

博士論文

論文題目 肺線維症における線維芽細胞の動態及び系譜に関する研究

氏名 津久井 達哉

## 目次

要旨 .....	3
略語一覧 .....	4
第一章 序文 .....	6
第二章 方法 .....	25
第三章 ブレオマイシン誘導性肺線維症における活性化線維芽細胞の動態 ....	38
3.1 はじめに.....	38
3.2 結果.....	39
3.3 考察.....	63
第四章 活性化線維芽細胞の細胞起源探索 .....	68
4.1 はじめに.....	68
4.2 結果.....	68
4.3 考察.....	89
第五章 総括と展望 .....	96
引用文献.....	99
謝辞 .....	112

## 要旨

特発性肺線維症に代表される肺線維症は、過剰な細胞外マトリックスの沈着により臓器の機能不全をもたらす予後不良の疾患である。細胞外マトリックスの産生源である活性化線維芽細胞の起源は未だ不明であり、活発な議論が行われている。私はこれまで知見に乏しかった線維芽細胞の肺線維化における動態や性状を特異的に解析し、その活性化様式を明らかにした。さらに、新規に確立した経気道移入法を用いて系譜追跡を行い、常在性線維芽細胞の活性化能が最も高い事を明らかにした。本研究で明らかになった肺線維化の細胞及び分子基盤により、肺線維症の進行を抑制する新規治療標的の発見に繋がることが期待される。

## 略語一覧

$\alpha$ -SMA     Alpha-smooth muscle actin

Al     肺胞腔 (alveolar airspace)

BFA     Brefeldin A

BLM     ブレオマイシン (bleomycin)

br     細気管支 (bronchiole)

bv     血管 (blood vessel)

BrdU     Bromodeoxyuridine

Col1     Type I collagen

Col4     Type IV collagen

Col-GFP     I型コラーゲンの GFP レポーターマウス

DIC     微分干渉像 (differential interference contrast)

ECM     細胞外マトリックス (extracellular matrix)

EMT     上皮間葉転移 (epithelial-mesenchymal transition)

FSC     Forward scatter

GFP     Green fluorescent protein

GO     Gene ontology

IPF     特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis)

Lin     Lineage



LL 左葉 (left lobe)

MFI Mean fluorescence intensity

NG2 Neural/glial antigen 2

OPN Osteopontin

PDGF 血小板由来成長因子 (platelet-derived growth factor)

PI Propidium iodide

qPCR 定量的リアルタイム PCR (quantitative real time PCR)

SAGE Serial analysis of gene expression

SSC Side scatter

TGF- $\beta$  Transforming growth factor beta

# 第一章 序文

## 線維症の社会的背景

線維化は慢性的な炎症の結果として引き起こされる各臓器に共通の終末像である。継続的な組織傷害によって組織の構築が破壊され、コラーゲン等の細胞外マトリックスが不可逆的に沈着する[1]。有効な治療法に乏しい場合が多く、線維化が進行すると最終的に臓器不全によって死に至る。代表的な線維症として、肺における特発性肺線維症（idiopathic pulmonary fibrosis: IPF）や肝臓における肝硬変、腎臓における糖尿病性腎症が知られている。また、多くの自己免疫疾患においても線維化が進行する[2]。さらには一部のガンにおいて組織が線維化することが知られており、線維化と発がんの関連が注目されている[3]。線維化は先進国における死因の45%までに関連するとも言われている[4]。糖尿病性腎症に伴う透析患者の増加など、線維症疾患が国の医療費を増大させる一因にもなっており、線維症の克服は社会的にも重要な課題である。

IPFは、肺胞壁の間質を病変の場とする間質性肺炎の中でも頻度が高く、最も重篤なものである[5]。多くの患者は50歳以上で発症し、女性よりも男性の方が発症しやすい傾向がある。さらには喫煙歴も危険因子である。有病率は10万人中13-20人とされており[5]、国内においても1万人以上の患者を有し

ている。発症の原因は分かっておらず、肺移植を除いて症状の進行を根本的に止める治療法は存在しない。診断後の生存期間中央値が 2.5 – 3.5 年という、極めて予後不良の疾患である[6]。

IPF が発症する原因は不明だが、間質性肺炎患者のおよそ 5 % を占めると考えられている家族性肺線維症の情報を基に発症機序について仮説が立てられている[5]。家族性肺線維症の原因遺伝子として同定されている surfactant protein C (*SFTPC*) や surfactant protein A2 (*SFTPA2*) はいずれも 2 型肺胞上皮細胞に高発現している遺伝子であり、遺伝子変異によってタンパク質の折り畳みが上手くいかず、変性タンパク質が蓄積して小胞体ストレス応答を引き起こすことが分かっている[7,8]。また、テロメラーゼをコードする遺伝子である *TERT* と *TERC* の変異も一部の家族性肺線維症に見られる[9]。*TERT* や *TERC* の変異は散発性 IPF のごく少数にしか見られないが、一方で変異の有無に関わらず IPF 患者における肺胞上皮細胞のテロメア長は健常人と比べて有意に短いことが報告されている[10]。これらに加えて、細気管支の上皮細胞に発現するムチンの一種である *MUC5B* の変異が家族性肺線維症・散発性 IPF 両患者で高頻度に見られることが最近明らかになった (IPF 患者の 38%) [11]。この変異は *MUC5B* のプロモーター領域に存在し、*MUC5B* の発現を上昇させる変異であるとされているが、IPF の発症に結びつく詳しいメカニズムは分かっていない。

これらの遺伝的要因を総合すると、肺の上皮細胞におけるタンパクの発現異常とそれに伴う小胞体ストレス、さらにはテロメア長が IPF 発症の原因と関わりがあることが予想される。しかしながら、同様の遺伝子変異をマウスに導入しても IPF 様の症状が自然発症するわけではなく、薬剤やウイルスによる付加的な傷害が線維化の誘導に必要なことが分かっており[12]、IPF の発症機構の解明は難航している。そのため、IPF の治療戦略として、臓器機能不全の直接的な原因となる細胞外マトリックスの過剰な沈着を抑制するアプローチも模索されている。

IPF の治療薬としては現在ピルフェニドン (pirfenidone) とニンテダニブ (nintedanib) が承認されている。ピルフェニドンの作用機序はよく分かっていないが、動物の肺線維症モデルで抑制的な働きを示し、臨床治験が行われた経緯がある[13]。ニンテダニブは vascular endothelial growth factor (VEGF)、fibroblast growth factor (FGF)、platelet-derived growth factor (PDGF)等複数のパスイを阻害するチロシンキナーゼ阻害薬であり、投与により呼吸機能の低下を抑制することが明らかになった[14]。しかしながら、いずれの薬においても症状の進行を遅らせるのみで、病気の根本的な克服には至っていない。また、治療として肺移植を選択した場合も、移植後の 5 年生存率は 50%程度であり[15]、拒絶など新たなリスクを伴うので、肺移植も決して万能な治療法ではな

い。IPF の病因及び病態を明らかにし、症状の進行のメカニズムに基づいたより特異的な新規治療法を開発することが必要とされている。

## IPF の病理学的特徴

IPF は通常型間質性肺炎 (usual interstitial pneumonia: UIP) と呼ばれる病理像を呈す。UIP の特徴として、肺下部の胸膜下に蜂巢肺と呼ばれる、線維化によって肺泡構造が崩壊して再構築され、気腔が拡張した像が見られる。蜂巢肺の領域では細気管支上皮細胞様の形態をした上皮細胞が過形成を起していることが多く、線維化が進行した終末像であるとされる。また、肺の近位は比較的通常の構造を保っており、低倍率で組織像を観察した時に線維化領域と通常領域が不均一に見られることも UIP の特徴である[16]。さらに、通常領域と線維化領域の境界周辺において、紡錘状の線維芽細胞が上皮下にクラスターを形成している像が見られる。このクラスターは線維芽細胞巣 (fibroblastic foci) と呼ばれ、線維化の病変が進行している最前線であると考えられており、活発に細胞外マトリックスの産生が行われている[16]。線維芽細胞巣の特徴として、正常の状態では上皮基底膜に囲まれた間質の領域に存在する線維芽細胞が、基底膜の気腔側でクラスターを形成し、上皮細胞と基底膜を介さずに接触していることである[17-20]。上皮傷害が生じている場所で活性化した線維芽細胞が肺胞腔

へ浸出することが知られており[21]、肺胞腔に移動した線維芽細胞が集積・増殖した結果として線維芽細胞巣が形成されると考えられている[18,19]。線維芽細胞巣が形成される病態生理学的な意味は分かっておらず、形成後の運命も不明である。線維芽細胞巣とは対照的に、より時間が経過した蜂巢肺のような線維化領域では比較的細胞の密度が低く、コラーゲン線維が中心に見られる[16]。また、IPFは線維化進行部位における白血球の浸潤を伴わない特徴があり、ステロイド等の抗炎症療法が線維化進行の抑制に効果を示さないことが知られている[5]。

### 線維化の細胞・分子機構

細胞外マトリックスの産生及び沈着は創傷治癒の一過程である[22] (図1)。皮膚等の上皮組織が傷害を受けた時、傷害部位で血液が凝固して炎症が始まる。傷害部位の周囲で線維芽細胞が活性化し、フィブリン等の transitional matrix を足場に傷害部位へ遊走する。線維芽細胞は移動と同時にコラーゲン等の細胞外マトリックスを産出し、さらには収縮能を持つ筋線維芽細胞 (myofibroblast) に分化して収縮する。収縮により傷害部位が小さくなり、再上皮化が起こる。創傷治癒の完了と同時に多くの筋線維芽細胞はアポトーシスによって組織から除かれる[23]。線維化が生じている場所では、筋線維芽細胞等の活性化した線

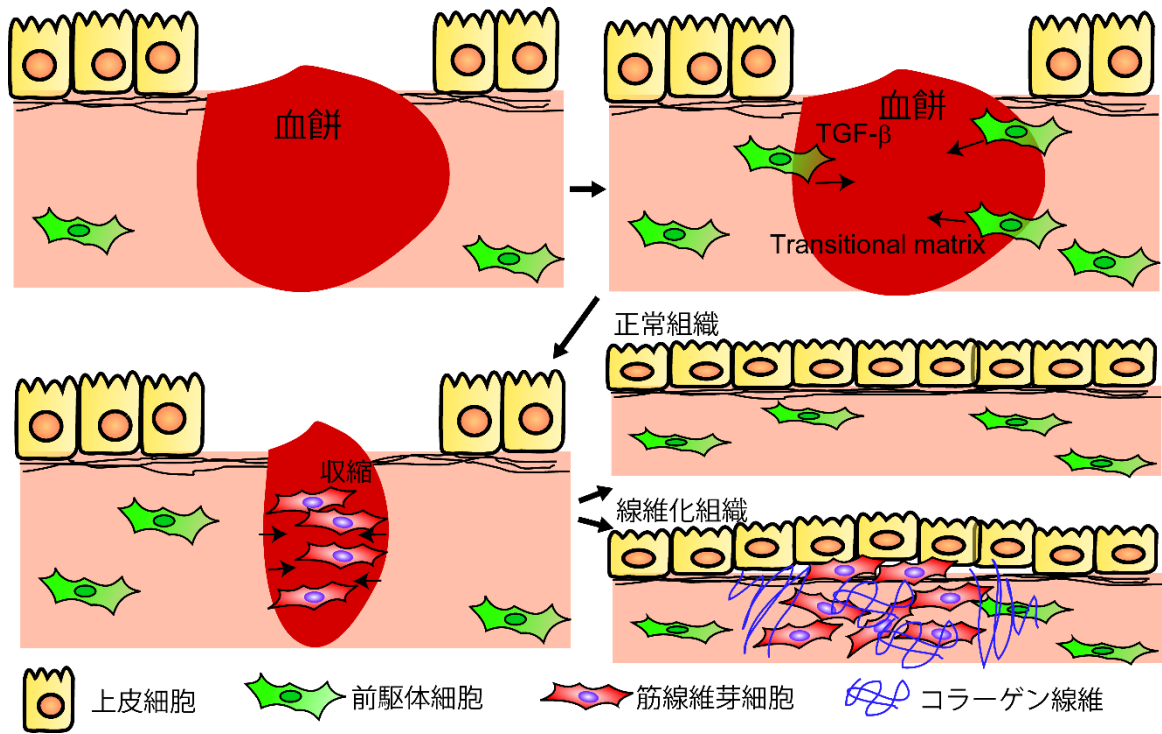


図1 創傷治癒と線維化

創傷治癒の過程。皮膚等の上皮組織が傷害を受けると、出血によって血餅が形成される。血餅中にはフィブリン等の transitional matrix が含まれており、周囲の組織から筋線維芽細胞の前駆体が遊走してくる。これらの前駆体の活性化に TGF- $\beta$  が関わっていることが分かっている。筋線維芽細胞は収縮することで創傷部位を小さくする。再上皮化の後に筋線維芽細胞はアポトーシスによって組織から除かれるが、線維化が生じている場所では筋線維芽細胞が蓄積し、過剰にコラーゲンを沈着させていると考えられている。引用文献[22]の図を改変して再描画。

維芽細胞による細胞外マトリックス産生が継続し、それらが不可逆的に組織沈着する状態であると考えられている[22]。線維症疾患の多くで上皮傷害が線維化の引き金となっていることも示唆されており[1]、慢性炎症や慢性的組織ストレスによって上皮傷害が継続し、創傷治癒の過程が妨げられている状態と考えられている。

筋線維芽細胞は線維症においても線維化領域で見られ、過剰にコラーゲンを産出しているエフェクター細胞であると考えられている[24,25]。筋線維芽細胞のマーカーとして最もよく用いられているのが **alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA)** である。通常は平滑筋細胞に発現しているこの分子は、線維芽細胞の活性化や細胞が置かれた機械的ストレスによって発現が誘導される[26]。また、線維芽細胞において  **$\alpha$ -SMA** の発現を誘導し、線維症においてもその主要な役割が報告されている分子として **transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ )** が挙げられる[27]。TGF- $\beta$  シグナルが肺線維化を促進することは様々な実験報告により明らかにされているが[28,29]、TGF- $\beta$  は線維化以外にも生体において様々な役割を担っているため、それ自体を治療標的とすることは困難であり、TGF- $\beta$  の翻訳後における活性制御を標的にした治療薬が模索されている。TGF- $\beta$  は主に上皮細胞や組織に浸潤したマクロファージ等によって分泌されるが、通常は活性の無い潜在型複合体として細胞外マトリックスや一部の細胞表面に付着する



[30]。この潜在型 TGF- $\beta$ からの活性型 TGF- $\beta$ の放出にはインテグリンの結合を介した複合体の構造変化が関与することが明らかになっている[29–31]。TGF- $\beta$ の活性体放出に寄与し、傷害部位近辺の活性化上皮細胞に高発現する integrin  $\alpha v\beta_6$  の中和抗体は動物の肺線維症モデルにおいて顕著な治療効果を示し、現在ヒトの肺線維症を対象に臨床治験が行われている[30]。

線維症は組織の破壊と再構築を伴い、TGF- $\beta$ のような発生でその役割が知られている遺伝子が活性化していることが分かっている。IPF 患者の肺において WNT/ $\beta$ -catenin 経路関連遺伝子の発現亢進が見られており[32]、WNT/ $\beta$ -catenin 経路の活性化を意味する  $\beta$ -catenin の核移行が 2 型肺胞上皮細胞と線維芽細胞巢において報告されている[33]。また、IPF 患者の肺における線維化領域の上皮細胞が Sonic hedgehog (SHH) を発現していることが明らかになっている[34]。これらのモルフォゲンが線維症において果たす役割は不明だが、上皮細胞と間質細胞のクロストークを制御することが *in vitro* の実験や発生の研究により分かっており[35,36]、新規治療標的分子として注目されている。

### 筋線維芽細胞の細胞起源

細胞外マトリックスの過剰な沈着をもたらすエフェクター細胞である筋線維芽細胞は治療標的として注目されてきた。その前駆体と活性化の分子機構を明ら

かにすることは標的分子の探索に必要不可欠であるが、筋線維芽細胞の細胞起源は長年激しい論争が続いており、未だ統一見解は得られていない。古典的には組織常在性線維芽細胞が組織傷害によって筋線維芽細胞に分化すると考えられてきたが、1990年代に骨髄由来の線維細胞（fibrocyte）が血流を介して抹消の組織に供給され、筋線維芽細胞に分化することが報告された[37]。さらに、遺伝子工学の技術が発展し、遺伝子改変マウスを用いて特定の細胞種を特異的に標識してその運命を辿ること（系譜追跡）が可能になると、種々の細胞の系譜追跡を行って筋線維芽細胞の起源探索が行われた。その中でも2000年代に入って上皮細胞が上皮間葉転移（epithelial mesenchymal transition; EMT）を起こして筋線維芽細胞に分化し、細胞外マトリックスの沈着に貢献することが複数のグループから次々と報告された[38,39]。また、2000年代の後半からはDuffieldらのグループが腎臓の線維化モデルにおいて報告したのを皮切りに、血管周囲細胞（pericyte）が筋線維芽細胞の主要な起源であるとの報告が相次いだ[40-42]。しかしながら、いずれの細胞種においても、筋線維芽細胞への貢献に否定的な報告もなされており、活発な議論が続いている（図2）。

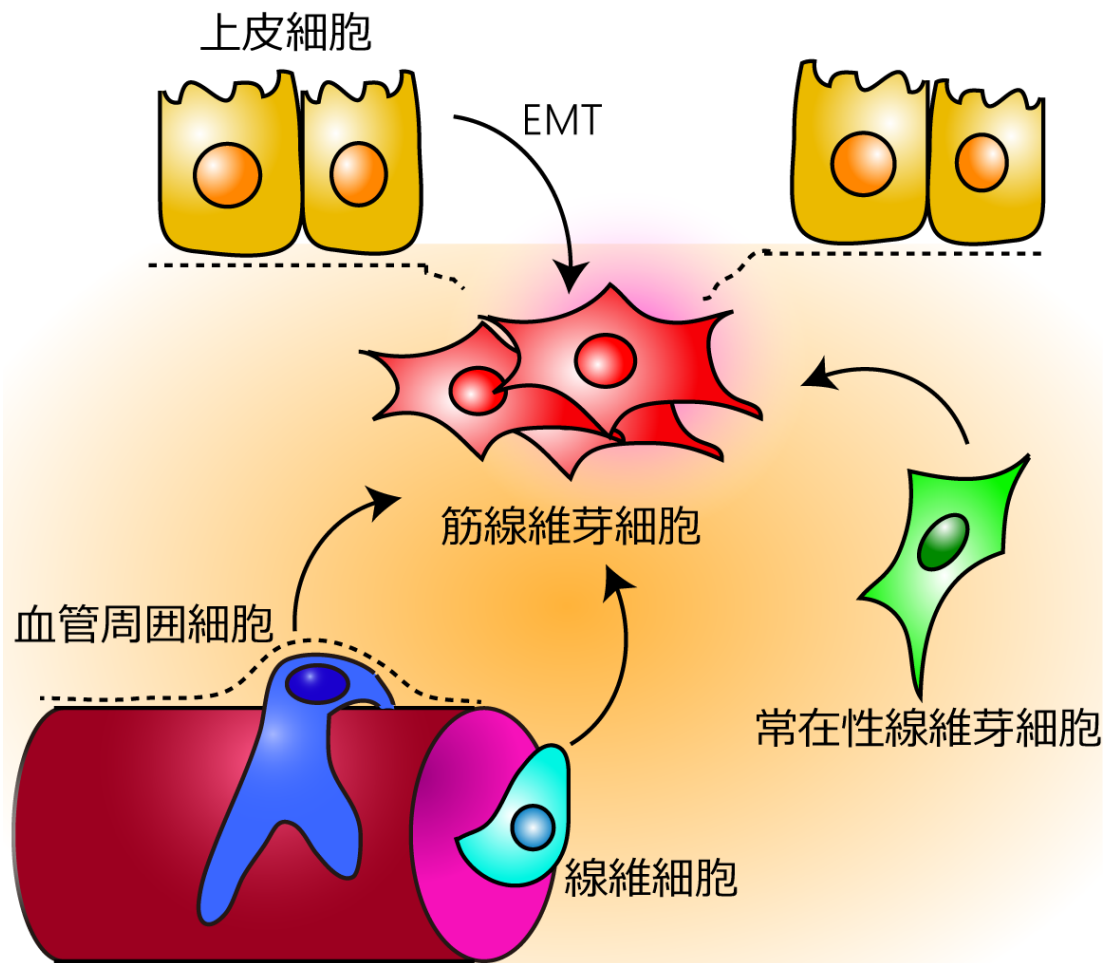


図2 活発な議論のある筋線維芽細胞の起源

線維症において過剰な細胞外マトリックス沈着のエフェクター細胞とされる筋線維芽細胞の起源は様々な説があり、現在も活発な議論が続いている。上皮細胞が上皮間葉転移（EMT）を介して分化する説や、線維細胞が血流を介して分化する説がある。また、血管に近接して血管基底膜（点線）の内側に位置する血管周囲細胞や、常在性線維芽細胞が起源であるとする説もある。

線維細胞は CD45、CD34 等の白血球マーカーを発現し、I 型コラーゲン陽性で定義される細胞であり [37]、線維細胞は骨髄から由来するとされている [43]。また、CD11b 等の単球マーカーを発現しているとの見解もある [44]。線維細胞は培養によって接着性で紡錘状の形態をした細胞に分化し、筋線維芽細胞様の性状を示す [44]。CXCR4 を発現しており、炎症部位で分泌される CXCL12 に反応して組織に浸潤し、線維化を促進するとの報告もある [45]。一方で、骨髄キメラや並体結合 (parabiosis) を用いた実験から、血流を介して組織に供給される I 型コラーゲン産生細胞は非常に少数であるとの報告も複数のグループから各臓器の線維症モデルでなされている [40,46,47]。最近 Vav-cre トランスジェニックマウスを用いた血球細胞における I 型コラーゲンのコンディショナルノックアウト (Vav-cre/coll1a1<sup>fl/fl</sup>) 実験により、血球細胞由来の I 型コラーゲンはブレオマイシン誘導性肺線維症の線維化に貢献しないことが明らかになった [48]。さらに同論文で著者らは、CD45 陽性細胞が培養液中の I 型コラーゲンを取り込むことによってフローサイトメーターで I 型コラーゲン陽性に変化することを示し、これまでの線維細胞に対する報告は遺伝子の転写・翻訳、組織へのコラーゲン産出等の直接的な証拠が希薄であると述べている [48]。線維細胞が線維化において果たす役割を明らかにするためには、筋線維芽細胞への分化能だけでなく、組織に常在する細胞との相対的なコラーゲン

産生量など定量的な線維細胞の解析が必要である。

EMTは発生やがんの分野で広く認められている現象であり[49]、線維症で見られる上皮細胞の異常や活性化しているシグナル経路から、線維症でもその役割が疑われている[39]。肺線維症モデルにおいてEMTが生じる論拠として、上皮細胞マーカーと間質細胞マーカーが一部で共局在することや、単離した上皮細胞が *in vitro* の培養で間質細胞様に分化することが指摘されてきた[50-52]。Rockらは2型肺胞上皮細胞のマーカーである *Sftpc* と細気管支上皮細胞のマーカーである *Scgb1a1* 発現細胞の系譜追跡を行い、肺線維症モデルにおいてそれらが間質に移動せず、 $\alpha$ -SMA や *S100a4* 等の活性化線維芽細胞マーカーを発現しない事を報告し、筋線維芽細胞の起源として上皮細胞を否定した[53]。腎臓や肝臓の線維症モデルにおいてもEMTを介する筋線維芽細胞への寄与に否定的な報告がなされている[41,54-56]。一方で、慢性的な傷害が生じている組織の上皮細胞で、発生やがんにおけるEMTと同様の遺伝子活性化が起こっていることが報告されており[39]、EMTは上皮細胞によるI型コラーゲン産生細胞への直接的な分化よりも、間質細胞とのクロストークを促し、線維化促進性の変化を与えるものとして定義を変えつつある[57,58]。

血管周囲細胞は血管の外側で血管内皮細胞に近接している細胞であり、血管形成や種々の血管機能に関わっているとされている[59]。血管周囲細胞の大

部分は血管基底膜の内側に存在しており、血管内皮細胞と直接的な接触を部分的に持っていると考えられる[60]。Duffieldらは腎臓において *Foxd1* で標識される細胞が血管周囲細胞様の特徴を有しており、一側尿管結紮モデルで I 型コラーゲン産生細胞の主要な起源であることを報告した[41]。その後立て続けに脊髄、皮膚、筋肉、肺においても血管周囲細胞様の細胞が癒傷形成細胞の主要な起源であることが複数のグループから報告された[42,61,62]。これらの報告では、定常状態で血管に近接して血管基底膜に囲まれている血管周囲細胞が、組織傷害時に血管を離れて基底膜の外側に移動し、筋線維芽細胞に分化して癒傷を形成することを示している。また、一部の血管周囲細胞は線維芽細胞のみならず脂肪細胞や軟骨細胞等の間葉系細胞への多分化能を有しているとの報告もあり[63]、末梢組織における間葉系幹細胞としての役割が疑われている。一方で、血管周囲細胞が主要な I 型コラーゲンの産生源ではないことを示唆する系譜追跡の報告もある。Rockらは肺線維症モデルにおいて血管周囲細胞の一つのマーカーである *neural/glial antigen 2 (NG2)* を発現する細胞を系譜追跡し、それらが筋線維芽細胞の主要な起源でないことを示した[53]。LeBlueらも同様に腎臓の線維症モデルにおいて、NG2 を発現する血管周囲細胞が腎臓の線維化に貢献しないことを示した[64]。

これらの相争う実験結果が報告される原因の一つとして、血管周囲細胞の

特徴や同定方法が確立していないことが挙げられる。現在提唱されている血管周囲細胞の表面マーカーとして PDGF receptor  $\beta$  (PDGFR $\beta$ ), CD146, NG2 があるが、いずれの分子も単独で血管周囲細胞を同定できる特異性は無く、さらには血管周囲細胞内での異質性も見られる[42,61]。また、あるグループが血管周囲細胞と定義している集団は血管周囲の線維芽細胞であるとする反論もあり[65]、臓器ごとにこれらの細胞の解剖学的・生理学的な特徴付けが必須であると考えられる。肝傷害に伴う線維症において、肝臓における血管周囲細胞とされる肝星細胞 (hepatic stellate cell) が筋線維芽細胞の主要な起源であることは比較的広く受け入れられているが[66,67]、肝星細胞は一般的な血管周囲細胞とは異なる特徴を持つ。肝星細胞はディッセ腔と呼ばれる内皮細胞と肝細胞の間の場所で内皮細胞に近接しているが、一般的な血管周囲細胞のように血管基底膜の内側に存在するわけではない[68]。また、ビタミン A を細胞内の脂肪滴に貯蔵しており、これらは筋線維芽細胞への活性化時に消失することが知られている[68]。肝星細胞は四塩化炭素肝傷害時に I 型コラーゲン陽性 $\alpha$ -SMA 陽性細胞に分化し、肝臓に蓄積する細胞外マトリックスの主要な産生源となる[69]。一方で胆管結紮肝線維化モデルにおいては門脈域線維芽細胞 (portal fibroblast) が主要な筋線維芽細胞の起源であるとの報告もある[70]。このような各臓器の間葉系細胞にどの程度生理学的な保存性があり、またどの程度の特異性がある

のか、各臓器の疾患発症機序に基づいて解析を行う必要がある。

### 肺の常在性線維芽細胞

肺の組織学的特徴として極めて薄い肺胞壁に上皮、間葉系、血管内皮等の細胞が効率的なガス交換を可能にする組織を形成し、その肺胞壁が嚢状の構造を単位として、3次元的に複雑なネットワークを肺全体に巡らせていることが挙げられる[71]。肺胞の95%の領域は扁平状である1型肺胞上皮細胞によって覆われており、残りは立方体様の2型肺胞上皮細胞が占めている[72]。上皮細胞と上皮基底膜で隔てられた間質の領域に常在性線維芽細胞が存在しており、多くの場合2型肺胞上皮細胞と近接している[71,73,74]。常在性線維芽細胞は肺全体の細胞の30-40%を構成しているとされ、肺胞の構造の足場となる細胞外マトリックスを産生している[72]。また、げっ歯類において常在性線維芽細胞が脂肪滴を有し、2型上皮細胞が分泌するサーファクタントに含まれる脂肪を供給しているとの報告があるが[73,75]、ヒトにおいても常在性線維芽細胞が同様の脂肪滴を有しているかは議論がある[76,77]。常在性線維芽細胞はPDGFR $\alpha$ 陽性であり、*in vitro*でTGF- $\beta$ 等の刺激により筋線維芽細胞に分化することが知られている[78]。*in vivo*においても古典的には常在性線維芽細胞が筋線維芽細胞の主要な起源であると考えられてきたが、それを証明する厳密な系譜追跡の実験



はまだ報告されていない[5,79]。RockらはPDGFR $\alpha$ -GFPレポーターマウスを用い、ブレオマイシン誘導性肺線維症においてGFP陽性細胞が増殖応答を示すことから、PDGFR $\alpha$ 陽性の常在性線維芽細胞が筋線維芽細胞に分化する前駆体の一つであると提案した[53]。一方でHungらはFoxd1-Cre-tdTomatoとI型コラーゲンGFPレポーターマウス(Col-GFP)の組み合わせから、およそ68%までの筋線維芽細胞が血管周囲細胞由来であり、残りを常在性線維芽細胞等の細胞由来であるとした[42]。これらの報告の欠点は常在性線維芽細胞と血管周囲細胞の特徴付けが不足していることで、それぞれのグループが見ている細胞集団の正当性や平滑筋細胞との重複の有無に疑問が残る。これまでに提唱されているマーカーや解剖学的特徴を基に、肺の間葉系細胞同定法を体系的に定義する必要があると考えられる。また、いずれの報告においても常在性線維芽細胞を特異的に標識した系譜追跡は行っていない。常在性線維芽細胞は、プラスチック培養皿に接着性を示す細胞という曖昧な定義で単離、解析されてきた経緯があり、*in vivo*における同定法や標識法は確立されていない。さらに、間葉系の細胞は血球系細胞のように免疫表現系により同定した特定の集団を養子移入により解析する方法が発達しておらず、その*in vivo*での振る舞いについて特異的な解析はほとんど行われて来なかった。同時に、線維症研究でよく用いられる組織学的な解析は使用できるパラメーターや解像度に限界があり、それだけで

シングルセルレベルの解析を行うことは困難である。筋線維芽細胞の起源細胞について結論を出すためには、常在性線維芽細胞を特異的かつ効率的に標識し、その動態を解析できる実験系の確立が必要不可欠である。

### ブレオマイシン誘導性肺線維症モデル

IPFの原因は不明であり、動物モデルにおいてその症状を完全に再現するモデルは存在しない。現在 IPF のモデルとして最も頻繁に用いられているのはブレオマイシンの経気道単回投与による肺線維症モデルである[80,81]。ブレオマイシンは抗がん剤の一種であり、臨床でもその副作用として肺線維症が問題になっている[82]。ブレオマシンは肺の上皮細胞において活性酸素種による酸化ストレスとそれに伴ったアポトーシスを誘導する[82,83]。経気道単回投与の場合、投与後1週間から2週間で気管支を中心とした領域に線維化領域を形成し、投与後4週間でコラーゲン沈着のピークを迎える[81]。ヌードマウスや SCID マウスにおいても同様の投与方法で線維化を誘導することから、ブレオマイシンは獲得免疫系とは独立して症状を引き起こすと考えられている[84,85]。

ブレオマイシン誘導性肺線維症は IPF のモデルとして最もよく用いられているモデルではあるが、IPF との多くの相違点が指摘されている。IPF は胸膜周

辺の肺下部を中心に線維化が進行するが、ブレオマイシンの経気道投与では肺上部の気管支及び細気管支周辺に線維化が生じる[86]。最も大きな両者の違いは、IPFでは線維化が炎症を伴わず慢性的に進行するが、ブレオマイシン誘導性肺線維症では急性傷害によって炎症とともに線維化が生じ、投与後4週間を過ぎると症状はそれ以上進行しない点である[81,86]。さらにブレオマイシン誘導性肺線維症は時間経過とともに自然治癒すると考えられてきた[87,88]。しかしながら、最近複数のグループからブレオマイシン投与後6ヶ月間線維化領域が維持されていることが報告された[89,90]。これらの報告はブレオマイシンにより不可逆的な線維化が形成されることの直接的な証拠であるが、投与方法や投与量、マウスの年齢等の違いにより可逆性・不可逆性の違いが生じるのかどうかは不明である。

ブレオマイシン誘導性肺線維症は症状の経過や部位がIPFと異なるとの批判があるが、一方で上皮傷害をもたらし、肺胞構造の崩壊と線維化を生じる点はIPFとの共通点である[81]。また、ブレオマイシン誘導性肺線維症ではIPFほどの明瞭な線維芽細胞巣が見られないが[79]、IPFで見られるものと組織学的な類似点を持つ微小な線維芽細胞巣を形成することが分かっている[18]。ブレオマイシン誘導性肺線維症でその有効性が確認され、IPFでも治療薬として承認された薬や現在臨床治験中の薬もあることから、線維化のメカニズムにおけ

る IPF との関連性も示唆される[13,14,91,92]。

## 本研究の目的

以上に述べたような背景を基に、私は肺線維症に活性化線維芽細胞の起源や活性化動態を明らかにし、肺線維症の新たな治療標的を探索することを本研究の目的とした。常在性線維芽細胞や血管周囲細胞等の同定方法を確立するため、レポーターマウスを用いて免疫学的及び超構造的解析を行った。また、I型コラーゲンレポーターマウスを用いて、ブレオマイシン誘導性肺線維症における活性化線維芽細胞の動態解析及び包括的遺伝子発現解析を行った。さらに、経気道移入による新たな系譜追跡実験系を確立し、各肺細胞の活性化能を調べた。

## 第二章 方法

### マウス

Collagen I( $\alpha$ 2)-GFP マウス (Col-GFP) は C57BL/6 系統と 10 世代以上戻し交配しており、東海大学の稲垣豊博士から譲り受けた[47]。NG2-DsRed マウスは The Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) から購入し (stock number 008241)、Col-GFP マウスもしくは C57BL/6 マウスと交配した第一世代のマウスを実験に用いた。戸村道夫先生 (現大阪大谷大学) から譲り受けた ROSA-CAG-SCAT3.1 マウスは BDF1 由来の胚性幹細胞から作製され、C57BL/6 マウスと 2 世代以上戻し交配したものを実験に使用した[93]。細胞周期インディケーターである FucciG1-#639/FucciS/G2/M-#474 マウスは理化学研究所の宮脇敦史先生から C57BL/6 系統と 5 世代戻し交配したマウスを譲り受け、その後 10 世代まで戻し交配して実験に用いた[94,95]。野生型マウスとして C57BL/6 マウス日本 SLC (浜松, 日本) もしくは日本 CLEA (東京, 日本) から購入した。コンジェニックマウスとして Ly5.1 マウスを The Jackson Laboratory から購入した (stock number 002014)。実験は 6 週令から 12 週令のマウスを用いて行われた。マウスは当教室の SPF 施設内で飼育され、全ての実験は東京大学大学院医学系研究科分子予防医学教室の「炎症・免疫疾患における免疫担当細胞・組織細胞の動

態制御(承認番号：医-P12-35P2A)」により東京大学医学系研究科・医学部動物実験委員会の承認のもと、法令および東京大学動物実験実施マニュアルに則って遂行した。

### 経気道投与

経気道投与に際して、マウスはペントバルビタールの腹腔内投与、もしくはイソフルレンの吸入投与により麻酔を施した。ブレオマイシン硫酸塩 (Toronto Research Chemical, Toronto, Canada) を 1.25 – 2.5 mg/kg 生理食塩水に溶解したもの 50  $\mu$ l、もしくは対照群として生理食塩水 50  $\mu$ l を口咽頭吸引法 (oropharyngeal aspiration) [96]で経気道投与した。経気道細胞移入に際しては、上記と同様にマウスに麻酔を施し、50  $\mu$ l の細胞懸濁液もしくは対照群として phosphate buffered saline (PBS)を口咽頭吸引法で経気道投与した。

### BrdU 処理

Bromodeoxyuridine (BrdU; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)は 0.8 mg を 200  $\mu$ l の生理食塩水に溶解し、解析の 24 時間前に腹腔内投与した。飲水投与の場合は 0.8 mg/ml で飲水に溶解し、解析日まで継続して摂取させた。

## 肺組織回収・細胞調製

マウス解析に際しては、マウスを麻酔下で安楽死させた後、心臓の右心室から 5 ml の PBS を注いで脱血した。気管支肺胞洗浄液を採取する際は、気道にシリンジを差し入れて結紮し、1 ml PBS での洗浄・回収を 3 回行った。使用する葉を回収し、解剖ハサミで約 1 mm 辺に切り刻んだ後、プロテアーゼ溶液[0.2% collagenase (和光純薬, 大阪, 日本), 0.1 mg/ml Dispase II (Roche, Basel, Switzerland), 2000 U/ml DNase I (Merck, Darmstadt, Germany), 10 mM HEPES (ナカライテスク, 京都, 日本) in RPMI medium (Sigma-Aldrich)]に懸濁した。懸濁液を 37 度インキュベーターに入れて 1 時間消化を行った。20 分毎にマイクロピペットで摩砕を行った。1 時間の消化終了後に、懸濁液を 70- $\mu$ m strainer (BD Biosciences, San Jose, USA)に通し、未消化の沈殿物を取り除いた。洗浄として PBS を加え、遠心後 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich)/RPMI に懸濁して細胞懸濁液とした。

## ヒドロキシプロリン定量

ヒドロキシプロリン定量用の葉は回収後、測定まで-80 度に保存した。測定に際して、サンプルを室温に戻した後カミソリを用いて細断し、800  $\mu$ l の超純水に懸濁した。800  $\mu$ l の 12N 塩酸を加え、110 度で 24 時間加熱し、組織を加水

分解した。加水分解産物を 0.45  $\mu\text{m}$  フィルターでろ過した後、等量の 6N 水酸化ナトリウムで中和し、クエン酸緩衝液 (5% クエン酸, 7.24% 酢酸ナトリウム, 3.4% 水酸化ナトリウム, 1.2% 氷酢酸, pH 6.0) で希釈した。クロラミン T 溶液 (564 mg chloramine T, 4 ml 超純水, 4 ml n-プロパノール, 32 ml クエン酸緩衝液) を加え、20 分間室温に静置した。次に、エールリッヒ溶液 (4.5 g 4-dimethylaminobenzaldehyde, 18.6 ml n-プロパノール, 7.8 ml 70% 過塩素酸) を加え、15 分間 65 度で加熱し、OD550 を測定した。試薬は和光純薬、Sigma-Aldrich、東京化成工業 (東京、日本) から購入した。

## 抗体

本研究に使用した抗体は下記の通りである。

Anti-CD31 (clone 390; BV421, PerCP/Cy5.5, and biotin; BioLegend, San Diego, CA).

Anti-CD31 (#AF3628; R&D Systems, Minneapolis, MN). Anti-CD45 (clone 30-F11;

APC/Cy7 and biotin; BD Biosciences). Anti-CD45.2 (clone 104; APC; BioLegend).

Anti-PDGFR $\alpha$  (clone APA5; APC and biotin; BioLegend). Anti-PDGFR $\beta$  (#AF1042;

R&D Systems). Anti-PDGFR $\beta$  (clone C82A3; Cell Signaling Technology, Danvers,

MA). Anti-CD146 (clone ME-9F1; PerCP/Cy5.5, APC, and unlabeled; BioLegend).

Anti-Ter119 (clone Ter119; APC/Cy7 and biotin; BD Biosciences). Anti- $\alpha$ -SMA (clone



1A4; APC; R&D Systems). Anti-osteopontin (#AF808; R&D systems). Anti-cleaved caspase 3 (clone 9661; Cell Signaling Technology). Anti-Collagen I (#LSL-LB-1102; LSL, Japan). Anti-Collagen IV (#LSL-LB-1403; LSL, Japan). Anti-BrdU (clone Bu20a; APC; BioLegend). Anti-BrdU (clone MoBu-1; Alexa 647; Life Technologies, Grand Island, NY). Anti-APC (#130-090-855; microbeads; Miltenyi Biotec, San Diego, CA). Anti-goat IgG (#A-21447; Alexa 647; Life Technologies). Anti-rabbit IgG (#A-31572 and #A-31573; Alexa 555 and 647; Life Technologies). Anti-rat IgG (#A-21247; Alexa 647; Life Technologies).

#### フローサイトメトリー

細胞懸濁液の濃度は Flow-Count Fluorospheres (Beckman Coulter, Brea, USA)を用いて測定した。細胞懸濁液を抗 CD16/32 抗体処理して抗体の非特異的な結合を防いだ後に、種々の蛍光標識抗体で染色した。細胞内染色に際しては、表面抗原を染色した後に、Cytotfix/Cytoperm buffer (BD Bioscience)を用いて室温で 20 分間固定・浸透化した後に、蛍光標識抗体で染色した。Osteopontin (OPN)染色に際しては、brefeldin A (BFA) を含む 10% FBS/RPMI 中で、6 時間 CO<sub>2</sub> インキュベーターにおいて培養し、トリプシナイズしたものを解析した。BrdU の取り込みは BrdU flow kit (BD Bioscience)を用いて解析した。染色後の細胞は PBS

での洗浄を行った後に Gallios flow cytometer (Beckman Coulter)で測定した。フローサイトメトリーのデータは Flow Jo Software version 7.6.5 もしくは version 10 (FLOWJO, Ashland, USA) を用いて解析した。

## 免疫組織化学

免疫組織化学用の葉には、回収前に気道から 4% Paraformaldehyde (PFA)/PBS を注ぎ、回収後 4% PFA/PBS に浸け、氷上で 6 時間固定した。その後 30%スクロースに 48 時間浸して置換を行った。気道から TissueTek optimal cutting temperature compound (Sakura Finetek Japan, 東京, 日本)を注ぎ、TissueTek Cryomold(Sakura Finetek Japan)内で TissueTek optimal cutting temperature compound に包埋し、液体窒素で凍結して凍結ブロックを作製した。凍結ブロックを 6  $\mu$ m に薄切してスライドガラス (シランコーティングスライド・アクア, Dako, Carpinteria, USA) に貼り付けたものを乾燥させた。染色に際して PBS で水和し、0.5% Triton X-100 (ナカライテスク)/PBS もしくは Tween 20 (Sigma-Aldrich)/PBS で透過処理をした。Blocking One (ナカライテスク)をブロッキングに使用し、種々の抗体で染色した。BrdU 染色に際しては、切片を 500 U/ml DNase I (Merck)に浸して 37 度で 60 分間処理した。染色後の切片は 4% PFA/PBS で 10 分間固定して洗浄した後、ProLong Gold もしくは ProLong

Diamond (Life Technologies)で封入した。核染色には propidium iodide を用いた。染色後の切片は SP5 confocal Microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて画像化した。取得した画像は ImageJ version 1.47t (NIH, Bethesda, USA) を用いて調整及び解析した。3次元再構築は Velocity 3D image analysis software version 6.2.1 (PerkinElmer, Waltham, USA)を使用した。

## 細胞純化

網羅的遺伝子発現解析に用いた細胞は、CD45, CD31, EpCAM, Ter119 に対する抗体で染色し、AutoMACS (Miltenyi Biotec)を用いてネガティブセレクションした分画を、FACS Aria (BD Biosciences)で  $CD45^- CD31^- EpCAM^- Ter119^- Col-GFP^+$ 細胞を純化した。経気道移入に際する  $Col-GFP^+ PDGFR\alpha^+$ の常在性線維芽細胞の濃縮は、細胞懸濁液を CD31, CD45, CD146, EpCAM, Ter119 に対する抗体で染色し、AutoMACS を用いてネガティブセレクションした。陰性分画の純度、細胞数を計測し、PBS で洗浄した後に PBS に再懸濁し( $1 \times 10^5 - 1 \times 10^7 / 50 \mu l$ )、経気道移入用の細胞懸濁液とした。セルソーターを用いた  $Col-GFP^+$ ,  $Col-GFP^+ NG2-DsRed^+$ ,  $NG2-DsRed^+$ ,  $EpCAM^+$  細胞の純化に際しては、細胞懸濁液を2つの分画に分け、一方を  $Col-GFP^+$ ,  $EpCAM^+$  細胞純化用、もう一方を  $Col-GFP^+ NG2-DsRed^+$ ,  $NG2-DsRed^+$  細胞純化用とした。前者はまず CD31,

CD45, CD146, Ter119 に対する抗体で染色し、AutoMACS でネガティブセレクションした陰性分画を EpCAM に対する抗体で染色した後に MoFlo Astrios (Beckman coulter)を用いて Col-GFP<sup>+</sup>細胞および EpCAM<sup>+</sup> 細胞を純化した。後者はまず CD31, CD45, PDGFR $\alpha$ , EpCAM, Ter119 に対する抗体で染色し、AutoMACS でネガティブセレクションした陰性分画を MoFlo Astrios を用いて Col-GFP<sup>+</sup> NG2-DsRed<sup>+</sup>および Col-GFP<sup>-</sup> NG2-DsRed<sup>+</sup> 細胞を純化した。純化した細胞は純度を測定した後に PBS で洗浄し、至適細胞濃度に PBS で再懸濁して経気道移入用の細胞懸濁液とした。

## 並体結合

並体結合の手術は過去に報告されている手順に則って行った[97]。週令の一致した Ly5.1 マウスと Col-GFP マウスの雌を手術により結合し、6 週間後にブレオマイシンもしくは生理食塩水を経気道投与してその後の解析を行った。

## 網羅的遺伝子発現解析

網羅的な遺伝子発現解析は serial analysis of gene expression (SAGE)法と Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) sequencer (Life Technologies)を用いて行った。3 匹のマウスからプールした細胞懸濁液から Col-GFP<sup>+</sup>細胞を純化し、

*mirVana* miRNA isolation kit (Life Technologies)を用いて RNA を単離した。1  $\mu$ g のトータル RNA から SOLiD SAGE kit (Life Technologies)を用いて SAGE ライブラリーを作製した。DNA は PureLink gel extraction kit (Life Technologies)を用い、アガロースゲルで取り除いた。SAGE コンストラクトにおける DNA 断片は Agilent 2100 Bioanalyzer と high-sensitivity kit (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)を用いて品質を検定した。テンプレート PCR、エマルジョン PCR、Ion Sphere Particle enrichment は Ion Xpress Template kit (Life Technologies)を用いて行った。Ion Sphere particle は Qubit 2.0 fluorometer (Life Technologies)で品質を調べ、318 chip (Life Technologies)に充填し、シーケンスを調べた。シーケンスの Raw data は NCBI Gene Expression Omnibus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>)で参照できる(accession number GSE42564)。

#### 次世代シーケンスデータのマッピング

それぞれのサンプルについて、PGM シークエンサーからの未処理の読み出しは RefSeq genes (<http://hgdownload.cse.ucsc.edu/goldenpath/mm9/database>)と Burrows-Wheeler alignment software version 0.6.2 (25\_1 mapping parameter)を用いてマッピングした。2 つ以上の遺伝子にマッピングされた読み出しは解析データから除外し、同一の isogroup 内に 2 つ以上マッピングされた読み出しはいずれか一つのみを

選択した。また、低発現の遺伝子や極端なばらつきを避けるために、生理食塩水・ブレオマイシン処理の両群でタグ数が 50 以下の遺伝子は解析から除外した。Gene Ontology (GO)解析は DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) Bioinformatic Resources software version 6.7 (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>)[98]を用いて行った。パスウェイ解析は IPA software version 9.0 (Ingenuity Systems, Redwood City, USA)を用いて行った。

#### 定量的リアルタイム PCR 解析

SAGE に使用した mRNA の一部を High capacity reverse transcription kit (Life Technologies)を用いて逆転写し、cDNA を作製した。また、セルソーターで純化した細胞を TRIzol reagent (Life Technologies)に溶解し、RNA を抽出した後に ReverTra Ace qPCR RT Kit (東洋紡, 大阪, 日本)で cDNA を作製した。定量的リアルタイム PCR (qPCR) は Thunderbird SYBR qPCR Mix (東洋紡)と ABI 7500 real-time PCR system (Life Technologies)を用いて行った。各遺伝子の発現は内在性コントロールとして Gapdh もしくは Rps3 を用い、相対発現量を算出した。qPCR に使用したプライマー配列は表 1 に示した。

Gene	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
GAPDH	AGTATGACTCCACTCACGGCAA	TCTCGCTCCTGGAAGATGGT
Rps3	CGGTGCAGATTTCCAAGAAG	GGACTTCAACTCCAGAGTAGCC
Col1a1	AGACATGTTTCAGCTTTGTGGAC	GCAGCTGACTTCAGGGATG
Acta2	GTCCCAGACATCAGGGAGTAA	TCGGATACTTCAGCGTCAGGA
Spp1	GGAGGAAACCAGCCAAGG	TGCCAGAATCAGTCACTTTCAC
S100a4	GGAGCTGCCTAGCTTCCTG	TCCTGGAAGTCAACTTCATTGTC
Fn1	CGGAGAGAGTGCCCTACTA	CGATATTGGTGAATCGCAGA
Ereg	TTGACGCTGCTTTGTCTAGG	GGATCACGGTTGTGCTGAT
Tnc	GGGCTATAGAACACCGATGC	CATTTAAGTTTCCAATTTTCAGGTTTC
Pcolce2	CAAATTCAGGCCGAAAAAGT	CCACAGTGGGCTTTAGACCT
Gsn	CAAAGTCGGGTGTCTGAGG	CTTCCCTGCCTTCAGGAAT
Efemp1	CCACAGGGTTACGAAGTGGT	TCATTGGTGGTCTCACATTCA
Il1b	AGGCAGGCAGTATCACTCATTGT	CGTCACACACCAGCAGGTTATC
Il5	AAGGATGCTTCTGCACTTGAGT	TCTCCAATGCATAGCTGGTGAT
Il13	CTTGCCTTGGTGGTCTCG	CGTTGCACAGGGGAGTCT
Il17a	AAGCTCAGCGTGTCCAAACA	GGCACTGAGCTTCCCAGATC
Tgfb1	CCCGAAGCGGACTACTATGC	CCCGAATGTCTGACGTATTGAA

表 1 使用したプライマー配列

## 遊走アッセイ

Col-GFP<sup>+</sup> 細胞の遊走能は Oris cell migration assay kit (fibronectin-coated) (Platypus Technologies, Madison, USA) を使用して測定した。Col-GFP<sup>+</sup> 細胞を純化した後、 $1 \times 10^5$  細胞を 100  $\mu$ l の 2% FBS/Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma –Aldrich) に懸濁し、ストッパーを含むウェルに加えた。24 時間 37 度 CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した後、ストッパーを取り除き、ウェルを一

度 PBS で洗浄して非付着細胞を取り除いた。ウェルに再び 2% FBS/DMEM を加えた時点をも 0 時間とし、37 度 CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養しつつ経時的に SP-5 confocal microscopy でウェルの画像を取得した。Migration index は 0 時間時点における中央の細胞が無い領域と、当該時点における中央の細胞が無い領域の面積の比として算出した。

### 浸潤アッセイ

浸潤アッセイは Cultrex 96-well basement membrane extract cell invasion assay kit (Trevigen, Gaithersburg, USA) を用いて行った。純化した Col-GFP<sup>+</sup> 細胞をプラスチックディッシュ上で 24 時間培養した (2% FBS/DMEM、37 度 CO<sub>2</sub> インキュベーター)。細胞をトリプシナイズし、無血清 DMEM に懸濁した。0.5 x basement membrane extract でコーティングした上部チャンバーに 5 x 10<sup>4</sup> 細胞を加え、下部チャンバーに 2% FBS/DMEM で満たした。36 時間 CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した後、細胞を 4% PFA/PBS で固定し、膜の上部チャンバー側の細胞を綿棒で取り除いた。膜をディフクイック (Sysmex, 神戸, 日本) で染色し、膜の下部チャンバー側の細胞数を計測した。Invasion index は対照群の平均細胞数に対する比として算出した。



## 統計

データは原則平均±標準誤差で表示した。有意差検定は2群間の比較の場合は t 検定、多群間の比較の場合は one-way analysis of variance と Tukey-Kramer post-test を用いて検定した。P 値が 0.05 未満のものを有意とした。統計処理は Prism software version 5.01 (GraphPad Software, La Jolla, USA)を用いて行った。

## 第三章 ブレオマイシン誘導性肺線維症における活性化線維芽細胞の動態

### 3.1 はじめに

肺線維化におけるエフェクター細胞である活性化線維芽細胞の起源とその活性化機構を明らかにするためには、活性化線維芽細胞の前駆体となり得る肺の間葉系細胞サブセットを同定し、その特徴を体系的に記述する必要がある。本章では、まず肺間葉系細胞サブセットを蛍光レポーターマウスを用いて免疫学的・解剖学的に特徴付け、細胞起源探索のための足場を築くことを試みた。

また、線維化部位における細胞外マトリックスの主要な構成成分である I 型コラーゲンのレポーターマウスを用い、ブレオマイシン誘導性肺線維症における活性化線維芽細胞の動態を解析した。さらに、活性化線維芽細胞を純化し、網羅的な遺伝子発現解析を行うことで活性化に際して変動している遺伝子群の特徴を解析し、新規活性化マーカーとして **Osteopontin** を同定した [99,100]。

## 3.2 結果

### Col-GFP マウスにおける常在性線維芽細胞同定法の確立

肺胞壁の線維芽細胞は I 型、III 型等のコラーゲンを生成しており、その中でも I 型コラーゲンは量的に主要な産生物である[101]。I 型コラーゲンの一つである *Colla2* のレポーターマウスは、各臓器で常在性線維芽細胞を標識することが報告されている[102,103]。私はまず、肺における常在性線維芽細胞の同定法を確立し、常在性線維芽細胞特異的な解析を行うため、*Colla2* の GFP レポーターマウス (Col-GFP マウス) [47]の肺を解析した (図 3)。Col-GFP マウスの肺細胞をプロテアーゼ処理により分散し、フローサイトメーターで測定したところ、GFP 発現細胞は血球細胞マーカーの CD45、血管内皮細胞マーカーの CD31、上皮細胞マーカーの EpCAM 陰性の細胞であることが明らかになった (図 3B)。免疫組織化学を用いて Col-GFP マウスの肺を観察すると、GFP 陽性細胞は肺胞壁と血管及び気道周囲に存在していた (図 3C)。このうち、血管及び気道周囲の GFP 陽性細胞は $\alpha$ -SMA 陽性の平滑筋細胞であった (図 3C)。肺胞壁の GFP 陽性細胞は IV 型コラーゲンで標識される上皮基底膜によって上皮細胞と隔てられている間質に存在しており、常在性線維芽細胞が GFP を発現している可能性が示唆された(図 3D)。

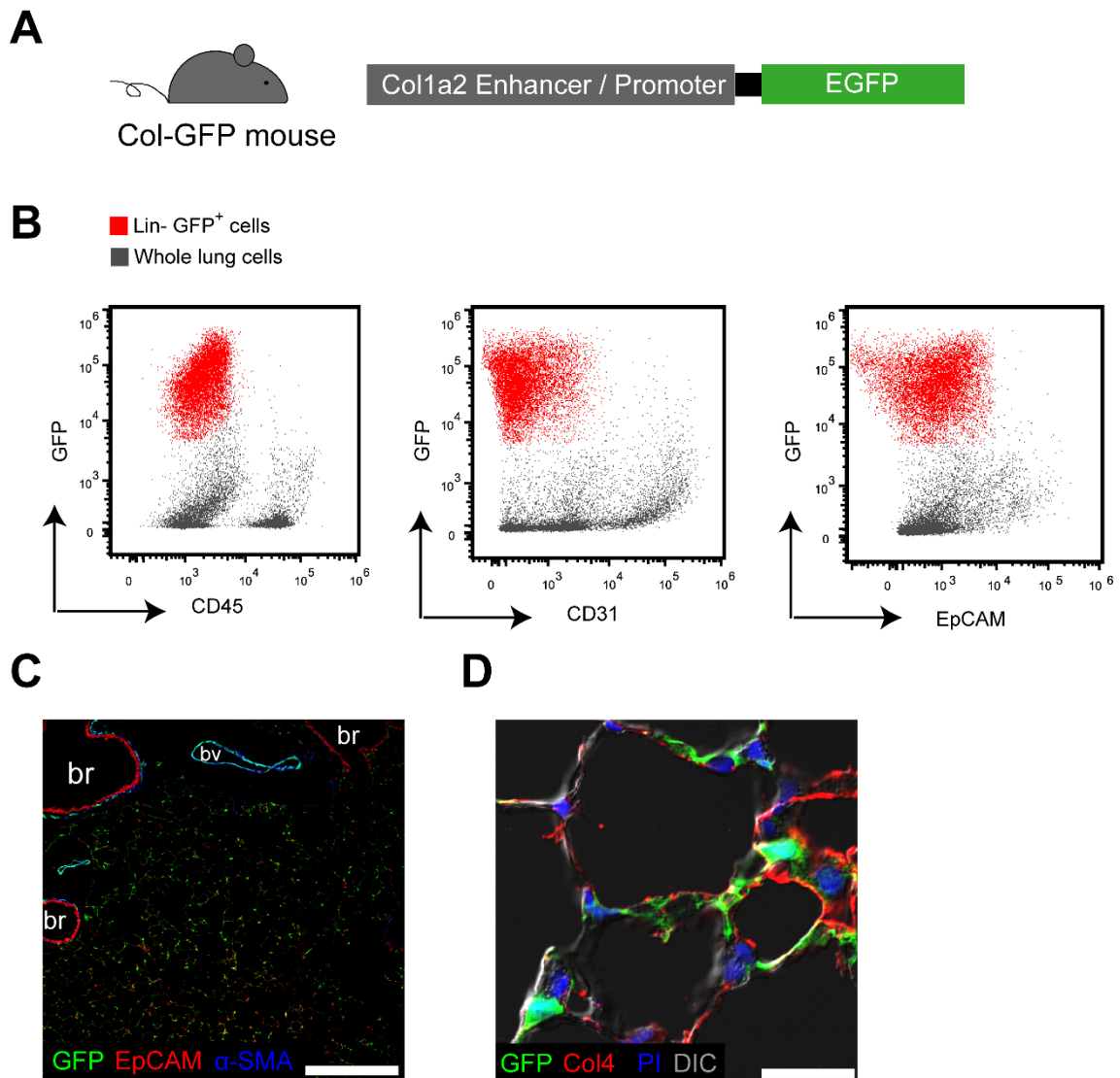


図3 Col-GFP マウスの肺における GFP 発現細胞

(A) Col-GFP マウスは Col1a2 のエンハンサーの一部とプロモーターの下流に EGFP を配した DNA コンストラクトのトランスジェニックマウスである。(B) Col-GFP マウス肺細胞のフローサイトメトリー解析。GFP 発現細胞 (赤) は CD45、CD31、EpCAM 陰性である。(C, D) Col-GFP (緑) マウスの代表的な免疫組織化学画像。(C) EpCAM (赤)、 $\alpha$ -SMA (青) で染色。br: 細気管支、bv: 血管。(D) Collagen 4 (Col4, 赤)、propidium iodide (PI, 青) で染色。DIC: 微分干渉像。スケールバー400  $\mu$ m (C)、25  $\mu$ m (D)。実験は3回以上行い、代表的なデータを示した(A-D)。

## 肺における間葉系細胞の特徴付け

肺における間葉系細胞の同定法を確立するため、次に私は Col-GFP マウスと、血管周囲細胞のマーカーである NG2 のレポーターマウス (NG2-DsRed) を交配し、レポーター分子を発現している細胞を調べた (図 4)。レポーター遺伝子が発現しているのは血球や内皮、上皮細胞を除いた集団が主であり、その中でも Col-GFP<sup>+</sup> (R1)、Col-GFP<sup>+</sup> NG2-DsRed<sup>+</sup> (R2)、NG2-DsRed<sup>+</sup> (R3) の三集団に分かれることが明らかになった (図 4B)。それぞれの集団をさらに常在性線維芽細胞のマーカーである PDGFR $\alpha$  [53,73]、血管周囲細胞や平滑筋のマーカーである CD146 で展開すると [104]、主に PDGFR $\alpha$  陽性集団と CD146 陽性集団の 2 集団に分かれた。R1 は  $86.7 \pm 1.29\%$  が PDGFR $\alpha$  陽性、 $5.26 \pm 0.37\%$  が CD146 陽性であった (図 4B)。R2 と R3 のほとんどは CD146 陽性であった (図 4B)。組織学的には、Col-GFP 陽性細胞のうち、血管周囲や気道周囲の平滑筋細胞が CD146<sup>+</sup> であった (図 4C)。また、血管周囲の Col-GFP 陽性平滑筋細胞は、NG2-DsRed も発現していた (図 4C)。これらのことから、Col-GFP 陽性細胞のうち、常在性線維芽細胞が PDGFR $\alpha$  陽性、気道周囲の平滑筋細胞が CD146 陽性、血管周囲の平滑筋細胞が CD146 陽性・NG2-DsRed 陽性であることが示唆された。Col-GFP 陰性で NG2-DsRed 陽性の細胞は肺胞壁に見られ、これらの細胞は血管周囲細胞のマーカーである PDGFR $\beta$  を発現していた (図 4D) [42,59,60]。一方で

すべての PDGFR $\beta$ 陽性細胞が NG2-DsRed を発現しているわけではなかった

(図 4D)。3次元超構造解析によって、肺胞壁に存在する NG2-DsRed 陽性細胞が血管基底膜の血管側で血管と近接し、血管周囲細胞の特徴を有していることが明らかになった (図 4E)。

肺胞壁の Col-GFP 陽性細胞は PDGFR $\alpha$ を発現していた (図 5A)。3次元超構造解析では、Col-GFP 陽性細胞は血管基底膜により内皮細胞と隔てられ、血管に近接している PDGFR $\beta$ 陽性細胞とは異なる局在を示した (図 5B, C)。これらの事から Col-GFP 陽性 PDGFR $\alpha$ 陽性細胞が常在性線維芽細胞であることが示唆されるが、一方で肺胞壁の NG2-DsRed 陽性細胞のうち、組織上で  $8.5 \pm 1.4\%$  の細胞が Col-GFP シグナルと重複していた。異なる2つの細胞が重なっている可能性も考えられるが、Hung らが報告するような線維芽細胞状の血管周囲細胞が存在する可能性もある[42]。PDGFR $\alpha$ 陽性 Col-GFP 陽性の細胞は、PDGFR $\alpha$ 陰性 Col-GFP 陽性の細胞と比べて 405 nm レーザーで励起した時の自家蛍光が高い (図 5E)。肺の常在性線維芽細胞は脂肪滴を有していることが報告されており[73]、さらに細胞内の脂肪滴によって 405 nm レーザー励起時に自家蛍光が生じることが知られている[105]。これらのことから肺胞に存在する PDGFR $\alpha$ 陽性 Col-GFP 陽性の細胞は典型的な常在性線維芽細胞の特徴を有していることが分かった。

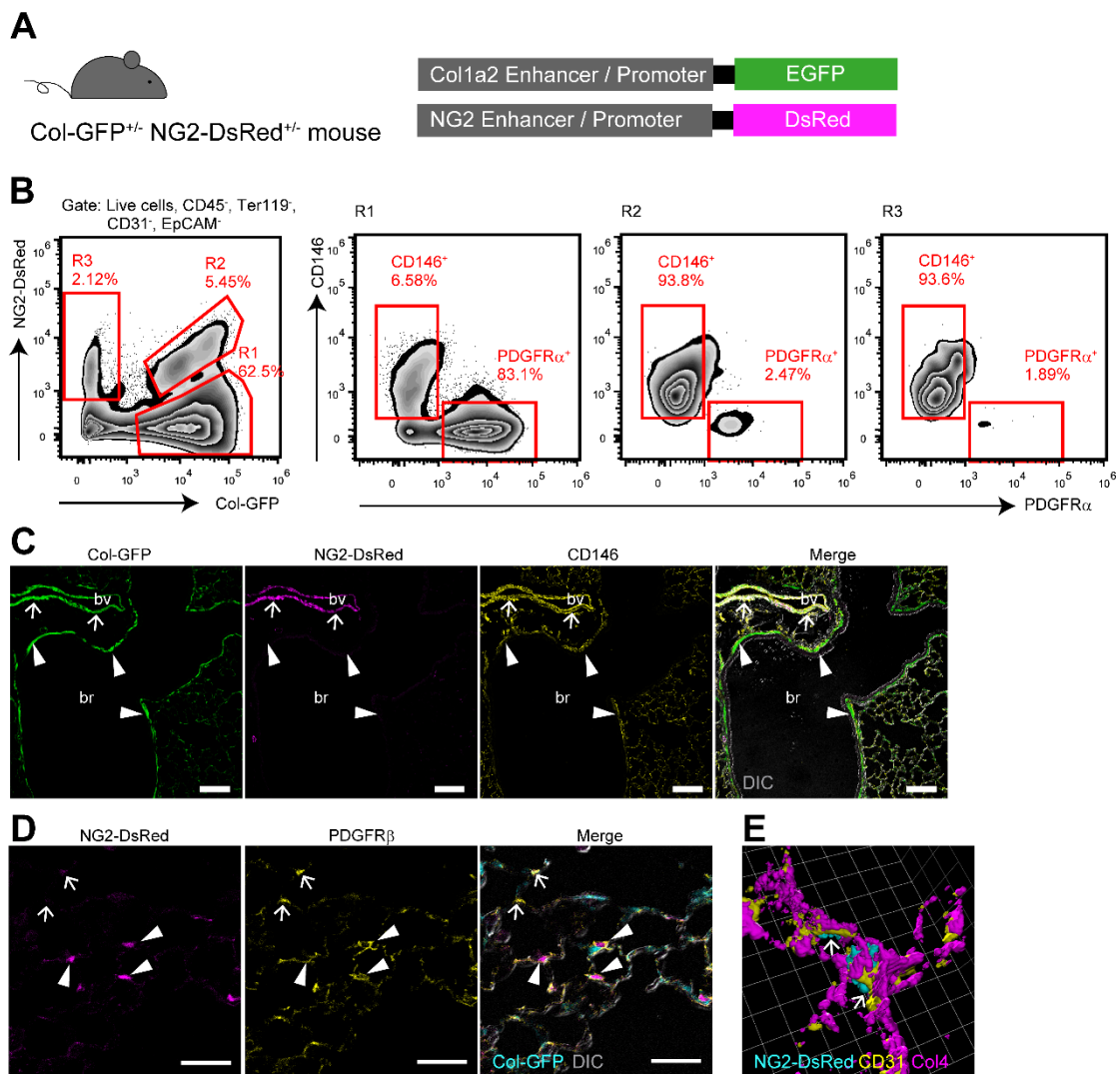


図4 Col-GFP、NG2-DsRed マウスを用いた肺の間葉系細胞解析

(A)解析に使用した Col-GFP、NG2-DsRed マウス。(B)フローサイトメトリーによる肺細胞の解析。左端パネルの R1、R2、R3 の集団を右のパネルに展開した。(C) Col-GFP (緑)、NG2-DsRed (マゼンタ)マウスの代表的な肺切片の免疫蛍光染色。CD146 (黄色)を染色。Arrowheads: CD146 陽性気道周囲平滑筋細胞。Arrows: CD146 陽性血管周囲平滑筋細胞。br: 細気管支、bv: 血管。(D) Col-GFP (シアン)、NG2-DsRed (マゼンタ)マウスの代表的な肺切片。PDGFRβ (黄色)を染色。(E) NG2-DsRed (シアン)マウスの肺切片。CD31 (黄色)、Collagen 4 (Col4, マゼンタ)で染色。Z-スタック画像を 3次元に再構成。Arrows: NG2-DsRed 陽性血管周囲細胞が血管に近接している。DIC: 微分干渉像。スケールバー 100 μm (C), 50 μm (D)。実験は 3 回以上行い、代表的なデータを示した(A-E)。

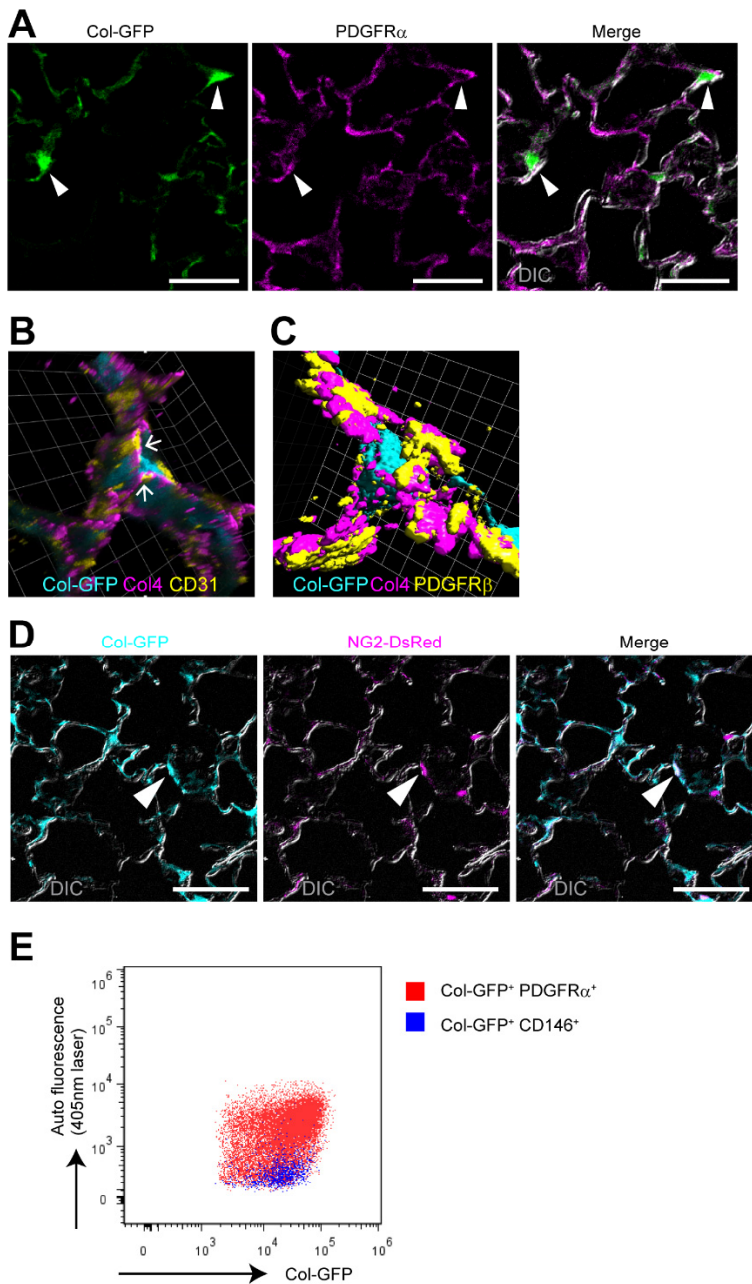


図5 Col-GFP 陽性常在性線維芽細胞の同定

(A) Col-GFP (緑)マウスの肺切片。PDGFR $\alpha$  (マゼンタ)を染色。Arrowheads: Col-GFP 陽性 PDGFR $\alpha$ 陽性細胞。(B, C) Col-GFP (シアン)マウスの肺切片の Z-スタック画像を 3 次元に再構成した組織像。(B) Collagen 4 (Col4, マゼンタ)、CD31 (黄色)を染色。Arrows: 血管内皮細胞の大部分と Col-GFP 陽性細胞は基底膜によって隔てられている。(C) Col4(マゼンタ)と PDGFR $\beta$  (黄色)を染色。(D) Col-GFP (シアン) NG2-DsRed (マゼンタ)マウスの肺切片。Arrow: Col-GFP 陽性、NG2-DsRed 陽性の領域。(E) Col-GFP マウスの Col-GFP 陽性肺細胞。PDGFR $\alpha$ 陽性細胞 (赤) は CD146 陽性細胞 (青) と比べて自家蛍光がある。実験は 3 回以上行い、代表的なデータを示した(A-E)。



## Col-GFP マウスにおけるブレオマイシン誘導性肺線維症

線維症における病変は I 型コラーゲンを産生する活性化線維芽細胞の増加に特徴づけられるが、肺線維症において活性化線維芽細胞を新鮮な状態かつ特異的に解析した研究はまだ報告されていない。I 型コラーゲン産生細胞の動態を調べるため、Col-GFP マウスにブレオマイシンを気道内投与し、肺線維症を誘導した (図 6)。免疫組織化学法により肺切片を観察したところ、対照群では肺胞壁に散在していた Col-GFP 陽性細胞が、ブレオマイシン投与後 14 日目には肺胞構造が崩壊した創傷部位においてクラスターを形成していた (図 6A)。 $\alpha$ -SMA の発現は対照群においては気道及び血管周囲の平滑筋細胞に限局していたが、ブレオマイシン投与群においては創傷部位にも発現が見られた (図 6A)。一部の創傷部位において Col-GFP 陽性細胞は $\alpha$ -SMA を発現しており、筋線維芽細胞に分化していることが示唆された (図 6A)。創傷部位においては I 型コラーゲンが沈着しており、Col-GFP 陽性細胞クラスターの局在と一致していた (図 6B)。これらの肺においてはヒドロキシプロリンの含量が増加していると同時に線維症において発現が誘導される遺伝子群(Coll1a1, Coll1a2, Fn1, S100a4) の発現も上昇しており、線維化の誘導が確認された (図 6C, D) [25,106]。これらの結果から、Col-GFP マウスを用いることで肺線維症における活性化線維芽細胞の活性化様式や動態を解析できることが示唆された。

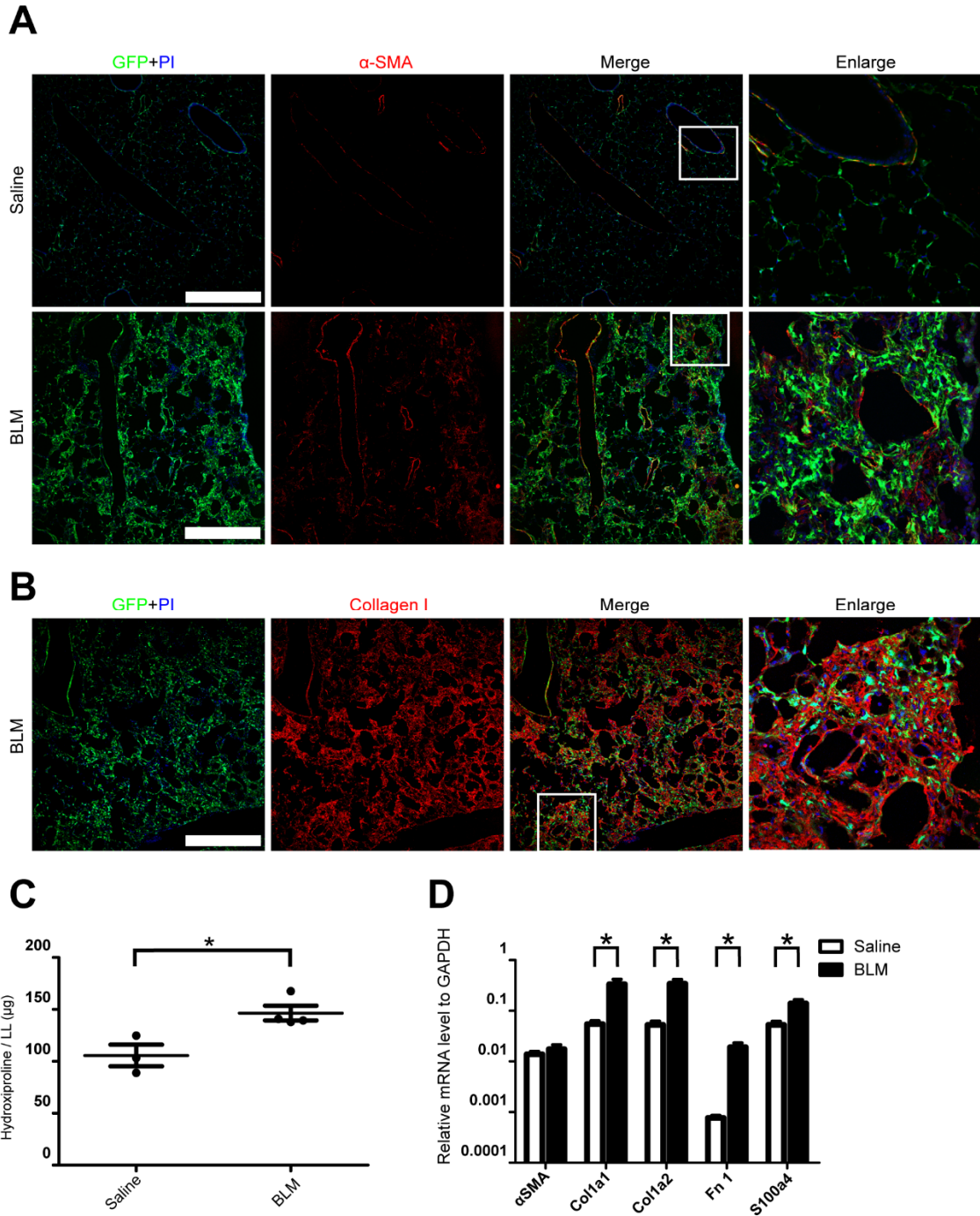


図6 Col-GFP マウスにおけるブレオマイシン誘導性肺線維症 (A-D) Col-GFP (緑)マウスに生理食塩水(saline)もしくはブレオマイシン(BLM)を気道内投与し、14日目に解析を行った。(A)肺切片を抗 $\alpha$ -SMA (赤)抗体、propidium iodide(PI, 青)で染色した。(B)肺切片を抗 Collagen I (赤)抗体、PI (青)で染色した。(C)左葉 (LL)におけるヒドロキシプロリン含量。(D)全肺細胞における mRNA 発現。データは平均 $\pm$ 標準誤差と各個体(C)、平均 $\pm$ 標準誤差(D)。スケールバー500  $\mu$ m。\* $P < 0.05$  (t 検定)。 $n = 3$  or 4 (C, D)。実験は3回以上行い、代表的なデータを示した (A-D)。

フローサイトメトリーを用いて肺細胞を解析したところ、線維化を誘導した肺の Col-GFP 陽性細胞は GFP の発現を亢進し、Side Scatter (SSC)及び Forward Scatter (FSC)の値が上昇していた (図 7A-C)。また、定常状態において Col-GFP 陽性細胞中  $4.41 \pm 0.49\%$ の細胞が $\alpha$ -SMA 陽性に分画されるが、ブレオマイシン投与後 7 日目、14 日目においてその数はおよそ 2 倍に増加し、21 日目に投与前の程度まで減少した (図 7D)。ブレオマイシン投与前の $\alpha$ -SMA 陽性細胞は平滑筋細胞を反映していると考えられるが、投与後 7・14 日目は筋線維芽細胞が増加していると考えられる[53,107]。

#### ブレオマイシン誘導性肺線維症における組織細胞の定量的解析

次に、Col-GFP マウスを用い、ブレオマイシン誘導性肺線維症における組織細胞数の変化をフローサイトメトリーで解析した (図 8A)。CD45 を発現する白血球細胞はブレオマイシン投与後 7 日目・14 日目に増加しており、炎症に伴う血球浸潤を反映していると考えられる (図 8B)。内皮細胞には有意な細胞数変動は見られなかった (図 8B)。上皮細胞は 14 日目にかけて劇的な細胞数の減少が見られ、線維化に伴って上皮傷害が生じていることが示唆された (図 8B)。興味深いことに、創傷部位でのクラスター形成にもかかわらず、Col-GFP を発現する細胞数に有意な変化は見られなかった (図 8B, C)。

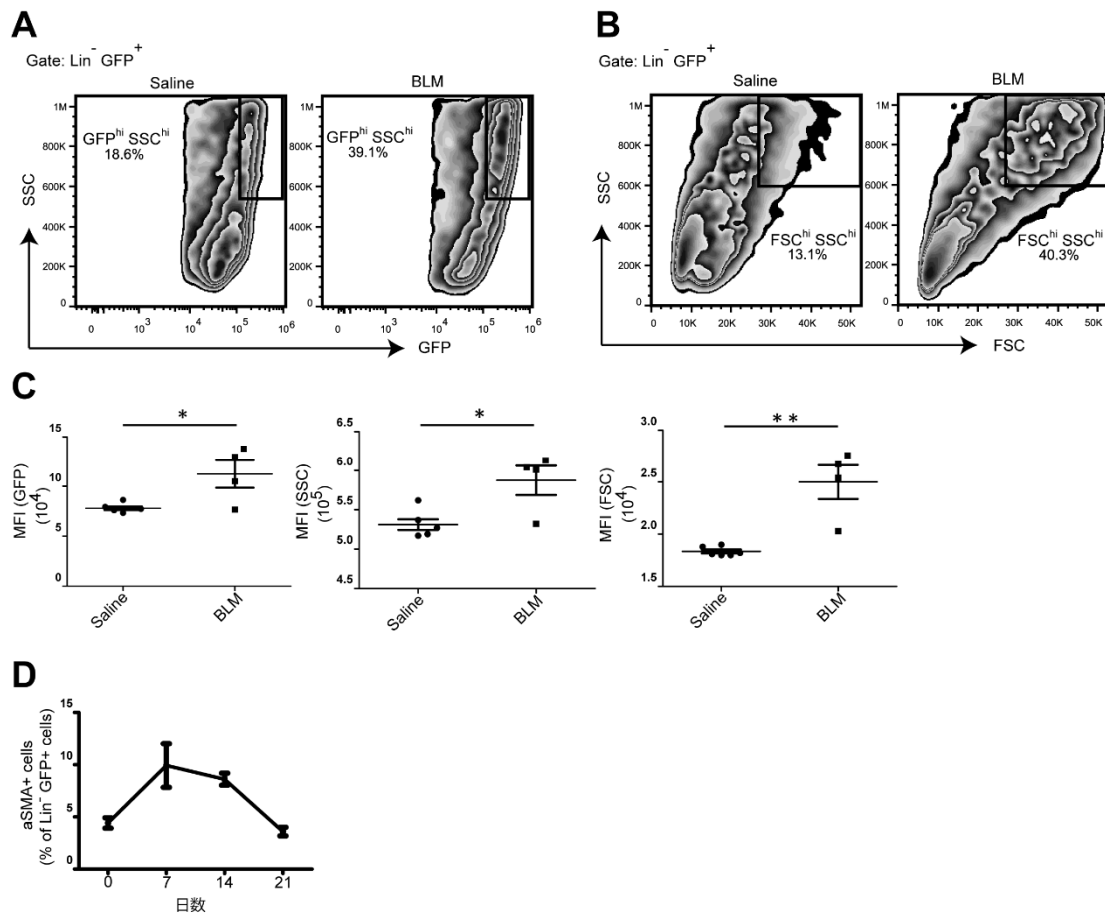


図7 フローサイトメトリーによる Col-GFP 陽性細胞の解析

(A, B) ブレオマイシン(BLM)投与後 14 日目に Lineage (Lin; CD45, CD31, EpCAM, Ter119)陰性、Col-GFP 陽性細胞にゲートをかけ、GFP・SSC (A)、FSC・SSC (B)で展開。ブレオマイシン誘導性線維症によって GFP、FSC、SSC のパラメーターが増加した。(C)ブレオマイシン投与後 14 日目の Col-GFP 陽性細胞における GFP、SSC、FSC の Mean Fluorescent Intensity (MFI)。(D)Lin 陰性、Col-GFP 陽性細胞における $\alpha$ -SMA 陽性細胞数。データは平均 $\pm$ 標準誤差と各個体(C)、平均 $\pm$ 標準誤差(D)。\* $P$ <0.05、\*\* $P$ <0.01 (t 検定)。 $n = 4$  or  $5$  (A-C),  $n = 3$  or  $4$  (D)。実験は 3 回以上行い、代表的なデータを示した(A-D)。

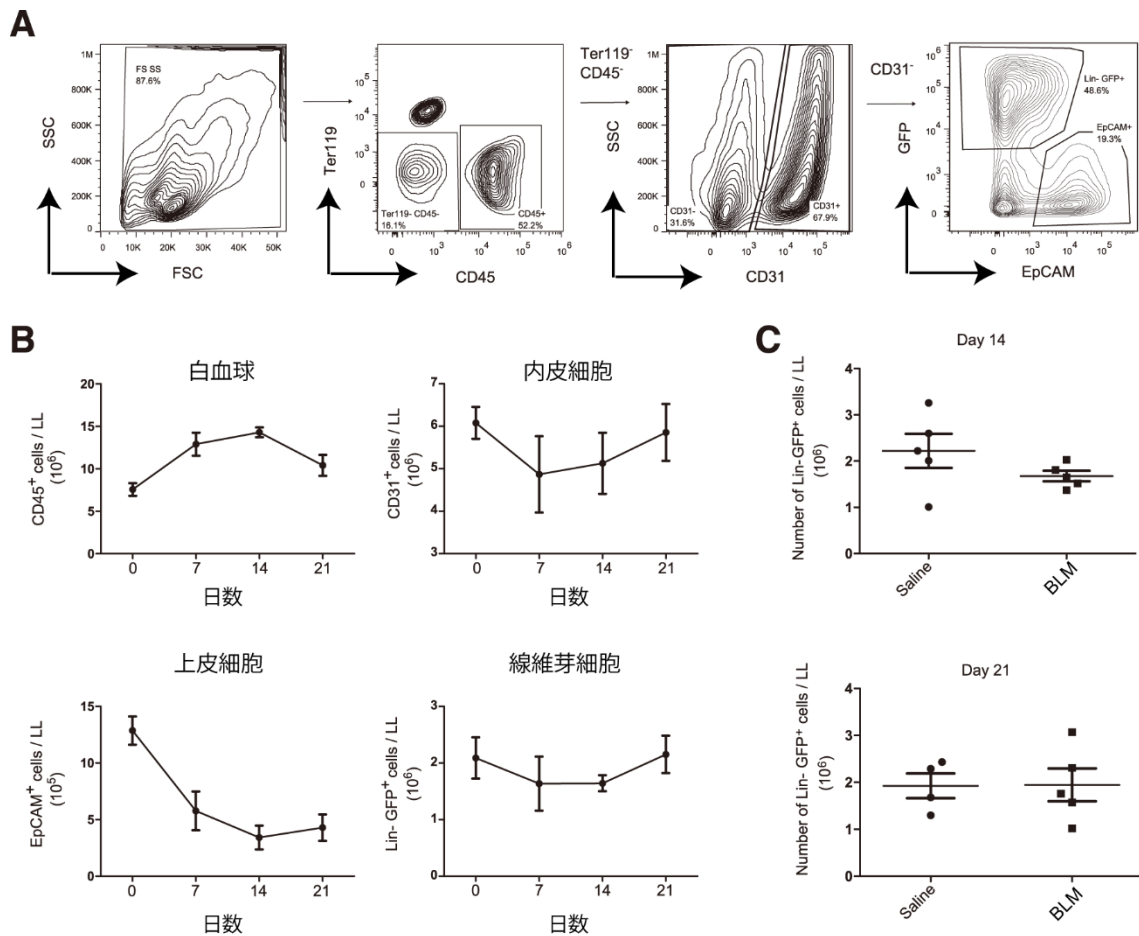


図8 フローサイトメトリーによる各細胞サブセットの定量的解析

(A)各細胞サブセット同定のゲーティング。CD45 陽性白血球細胞、CD31 陽性内皮細胞、EpCAM 陽性上皮細胞、Col-GFP 陽性線維芽細胞をゲーティングした。(B)左葉(LL)における各細胞サブセットのブレオマイシン投与後細胞数の変動。(C)左葉(LL)における、Lineage (Lin; CD45, CD31, EpCAM, Ter119)陰性、Col-GFP 陽性の数を生理食塩水(Saline)・ブレオマイシン(BLM)投与群で比較。データは平均±標準誤差(B)、平均±標準誤差と各個体(C)。n = 3 or 4 (B), 4 or 5 (C)。実験は3回以上行い、代表的なデータを示した。(A-C)。

## Col-GFP 陽性細胞の増殖・細胞死応答

線維化に伴った線維芽細胞の増殖は、活性化線維芽細胞蓄積の一つのメカニズムとして提唱されている[108]。しかしながら、肺全体における Col-GFP 陽性細胞の有意な増加は見られなかった。そこで、次に私はブレオマイシン誘導性肺線維症における Col-GFP 陽性細胞の増殖・細胞死応答を調べた (図 9, 10)。まず、ブレオマイシン投与後の肺の組織細胞における切断型カスパーゼ 3 をフローサイトメトリーで調べた (図 9A, B)。内皮細胞で最大 0.7%ほどの細胞が切断型カスパーゼ 3 陽性であったのに対し、上皮細胞は投与後 14 日目に約 6%の細胞が切断型カスパーゼ 3 陽性であり、顕著な細胞死応答が見られた (図 9B)。Col-GFP 陽性線維芽細胞の細胞死応答のピークは投与後 7 日であり、約 2%の細胞が切断型カスパーゼ 3 陽性であった (図 9B)。

次に、BrdU 投与後 24 時間における BrdU の取り込みを調べた。各細胞種でブレオマイシン投与後に BrdU の取り込みが見られ、細胞増殖応答の増加が示唆された (図 9C, D)。線維芽細胞の BrdU 取り込みピークは投与後 7 日であった (図 9D)。免疫組織化学により BrdU を取り込んだ細胞の局在を調べたところ、肺胞壁の構造が崩壊し、Col-GFP 陽性細胞が小さなクラスターを形成している場所で BrdU を取り込んだ Col-GFP 陽性細胞が見られた (図 9E)。また、カスパーゼ 3 の活性化を検出する蛍光インディケータータンパクを全身で

発現する ROSA-CAG-SCAT3.1 マウスと[93]、細胞周期インディケータータンパクを全身で発現する Fucci マウス[95]を用いて同様の解析を行った。これらのインディケーターを指標にした場合も、切断型カスパーゼ 3 及び BrdU の取り込みで調べた場合と同様の増殖・細胞死応答の変化が見られた (図 10)。

さらに Col-GFP 陽性細胞の増殖応答を調べるため、私は BrdU をマウスの飲水に含めることで継続的に BrdU を投与し、投与期間中に増殖した細胞を調べた (図 11A)。ブレオマイシン投与後 14、21 日目において、Col-GFP 陽性細胞中約 3%が BrdU 陽性であったが、14 日目と 21 日目の間に差はなかった (図 11B)。肺切片を解析したところ、創傷部位で一部の Col-GFP 陽性細胞が BrdU 陽性であったが、クラスターを形成している細胞でも多くは BrdU 陰性であった (図 11C)。一方で内皮細胞や上皮細胞における BrdU 陽性細胞は 14 日目以降も増加しており、21 日目には 10%以上の細胞が BrdU 陽性であった (図 11D)。白血球細胞はブレオマイシン処理の有無に関わらず約 30%が BrdU 陽性であった。この標識率は過去の報告と比べて少ないが[109]、自家蛍光の異なる多様な細胞種を含む CD45 陽性細胞全体にゲートを掛けているため、実際の標識率より低く値が算出されている可能性がある (図 11E)。これらの結果から、Col-GFP 陽性細胞は増殖と細胞死が両方亢進することで細胞数が有意に変化せず、クラスター形成には増殖以外の要因も関わっていることが示唆された。

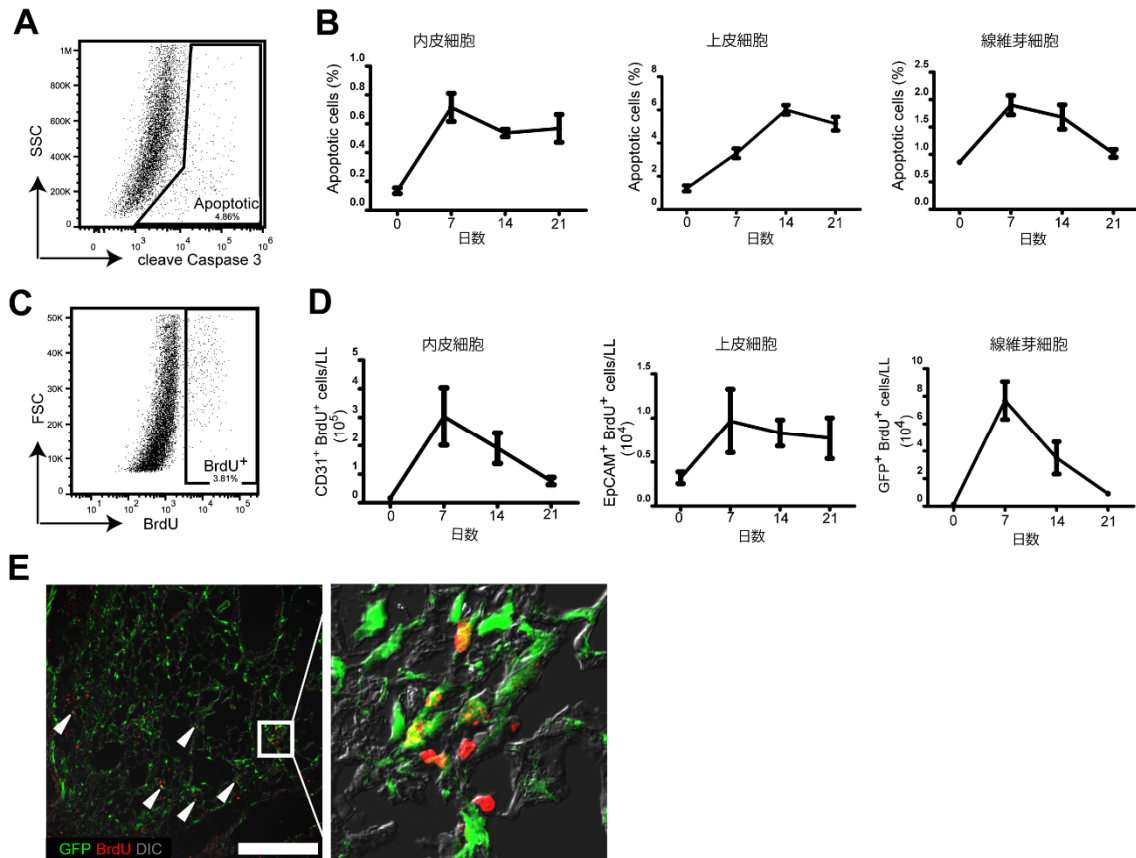


図9 ブレオマイシン誘導性肺線維症における各細胞の増殖・細胞死応答

(A-D) Col-GFP マウスにブレオマイシンを投与し、フローサイトメトリーで切断型カスパーゼ 3 (A, B)、BrdU の取り込み (C, D) を解析した。BrdU は解析の 24 時間前に腹腔内投与した。(A, C) 切断型カスパーゼ 3、BrdU 陽性細胞の検出。(B, D) CD31 陽性内皮細胞、EpCAM 陽性上皮細胞、Col-GFP 陽性線維芽細胞における切断型カスパーゼ 3 もしくは BrdU 陽性細胞の動態。(E) ブレオマイシン投与後 7 日目の肺切片において BrdU (赤) を染色。Col-GFP (緑)。Arrowheads: BrdU 陽性 Col-GFP 陽性細胞。DIC: 微分干渉像。データは平均±標準誤差 (B, D)。スケールバー 250 μm。n = 3 or 4。実験は 3 回行い、代表的なデータを示した (A-E)。



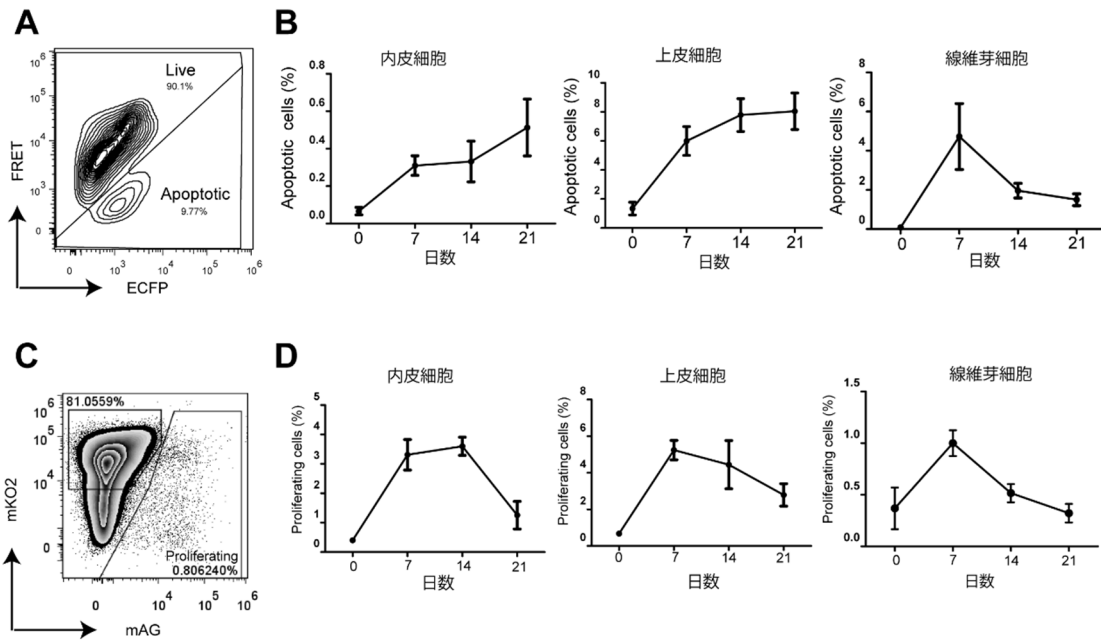


図 10 蛍光インディケーターによる増殖、細胞死応答

(A-D)細胞死インディケーターROSA-CAG-SCAT3.1 マウス、細胞周期インディケーターFucci マウスを用いたブレオマイシン誘導性肺線維症における細胞死、増殖の動態解析。(A, C)フローサイトメトリーによる肺細胞のアポトーシス細胞と増殖細胞の検出。(B, D) CD31 陽性内皮細胞、EpCAM 陽性上皮細胞、Lineage (CD45, CD31, EpCAM)陰性線維芽細胞におけるブレオマイシン投与後の細胞死、増殖動態。データは平均±標準誤差。n = 3 or 4。実験は 2 回以上行い、代表的なデータを示した(A-D)。

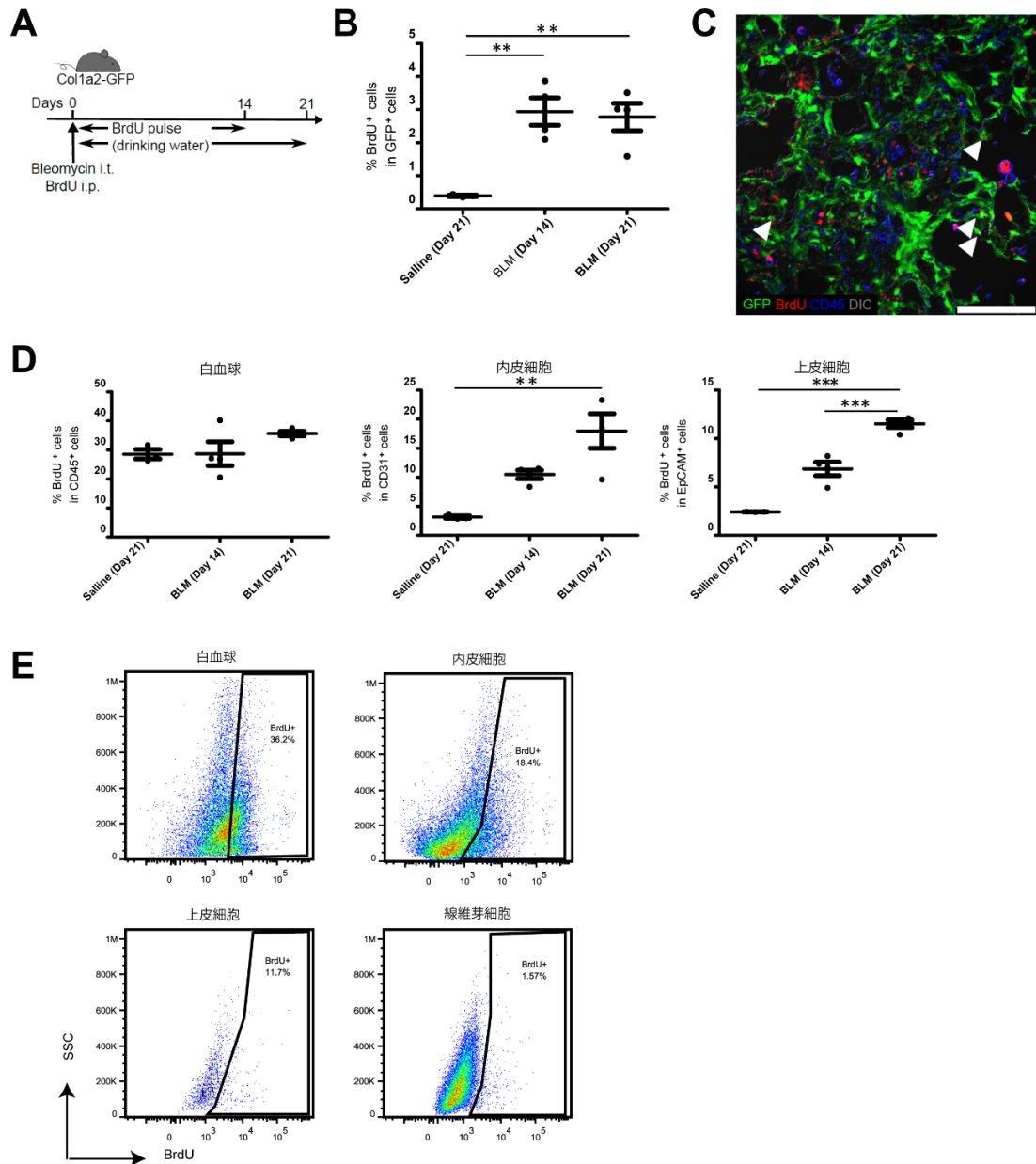


図 1 1 BrdU 長期投与による細胞増殖解析

(A-E) Col-GFP マウスをブレオマイシン処理し、BrdU を含む飲水を与え続け、その間に増殖した細胞を検出した。(B)生理食塩水投与後 14 日目、ブレオマイシン投与後 14、21 日目における Col-GFP 陽性細胞中の BrdU 陽性細胞。(C)ブレオマイシン投与後 14 日目の肺切片で BrdU (赤)、CD45 (青)を染色。Col-GFP (緑)。Arrowheads: BrdU 陽性 Col-GFP 陽性細胞。(D, E)CD45 陽性白血球、CD31 陽性内皮細胞、EpCAM 陽性上皮細胞における BrdU 陽性細胞数 (D) 及びゲーティング (E)。陽性ゲートは BrdU 未投与群より決定した。データは平均±標準誤差と各個体(B, D)。\*\* $P < 0.01$ 、\*\*\* $P < 0.005$  (One way-ANOVA, Tukey-Kramer post-test)。DIC: 微分干渉像。n = 3 or 4。実験は 2 回行い、代表的なデータを示した(A-E)。

## ブレオマイシン誘導性肺線維症における I 型コラーゲン産生細胞の網羅的遺伝子発現解析

線維化における線維芽細胞の活性化をさらに調べるため、Col-GFP 陽性の I 型コラーゲン産生細胞の網羅的遺伝子発現解析を行った。解析は次世代シーケンサーを用いた SAGE-seq 法により行った。Col-GFP マウスにおいて生理食塩水もしくはブレオマイシン投与後 14 日目に Col-GFP をセルソーターで純化した。純化後の細胞純度は生理食塩水処理群で 94.5%、ブレオマイシン処理群で 98.0%であった。それぞれにつき 100 万タグ以上読み込み、解析に際して合計タグ数を生理食塩水処理群を基準に正規化した。2 群間の比較で 3 倍以上発現変動した遺伝子は 213 個あった。この内、ブレオマイシン処理群で最も発現上昇していた 40 の遺伝子を表 2 に示した。変動のあった遺伝子のうち代表的なものに関して、同サンプルの cDNA から qPCR を行い、SAGE のタグ数と比較したところ、良い相関が見られた (図 12)。

ブレオマイシン処理群で特に発現上昇を示した遺伝子のうち、いくつかは線維症において重要な遺伝子として報告されている。*Spp1* は osteopontin (OPN) の名でも知られ、ブレオマイシン誘導性肺線維症や IPF 患者で発現上昇することが報告されている[110,111]。Cytokine receptor-like factor 1 (*Crlf1*)は上皮細胞によって分泌されるものが抗線維化作用を持つとの報告がある[112]。

Symbol	Tags, no.		Fold change
	Saline	Bleomycin	
<i>Spp1</i>	57	12,155	213.2
<i>Crlf1</i>	1	212	212.0
<i>Chl1</i>	1	157	157.0
<i>Cthrc1</i>	1	97	97.0
<i>Ereg</i>	7	449	64.1
<i>Anxa8</i>	2	108	54.0
<i>Lrg1</i>	2	104	52.0
<i>Hp</i>	28	1,077	38.5
<i>9930013L23Rik</i>	4	103	25.8
<i>Gjb3</i>	4	98	24.5
<i>C1qtnf6</i>	13	298	22.9
<i>Sdc1</i>	6	136	22.7
<i>Areg</i>	3	66	22.0
<i>Tnc</i>	40	824	20.6
<i>S100a4</i>	116	2,060	17.8
<i>Fst</i>	36	568	15.8
<i>Ildr2</i>	6	86	14.3
<i>Mcm6</i>	6	74	12.3
<i>Hspb7</i>	9	106	11.8
<i>Timp1</i>	163	1,883	11.6
<i>Slc7a2</i>	8	88	11.0
<i>Sfrp1</i>	165	1,702	10.3
<i>Fkbp5</i>	10	95	9.5
<i>Serpina3m</i>	18	164	9.1
<i>Rnf149</i>	21	191	9.1
<i>Fn1</i>	1018	8,890	8.7
<i>Chst11</i>	10	87	8.7
<i>Il11</i>	8	66	8.3
<i>Nrep*</i>	48	395	8.2
<i>Cd109</i>	16	118	7.4
<i>1110038B12Rik</i>	15	107	7.1
<i>Slpi</i>	23	164	7.1
<i>Rgs16</i>	25	176	7.0
<i>Cyp26b1</i>	11	75	6.8
<i>Saa3</i>	219	1,474	6.7
<i>Nek6</i>	12	78	6.5
<i>Inhba</i>	14	90	6.4
<i>Col12a1</i>	30	189	6.3
<i>Col7a1</i>	19	118	6.2
<i>Wisp1</i>	30	180	6.0

\*Alias *DOH4S114*.

表2 ブレオマイシン処理群 Col-GFP 陽性細胞における発現上昇上位の遺伝子

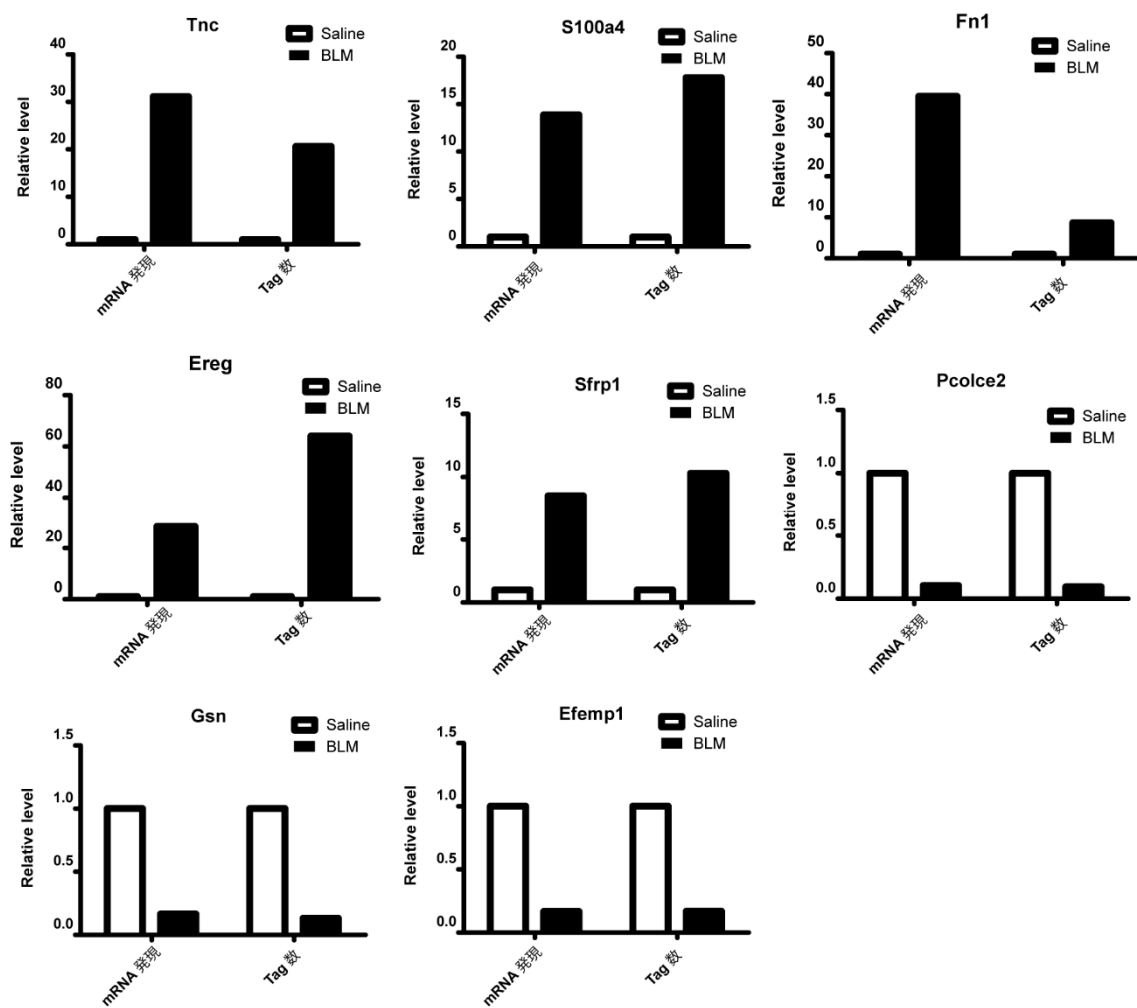


図 1.2 qPCR による SAGE 法の妥当性確認

次世代シーケンサーによる SAGE-seq 法により行った網羅的遺伝発現解析の各代表的遺伝子のタグ数と、同サンプルの cDNA を用いた qPCR 結果の比較。

*Sl00a4* は fibroblast specific protein 1 (Fsp1)の名でも知られているが、通常の Col-GFP 陽性細胞では発現は低く、線維化誘導により劇的に発現上昇することが明らかになった。Fibronectin 1 (*Fn1*)は細胞外マトリックスの一種であり、線維化した領域で見られることや、筋線維芽細胞への分化を促す働きが報告されている[22,24]。

Col-GFP 陽性細胞における遺伝子発現変動を機能的に特徴付けるため、Gene Ontology (GO)解析を DAVID ソフトウェアを用いて行った (表 3) [98]。ブレオマイシン処理群の Col-GFP 陽性細胞において上昇している遺伝子は、細胞外マトリックスやその構築に関わるものを数多く含んでおり、Col-GFP 陽性細胞におけるこれらの発現変動が線維化領域における細胞外マトリックス沈着に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

また、IPA ソフトウェアを用いて、変動している遺伝子の生物学的機能を解析した (表 4)。ブレオマイシン処理により細胞増殖を促すような遺伝子変化が起きており、同時に細胞死に対して抑制的な遺伝子変化も観察された。細胞の移動や浸潤、接着に関わる遺伝子変化も見られ、Col-GFP 陽性細胞の可動性が上昇していることも示唆された。

GO term	Genes, no.	P value
Extracellular region	40	$2.58 \times 10^{-14}$
Extracellular region part	25	$4.17 \times 10^{-11}$
Extracellular matrix part	11	$3.04 \times 10^{-10}$
Proteinaceous extracellular matrix	16	$5.03 \times 10^{-10}$
Extracellular matrix	16	$8.70 \times 10^{-10}$
Collagen	5	$5.60 \times 10^{-06}$
Cell adhesion	14	$4.81 \times 10^{-05}$
Biological adhesion	14	$4.90 \times 10^{-05}$
Glycosaminoglycan binding	7	$7.71 \times 10^{-05}$
Basement membrane	6	$1.01 \times 10^{-04}$
Pattern binding	7	$1.46 \times 10^{-04}$
Polysaccharide binding	7	$1.46 \times 10^{-04}$
Heparin binding	6	$1.67 \times 10^{-04}$
Growth factor activity	7	$2.48 \times 10^{-04}$
Extracellular structure organization	7	$3.59 \times 10^{-04}$
Extracellular matrix organization	6	$4.44 \times 10^{-04}$

表3 ブレオマイシン処理群 Col-GFP 陽性細胞において3倍以上の上昇を示した遺伝子の Gene Ontology (GO) term

Function annotation	P value	Predicted activation state	Activation Z-score
Proliferation of cells	$1.19 \times 10^{-42}$	Increased	3.075
Necrosis	$7.76 \times 10^{-36}$		-1.309
Cell death	$2.45 \times 10^{-35}$		-1.146
Apoptosis	$2.86 \times 10^{-34}$		-1.598
Cell movement	$1.74 \times 10^{-28}$	Increased	3.756
Migration of cells	$2.78 \times 10^{-28}$	Increased	3.179
Metabolism of protein	$4.61 \times 10^{-28}$	Increased	2.429
Proliferation of fibroblasts	$6.11 \times 10^{-22}$	Increased	2.54
Invasion of cells	$1.96 \times 10^{-20}$	Increased	2.798
Proliferation of fibroblast cell lines	$4.35 \times 10^{-19}$	Increased	2.526
Proliferation of connective tissue cells	$2.36 \times 10^{-18}$	Increased	3.652
Migration of connective tissue cells	$1.32 \times 10^{-16}$	Increased	2.843
Cell movement of connective tissue cells	$2.77 \times 10^{-16}$	Increased	3.032
Migration of fibroblasts	$7.95 \times 10^{-16}$	Increased	2.253
Cell movement of fibroblasts	$5.39 \times 10^{-15}$	Increased	2.57
Cell spreading	$1.08 \times 10^{-13}$	Increased	2.297
Adhesion of connective tissue cells	$2.20 \times 10^{-10}$	Increased	2.849
Attachment of cells	$1.65 \times 10^{-08}$	Increased	2.557
Chemotaxis	$1.64 \times 10^{-06}$	Increased	2.317

表4 ブレオマイシン処理群で変動した遺伝子の生物学的機能解析

## 線維芽細胞の新規活性化マーカーとしての OPN の同定

遺伝子 *Spp1* によってコードされる OPN が Col-GFP 陽性細胞において最も劇的な発現上昇を示したため、OPN が線維芽細胞の新規活性化マーカーになりうるかどうか検討した。OPN はこれまで T 細胞やマクロファージによって産生されると考えられてきたが、非血球系に別の産生源が存在する可能性が示唆されていた[113]。qPCR を用いて純化した Col-GFP 陽性細胞における *Spp1* の発現を調べたところ、ブレオマイシン処理 14 日後において生理食塩水処理と比べておよそ 500 倍の発現上昇が見られた (図 13A)。OPN タンパク質の発現を確認するため、肺の線維芽細胞を BFA 入りの培養液で培養し、フローサイトメーターで解析した (図 13B, C)。生理食塩水処理マウスから単離した Col-GFP 陽性細胞には OPN 陽性細胞はほとんど見られなかったが、ブレオマイシン処理 14 日後のマウスから単離した Col-GFP 陽性細胞は約 10% が OPN 陽性と判定された (図 13B)。興味深いことに、OPN 陽性と判定された Col-GFP 陽性細胞は FSC と SSC の値が大きい細胞であり、肥大して小胞体の発達した活性化線維芽細胞が OPN を発現している可能性が示唆された (図 13B)

また、免疫組織化学により Col-GFP 陽性細胞における OPN の発現が *in vitro* (図 13D)、*in vivo* (図 13E)において確認された。ブレオマイシン投与後 14 日後の肺切片において、肺胞腔における一部の血球細胞において OPN のシグ



ナルが見られたが(図 13E)、肺胞マクロファージであると考えられる[113]。

OPN 陽性の Col-GFP 陽性細胞は、線維化領域の肺胞腔に面した境界上に特徴的に見られた (図 13E)。さらに、一部の OPN 陽性 Col-GFP 陽性細胞は上皮細胞が欠落した肺胞で直接的に肺胞腔に接していた (図 13E)。一部の OPN 陽性・Col-GFP 陽性細胞は同時に $\alpha$ -SMA を発現していたが、創傷部位の中心部に位置する Col-GFP 陽性細胞は主に $\alpha$ -SMA を発現しており、OPN 高発現細胞はほとんど見られなかった (図 13F)。OPN 陽性細胞は、肺胞壁の崩壊が進行した線維化領域よりも、部分的に肺胞壁の構造を残し、再構築が進行中と考えられる領域に顕著に見られた (図 13F)。これらの結果から、OPN が肺胞腔に面する活性化線維芽細胞に特徴的に発現し、それらの細胞が OPN を肺胞腔に対して分泌している可能性が示唆された。

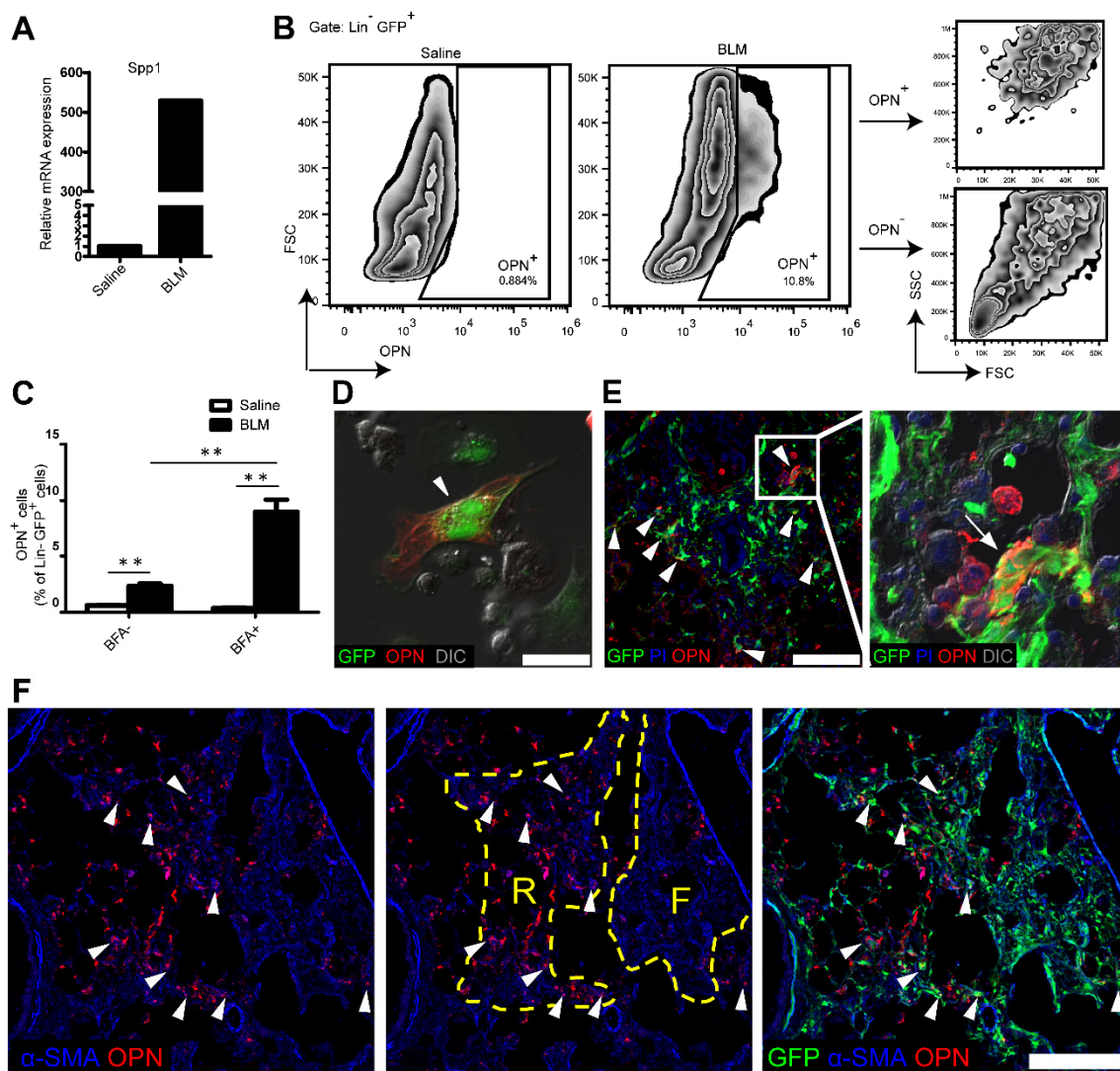


図 1 3 活性化 Col-GFP 陽性細胞における OPN の発現

(A-F)ブレオマイシン(BLM)または生理食塩水(Saline)投与後 14 日目の Col-GFP マウス。(A) 3 匹の個体からプールした肺細胞から Col-GFP 陽性細胞を純化し、RNA を抽出して qPCR で *Spp1* を測定。(B, C)BFA 処理を行った肺細胞の Lineage (Lin; CD45, CD31, EpCAM, Ter119)陰性 Col-GFP 陽性細胞における OPN のフローサイトメトリー解析。(B)OPN 陽性のゲーティング。OPN 陽性細胞は FSC と SSC の値が大きい。(C)OPN 陽性細胞の数を BFA 処理あり・なしで比較した。(D)BFA 処理した肺細胞の *in vitro* における免疫蛍光染色。Col-GFP (緑)、OPN (赤)。(E)BFA 処理した肺切片で OPN (赤), propidium iodide (PI; 青)を染色。Col-GFP (緑)。(F)肺切片において OPN (赤)、 $\alpha$ -SMA (青)を染色。Col-GFP (緑)。R: 再構築領域。F: 線維化領域。Arrowheads: Col-GFP 陽性 OPN 陽性細胞 (D-F)。データはそれぞれの値(A)、平均 $\pm$ 標準誤差(C)。\*\* $P < 0.01$  (t 検定)。DIC: 微分干渉像。スケールバー=25  $\mu$ m (D)、100  $\mu$ m (E)、200  $\mu$ m (F)。 $n = 4$  (C)。実験は 3 回以上行い、代表的なデータを示した(A-F)。

### 3.3 考察

これまでの肺線維症研究において解析されてきた線維芽細胞及び活性化線維芽細胞の多くは、プラスチック培養皿で培養した時に接着性を示す細胞として単離されたものであり、培養を挟むことにより性質が変化している可能性があった[114]。また、間葉系細胞はフローサイトメトリーを用いたシングルセルレベルでの解析法も血球系細胞で行われているほど発達しておらず、活性化の性状変化は不明な点が多かった。本研究では蛍光レポーターマウスを用いることで、肺線維症モデルにおける活性化線維芽細胞の動態や遺伝子変化を新鮮な状態で解析した。また、活性化線維芽細胞の新規マーカーとして OPN を同定し、筋線維芽細胞とは機能的に異なる活性化線維芽細胞サブセットが存在する可能性を示した。

私は Col-GFP、NG2-DsRed ダブルトランスジェニックマウスを用いることで、肺胞壁における常在性線維芽細胞が Col-GFP 陽性 PDGFR $\alpha$ 陽性であり、血管周囲細胞が NG2-DsRed 陽性 CD146 陽性 PDGFR $\beta$ 陽性であることを示した。一方で、肺胞壁におけるすべての PDGFR $\beta$ 陽性細胞が NG2-DsRed を発現しているわけでは無かった。NG2 は血管周囲細胞の一部を標識すると報告されており[42,53]、これらの血管周囲細胞のサブセットに機能的な違いがあるのかどうか調べる必要がある。Hung らは、Foxd1-Cre で標識される血管周囲細胞の中

に、Col-GFP を発現した線維芽細胞様の細胞が見られることを報告した[42]。

本研究においても、肺胞壁において一部の NG2-DsRed 陽性細胞が Col-GFP 陽性細胞と重複する様子が見られたが、血管周囲細胞内にこのようなサブタイプが存在するかどうか検討の余地がある。

Col-GFP マウスを用いたブレオマイシン誘導性肺線維症の解析により、Col-GFP 陽性細胞が創傷部位に集積し、線維芽細胞巣を形成することが明らかになった。また、線維化を誘導した肺から純化した Col-GFP 陽性細胞は線維化関連遺伝子を高発現し、細胞外マトリックスの産生細胞として中心的な役割を担っている可能性が示唆された。しかしながら、フローサイトメトリーを用いた定量的な解析では、肺における Col-GFP 陽性細胞数に有意な変動は見られなかった。BrdU の取り込み実験や蛍光インディケーターマウスを用いた実験により、ブレオマイシン投与後 7 日目をピークに線維芽細胞の増殖が亢進していたが、アポトーシスも同時に亢進しており、増殖と細胞死のバランスが保たれることで全肺における Col-GFP 陽性細胞数に変化が見られなかった可能性が考えられる。フローサイトメトリーによる組織細胞の定量的な解析に技術的な問題があつて細胞数の増減が検出されなかった可能性も考えられるが、私は同解析系を用いたネガティブコントロール及びポジティブコントロールとしてとして以下のような実験を行っている。浸潤した炎症細胞の増加によって組織細胞

数が少なく検出されている可能性を除くため、一般に組織細胞への傷害が小さいとされている Lipopolysaccharide 誘導性肺炎モデルにおいて、炎症細胞の増加を検出しつつ組織細胞数に変化のないことを確認した[99]。また、組織における血球細胞以外の増加を検出できることを示すため、ルイス肺がん細胞の肺転移モデルにおいてがん細胞の増加を同解析系を用いて検出可能であることを示した[99]。さらには、第四章で述べる経気道移入の系を用いて、移入用量依存的な活性化線維芽細胞の増加を検出したことから（図 24A）、フローサイトメトリーによる肺組織細胞の定量的解析結果が技術的要因によるアーティファクトである可能性は低いと考えられる。

増殖は活性化線維芽細胞による線維化部位形成の一つのメカニズムと考えられている[108]。実際に IPF 患者や動物の線維症モデルから単離された活性化線維芽細胞が増殖能を亢進しているとの報告があるが[115,116]、一方で IPF 患者由来の線維芽細胞は増殖能が低く、よりアポトーシスを起こしやすいとの報告もある[117]。重合化した I 型コラーゲンが線維芽細胞の増殖を抑制するとの報告もあり[118]、*in vivo* における活性化線維芽細胞の増殖は微小環境によって制御されている可能性がある。BrdU の継続投与実験においても、クラスターを形成している Col-GFP 陽性細胞の一部のみが BrdU 陽性であったことから、線維芽細胞巢の形成には増殖以外の要因も関与していると考えられる。例え

ば、他の細胞サブセットから増殖を経ずに活性化線維芽細胞に分化する可能性や、主に移動によって線維化部位でクラスターを形成した可能性がある。網羅的遺伝子発現解析の結果では、増殖関連遺伝子に加えて細胞の移動や浸潤に関わる遺伝子が有意に上昇していたことから、細胞の移動が線維芽細胞巢形成に果たす役割を解析する必要がある。

私は活性化線維芽細胞において最も劇的な発現上昇を示す遺伝子として OPN を同定し、線維化の辺縁部に局在する活性化線維芽細胞で特に発現が高い事を示した。OPN は細胞外マトリックスの一種であるが、*matricellular* タンパクに分類され、コラーゲン等の古典的な細胞外マトリックスとは異なる性質を有している[119]。皮膚の傷害モデルにおいて、PDGF の刺激を受けた皮膚線維芽細胞が OPN を発現し、瘢痕の形成に関与するとの報告がある[120]。また、心臓や皮膚の線維芽細胞において筋線維芽細胞への分化に OPN が必要であるとの報告もある[121]。肺においてはこれまでマクロファージ、上皮細胞、T 細胞が OPN の産生源として考えられてきた[110,122]。本研究は *in vivo* において活性化線維芽細胞が OPN の産生源となることを初めて示した。一方で、組織中の OPN に対する各 OPN 産生細胞の相対的な寄与率は今後の検討が必要である。

線維化誘導後における OPN の劇的な発現上昇は、OPN の線維化病態への

関与を強く示唆している。OPN はこれまで線維芽細胞の移動、浸潤、増殖を促進する機能が報告されている[110,123]。線維化部位辺縁部の活性化線維芽細胞が OPN を高発現し、肺胞腔への分泌が示唆されたことから、肺胞腔への線維芽細胞等の浸潤を促進している可能性がある。OPN ノックアウトマウスにおけるブレオマイシン誘導性肺線維症では、創傷部位の形成に異常を呈し、野生型と比べて肺胞腔が拡張した様子が見られることもこの仮説を支持している[113]。IPF 患者の肺胞洗浄液中においても OPN が増加していることから[110]、IPF における線維芽細胞巢の形成にも関与している可能性がある。OPN が IPF 患者の血清中で検出されるとの報告もあり[124]、OPN が IPF において果たす役割を明らかにすることで、新規治療標的やバイオマーカーの発見に繋がる可能性がある。

## 第四章 活性化線維芽細胞の細胞起源探索

### 4.1 はじめに

第三章では Col-GFP マウスにブレオマイシンによって線維化を誘導し、I 型コラーゲンを産生する活性化線維芽細胞の動態を解析したが、活性化線維芽細胞の細胞起源は Col-GFP マウスへのブレオマイシン投与では明らかにできない。議論が続いている活性化線維芽細胞の細胞起源を明らかにすることは、特異的な治療標的探索のために必要不可欠である。

本章ではまず並体結合を用いて循環血における活性化線維芽細胞前駆体の存在を解析した。さらに、活性化線維芽細胞の局在変化に基づいて新規実験法である常在性線維芽細胞の経気道移入法を確立し、各種細胞サブセットの系譜追跡を行った。また、経気道移入による常在性線維芽細胞の活性化様式を解析し、線維芽細胞巢形成機構の解析や治療標的探索における経気道移入法の有用性を明らかにした[100]。

### 4.2 結果

#### 並体結合による骨髄由来活性化線維芽細胞の検証

ブレオマイシン誘導性肺線維症において、骨髄由来線維細胞が循環血を介して



肺に供給され、病態形成に関わるとの報告があるが[6,45]、Col-GFP マウスの末梢血細胞を調べたところ、生理食塩水処理・ブレオマイシン処理群いずれにおいても、Col-GFP を発現している細胞は検出されなかった (図 14A)。活性化線維芽細胞が骨髄から供給されるかどうか検討するため、CD45.1 コンジェニックマウスと Col-GFP マウスの並体結合を行った (図 14B)。並体結合手術の 6 週間後に、ブレオマイシンもしくは生理食塩水投与を行い、21 日目に解析した。血球細胞におけるキメリズムは 40 – 60% であり、循環血は並体結合のペア間で共有されていた (図 14C)。しかしながら、野生型の肺で Lineage 陰性・Col-GFP 陽性と判定された細胞は生理食塩水及びブレオマイシン両処理群においてごく少数 (<0.5%) であった (図 14D)。さらには、免疫組織化学により肺切片を観察したところ、Col-GFP 陽性細胞が創傷部位を形成している Col-GFP マウスの肺とは対照的に、野生型のマウスの肺では創傷部位においても Col-GFP 陽性細胞はほとんど見られなかった (図 14E)。これらの結果により、Col-GFP 陽性活性化線維芽細胞は循環血からは供給されず、組織に常在している細胞から生じることが強く示唆された。

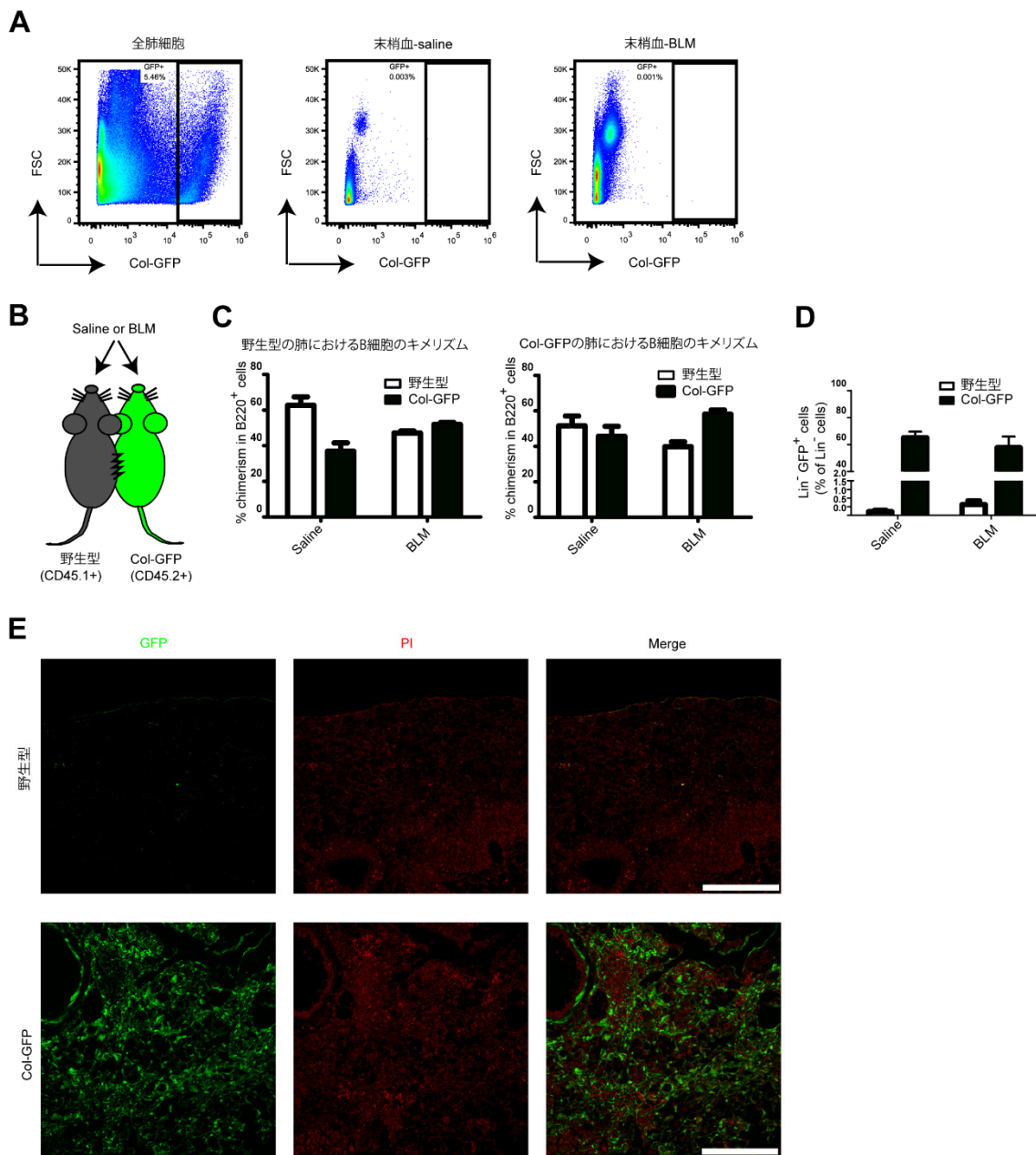


図 1 4 並体結合による骨髄由来活性化線維芽細胞の検証

(A)Col-GFP マウスにおける肺細胞・末梢血細胞の Col-GFP 陽性細胞をフローサイトメトリーで解析した。末梢血は生理食塩水 (Saline) もしくはブレオマイシン(BLM)処理後 14 日目に採集した。(B-E)並体結合を用いた実験。並体結合の手術後 6 週間目にブレオマイシンもしくは生理食塩水処理し、21 日目に解析した。(C)野生型・Col-GFP マウス肺の B 細胞におけるキメリズム。(D)肺の Lineage (Lin; CD45, CD31, EpCAM, Ter119)陰性細胞の内、Col-GFP 陽性細胞の数をフローサイトメトリーで解析。(E)肺切片を propidium iodide (PI)で染色。Col-GFP (緑)。データは平均±標準誤差 (C, D)。スケールバー250  $\mu$ m。n = 3 or 4。実験は 2 回行い、代表的なデータを示した(A-E)。

## ブレオマイシン投与後の Col-GFP 陽性細胞の局在変化

Col-GFP マウスの肺において、ブレオマイシン処理後 Col-GFP 陽性細胞がクラスターを形成したが (図 6)、一方で Col-GFP 陽性細胞の増殖応答はクラスター形成を説明できる程強固ではなかった (図 11)。また、Col-GFP 陽性細胞は循環血からは供給されていなかった (図 14)。そこで、Col-GFP 陽性細胞のクラスター形成のメカニズムを探索するため、ブレオマイシン誘導性肺線維症における Col-GFP 陽性細胞の局在変化を詳しく調べた。未処置の肺胞壁において、Col-GFP 陽性の常在性線維芽細胞は上皮基底膜の内側である間質の領域に散在している (図 15A)。一方で、ブレオマシンの投与後 10 日目において、肥大した Col-GFP 陽性細胞が間質から基底膜の外側、肺胞腔に移動している様子が観察された (図 15B)。肺胞腔に移動した Col-GFP 陽性細胞は、細胞の一端を肺胞壁に付着させていた (図 15B)。

Col-GFP 陽性細胞の可動性が増加しているかどうか調べるため、細胞遊走アッセイと細胞浸潤アッセイを行った (図 15C- E)。ブレオマイシン投与後 7 日目に純化した Col-GFP 陽性細胞は、生理食塩水投与群と比べて、細胞の遊走能及び浸潤能が増加していた。

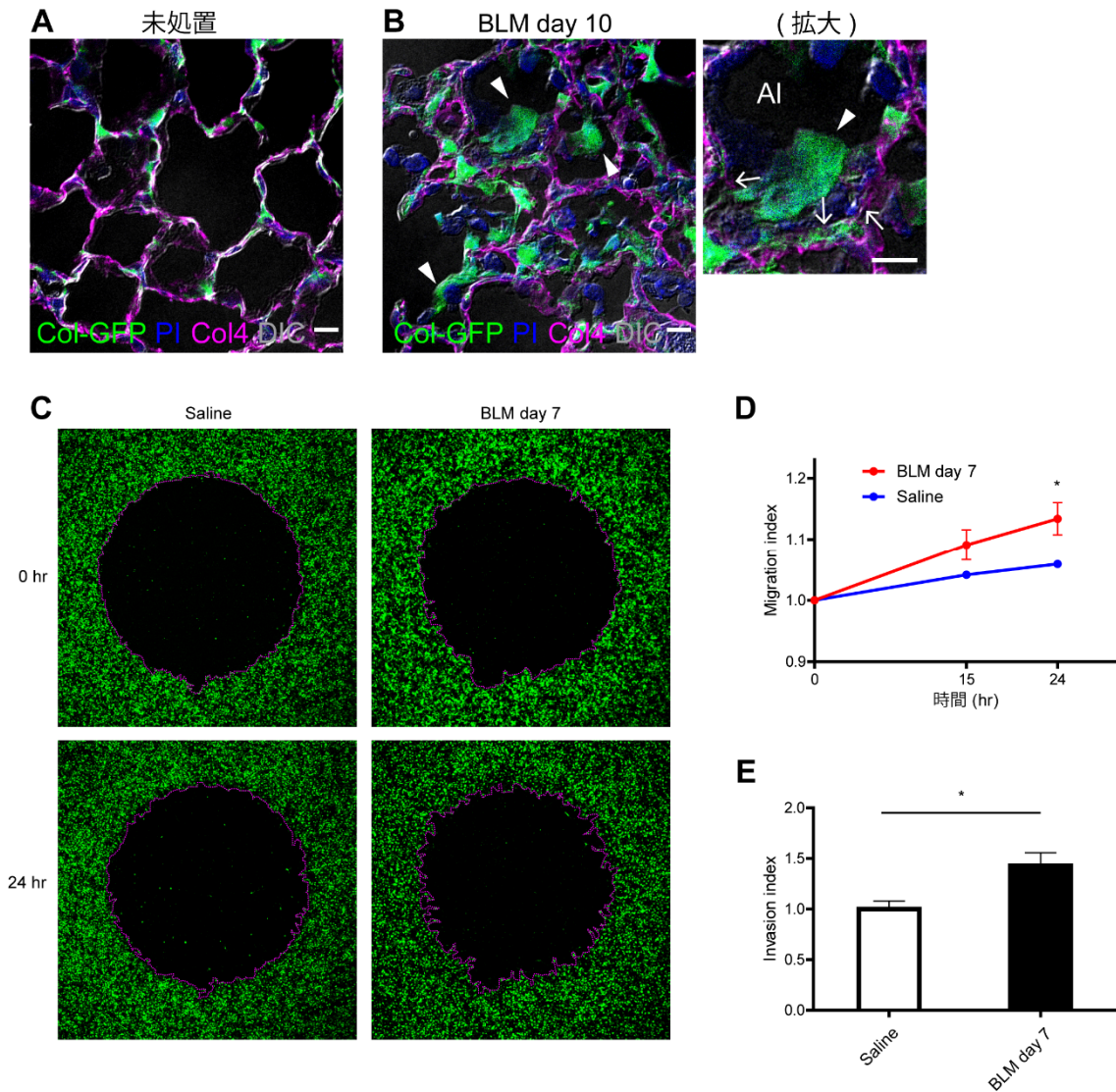


図 15 ブレオマイシン投与後初期における Col-GFP 陽性細胞の局在変化と可動性の変化

(A, B)未処置(A)もしくはブレオマイシン(BLM)投与後 10 日目(B)の Col-GFP (緑)マウス肺切片で Collagen 4 (Col4, マゼンタ)と propidium iodide (PI, 青)を染色。Arrowheads: 肺胞腔に移動した Col-GFP 陽性細胞。Arrows: 基底膜。Al: 肺胞腔。(C-E)生理食塩水(Saline)もしくはブレオマイシン投与後 7 日目の Col-GFP マウスから Col-GFP 陽性細胞を純化し、細胞遊走アッセイ(C, D)及び細胞浸潤アッセイ(E)を行った。(C)中央の細胞が無い領域の面積を測り、migration index を算出した。Col-GFP (緑)。(D)アッセイ開始後 15 時間、24 時間における各群の migration index。(E)細胞浸潤アッセイにおける invasion index。データは 3 つの technical replicate の平均±標準誤差(D, E)。\* $P < 0.05$  (t 検定)。DIC: 微分干渉像。スケールバー 10  $\mu\text{m}$ 。実験は 2 回以上行い、代表的なデータを示した(A-E)。

## 常在性線維芽細胞の経気道移入系の確立

肺の上皮傷害の後に、活性化した線維芽細胞が肺胞腔に移動する様子は、動物実験モデルや IPF 患者において報告されている[21,125]。これらの報告においても、発達した小胞体を持つ線維芽細胞が、基底膜との接着を保ちながら肺胞腔に浸出する様子が記述されている。また、IPF 患者における線維芽細胞巢の解剖学的特徴から、肺胞腔に浸出した線維芽細胞によって線維芽細胞巢が形成されるとの仮説がある[19,20]。そこで私は、肺胞腔に移動した線維芽細胞が線維芽細胞巢を形成できるかどうか検討する実験を行った (図 16)。まず野生型のマウスにブレオマイシンを投与し、肺線維症を誘導した。そして数日後に未処置の Col-GFP マウスから常在性線維芽細胞を単離し、経気道的にブレオマイシンを投与した野生型マウスに移入した (経気道移入) (図 16A)。常在性線維芽細胞は Lineage マーカー (CD45, CD31, CD146, EpCAM, Ter119) のネガティブセレクションで単離し、純度は 80%以上であった (図 16B)。ブレオマイシン投与後 21 日目に解析したところ、ブレオマイシン投与後 4 日目・7 日目・10 日目に移入したいずれの場合も Col-GFP 陽性細胞がホストマウスから検出されたが、7 日目・10 日目に移入した場合に検出数が多い傾向にあった (図 16C, D)。一方で肺傷害を誘導していない生理食塩水処理群に移入した場合は、ホストマウスから Col-GFP 陽性細胞は検出されなかった (図 16C, D)。

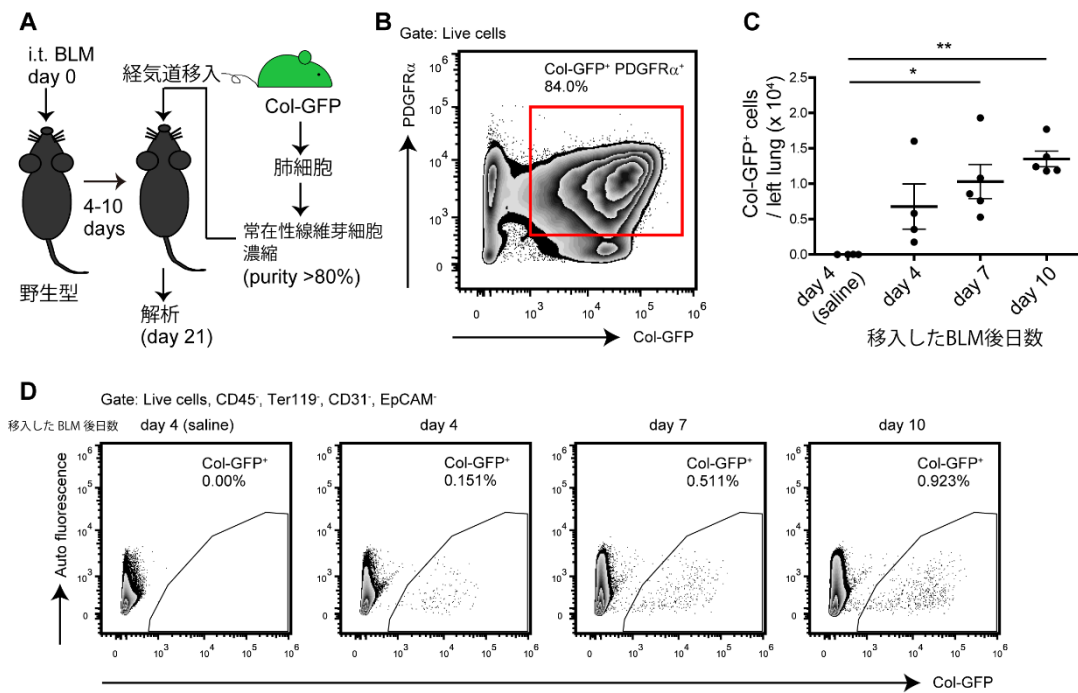


図 1 6 常在性線維芽細胞の経気道移入実験系

(A)実験方法の図示。野生型のマウスをブレオマイシン処理して数日後に、Col-GFP マウスから単離した常在性線維芽細胞を経気道的に移入し、ブレオマイシン処理後 21 日目に解析した。(B)移入前の Col-GFP 陽性 PDGFR $\alpha$ 陽性常在性線維芽細胞の純度は 80%以上であった。(C, D)フローサイトメトリーによるホストマウスの肺の解析。データは平均 $\pm$ 標準誤差と各個体 (C)。\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$  (one-way ANOVA, Tukey-Kramer post-test)。 $n = 4$  or 5 (C)。実験は 3 回行い、代表的なデータを示した(A-D)。

免疫組織化学によりホストマウスの肺組織を解析したところ、ブレオマイシンを投与し、経気道移入を行った群では Col-GFP を発現する細胞が創傷部位に組み込まれており、ほぼすべての Col-GFP 陽性細胞は間質の領域に存在していた (図 17)。一方で、生理食塩水を投与して経気道移入した群では Col-GFP 陽性細胞は見られなかった (図 17)。4 日目に移入した肺では Col-GFP 陽性細胞のクラスターは稀であったが、7 日目、10 日目に移入した肺では一部の Col-GFP 陽性細胞が線維芽細胞巣を形成していた (図 17)。これらの結果から、ブレオマイシンにより肺傷害を誘導した肺では、移入した常在性線維芽細胞が生着可能であり、より上皮傷害が見られる 7 日目から 10 日目にかけて (図 8-10) 生着可能細胞数が増加する可能性が示唆された。



Col-GFP Col1 PI

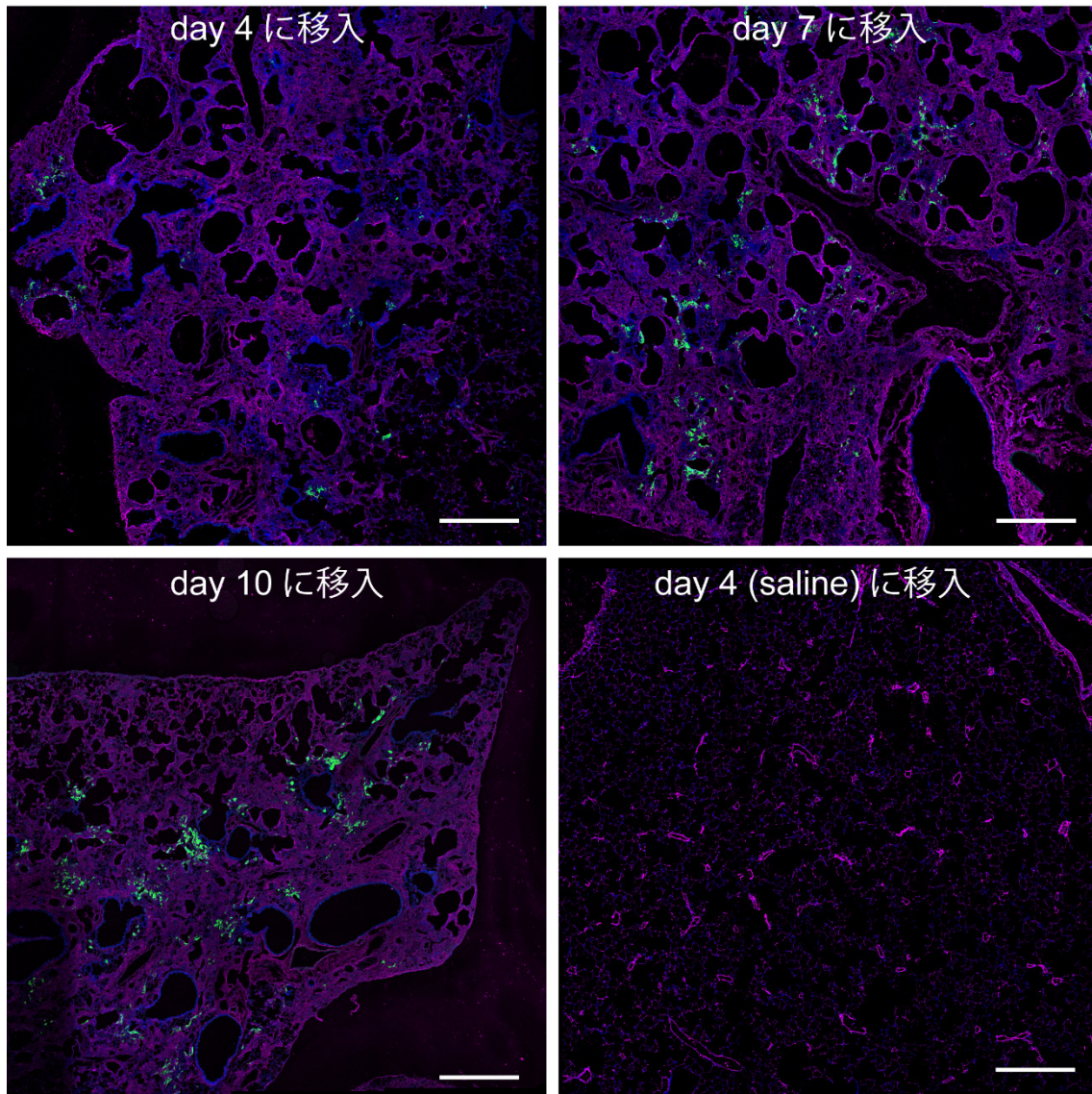


図 1 7 経気道移入後のホストマウスの肺組織解析

ブレオマイシンもしくは生理食塩水(Saline)を投与して4日目、7日目、10日目に Col-GFP (緑)マウスから単離した常在性線維芽細胞を経気道移入し、21日目の肺切片を Collagen 1 (Col1, マゼンタ)と propidium iodide (PI, 青)で染色。スケールバー500  $\mu\text{m}$ 。実験は3回行い、代表的なデータを示した。



移入後の常在性線維芽細胞の変化を免疫組織化学により解析した。移入して一日目においては移入した細胞は球形の形態をしており、肺胞上皮細胞や、上皮の欠落した上皮基底膜に付着していた (図 18)。移入後 4 日目には細胞の形態は肥大して基底膜との接着部位が増加しており、一部の細胞はクラスターを形成していたことから増殖した可能性が示唆された (図 18)。移入後 7 日目にはほぼすべての移入細胞が上皮の間質に存在しており、星形の典型的な活性化線維芽細胞の形態をしていた (図 18)。これらの結果から、経気道移入した常在性線維芽細胞が肺胞腔の環境下で活性化し、間質に移動して線維芽細胞巣を形成した可能性が示唆された。

### 経気道移入を用いた系譜追跡

経気道移入によって常在性線維芽細胞が線維芽細胞巣を形成し、活性化することが明らかになったので、その他の細胞サブセットも同様の経気道移入によって活性化線維芽細胞に分化することができるかどうか調べた (図 19)。Col-GFP<sup>+/+</sup> NG2-DsRed<sup>+/+</sup> マウスから、Col-GFP 陽性細胞 (常在性線維芽細胞)、Col-GFP 陽性 NG2-DsRed 陽性細胞 (平滑筋細胞)、NG2-DsRed 陽性細胞 (血管周囲細胞)、EpCAM 陽性細胞 (上皮細胞) をセルソーターにより純化し、純化後の細胞純度はいずれも 95%以上であった (図 19B)。純化した細胞をブレオマイ

シン投与後 7 日目の野生型マウスに  $1 \times 10^4$  細胞経気道移入した。ブレオマイシン投与後 14 日目にホストマウスの肺を解析したところ、Col-GFP 陽性常在性線維芽細胞を移入した群が最も肺中の Col-GFP 陽性細胞数が多かった ( $3.02 \pm 0.42 \times 10^3$  細胞/左葉) (図 19C, D)。Col-GFP 陽性 NG2-DsRed 陽性平滑筋細胞を移入した群においても若干の Col-GFP 陽性細胞が見られた ( $8.11 \pm 2.44 \times 10^2$  細胞/左葉) (図 19C, D)。一方で、NG2-DsRed 陽性血管周囲細胞と EpCAM 陽性上皮細胞を移入した群において Col-GFP 陽性細胞は検出されなかった (図 19C, D)。肺切片を観察したところ、Col-GFP 陽性常在性線維芽細胞を移入したマウスの肺においては肥大して活性化した形態を持った Col-GFP 陽性細胞がクラスターを形成していたが、その他の細胞を移入した群では肥大した細胞やクラスター形成は見られなかった (図 19E)。移入した Col-GFP 陽性 NG2-DsRed 陽性平滑筋細胞の一部は NG2-DsRed の発現を減弱させていた (図 19F)。また、NG2-DsRed 陽性血管周囲細胞を移入した群では、NG2-DsRed 陽性細胞が検出されたが ( $5.40 \pm 0.68 \times 10^2$  細胞/左葉)、Col-GFP の発現は見られなかった (図 19G)。また、蛍光タンパク ROSA-CAG-SCAT3.1 を全身に発現するマウスから同様の手順で上皮細胞を純化し、経気道移入を行ったところ、上皮細胞としての生着が見られたが、間質に移動して活性化線維芽細胞に分化している様子は見られなかった (図 20A, B)。

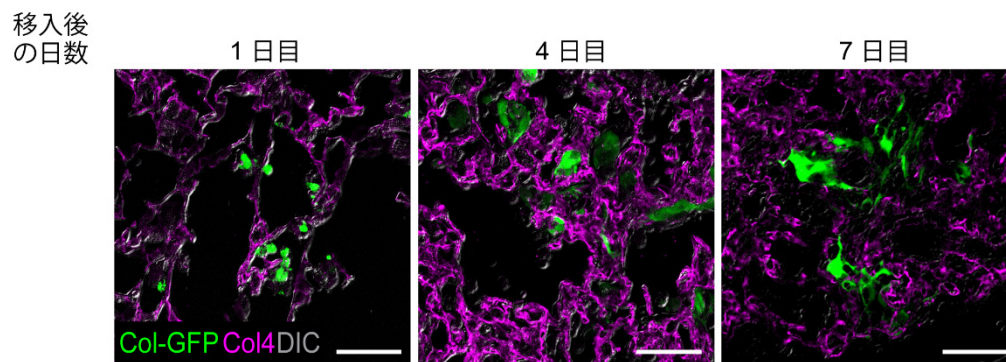


図18 経気道移入した常在性線維芽細胞の経時的解析

ブレオマイシンを投与して7日目の野生型マウスに Col-GFP (緑)マウスの肺から単離した常在性線維芽細胞を経気道移入し、1日後・4日後・7日後の肺切片で Collagen 4 (Col4, マゼンタ)を染色。DIC: 微分干渉像。スケールバー50  $\mu\text{m}$ 。実験は2回行い、代表的なデータを示した。

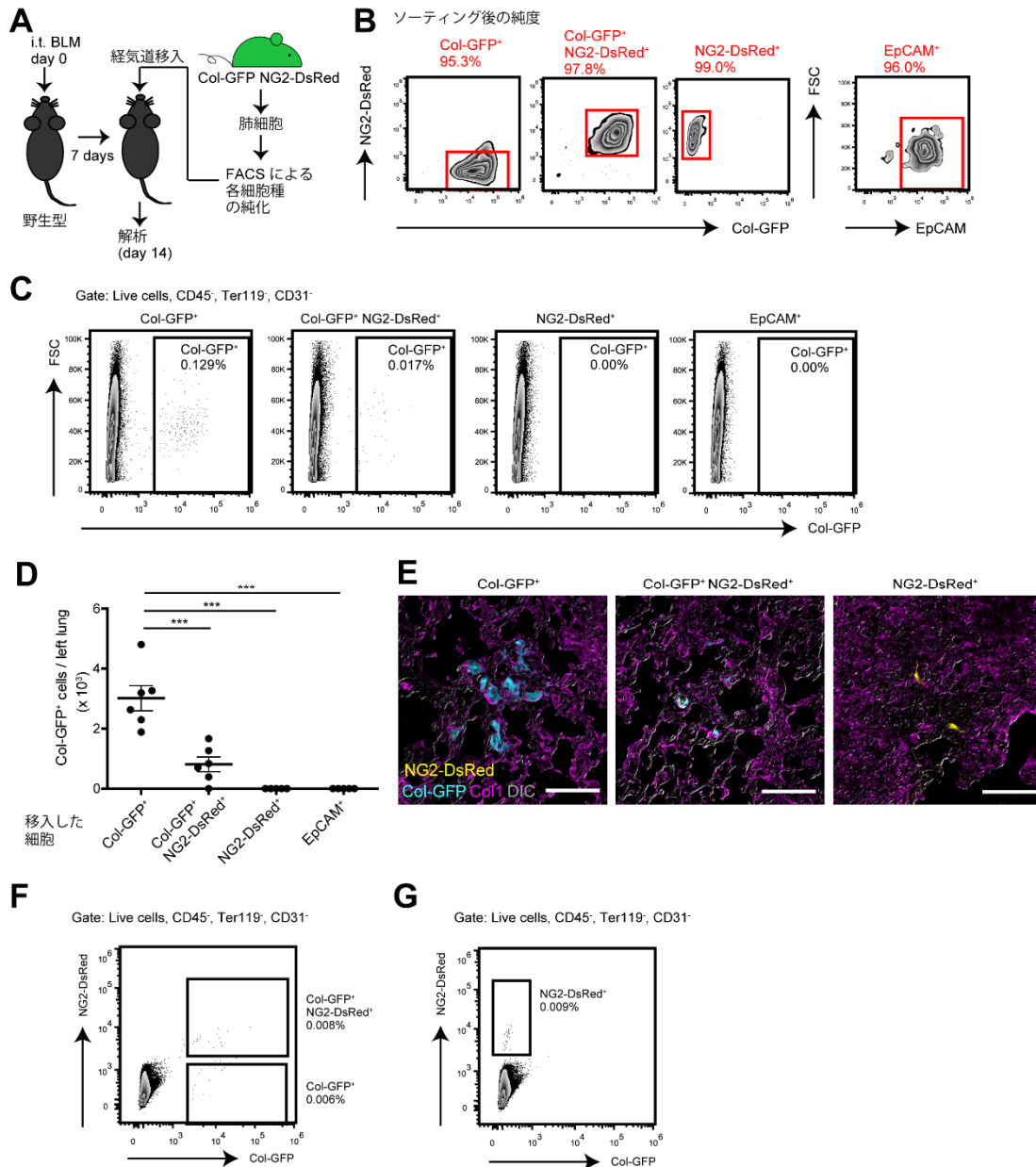


図 19 経気道移入を用いた系譜追跡

(A)ブレオマイシンを投与した野生型のマウスに、Col-GFP マウスの常在性線維芽細胞を経気道移入した。(B)各細胞種をセルソーターで純化した後の細胞純度。(C)フローサイトメトリーを用いた宿主肺における Col-GFP 陽性細胞の検出。(D)宿主マウス左葉あたりの Col-GFP 陽性細胞数。(E)宿主マウスの肺切片で Collagen 1 (Col1, マゼンタ)を染色。Col-GFP (シアン)、NG2-DsRed (黄色)。DIC: 微分干渉像。(F)Col-GFP 陽性 NG2-DsRed 陽性平滑筋細胞移入群におけるフローサイトメトリー解析。(G) NG2-DsRed 陽性血管周囲細胞移入群におけるフローサイトメトリー解析。データは平均±標準誤差と各個体(D)。スケールバー100  $\mu\text{m}$  (E)。\*\*\* $P < 0.001$  (one-way ANOVA, Tukey-Kramer post-test)。 $n = 5$  or 6。実験は 2 回行い、代表的なデータを示した(A-G)。

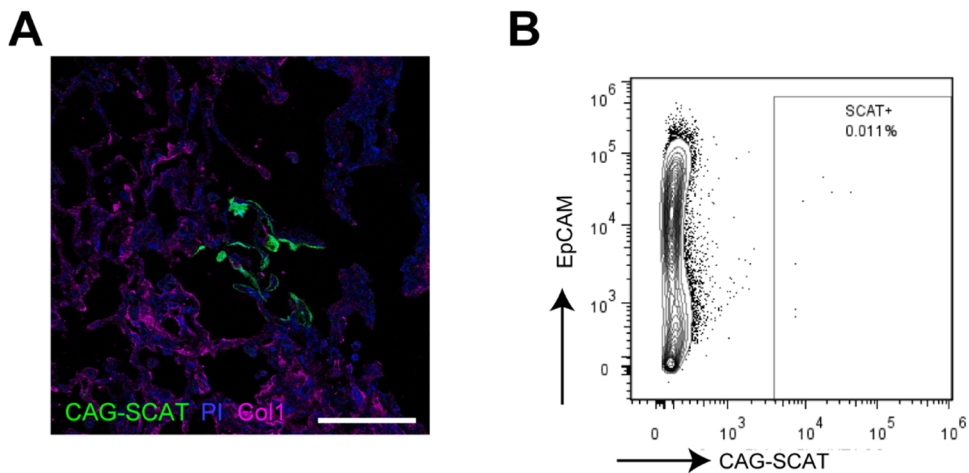


図 2 0 ROSA-CAG-SCAT3.1 マウスを用いた上皮細胞の経気道移入

(A, B)ブレオマイシンを投与して7日目の野生型マウスに、ROSA-CAG-SCAT3.1 マウスから純化した EpCAM 陽性上皮細胞を経気道移入し、ブレオマイシン投与後 14 日目に解析。(A)肺切片で Collagen 1 (Col1, マゼンタ)と propidium iodide (PI, 青)で染色。ROSA-CAG-SCAT3.1 (緑)。(B)フローサイトメトリーを用いたホストマウスの肺における ROSA-CAG-SCAT3.1 陽性細胞の検出。スケールバー100  $\mu\text{m}$  (A)。実験は 2 回行い、代表的なデータを示した(A, B)。

## 経気道移入による常在性線維芽細胞の活性化

経気道移入によって生じる常在性線維芽細胞の活性化をさらに解析した。ブレオマイシン投与後7日目に移入し、14日目に回収・純化した Col-GFP 陽性細胞は *Colla1*、*Acta2*、*Spp1*、*S100A4*、*Fnl1*、*Tnc* 等の線維芽細胞の活性化マーカー遺伝子の発現が劇的に上昇していた (図 21A)。また、組織上で移入した常在性線維芽細胞によって形成された線維芽細胞巣の一部は、 $\alpha$ -SMA を高発現しており、筋線維芽細胞に分化していた (図 21B)。フローサイトメトリーによって移入した Col-GFP 陽性細胞中における $\alpha$ -SMA 発現細胞を調べたところ、移入後2日目から4日目にかけて顕著に増加していたが、4日目から7日目にかけては変化がなかった (図 21C, D)。

また、移入後2日目から4日目にかけて細胞の FSC 及び SSC が顕著に増加しており、4日目から7日目においてはそれらが減少傾向にあった (図 22A, B)。移入後4日目にホストマウスから単離・純化した Col-GFP 陽性細胞の可動性を細胞遊走アッセイで調べたところ、移入して活性化した Col-GFP 陽性細胞は可動性が増加していた (図 22C, D)。さらに、基底膜成分に対する浸潤能も増加していた (図 22E)

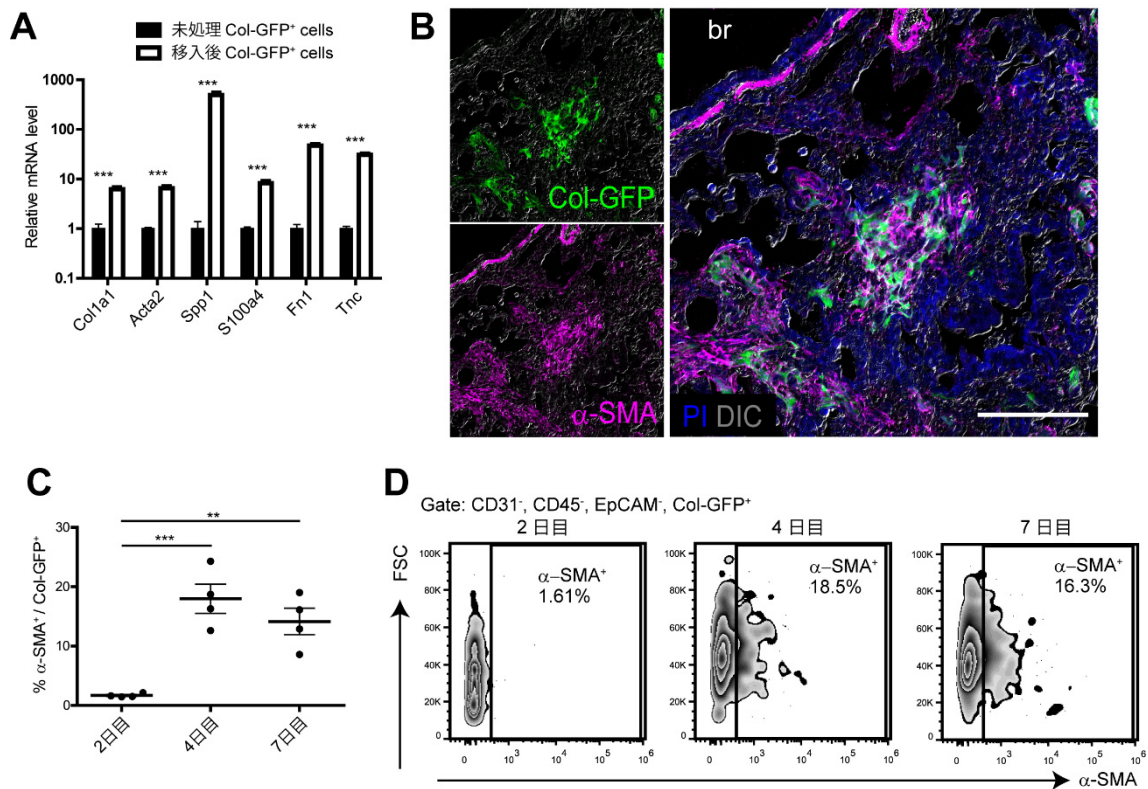


図 2 1 経気道移入による常在性線維芽細胞の活性化マーカー発現

(A-D)ブレオマイシン投与後 7 日目に Col-GFP 陽性常在性線維芽細胞を経気道移入し、その活性化を調べた。(A)移入後 7 日目にホストマウスから Col-GFP 陽性細胞を純化し、遺伝子発現を qPCR によって移入前の未処理 Col-GFP 陽性細胞と比較した。(B)移入後 4 日目に肺切片でα-SMA (マゼンタ)、propidium iodine (PI, 青)を染色。Col-GFP (緑)。DIC: 微分干渉像。br: 細気管支。(C, D)移入後 2、4、7 日目に Col-GFP 陽性細胞中のα-SMA 陽性細胞をフローサイトメトリーで調べた。データは平均±標準誤差(A)、平均±標準誤差と各個体(C)。\*\*\* $P < 0.001$  (t 検定) (A)、\*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  (one-way ANOVA, Tukey-Kramer post-test) (C)。スケールバー 100 μm (E)。 $n = 3$  (A; 未処理 Col-GFP<sup>+</sup> cells), 5 (A; 移入後 Col-GFP<sup>+</sup> cells), 4 (C, D)。実験は 2 回以上行い、代表的なデータを示した(A-D)。



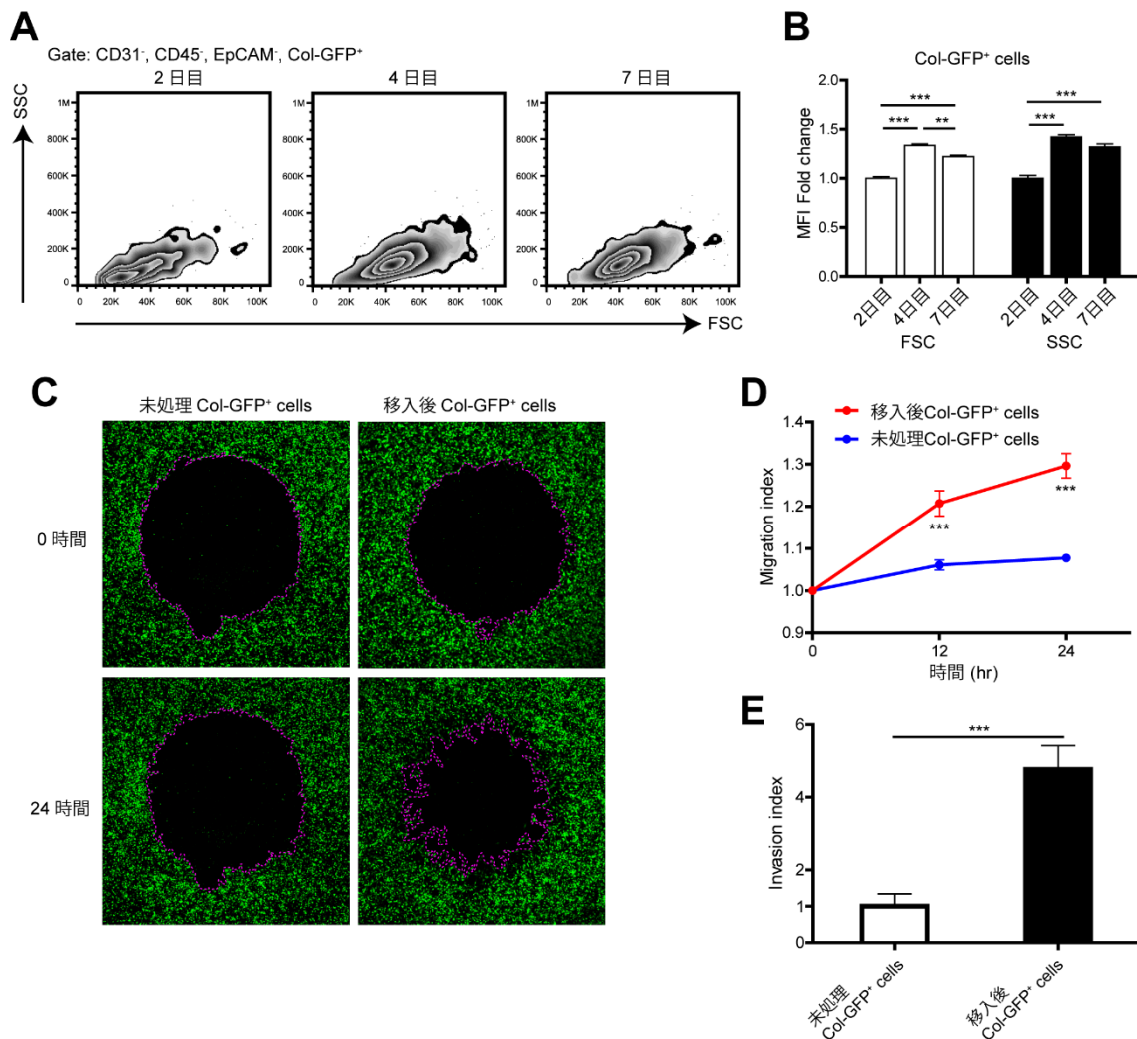


図 2 2 経気道移入による常驻性線維芽細胞の形態及び可動性の変化

(A-E)ブレオマイシン投与後7日目の野生型マウスにCol-GFPマウスの肺から単離した常驻性線維芽細胞を経気道移入し、その後Col-GFP陽性細胞を単離して形態、可動性、浸潤能を調べた。(A, B)移入して2、4、7日目にCol-GFP陽性細胞のFSC及びSSCをフローサイトメトリーで解析。(C)移入して4日目のCol-GFP陽性細胞を純化して細胞遊走アッセイを行った。中央の細胞の無い領域の面積を測定した。Col-GFP(緑)。(D)細胞遊走アッセイで算出したmigration index。(E)基底膜成分に対する浸潤能アッセイ。データは平均±標準誤差(B)。3つのtechnical replicateの平均±標準誤差(D, E)。\*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  (one-way ANOVA, Tukey-Kramer post-test) (B)、\*\*\* $P < 0.001$  (t検定) (D, E)。 $n = 4$  (B)。実験は2回以上行い、代表的なデータを示した(A-E)。



BrdU の取り込みにより、移入した常在性線維芽細胞の増殖応答を調べた。ブレオマイシン投与後 6 日目からホストマウスに BrdU を飲水に混ぜて継続投与し、ブレオマイシン投与後 7 日目に Col-GFP 陽性常在性線維芽細胞を経気道移入し、移入後 2、4、7 日目に解析した (図 23)。移入後 2 日目において BrdU 陽性 Col-GFP 陽性細胞は約 4%であったが、4 日目にかけて約 8%まで増加した (図 23A, B)。一方で、4 日目から 7 日目にかけては BrdU 陽性細胞の増加は見られなかった (図 23A, B)。BrdU 陽性 Col-GFP 陽性細胞は、FSC の値が大きく、肥大した細胞であった (図 23B)。移入して 4 日目に肺切片を免疫蛍光化学により観察したところ、線維芽細胞巣を形成する一部の Col-GFP 陽性細胞が BrdU 陽性であった (図 23C)。これらの結果を総合すると、常在性線維芽細胞の経気道移入後、細胞の肥大化や小胞体の発達、さらには $\alpha$ -SMA の発現や増殖等の活性化は移入後 2 日目から 4 日目の間に生じ、その後は活性化マーカーの発現や活性化形態を保ちつつも増殖はしない段階に入ることが示唆された。

また、移入した Col-GFP 陽性常在性線維芽細胞によって形成された線維芽細胞巣は、上皮基底膜の肺胸腔側に位置しており、上皮細胞と基底膜を介さずに接していた (図 23C)。これらは IPF における線維芽細胞巣と同様の特徴であり [17-19,126]、経気道移入した常在性線維芽細胞が IPF と似通った線維芽細胞巣を形成できることが示唆された。

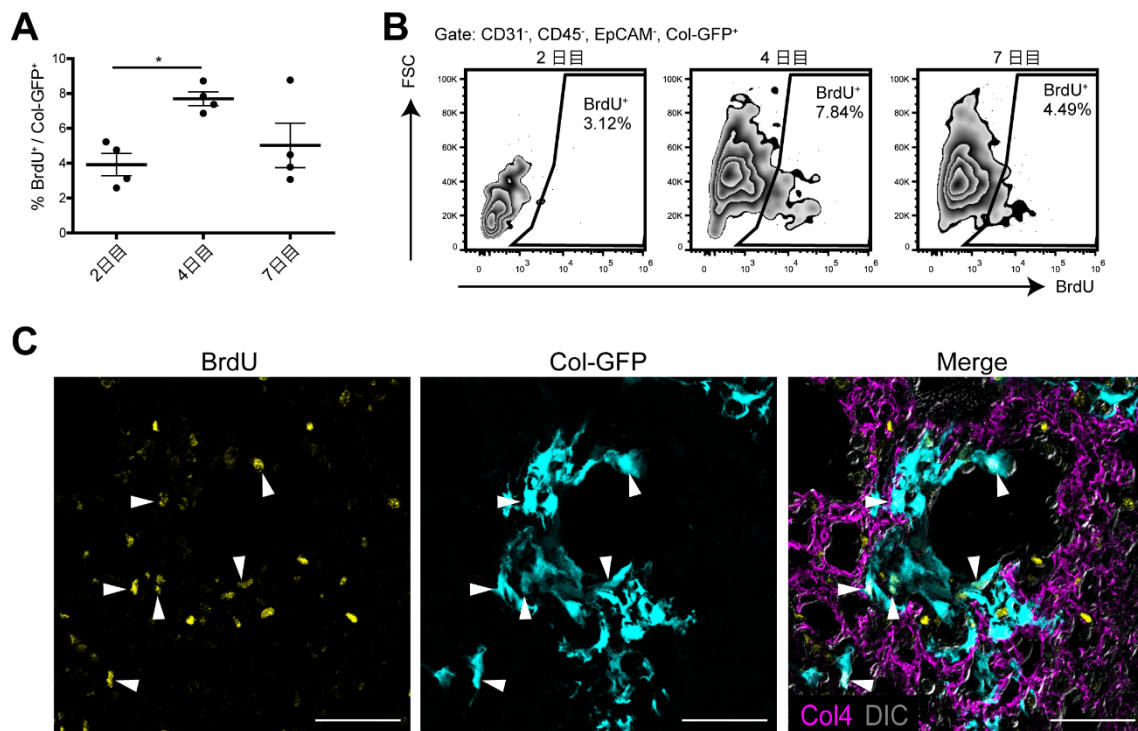


図 2 3 経気道移入による常在性線維芽細胞の増殖及び線維芽細胞巣形成

(A-C)野生型のマウスに、ブレオマイシン投与後 6 日目から継続的に BrdU 投与。ブレオマイシン投与後 7 日目に Col-GFP 陽性常在性線維芽細胞を経気道移入し、BrdU の取り込みを解析した。(A, B)移入後 2、4、7 日目にホストマウス肺における Col-GFP 陽性細胞中の BrdU 陽性細胞をフローサイトメトリーで解析。(C)移入後 4 日目に肺切片で BrdU (黄色)、Collagen 4 (Col4, マゼンタ)を染色。Col-GFP (シアン)。DIC: 微分干渉像。Arrowheads: BrdU 陽性 Col-GFP 陽性細胞。データは平均±標準誤差と各個体 (A)。スケールバー 50 μm (C)。\* $P < 0.05$  (one-way ANOVA, Tukey-Kramer post-test)。 $n = 4$  (A, B)。実験は 2 回以上行い、代表的なデータを示した(A-C)。

## 常在性線維芽細胞の経気道移入が線維化に与える影響

最後に常在性線維芽細胞の経気道移入が宿主肺の線維化に与える影響を調べた。ブレオマイシン投与後 7 日目の野生型マウスに、Col-GFP 陽性常在性線維芽細胞を中用量・高用量と細胞数を振って経気道移入を行った (図 24)。ブレオマイシン投与後 14 日目に解析したところ、生着した細胞数は用量依存的に増加していた (図 24A)。宿主肺におけるヒドロキシプロリン量を定量したところ、移入しなかった群と比較して移入した群ではヒドロキシプロリン量が増加しており、移入した常在性線維芽細胞によって組織の線維化が増加した可能性が示唆された (図 24B)。一方で中用量群と高用量群には差は見られず、高用量では線維化による負のフィードバックが生じた可能性がある (図 24B) [118]。経気道移入によって炎症や傷害が亢進したかどうか検討するため、組織に浸潤した血球細胞数を計測したところ、移入した群で浸潤細胞の増加は見られず、むしろ減少傾向にあった (図 24C)。また、全肺における線維化促進性サイトカインの mRNA 発現を解析したところ [108]、移入した群で線維化促進性サイトカインの発現上昇は見られず、浸潤細胞と同様に移入した群で減少傾向にあった。これらの結果は、増加したコラーゲン沈着が、宿主肺における線維化反応の亢進ではなく、経気道移入による活性化線維芽細胞の増加によって引き起こされたことを支持する結果であると考えられる。

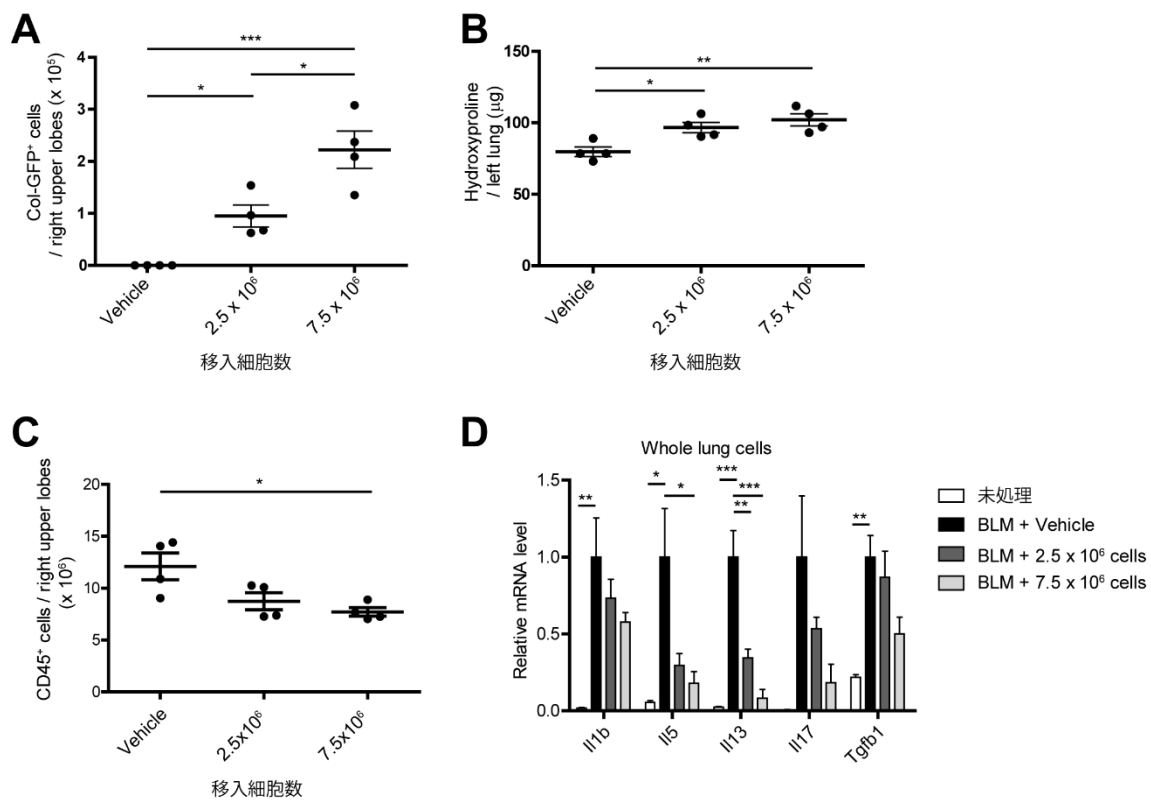


図 2 4 常在性線維芽細胞の経気道移入が線維化に与える影響

(A-D)ブレオマイシン投与後 7 日目の野生型マウスに、Col-GFP 陽性常在性線維芽細胞を用量を振って経気道移入し、ブレオマイシン投与後 14 日目に解析した。(A)右上葉と右中葉における Col-GFP 陽性細胞数。(B)左葉におけるヒドロキシプロリン量。(C)右上葉と右中葉における CD45 陽性血球細胞数。(D)全肺由来 RNA を用いた線維化促進性サイトカインの qPCR。データは平均±標準誤差と各個体(A-C)。平均±標準誤差(D)。\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  (one-way ANOVA, Tukey-Kramer post-test) (A-D)。 $n = 4$  (A-D)。実験は 2 回行い、代表的なデータを示した(A-D)。

### 4.3 考察

肺線維症における活性化線維芽細胞起源を巡るこれまでの研究の最大の問題点は、古典的に活性化線維芽細胞の起源と考えられてきた常在性線維芽細胞の厳密な系譜追跡が行われていないことであった[79]。その原因の一つとして、常在性線維芽細胞を特異的かつ高効率に標識するツールが不足していたことが挙げられる。本研究は、内因性線維芽細胞の活性化を部分的に再現する経気道移入法を用いて、常在性線維芽細胞の厳密な系譜追跡を行うことに成功した。経気道移入法は線維化を抑制する治療標的探索のための強力なツールになる可能性がある。

私は並体結合の実験により Col-GFP 陽性活性化線維芽細胞が循環血からは供給されないことを示した。これは骨髄由来の線維細胞が肺線維症に貢献するとした報告と矛盾する結果である[45,127,128]。線維細胞について記述したこれらの論文の多くは線維細胞の定義が曖昧であり、炎症に伴って肺に浸潤した単球や組織のマクロファージと明確な区別ができていない可能性がある。また、同様に線維細胞の同定方法として用いられている、血球細胞の中でプラスチックディッシュに接着性を示す細胞を線維細胞とする方法も、ディッシュに接着性を示すマクロファージとの区別は困難である[129,130]。培養液中の I 型コラーゲンを取り込んだ血球細胞がフローサイトメトリーで CD45 陽性 I 型コラ

ーゲン陽性と判定されることも考慮し[48]、線維化における線維細胞の同定方法や役割を再定義する必要があると考えられる。

活性化した線維芽細胞が傷害部位へ遊走することは皮膚の創傷治癒でよく記述されており[22,131,132]、同様のメカニズムが肺においても提唱されている[21,92,125]。IPF患者から単離した線維芽細胞の移動性が亢進していることも報告されている[133]。IPF患者における線維芽細胞巣は、その解剖学的特徴から肺胞腔に移動した線維芽細胞によって形成したものと考えられていた[18,19]。常在性線維芽細胞の経気道移入により形成した線維芽細胞巣も、IPFで見られるものと同様の解剖学的特徴を有していた。経気道移入は、肺胞腔へ直接常在性線維芽細胞を移入することで、肺胞腔へ浸出した後の常在性線維芽細胞の活性化や線維芽細胞巣の形成などを再現すると考えられる。また、本研究は肺傷害によって生じる線維芽細胞巣が、肺胞腔に存在する細胞によって形成され得ることを実験的に証明した初めての研究である。同時に、移入した常在性線維芽細胞が活性化マーカーの発現を劇的に亢進し、線維芽細胞巣を形成したことは、創傷部位の形成において肺胞腔の環境に曝露することが重要な役割を果たす可能性を示唆している。Tagerらはlysophosphatidic acid (LPA)が線維芽細胞の移動を制御していることを示し、同レセプターの阻害が肺線維症を抑制することを報告した[134]。LPAレセプターの阻害剤は現在IPFに対する臨床治験が行

われている[92]。また、筋線維芽細胞の浸潤能を亢進させると肺線維症が悪化することも報告されている[135]。これらのことを総合すると、上皮傷害に伴って活性化線維芽細胞が肺胞腔に浸潤し、線維芽細胞巣を形成することの抑制がIPFの治療として有力な戦略となる可能性を示唆している。

常在性線維芽細胞は、傷害を誘導していないマウスに移入しても生着しなかった。よって経気道移入の成立には上皮細胞の傷害とそれに伴う炎症環境が必要であると考えられる。このことは同時に、経気道移入により生着した細胞は、上皮傷害が起こっている部位で活性化を受けた細胞であることを示唆している。全肺から単離したホスト由来線維芽細胞は活性化したものと未活性のものとの混在だが、経気道移入を用いて移入した細胞を単離すると、それらの多くは同時期に活性化を受けた活性化線維芽細胞であると想定される。それらの細胞を解析することで、活性化の特徴や遺伝子発現変化を高いSN比で検出できることが示唆される。遺伝子操作した細胞や遺伝子改変マウスから単離した細胞も移入可能であり、経気道移入は常在性線維芽細胞活性化の分子機構及び治療標的を探索する有用なツールになると考えられる。

Col-GFPの発現、線維芽細胞巣の形成及び活性化形態を指標にすると、常在性線維芽細胞の活性化能が最も高かったが、その他の平滑筋細胞や血管周囲細胞、上皮細胞も一部の細胞がホストマウスに生着していた。平滑筋細胞と血

管周囲細胞は創傷部位の内部に生着していたが、クラスター形成や細胞の肥大化が見られなかった事から、活性化線維芽細胞には分化せず、異所的な生着が生じたと考えられる。経気道移入により傷害を起こした肺に上皮細胞が移植可能なことは過去にも報告されている[136-138]。移入した上皮細胞は、立方体状の2型肺胞上皮細胞もしくは扁平状の1型上皮細胞様の形態と局在をしていた。一部ではこれら2種の細胞がクラスターを形成していた事から、過去に報告されているように2型肺胞上皮細胞が増殖し、1型肺胞上皮細胞に分化した可能性が考えられる[53,73,139]。一方で、EMTによって間質に移動している様子は見られなかったことから、最近の系譜追跡の報告と同様に活性化線維芽細胞への分化は起こらなかったと考えられる[53]。

NG2-DsRed 陽性血管周囲細胞を経気道移入しても、Col-GFP 陽性細胞は検出されなかった。Hung らは Foxd1-Cre で標識される血管周囲細胞が、線維化誘導に伴って Col-GFP 陰性から陽性に変化し、筋線維芽細胞に分化すると報告した[42]。Hung らの報告における問題点は、Foxd1-Cre で標識される細胞の *in vivo* における特徴付けをすべて免疫組織化学で行っている点であり、定量性等に疑問が生じる[42]。また、Foxd1 は平滑筋細胞も含めた多くの間葉系細胞を標識することが報告されており[140,141]、Hung らの報告において筋線維芽細胞と平滑筋細胞が混同されている可能性も考えられる[42]。一方で NG2-DsRed



は、血管周囲細胞マーカーの一つである PDGFR $\beta$ 陽性細胞の一部しか標識していなかったため、NG2-DsRed 陰性 PDGFR $\beta$ 陽性の血管周囲細胞が活性化線維芽細胞の前駆体である可能性は排除できない。この仮説は Rock らによる、NG2-CreER で標識された血管周囲細胞が筋線維芽細胞の主要な起源ではないとする報告も説明可能である[53]。血管周囲細胞内でこれらのマーカー発現による機能的な違いがあるのかどうか検討する必要がある。

一部の血管周囲細胞には多分化能があり、間葉系幹細胞としての機能を持つとの報告がある[60,63]。骨髄における一部の間葉系細胞や[142,143]、各組織における一部の血管周辺細胞(perivascular cell)においても[144]、in vitro での多分化能があることが報告されているが、in vivo における多分化能やそれらの細胞の機能にはまだ不明な点が多い。本研究では単離した血管周囲細胞を直接的に肺胞腔に移入した。Duffield らのグループは、血管周囲細胞が傷害を感知して血管を離れ、筋線維芽細胞様に分化することを提唱しているが[145]、血管周囲細胞が活性化線維芽細胞に分化するためにはまず血管周囲微小環境での教育が必要である可能性も考えられる。また、本研究は Col-GFP の発現を指標に活性化線維芽細胞への分化能を調べているが、Col-GFP の発現無しで血管周囲細胞が線維化に貢献しているかどうかは本研究に用いたツールでは調べられない。in vivo においてどのような時に血管周囲細胞等が持つ多分化能が役割を果

たすのか今後の検討が望まれる。

経気道移入した細胞の解析により、常在性線維芽細胞の顕著な活性化は移入後 2 日から 4 日目の間に生じることが明らかになった。この時に移入した常在性線維芽細胞は増殖応答を示し、細胞の大きさや細胞内小器官の複雑性を増大させた。細胞の肥大化と小胞体の発達は第三章で行った内因性線維芽細胞の解析でも見られ、過去に電子顕微鏡を用いた肺傷害モデルの解析でも報告されている[21]。一方で移入後 4 日から 7 日目の間には増殖応答は見られず、細胞の大きさは減少傾向にあったが、活性化マーカー遺伝子は高発現を保っていた。移入後 4 日目にかけては、細胞が傷害部位へ移動してクラスターを形成している時期であると考えられ、増殖及び肥大することで創傷部位を形成していると考えられる。創傷部位を形成した後に線維芽細胞は筋線維芽細胞に分化して収縮することが知られており[22]、移入した細胞が 4 日から 7 日にかけて細胞の大きさを減弱したのは収縮によるものと予想することができる。これらのことは、線維芽細胞の活性化において増殖応答を伴うのは活性化初期のごく一時期であり、線維芽細胞巣を形成した後は増殖せず、収縮や細胞外マトリックス産生等の機能に特化する可能性が示唆される。通常の創傷治癒では、再上皮化が完了した創傷部位の筋線維芽細胞はアポトーシスを起こすことが報告されている[23]。IPF における蜂巢肺の領域は筋線維芽細胞がアポトーシスを起こし

た後の線維化終末像であると考えられているが[86,146]、線維芽細胞巢から蜂巢肺への病態変化は証明されていない。経気道移入法を用いて線維芽細胞巢形成機構やその後の運命を解析することで、これらの病理像が生じる原因について明らかにできる可能性がある。

## 第五章 総括と展望

本研究において私は、肺線維症において細胞外マトリックスを産生するエフェクター細胞である線維芽細胞の動態と系譜を解析した。まず I 型コラーゲンと NG2 の蛍光レポーターマウスを組み合わせ、常在性線維芽細胞、血管周囲細胞、平滑筋細胞の同定方法を記述した。次に、Col-GFP マウスにおいてブレオマイシン誘導性肺線維症を起こし、Col-GFP 陽性細胞が I 型コラーゲンの沈着する創傷部位を形成することを示した。Col-GFP 陽性細胞は線維化関連遺伝子を高発現していたが、全肺における Col-GFP 陽性細胞の増加は見られなかった。並体結合の実験により、Col-GFP 陽性細胞は循環血からは供給されないことを示した。さらに活性化線維芽細胞の細胞起源を探索するため、経気道移入法を確立し、常在性線維芽細胞のみが活性化形態や線維芽細胞巣の形成を示すことを明らかにした。これらの結果から、肺線維症における活性化線維芽細胞の主要な細胞起源は常在性線維芽細胞であることを結論づけた。

線維症疾患は克服すべき課題として社会の関心を集めており、その中でも線維化のエフェクター細胞である活性化線維芽細胞は治療標的として多くの研究グループが扱っている。本研究は活性化線維芽細胞の動態に関して新しい知見をもたらすだけでなく、議論が続いていた活性化線維芽細胞の細胞起源につ

いて、新しい手法を用いて常在性線維芽細胞が主要な起源であることを証明した。本研究で明らかになった細胞起源を基盤に、活性化線維芽細胞が生じる分子機構を明らかにできれば、過剰な細胞外マトリックスの沈着を抑制する治療薬の開発に繋がる可能性がある。また、常在性線維芽細胞の活性化をもたらす因子を特定できれば、IPFにおいて慢性的な線維化を生じさせる原因を明らかにできる可能性がある。

一方で、肺が線維化するメカニズムについて、今後明らかにしなくてはいけないことは数多く存在する。一つは可逆性・不可逆性の境界である。一般に一度傷害を受けて瘢痕を形成した組織は、完全に傷害前の状態に戻るわけではなく、多少機能の劣った組織となる[147]。肺に傷害が起こった際に、組織修復がどのように起こるのか、一度傷害された肺胞が元の状態に戻る可能性があるかどうかは不明である。IPFにおいて線維化が生じる最前線として線維芽細胞巣が形成すると考えられているが、線維芽細胞巣が形成する病態生理学的な意義や、可逆性・不可逆性を明らかにすることで、IPFの治療に対する新たなアプローチが見つけられるかもしれない。

また、最も重要な事はIPFの根源的な原因を突き止めることである。家族性肺線維症の情報を元に、慢性的な上皮傷害の仮説が立てられているが、最終的な答えには至っていない。この問題を解決するためには、IPF患者のサン

ルを用いることが必要不可欠であり、新しい技術によるパラダイムシフトが期待される。例として、次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析を IPF 患者に対して行うことで、単一遺伝子ではない複合的な遺伝的要因を明らかにできる可能性がある。また、IPF 患者の細胞から iPS 細胞を作製し、肺胞上皮細胞や線維芽細胞に分化誘導することで、それぞれの細胞の病態生理学的な特徴を明らかにできるかもしれない。さらには、遺伝子操作した肺胞上皮細胞等を患者に移植する再生医療を展開できる可能性もある。

## 引用文献

1. Kramann, R., DiRocco, D.P. & Humphreys, B.D. Understanding the origin, activation and regulation of matrix-producing myofibroblasts for treatment of fibrotic disease. *J Pathol* **231**, 273-289 (2013).
2. Davidson, A. & Diamond, B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med* **345**, 340-350 (2001).
3. Cox, T.R. & Erler, J.T. Remodeling and homeostasis of the extracellular matrix: implications for fibrotic diseases and cancer. *Dis Model Mech* **4**, 165-178 (2011).
4. Mehal, W.Z., Iredale, J. & Friedman, S.L. Scraping fibrosis: Expressway to the core of fibrosis. *Nature Medicine* **17**, 552-553 (2011).
5. Noble, P.W., Barkauskas, C.E. & Jiang, D. Pulmonary fibrosis: patterns and perpetrators. *Journal of Clinical Investigation* **122**, 2756-2762 (2012).
6. King, T.E., Jr., Pardo, A. & Selman, M. Idiopathic pulmonary fibrosis. *Lancet* **378**, 1949-1961 (2011).
7. Thomas, A.Q., Lane, K., Phillips, J., 3rd, Prince, M., Markin, C., Speer, M., Schwartz, D.A., Gaddipati, R., Marney, A., Johnson, J., Roberts, R., Haines, J., Stahlman, M. & Loyd, J.E. Heterozygosity for a surfactant protein C gene mutation associated with usual interstitial pneumonitis and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred. *Am J Respir Crit Care Med* **165**, 1322-1328 (2002).
8. Wang, Y., Kuan, P.J., Xing, C., Cronkhite, J.T., Torres, F., Rosenblatt, R.L., DiMaio, J.M., Kinch, L.N., Grishin, N.V. & Garcia, C.K. Genetic defects in surfactant protein A2 are associated with pulmonary fibrosis and lung cancer. *Am J Hum Genet* **84**, 52-59 (2009).
9. Armanios, M.Y., Chen, J.J., Cogan, J.D., Alder, J.K., Ingersoll, R.G., Markin, C., Lawson, W.E., Xie, M., Vulto, I., Phillips, J.A., 3rd, Lansdorp, P.M., Greider, C.W. & Loyd, J.E. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* **356**, 1317-1326 (2007).
10. Alder, J.K., Chen, J.J., Lancaster, L., Danoff, S., Su, S.C., Cogan, J.D., Vulto, I., Xie, M., Qi, X., Tudor, R.M., Phillips, J.A., 3rd, Lansdorp, P.M., Loyd, J.E. & Armanios, M.Y. Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 13051-13056 (2008).
11. Seibold, M.A., Wise, A.L., Speer, M.C., Steele, M.P., Brown, K.K., Loyd, J.E., Fingerlin, T.E., Zhang, W., Gudmundsson, G., Groshong, S.D., Evans, C.M., Garantziotis, S., Adler, K.B., Dickey, B.F., du Bois, R.M., Yang, I.V., Herron, A., Kervitsky, D., Talbert, J.L., Markin, C., Park, J., Crews, A.L., Slifer, S.H., Auerbach, S., Roy, M.G., Lin, J., Hennessy, C.E., Schwarz, M.I. & Schwartz, D.A. A common

- MUC5B promoter polymorphism and pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* **364**, 1503-1512 (2011).
12. Lawson, W.E., Cheng, D.S., Degryse, A.L., Tanjore, H., Polosukhin, V.V., Xu, X.C., Newcomb, D.C., Jones, B.R., Roldan, J., Lane, K.B., Morrissey, E.E., Beers, M.F., Yull, F.E. & Blackwell, T.S. Endoplasmic reticulum stress enhances fibrotic remodeling in the lungs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 10562-10567 (2011).
  13. Iyer, S.N., Wild, J.S., Schiedt, M.J., Hyde, D.M., Margolin, S.B. & Giri, S.N. Dietary intake of pirfenidone ameliorates bleomycin-induced lung fibrosis in hamsters. *J Lab Clin Med* **125**, 779-785 (1995).
  14. Richeldi, L., du Bois, R.M., Raghu, G., Azuma, A., Brown, K.K., Costabel, U., Cottin, V., Flaherty, K.R., Hansell, D.M., Inoue, Y., Kim, D.S., Kolb, M., Nicholson, A.G., Noble, P.W., Selman, M., Taniguchi, H., Brun, M., Le Maulf, F., Girard, M., Stowasser, S., Schlenker-Herceg, R., Disse, B. & Collard, H.R. Efficacy and safety of nintedanib in idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* **370**, 2071-2082 (2014).
  15. Orens, J.B. & Garrity, E.R., Jr. General overview of lung transplantation and review of organ allocation. *Proc Am Thorac Soc* **6**, 13-19 (2009).
  16. Katzenstein, A.L. & Myers, J.L. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med* **157**, 1301-1315 (1998).
  17. Brody, A.R., Soler, P., Basset, F., Haschek, W.M. & Witschi, H. Epithelial-mesenchymal associations of cells in human pulmonary fibrosis and in BHT-oxygen-induced fibrosis in mice. *Exp Lung Res* **2**, 207-220 (1981).
  18. Kuhn, C., 3rd, Boldt, J., King, T.E., Jr., Crouch, E., Vartio, T. & McDonald, J.A. An immunohistochemical study of architectural remodeling and connective tissue synthesis in pulmonary fibrosis. *Am Rev Respir Dis* **140**, 1693-1703 (1989).
  19. Kuhn, C. & McDonald, J.A. The roles of the myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis. Ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis. *Am J Pathol* **138**, 1257-1265 (1991).
  20. Noble, P.W. Back to the Future: Historical Perspective on the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **33**, 113-120 (2005).
  21. Fukuda, Y., Ferrans, V.J., Schoenberger, C.I., Rennard, S.I. & Crystal, R.G. Patterns of pulmonary structural remodeling after experimental paraquat toxicity. The morphogenesis of intraalveolar fibrosis. *Am J Pathol* **118**, 452-475 (1985).
  22. Tomasek, J.J., Gabbiani, G., Hinz, B., Chaponnier, C. & Brown, R.A. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **3**, 349-363 (2002).
  23. Desmouliere, A., Redard, M., Darby, I. & Gabbiani, G. Apoptosis mediates the



- decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* **146**, 56-66 (1995).
24. Hinz, B., Phan, S.H., Thannickal, V.J., Galli, A., Bochaton-Piallat, M.-L. & Gabbiani, G. The Myofibroblast. *The American Journal of Pathology* **170**, 1807-1816 (2007).
  25. Hinz, B., Phan, S.H., Thannickal, V.J., Prunotto, M., Desmouliere, A., Varga, J., De Wever, O., Mareel, M. & Gabbiani, G. Recent developments in myofibroblast biology: paradigms for connective tissue remodeling. *Am J Pathol* **180**, 1340-1355 (2012).
  26. Hinz, B. Masters and servants of the force: the role of matrix adhesions in myofibroblast force perception and transmission. *Eur J Cell Biol* **85**, 175-181 (2006).
  27. Desmouliere, A., Geinoz, A., Gabbiani, F. & Gabbiani, G. Transforming growth factor-beta 1 induces alpha-smooth muscle actin expression in granulation tissue myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J Cell Biol* **122**, 103-111 (1993).
  28. Hoyles, R.K., Derrett-Smith, E.C., Khan, K., Shiwen, X., Howat, S.L., Wells, A.U., Abraham, D.J. & Denton, C.P. An Essential Role for Resident Fibroblasts in Experimental Lung Fibrosis Is Defined by Lineage-Specific Deletion of High-Affinity Type II Transforming Growth Factor Receptor. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **183**, 249-261 (2010).
  29. Munger, J.S., Huang, X., Kawakatsu, H., Griffiths, M.J., Dalton, S.L., Wu, J., Pittet, J.F., Kaminski, N., Garat, C., Matthay, M.A., Rifkin, D.B. & Sheppard, D. The integrin alpha v beta 6 binds and activates latent TGF beta 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* **96**, 319-328 (1999).
  30. Sheppard, D. Epithelial-mesenchymal interactions in fibrosis and repair. Transforming growth factor-beta activation by epithelial cells and fibroblasts. *Ann Am Thorac Soc* **12 Suppl 1**, S21-23 (2015).
  31. Shi, M., Zhu, J., Wang, R., Chen, X., Mi, L., Walz, T. & Springer, T.A. Latent TGF-beta structure and activation. *Nature* **474**, 343-349 (2011).
  32. Selman, M., Pardo, A. & Kaminski, N. Idiopathic pulmonary fibrosis: aberrant recapitulation of developmental programs? *PLoS Med* **5**, e62 (2008).
  33. Chilosì, M., Poletti, V., Zamo, A., Lestani, M., Montagna, L., Piccoli, P., Pedron, S., Bertaso, M., Scarpa, A., Murer, B., Cancellieri, A., Maestro, R., Semenzato, G. & Doglioni, C. Aberrant Wnt/beta-catenin pathway activation in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* **162**, 1495-1502 (2003).
  34. Coon, D.R., Roberts, D.J., Loscertales, M. & Kradin, R. Differential epithelial expression of SHH and FOXF1 in usual and nonspecific interstitial pneumonia. *Exp*

- Mol Pathol* **80**, 119-123 (2006).
35. Weaver, M., Batts, L. & Hogan, B.L. Tissue interactions pattern the mesenchyme of the embryonic mouse lung. *Dev Biol* **258**, 169-184 (2003).
  36. Bolanos, A.L., Milla, C.M., Lira, J.C., Ramirez, R., Checa, M., Barrera, L., Garcia-Alvarez, J., Carbajal, V., Becerril, C., Gaxiola, M., Pardo, A. & Selman, M. Role of Sonic Hedgehog in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **303**, L978-990 (2012).
  37. Bucala, R., Spiegel, L.A., Chesney, J., Hogan, M. & Cerami, A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med* **1**, 71-81 (1994).
  38. Kim, K.K. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 13180-13185 (2006).
  39. Chapman, H.A. Epithelial-Mesenchymal Interactions in Pulmonary Fibrosis. *Annual Review of Physiology* **73**, 413-435 (2011).
  40. Lin, S.-L., Kisseleva, T., Brenner, D.A. & Duffield, J.S. Pericytes and Perivascular Fibroblasts Are the Primary Source of Collagen-Producing Cells in Obstructive Fibrosis of the Kidney. *The American Journal of Pathology* **173**, 1617-1627 (2008).
  41. Humphreys, B.D., Lin, S.-L., Kobayashi, A., Hudson, T.E., Nowlin, B.T., Bonventre, J.V., Valerius, M.T., McMahon, A.P. & Duffield, J.S. Fate Tracing Reveals the Pericyte and Not Epithelial Origin of Myofibroblasts in Kidney Fibrosis. *The American Journal of Pathology* **176**, 85-97 (2010).
  42. Hung, C., Linn, G., Chow, Y.H., Kobayashi, A., Mittelsteadt, K., Altemeier, W.A., Gharib, S.A., Schnapp, L.M. & Duffield, J.S. Role of lung pericytes and resident fibroblasts in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **188**, 820-830 (2013).
  43. Mori, L., Bellini, A., Stacey, M.A., Schmidt, M. & