

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：24601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08162

研究課題名（和文）脂質代謝関連分子ANGPTL4による肺線維症の病態解明と新規治療戦略の確立

研究課題名（英文）Elucidation of pathology of pulmonary fibrosis by a lipid metabolism-related molecule ANGPTL4.

研究代表者

北畠 正大 (Maahiro, Kitabatake)

奈良県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60457588

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：特発性肺線維症は不可逆的に線維化が進行する予後不良の難治性疾患であり、その病態解明と新規治療薬開発が望まれている。本研究は、肺線維症患者の肺線維芽細胞で高発現する脂質代謝関連分子ANGPTL4に着目し、その産生機構と線維化に与える影響を明らかにすることを目的とした。肺線維症モデルでは、ANGPTL4は肺線維芽細胞選択的に発現が誘導され、その欠損により病態が改善した。肺線維芽細胞ではTGF- β 刺激により産生が誘導され、細胞増殖や浸潤、線維化関連分子の発現誘導に寄与していた。以上より、ANGPTL4は肺線維症の増悪因子であることが明らかとなり、診断・治療の有望な標的となることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

特発性肺線維症（IPF）は、喫煙などによる肺の慢性炎症が発端となって不可逆的に線維化が進行し、最終的に機能障害をきたす予後不良の難治性疾患である。現在2種の抗線維化薬が治療に用いられているが、その効果は線維化の進行を抑えるに留まり、診断時からの平均生存期間は5年に満たない。よって、IPFの病態を解明し、新たな機序に基づき症状改善を可能とする治療薬の開発が強く望まれている。本研究は、IPF患者の肺線維芽細胞で高発現する脂質代謝関連分子ANGPTL4が線維芽細胞自身の活性化を促す、新規の病態増悪化因子であることを明らかにしたものであり、今後の診断・治療の有望な標的となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a chronic, progressive, and irreversible interstitial pneumonia caused by the excessive production and deposition of extracellular matrix components. However, the mechanisms underlying disease progression have not been fully elucidated. In this study, we focused on a lipid metabolism-related molecule ANGPTL4, which were highly expressed in lung fibroblasts from IPF patients. We found that ANGPTL4 regulated the gene expression of fibrosis-related markers, cell migration, and proliferation. In a murine model of PF, ANGPTL4 was predominantly expressed in the activated fibroblasts and myofibroblasts from the acute to the chronic phase. The pathogenesis of PF was improved in Angptl4-deficient mice. These results indicate that ANGPTL4 is critical for the progression of PF and might be an early diagnostic marker and therapeutic target for IPF.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：特発性肺線維症 筋線維芽細胞 増悪化因子

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (Idiopathic Pulmonary Fibrosis, IPF) は、不可逆性に肺の線維化が進行する予後不良の難治性疾患であり、診断時からの平均生存期間は5年に満たない。線維化は、喫煙などによる慢性的な炎症反応によって生じる組織障害と、その修復・治癒過程における細胞外マトリックスの過剰な合成・蓄積によって起こり、最終的に機能障害をきたすと考えられているが、その病態は未解明な点が多い。一方、IPFの治療には抗線維化薬としてニンテダニブやピルフェニドンが使用されてきたが、その効果は線維化の進行を抑えるに留まり、新たな機序に基づき症状改善を可能とする治療薬の開発が強く望まれている。

申請者は、様々な刺激やダメージによる線維芽細胞の質的変化が線維化の発端となるのではないかと考え、IPF合併肺がん患者から十分な説明と同意のもと非がん部の肺検体の提供を受け、線維化部および非線維化部それぞれの組織から線維芽細胞を単離した。その遺伝子発現の違いをDNAマイクロアレイにより網羅的に解析した結果、線維化部の線維芽細胞で脂質代謝に関連する分子Angiopoietin-like 4 (ANGPTL4)の遺伝子発現が有意に増加していることを見出した。さらに、免疫組織化学的解析からANGPTL4はIPFの病理組織の特徴である活性化した筋線維芽細胞の集簇Fibroblastic fociに強く発現していることが明らかとなり、ANGPTL4が肺線維症の病態と関連するのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究は、IPF患者肺の線維化部の線維芽細胞で高発現するANGPTL4の産生機構ならびに線維化に与える影響を明らかにすることで、肺線維症の病態解明と診断・治療標的としての可能性を探索することを目的とした。

