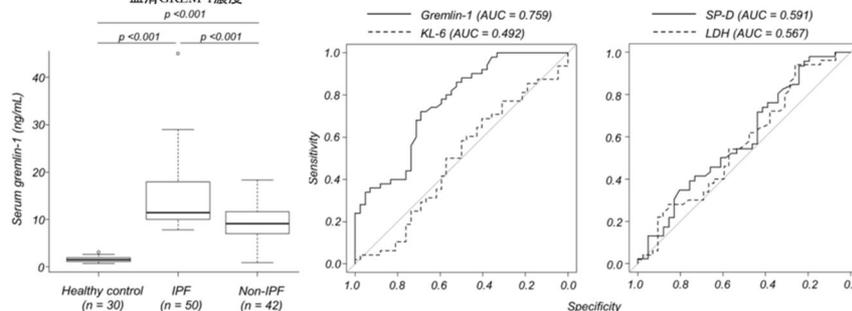
Fig.2 Myofibroblast特異的遺伝子のheat map



その中には、Grem1, Ltbp2, Postn, Hbegf, Birc5, Spp1, Tnc, Thbs4, Col8a1およびInhbaの10個の分泌タンパク質の遺伝子が含まれていた。まず、TGF-によるcollagen線維産生を減少させる作用を有するBMP4に対するアンタゴニストであるGremlin1 (GREM1) (Fig.2の矢印の遺伝子) について検討した。IPF患者群50名、非IPF-ILD患者群42名および健常対照群30名を対象に、临床上で汎用されている3つの血清マーカー (Krebs von den Lungen-6 [KL6]、

Surfactant protein-D [SP-D]、乳酸脱水素酵素 [LDH])とGREM1の血清濃度を測定した。血清GREM1はIPF患者群 (平均14.4 ng/mL) で有意に高く、次いで、非IPF-ILD患者群 (8.8 ng/mL) 、健常対照群 (1.6 ng/mL) であった。IPF対非IPF-ILDsのROC曲線下面積 (AUC) は0.759 (95%信頼区間 : 0.661 ~ 0.857) であり、KL6, SP-DおよびLDHよりも優れていた。GREM1 (カットオフ : 10.4 ng/mL) の感度は72%、特異度は69%であった (Fig. 3) 。さらに、GREM1は肺myofibroblastに強く発現することを免疫染色にて明らかにした。

Fig.3 健常者、IPFおよびnon-IPFにおける血清GREM-1濃度



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計17件（うち査読付論文 17件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 11件）

1. 著者名 Kawasaki Hideya, Hariyama Takahiko, Kosugi Isao, Meguro Shiori, Iwata Futoshi, Shimizu Kosuke, Magata Yasuhiro, Iwashita Toshihide	4. 巻 98
2. 論文標題 Human induced pluripotent stem cells are resistant to human cytomegalovirus infection primarily at the attachment level due to the reduced expression of cell-surface heparan sulfate	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e0127823
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/jvi.01278-23	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 Miura Katsutoshi, Iwashita Toshihide	4. 巻 13
2. 論文標題 Observations of amyloid breakdown by proteases over time using scanning acoustic microscopy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 20642
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-48033-4	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 Suzuki Daisuke, Meguro Shiori, Furusawa Shin, Hashimoto Nanako, Kawasaki Hideya, Kosugi Isao, Enomoto Yasunori, Fujihiro Mayu, Tsukui Hiroe, Iwashita Toshihide	4. 巻 11
2. 論文標題 An autopsy case of disseminated carcinomatosis of the bone marrow from esophageal adenocarcinoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Clinical Case Reports	6. 最初と最後の頁 e7877
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ccr3.7877	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 Kurita Yuki, Meguro Shiori, Tsuyama Naoko, Kosugi Isao, Enomoto Yasunori, Kawasaki Hideya, Uemura Takashi, Kimura Michio, Iwashita Toshihide	4. 巻 18
2. 論文標題 Accurate deep learning model using semi-supervised learning and Noisy Student for cervical cancer screening in low magnification images	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0285996
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0285996	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 Unno Kyoko, Ohtani Hayato, Sakamoto Atsushi, Murakami Hirotake, Yagi Haruna, Ito Hiroaki, Baba Satoshi, Iwashita Toshihide, Kosugi Isao, Maekawa Yuichiro	4. 巻 62
2. 論文標題 Pulmonary Tumor Thrombotic Microangiopathy Caused by Metastatic Ovarian Cancer: An Antemortem Diagnosis with Pulmonary Aspiration Cytopathology	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 3649 ~ 3655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.1641-23	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 Kitagawa K, Shibata E, Yamamoto M, Harada H, Yoshino K, Iwashita T, Oshima M, Tsuji M	4. 巻 28
2. 論文標題 Subacute exposure to bisphenol F diglycidyl-ether induces chronic dermatitis characterized by psoriasis-like skin inflammation in mice.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes Cells.	6. 最初と最後の頁 42 ~ 52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12995.	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 Takanashi Y, Kurachi K, Fujihiro M, Sekihara K, Torii K, Kawase A, Matsubayashi Y, Hayakawa T, Baba S, Sugimura H, Iwashita T, Funai K	4. 巻 42
2. 論文標題 Thyroid transcription factor-1 expression in rectal adenocarcinoma metastatic to the lung	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Respir Med Case Rep	6. 最初と最後の頁 101812
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.rmcr.2023.101812.	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 Itoh T, Yamada S, Ohta I, Meguro S, Kosugi I, Iwashita T, Itoh H, Kanayama N, Okudela K, Sugimura H, Misawa K, Hariyama T, Kawasaki H.	4. 巻 103
2. 論文標題 Identifying Active Progeny Virus Particles in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Sections Using Correlative Light and Scanning Electron Microscopy.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Lab Invest.	6. 最初と最後の頁 100020
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.labinv.2022.100020.	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 Yamada Satoshi, Itoh Toshiya, Ikegami Taro, Imai Atsushi, Mochizuki Daiki, Nakanishi Hiroshi, Ishikawa Ryuji, Kita Junya, Nakamura Yuki, Takizawa Yoshinori, Okamura Jun, Noda Yoshihiro, Iwashita Toshihide, Hariyama Takahiko, Suzuki Mikio, Misawa Kiyoshi, Kawasaki Hideya	4. 巻 13
2. 論文標題 Association between human papillomavirus particle production and the severity of recurrent respiratory papillomatosis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-32486-8	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 Mathews NS, Suzuki Y, Honkura N, Sano H, Iwashita T, Urano T.	4. 巻 210
2. 論文標題 Pre-administration of a carboxypeptidase inhibitor enhances tPA-induced thrombolysis in mouse microthrombi: Evidence from intravital imaging analysis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Thromb Res.	6. 最初と最後の頁 78 ~ 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.thromres.2021.12.031	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 Suzuki D, Meguro S, Inagaki K, Hashimoto M, Kawasaki H, Kosugi I, Enomoto Y, Sugiyama M, Fukushima M, Iwashita T.	4. 巻 10
2. 論文標題 An autopsy case of ovarian mucinous cystic tumor complicated by ovarian abscess and a review of the English literature.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clin Case Rep	6. 最初と最後の頁 e6507
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ccr3.6507.	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 Isao Kosugi, Yoshifumi Arai, Satoshi Baba, Hideya Kawasaki, Toshihide Iwashita and Yoshihiro Tsutsui	4. 巻 9
2. 論文標題 Prolonged activation of cytomegalovirus early gene e1-promoter exclusively in neurons during infection of the developing cerebrum.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Neuropathol Commun.	6. 最初と最後の頁 39
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40478-021-01139-0	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 -

