

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月13日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22390164

研究課題名（和文）

肺の間質・気道の線維化および発癌・進展に関与する循環線維細胞の分子病態とその制御

研究課題名（英文）

Pathogenesis and control of circulating fibrocytes and miRNAs causing interstitial/airway fibrosis and initiating/promoting cancer in the lung

研究代表者 海老名 雅仁 (EBINA MASAHIITO)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：10280885

研究成果の概要（和文）：

肺線維症患者の循環線維細胞は分離・同定中に細胞が分化し、薬物耐性や感受性の検討に適さない為、環線維細胞を制御する影循環血液中 micro-RNA の病態に関して、マウスブレオマイシン肺障害をもちいて検討した。その結果143個のmiRNAが肺障害によって大きく変動し、miR-322, miR-874, miR-155が線維化期に肺組織と血清中で共に上昇することを見出した。これらのmiRNAは新たな線維化マーカーとしてのみならず新しい線維化抑制療法として期待される。

研究成果の概要（英文）：

Although the circulating fibrocytes in the patients with progressive fibrosis have been supposed to cause progressive fibrosis, these cells obtained from patients with various stages of IPF became too differentiated to reveal the sensitivity or tolerance to drugs. Therefore, we examined the circulating micro-RNAs (miRNAs) which might effect on circulating fibrocytes in these severe patients. We compared the expression patterns of miRNAs on Days 0, 7, and 21 in the serum and lung tissues. We found miR-30d increased the most toward Day 21, followed by miR-122, -690, 1907, and 3096b-5p, none of which were increased in the lung tissues. Only miR-322 and miR-874 were moderately increased in both serum and lung tissues. These results suggested these circulating miRNAs as possible biomarkers for pulmonary fibrosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2012年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：非閉塞性肺疾患

キーワード：

- (1) 非閉塞性肺疾患 (2) 肺線維症 (3) 呼吸器感染症
(4) Fibrocyte

1. 研究開始当初の背景

(1) IPF および f-NSIP を中心とした進行性肺線維症に対する治療は未だに困難を極めている。線維芽細胞の異常な病態は、肺線維症のみならず気道周囲の線維化もまた様々な気道疾患の難治化の原因になっている。

(2) 末梢循環血中に見出された循環線維細胞(circulating fibrocyte)は組織内線維芽細胞の前駆細胞と考えられ、MCP-1, SLC, SDF-1 などに誘引され(JCI, 2004)、組織内で線維芽細胞から筋線維芽細胞に分化することによって、様々な臓器の線維化に関わっている。肺線維症(AJRCCM, 2009)のみならず、気管支喘息や狭窄性細気管支炎の気道壁線維化にも関わり(AJRCCM, 2008)、今後の線維化関連疾患に対する治療戦略上、この循環線維細胞の病態を解析する必要がある。

(3) 申請者は、難治性進行性肺線維症で知られる IPF と f-NSIP とでは線維化病変の場が全くことなることを示した。すなわち IPF 患者肺では線維化は小葉間隔壁と胸膜下組織に進行するが、f-NSIP は肺胞壁自体に線維化がすすむ。また、気道壁に線維化が亢進する難治性気管支喘息や狭窄性細気管支炎では肺胞壁には線維化がすすまないことから、炎症の場に加えて fibrocyte の phenotype の可能性を想起させる。しかし、このような患者検体を用いた fibrocyte の病態の研究はまだ不十分でありこれからの分野である。

申請者は従来免疫抑制剤として投与されてきた cyclosporin が筋線維芽細胞に直接作用して線維化抑制効果をしめすことを、遺伝子発現プロファイリングなどによって示した

(ATS 2009)。また初めての抗肺線維化薬 pirfenidone の第 III 治療試験にも関わり、その層別解析によって抗線維化効果が著しい患者群を特定した(ERS, 2009)。

2. 研究の目的

(1) 本研究課題「肺の間質・気道の線維化および発癌・進展に関与する循環線維細胞の分子病態とその制御」は難治で知られる特発性肺線維症・線維性非特異性間質性肺炎の間質の線維化病変、および狭窄性細気管支炎や難治性気管支喘息における気道壁の線維化病変に関わる線維芽細胞を、fibrocyte とよばれる血中の前駆細胞から、TGF-beta, PDGF, CTGF などにより分化する筋線維芽細胞に至るまでの分子病態を解析し、その制御すべき遺伝子発現を明らかにすることによって新しい治療戦略を模索することを目的とする。