3. 研究の方法

ANGPTL4発現誘導機構の解析

肺上皮細胞株A549細胞、正常ヒト肺線維芽細胞(NHLF)またはIPF患者由来肺線維芽細胞をTGF- β により刺激し、ANGPTL4の発現を定量的PCR法およびウエスタンブロット法により解析した。また、TGF- β のシグナル伝達阻害剤の存在下でのANGPTL4の発現誘導について解析した。

線維芽細胞活性化に対するANGPTL4の影響の解析

RNA干渉によりANGPTL4遺伝子の発現を抑制した、あるいは、ANGPTL4タンパクを添加したNHLF細胞をTGF- β で刺激し、線維化関連遺伝子の発現変動を定量的PCR法により、細胞増殖への影響をMTTアッセイ法により、細胞浸潤への影響をスクラッチアッセイ法により解析した。

肺線維症モデルマウスにおけるANGPTL4の発現誘導の解析

C57BL/6マウスにプレオマイシンを気管内投与することで肺線維症を誘導し、線維化肺におけるANGPTL4の発現の経時的な変化を、定量的PCR法およびウエスタンブロット法により解析した。

シングルセル遺伝子発現解析によるANGPTL4の発現細胞の解析

分担研究者が作製したプレオマイシン誘導性肺線維症モデルの経時的なシングルセル遺伝子発現解析データベースをもとにANGPTL4発現細胞の検索を行なった。また、線維芽細胞におけるサブクラスタリング解析を実施し、ANGPTL4発現細胞の特徴を解析した。

肺線維症病態におけるANGPTL4の影響の解析

プレオマイシン誘導性肺線維症モデルに対して、ANGPTL4タンパクを3日目から隔日で経鼻投与し、14日目の肺組織をマッソントリクローム染色し、Ashcroftスコアによって線維化病変を評価した。また、肺中のヒドロキシプロリン量をSircolコラーゲンアッセイ法により定量し、コラーゲン遺伝子発現を定量的PCR法により解析した。さらに、経卵管ゲノム編集iGONAD法を用いてANGPTL4欠損マウスを作製し、肺線維症モデルの病態を野生型マウスと比較した。

4. 研究成果

ANGPTL4発現誘導の分子機構

NHLF細胞において、ANGPTL4の発現はTGF- β 刺激後2時間をピークとして一過性に認められ、TGF- β 1受容体シグナルと一部MAPキナーゼ経路が関与すること、細胞外マトリックスの主要構成成分であるコラーゲンや筋線維芽細胞マーカーACTA2の遺伝子発現上昇よりも先行して誘導されることが明らかとなった。IPF患者の肺線維芽細胞においても、その由来に

関わらず、上記シグナル経路によって ANGPTL4 が誘導されることが確認され、また筋線維芽細胞誘導機構の一つと考えられている TGF- β 誘導性上皮間葉転換においても ANGPTL4 の発現が認められた。以上の結果から、ANGPTL4 誘導には TGF- β シグナルが重要であることが示唆された。

線維芽細胞活性化における ANGPTL4 の機能

肺線維芽細胞の増殖、細胞浸潤、線維化関連タンパクの発現に与える ANGPTL4 の影響を解析した。TGF- β 誘導性の ACTA2 やコラーゲン遺伝子の発現上昇は、ANGPTL4 タンパクの添加により亢進し、ANGPTL4 の発現抑制により有意に低下した。ANGPTL4 タンパクの添加による細胞増殖および細胞浸潤の亢進は認められなかったが、ANGPTL4 の発現抑制によって TGF- β 刺激の有無に関わらず、細胞増殖および細胞浸潤能は低下した。これらの結果から、ANGPTL4 は活性化した肺線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化、増殖ならびに集簇を促進し、Fibroblastic foci 形成に関与することが示唆された。