1. 著者名 Haruna Yagi, Masato Nakaguro, Masafumi Ito, Yuki Okumura, Seishiro Takahashi, Yoichiro Aoshima, Yasunori Enomoto, Shiori Meguro, Hideya Kawasaki, Isao Kosugi, Yoshie Shimoyama, Hiroshi Ogawa, Hisashi Tateyama, Toshihide Iwashita.	4. 巻 71
2. 論文標題 Difference in the distribution of tumor-infiltrating CD8+ T cells and FOXP3+ T cells between micronodular thymoma with lymphoid stroma and micronodular thymic carcinoma with lymphoid stroma.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathol Int.	6. 最初と最後の頁 453 ~ 462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13099	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 -

1. 著者名 Aoshima Y, Enomoto Y, Muto S, Meguro S, Kawasaki H, Kosugi I, Fujisawa T, Enomoto N, Inui N, Nakamura Y, Suda T, Iwashita T.	4. 巻 199
2. 論文標題 Gremlin-1 for the Differential Diagnosis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis Versus Other Interstitial Lung Diseases: A Clinical and Pathophysiological Analysis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Lung.	6. 最初と最後の頁 289 ~ 298
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00408-021-00440-y	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 -

1. 著者名 Ooishi M, Yamada S, Itoh T, Meguro S, Yagi H, Kosugi I, Iwashita T, Shinmura K, Misawa K, Hariyama T, Kawasaki H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Diagnosis of Ion-Exchange Resin Depositions in Paraffin Sections Using Corrective Light and Electron Microscopy-NanoSuit Method.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diagnostics	6. 最初と最後の頁 1193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/diagnostics11071193	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 -

1. 著者名 Aoshima Y, Enomoto Y, Fukada A, Kurita Y, Matsushima S, Meguro S, Kosugi I, Kawasaki H, Katsura H, Fujisawa T, Enomoto N, Nakamura Y, Inui N, Suda T, Iwashita T	4. 巻 13
2. 論文標題 Metformin reduces pleural fibroelastosis via inhibition of extracellular matrix production induced by CD90-positive myofibroblasts.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Am J Transl Res	6. 最初と最後の頁 12318 ~ 12337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Arai K, Matsuda M, Nakayasu H, Meguro S, Kurokami T, Kubota A, Iwasaki T, Suzuki M, Kawaguchi S, Iwashita T.	4. 巻 9
2. 論文標題 Nivolumab-induced liver injury with a steroid-refractory increase in biliary enzymes, in a patient with malignant mesothelioma: An autopsy case report.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin Case Rep.	6. 最初と最後の頁 e05174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ccr3.5174	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	目黒 史織 (Meguro Shiori) (40724290)	浜松医科大学・医学部・助教 (13802)	

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
---------	---------