(2) 肺線維症患者に肺癌が高率に発症することが知られており、CAF は様々なサイトカインや成長因子を産生することで前癌状態の細胞周囲の微小環境を整えて、その発癌から浸潤・転移まで育むことが示されている。申請者も p53 変異遺伝子をもつ癌細胞周囲に増殖する CAF は p53 遺伝子異常をもたない独立した細胞系であることを報告した。肺線維症患者に多い肺癌の発症機序を考えると、まだ CAF との関係を示されていない fibrocyte の病態を明らかにする必要がある。

(3) 申請者らはこれまでに、本来血管内皮細胞において VEGF によって誘導される血管新生抑制因子 VASH-1(JCI, 2004)が筋線維芽細胞から産生されることを見出し、線維化病変における毛細血管消失機序であることを

示した(ATS 2009)。さらに筋線維芽細胞の VASH-1 発現を siRNA でノックダウンすると筋線維芽細胞に線維化亢進作用をもたらす作用を初めて示した。このことから fibrocyte などの線維化関連細胞の病態を確かめるには、細胞内で mRNA に直接結合して蛋白への翻訳を調節している miRNA を網羅的にとらえる必要性に着目した。

(4) 肺線維症における VEGF には線維化を促進する作用と、肺上皮細胞間と毛細血管細胞間の tight junction をゆるめ、急性増悪発症病態の原因となる可能性を申請者らに見出した。fibrocyte-線維芽細胞-筋線維芽細胞の連鎖のなかにあつて、これらの様々な疾患における phenotype の可能性、CR2, CCR7, CXCR4 などのケモカインレセプターや VEGF, VASH-1 産生の変化を、miRNA の病態からもとらえる必要がある。

3. 研究の方法

(1) 患者肺標本およびにおける fibrocyte の分布を同定し、miRNA の評価から phenotype を区別する。

(2) 患者末梢静脈血中から fibrocyte を分離し、その疾患特異性を探る。

(3) 患者末梢静脈血中から分離した fibrocyte を肺胞上皮細胞、肺毛細血管内皮細胞、リンパ管内皮細胞、気道上皮細胞、肺癌細胞と反応させ、遺伝子発現プロファイリングと miRNA の発現を解析し、組織内における変性から疾患特異性を検証する。

(4) 患者末梢血中の fibrocyte に対して、抗線維化薬 pirfenidone, cyclosporine, PDGFR 阻害剤に対する反応を遺伝子発現プロファイリングと miRNA の発現変化をみる。

(5) これらの結果と実際の各患者の臨床的な治療経過と比較することで、疾患の診断・治療への応用する基準を策定する。

4. 研究成果

(1) プレオマイシンモデルにおける肺の炎症と線維化の経時変化

①炎症の経時変化：本実験でのプレオマイシンモデルでの肺の炎症と線維化の経時変化をみるため、プレオマイシン投与後 0, 3, 7, 14, 21 日目の炎症と線維化の評価を行った。その結果、BALF 中の総タンパク濃度は 3 日目から上昇し 14 日目にピークを迎え、21 日目には減少した。肺湿重量と BALF 中総細胞数、は 7 日目で大きく上昇し、14 日目でさらに上昇し、21 日目には低下した。BALF 中の細胞分画では好中球は 7 日目にピークを迎えたが、マクロファージ、リンパ球は 7 日目に大きく上昇し 14 日目にピークを迎えた。

②肺線維化の経時変化：プレオマイシン投与後、7 日目では、肺間質への炎症細胞浸潤を認め、線維化も胸膜直下に認めた。14 日目では大きな線維化巣の形成を認め、21 日目でも線維化巣形成は継続していた。肺内コラーゲン量は 7 日目から増加し、14 日目がピークであった。病理組織標本による線維化スコアは 0 日目と 3 日目には見られなかったものの、7 日目から出現し 14 日目に最大となった。肺内コラーゲン含量と線維化スコア共に、21 日目では軽度減少がみられたが、線維化は強く持続していた。

(2) SP-D の経時変化

肺組織免疫染色にては 7 日目から SP-D 発現の上昇がみられ、14 日目と 21 日目まで持続していた。BALF SP-D は 3 日目より上昇し、21 日目まで高値が継続した。一方、血清 SP-D は 3 日目までは大きな変化はなく 7 日目に急激に上昇した。14 日目には軽度低下し、21 日目には 7 日目の 3 分の 1 ほどまで低下した。

(3) SP-D 発現に対するプレオマイシンの直接作用

血清 SP-D と BALF SP-D の経時変化に大きな相違を考察するため、SP-D 発現に対するプ

レオマイシンの影響を調べた。ブレオマイシンの肺上皮細胞での SP-D 発現への直接作用を検証するため、ヒト肺上皮培養細胞である A549 と H441 にて検討を行った。その結果、両細胞株ともに有意に SP-D の発現の上昇がみられた。

(4) 血清 SP-D 値は肺の炎症と相関

血清 SP-D は体重変化と有意に相関していた。血清 SP-D は湿肺重量と BALF 中の総タンパク量と有意に強く相関していた。また、血清 SP-D と肺内コラーゲン量と線維化スコアとの間にも有意な正相関がみられた。

(5) 血清 CRP の変化

CRP はブレオマイシン投与後 3 日目からわずかに上昇が見られ、ピークは 7 日目だった。その後は、緩やかに低下し、21 日目にはほぼ正常レベルまで低下した。CRP は SP-D と同様に体重変化と有意な負の相関を認めたが、肺内コラーゲン量と BALF 中の総タンパク量とは相関を認めなかった。血清 SP-D と CRP に相関は見られなかった。

(6) circulating miRNA の経時的変化

血清 SP-D と CRP がピークを迎え炎症が高まっていると考えられる 7 日目を炎症期、強い線維化が遷延する 21 日目を線維化期として血清から total RNA を抽出し、miRNA microarray を行った。変動の定義を 2 倍以上に増加、もしくは 2 分の 1 に減少、とすると、143 個の miRNA がコントロール群 (0 日目) に比して変動していた。これら 143 個の miRNA に関して global normalization データを用いて階層的クラスタ解析を行った。

血清マーカーの候補としてまず考えられるものは 7 日目と 21 日目ともに上昇しているものとして miR-30d, miR-122, miR-690, miR-1907, miR-3096b-5p を認めた。特に miR-30d は 10 倍以上に上昇していた。さらに、7 日目に低下するが 21 日目には上昇する

miR-501-3p, miR-15a, miR-20b を、7 日目に低下し 21 日目にさらに低下するもの、7 日目には上昇するが 21 日目には低下するものについてもそれぞれ検討した。その結果、miR-3095-3p, miR-504, miR-500* が該当した。

(7) circulating miRNA と肺組織 miRNA

コントロール群と 21 日目のマウス肺組織からの miRNA microarray を行ったところ、46 個の miRNA がコントロール群に比して変動していた。これら 46 個の miRNA に関して階層的クラスタ解析を行った結果、31 個の miRNA が上昇、15 個の miRNA が低下していた。血清と肺組織内の miRNA の発現はコントロール群と 21 日目で統計上は有意に相関しているが、miR-690 や let-7 など、肺組織での発現が高く、血清中では低値のものも認めた。miR-322 と miR-874 は 21 日目で肺組織と血清の両方で増加していた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 27 件)

1. Satoh H, **Ebina M**, et al. Nrf2 prevents initiation but accelerates progression through the Kras signaling pathway during lung carcinogenesis. *Cancer Res* **2013 in press**. (査読有)
2. Kobayashi M, Miki Y, **Ebina M**, et al. Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules as surrogate markers for EGFR inhibitor sensitivity in human lung adenocarcinoma. *Br J Cancer*. **107: 1745-1753, 2012**. (査読有)
3. Wong WF, **Ebina M**, et al. Runx1-deficiency in CD4+ T Cells Causes Fatal Autoimmune Inflammatory Lung Disease due to Spontaneous Hyperactivation of Cells. *J. Immunol*. **188: 5408-5420, 2012**. (査読有)
4. Chiba S, **Ebina M**. The diagnostic value

- of the interstitial biomarkers KL-6 and SP-D for progressive fibrosis in combined pulmonary fibrosis and emphysema. *Pulmonary Med* 2012:492960. *Epub* 2012 Feb 28. (査読有)
5. Ohta H, **Ebina M**, et al. Altered expression of tight junction molecules in alveolar septa in lung injury and fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 302:L193-205, 2012. (査読有)
 6. Murakami K, **Ebina M**, Nukiwa T. Toll-like receptor 4 potentiates Ca²⁺-dependent electrolyte secretion from swine tracheal glands. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 45:1101-10, 2011. (査読有)
 7. Raghu G, **Ebina M**, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med*. 183:788-824, 2011 (査読有)
 8. Daito H, **Ebina M**, I et al. Mycobacterial hypersensitivity pneumonitis requires TLR9-MyD88 in lung CD11b+CD11c+ cells. *Eur Respir J*. 38:688-701, 2011. (査読有)
 9. **Ebina M**, et al. Gradual increase of high mobility group protein B1 (HMGB1) in the lungs after the onset of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulmonary Med* 2011, 2011/916486, 1-9 (査読有)
 10. Hisata S, **Ebina M**. A normal range of KL-6/MUC1 independent elevated SP-D indicates a better prognosis in idiopathic pulmonary fibrosis. *Pulmonary Med* 2011, 2011/806014, 1-7. (査読有)
 11. **Ebina M**, S et al. The disappearance of subpleural and interlobular lymphatics in idiopathic pulmonary fibrosis. *Lymphat Res Biol*. 8:199-207, 2010. (査読有)
 12. Satoh H, **Ebina M**, et al. Nrf2-deficiency creates a responsive microenvironment for metastasis to the lung. *Carcinogenesis*. 31:1833-1843, 2010. (査読有)
[学会発表] (計 37 件)
 1. **Ebina M**: Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Clinical Strategy Based on Its Pathogenesis. In: Meet the Professor Seminar in ATS 2013 Philadelphia, USA, May 21 2013
 2. 平成 24 年 4 月 20 日 第 51 回 日本呼吸器学会学術講演会 (神戸) **海老名雅仁** “Comparative pathogenesis of the cyst formation among emphysema, honey-combing by fibrosis, and the combined”
 3. **Ebina M**, et al. RTP801, An Essential Mediator Of Cigarette Smoke-Induced Emphysema, Is Also Increased In Fibrotic Lesions With And Without Smoking Habits. **ATS 2011, May13-18, 2011;Denver, USA.**
 4. Chiba S, and **Ebina M**. Diagnostic Value Of Interstitial Biomarkers, KL-6 And SP-D For Progressive Fibrosis In Combined Pulmonary Fibrosis And Emphysema. **ATS 2011, May13-18, 2011;Denver, USA.**
 5. Chiba S, **Ebina M**, et al. Clinicopathologic Characteristics Of Lung Cancer Occurred In Combined Pulmonary Fibrosis And Emphysema (CPFE). **ATS 2011,**

May13-18, 2011;Denver, USA.

6. Hisata S, Ebina M. Liver X Receptor Agonists Inhibit TGF-Betal Induced Myofibroblast-Differentiation. **ATS 2011, May13-18, 2011;Denver, USA.**

7. Narumi S, Ebina M. Pirfenidone Reduces Serum Level Of SP-D And KL-6, Sensitive Interstitial Biomarkers, Even In Severe Idiopathic Pulmonary Fibrosis (IPF) With Treatment. **ATS 2011, May13-18, 2011;Denver, USA.**

8. Ono M, Ebina M. Direct Effect of Vasohibin-1, A Negative Regulator of Angiogenesis, On Lung Fibroblasts Against Fibrogenesis. **ATS 2011, May13-18, 2011;Denver, USA.**

9. Ohta H, Ebina M, Nukiwa T. Bleomycin-Induced Lung Injury Causes Disturbance of Tight Junction of Alveolar Epithelial Cells. **ATS 2011, May13-18, 2011;Denver, USA.**

10. 平成23年4月8~10日 第28回 日本医学会総会(東京)シンポジウム 海老名雅仁 「特発性肺線維症・急性増悪研究の新しい展開」

11. 平成23年2月11~13日 日本小児リウマチ学会(那覇)特別講演 海老名雅仁 「小児とリウマチによくみる間質性肺疾患と気道疾患における血清KL-6」

12. 平成22年10月28日 東京医大先端医科学講義(東京) 海老名雅仁 「進行性肺線維症と肺気腫合併肺線維症の病態の特徴とその治療」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海老名 雅仁 (EBINA MASAHIRO)

東北大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 10280885

(2) 研究分担者

近藤 丘 (KONDOH TAKAHSHI)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号: 10195901

大河内 眞也 (OKOUCHI SHINYA)

東北大学・病院・助教

研究者番号: 40375035

佐藤 靖史 (SATO YASUFUMI)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号: 50178779

井上 彰 (INOUE AKIRA)

東北大学・病院・特任准教授

研究者番号: 70361087

玉田 勉 (TAMADA TSUTOMU)

東北大学・病院・助教

研究者番号: 80396473

久田 修 (HISATA SHU)

東北大学・病院・助教

研究者番号: 60466571

太田 洋充 (OHTA HIROMITSU)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 40451562