肺線維症病態モデルにおける ANGPTL4 の発現誘導

肺線維症病態モデルにおいて ANGPTL4 の発現がどのように変遷するかを解析した。プレオマイシン誘導モデルでは、線維化関連因子の発現上昇や線維化病変は 7 日目から認められ、14 日目をピークに 21 日目には改善傾向を示した。一方、ANGPTL4 の発現上昇は 3 日目から認められ、7 日目をピークとして 21 日目には低下していた。この結果は *in vitro* の結果と一致し、ANGPTL4 が線維化の早期から誘導される分子であることが明らかとなった。

肺線維症病態モデルにおける ANGPTL4 の発現細胞

肺線維症モデルにおける ANGPTL4 の発現細胞を同定するためにシングルセル遺伝子発現解析を行なった。ANGPTL4 は線維芽細胞と一部のマクロファージに選択的に発現しており、線維芽細胞中の ANGPTL4 陽性細胞の割合と ANGPTL4 の発現レベルは 3 日目から上昇し、21 日目には低下傾向にあった。さらに線維芽細胞のサブクラスタリング解析を実施したところ、ANGPTL4 の発現は筋線維芽細胞を含む活性化線維芽細胞に広く認められ、線維芽細胞の活性化マーカーとしての有用性が示唆された。

肺線維症病態モデルに与える ANGPTL4 の影響

肺線維症モデルに対して ANGPTL4 タンパクを経鼻投与することで、線維化の病理学的スコアは有意に上昇し、コラーゲン遺伝子発現および肺中コラーゲン量も増加した。一方、iGONAD 法によって作製した ANGPTL4 欠損マウスは野生型マウスと比較して、線維化の病理学的スコアは有意に改善し、コラーゲン遺伝子発現および肺中コラーゲン量も低下した。これらの結果から、ANGPTL4 は線維化増悪化因子であることが明らかとなった。

以上の研究成果より、肺線維症の線維化部で発現上昇する ANGPTL4 は、線維化の初期過程で TGF- β により活性化した線維芽細胞から選択的に産生され、自身の増殖や集簇、筋線維芽細胞への分化を促進し、IPF 病態に特徴的な Fibroblastic foci を形成させ、病態悪化のトリガーとなることが示唆された。本研究で標的とした ANGPTL4 は、健常者と IPF 患者との比較ではなく、IPF 患者の線維化部と非線維化部の線維芽細胞における遺伝子発現の比較から見出された分子であるため、個人差や遺伝的背景の影響を受けない、真の線維化増悪化因子であると推察される。ANGPTL4 に関する研究は、これまで脂質代謝の観点から肥満や糖尿病に与える影響や、腫瘍の浸潤や転移、感染症などの病態制御に着目し行われており、申請者らは ANGPTL4 が肺線維症の増悪化因子であることを世界に先駆けて報告した (Am J Respir Cell Mol Biol.2023)。ANGPTL4 は線維化の初期過程から誘導されることから、肺線維症の診断・治療の有望な標的となることが期待される。そのためには、IPF 患者における血清 ANGPTL4 値と KL-6 や SP-D といった既存の肺線維症マーカーとの相関性や肺 CT 画像における線維化の進展との関連性を解析することで、病態予測や診断マーカーとしての有用性の検証が必要である。また、ANGPTL4 は多機能分泌タンパクであることから、どのような機能性が直接的に線維化と結びつくのか、線維芽細胞と他の細胞集団との相互作用に与える影響は未解明であり、今後解析を行なっていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Saito Shoichiro, Kitabatake Masahiro, Ouji-Sageshima Noriko, Ogawa Tatsuro, Oda Akihisa, Nishimura Tomoko, Nishioka Tatsuki, Fushimi Satoki, Hara Atsushi, Shichino Shigeyuki, Kumamoto Makiko, Hontsu Shigeto, Kawaguchi Takeshi, Ueha Satoshi, Sawabata Noriyoshi, Muro Shigeo, Matsushima Kouji, Ito Toshihiro	4. 巻 69
2. 論文標題 Angiopoietin-like 4 Is a Critical Regulator of Fibroblasts during Pulmonary Fibrosis Development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 328 ~ 339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1165/rcmb.2022-03040C	査読の有無 無
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 Sonobe Shota, Kitabatake Masahiro, Hara Atsushi, Konda Makiko, Ouji-Sageshima Noriko, Terada-Ikeda Chiyoko, Furukawa Ryutaro, Imakita Natsuko, Oda Akihisa, Takeda Maiko, Takamura Shiki, Inoue Satoki, Kunkei Steven L., Kawaguchi Masahiko, Ito Toshihiro	4. 巻 60
2. 論文標題 THE CRITICAL ROLE OF THE HISTONE MODIFICATION ENZYME SETDB2 IN THE PATHOGENESIS OF ACUTE RESPIRATORY DISTRESS SYNDROME	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Shock	6. 最初と最後の頁 137 ~ 145
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SHK.0000000000002145	査読の有無 無
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 Konda Makiko, Kitabatake Masahiro, Ouji-Sageshima Noriko, Tonomura Rei, Furukawa Ryutaro, Sonobe Shota, Terada-Ikeda Chiyoko, Takeda Maiko, Kawaguchi Masahiko, Ito Toshihiro	4. 巻 24
2. 論文標題 A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs 4 Regulates Pulmonary Vascular Hyperpermeability through Destruction of Glycocalyx in Acute Respiratory Distress Syndrome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 16230 ~ 16230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms242216230	査読の有無 無
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 Shichino S, Ueha S, Hashimoto S, Ogawa T, Aoki H, Wu B, Chen CY, Kitabatake M, O uji-Sageshima N, Sawabata N, Kawaguchi T, Okayama T, Sugihara E, Hontsu S, Ito T, Iwata Y, Wada T, Ikeo K, Sato TA, Matsushima K.	4. 巻 5
2. 論文標題 TAS-Seq is a robust and sensitive amplification method for bead-based scRNA-seq.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Commun Biol	6. 最初と最後の頁 602
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-03536-0	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 Kitabatake M, O uji-Sageshima N, Sonobe S, Furukawa R, Konda M, Hara A, Aoki H, Suzuki Y, Imakita N, Nakano A, Fujita Y, Shichino S, Nakano R, Ueha S, Kasahara K, Muro S, Yano H, Matsushima K, Ito T.	4. 巻 76
2. 論文標題 Transition of Antibody Titers after SARS-CoV-2 mRNA Vaccination in Japanese Healthcare Workers.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Jpn J Infect Dis	6. 最初と最後の頁 72-76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7883/yoken.JJID.2022.041	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 Kawasaki T, Ikegawa M, Yunoki K, Otani H, Ori D, Ishii KJ, Kuroda E, Takamura S, Kitabatake M, Ito T, Isotani A, Kawai T.	4. 巻 41
2. 論文標題 Alveolar macrophages instruct CD8+ T cell expansion by antigen cross-presentation in lung.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Rep	6. 最初と最後の頁 111828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.111828	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 Furukawa R, Kitabatake M, O uji-Sageshima N, Suzuki Y, Nakano A, Matsumura Y, Nakano R, Kasahara K, Kubo K, Kayano SI, Yano H, Ito T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Persimmon-derived tannin has antiviral effects and reduces the severity of infection and transmission of SARS-CoV-2 in a Syrian hamster model.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 23695
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-03149-3.	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 Tatsumi K, Kinugawa K, Isonishi A, Kitabatake M, Okuda H, Takemura S, Tanaka T, Mori E, Wanaka A.	4. 巻 14
2. 論文標題 3.Olig2-astrocytes express neutral amino acid transporter SLC7A10 (Asc-1) in the adult brain.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Brain	6. 最初と最後の頁 163
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-021-00874-8.	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 Fujioka N, Kitabatake M, O uji-Sageshima N, Ibaraki T, Kumamoto M, Fujita Y, Hontsu S, Yamauchi M, Yoshikawa M, Muro S, Ito T.	4. 巻 16
2. 論文標題 Human Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Ameliorate Elastase-Induced Emphysema in Mice by Mesenchymal-Epithelial Transition.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease	6. 最初と最後の頁 2783-2793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/COPD.S324952.	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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Masahiro Kitabatake, Noriko O uji-Sageshima, Atsushi Hara, Akihisa Oda, Shigeyuki Shichino, Satoshi Ueha, Kouji Matsushima, and Toshihiro Ito
2. 発表標題 Angiopoietin-like 4 is a critical mediator for fibroblast activation in pulmonary fibrosis
3. 学会等名 第52回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 齊藤正一郎、北畠正大、王寺典子、古川龍太郎、西村知子、本津茂人、川口剛史、澤端章好、室繁郎、伊藤利洋
2. 発表標題 肺線維症の病態制御因子としてのAngiopoietin-like 4の役割
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	齊藤正一郎、北畠正大、王寺典子、古川龍太郎、西村知子、本津茂人、川口剛史、澤端章好、室繁郎、伊藤利洋
2. 発表標題	Angiopoietin-like 4は肺線維症の病態を制御する 肺線維症患者肺検体とマウスモデルでの解析
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	Masahiro Kitabatake, Noriko Ouji-Sageshima, Ryutaro Furukawa, Atsushi Hara, Toshihiro Ito
2. 発表標題	Transition of antibody titers after the SARS-CoV-2 mRNA vaccine in Japanese healthcare workers.
3. 学会等名	第51回日本免疫学会総会・学術集会
4. 発表年	2022年

1. 発表者名	Masahiro Kitabatake, Shoichiro Saito, Noriko Ouji-Sageshima, Akihisa Oda, Atsushi Hara, Tatsuro Ogawa, Shigeyuki Shichino, Satoshi Ueha, Kouji Matsushima, Toshihiro Ito.
2. 発表標題	Angiopoietin like 4 plays a critical role in the development of pulmonary fibrosis
3. 学会等名	第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	Noriko Ouji-sageshima, Masahiro Kitabatake, Ryutaro Furukawa, Toshihiro Ito.
2. 発表標題	HLA-F as a new target molecule for cancer immunotherapy of colon cancer
3. 学会等名	第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年	2021年

1. 発表者名 Ryutaro Furukawa, Noriko Ouji Sageshima, Masahiro Kitabatake, Toshihiro Ito
2. 発表標題 Persimmon-derived tannin has antiviral effects in a Syrian hamster model of SARS-CoV-2 infection
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Shota Sonobe, Masahiro Kitabatake, Atsushi Hara, Makiko Konda, Ryutaro Furukawa, Tomoko Nishimura, Noriko Ouji-Sagaeshima, Shiki Takamura, Toshihiro Ito.
2. 発表標題 Histone modification enzyme SET domain bifurcated 2 (Setdb2) contributes to the pathogenesis of acute respiratory distress syndrome (ARDS) in murine model
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
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
研究分担者	上羽 悟史 (Ueha Satoshi) (00447385)	東京理科大学・研究推進機構生命医科学研究所・准教授 (32660)	
研究分担者	本津 茂人 (Hontsu Shigeto) (90458034)	奈良県立医科大学・医学部・准教授 (24601)	

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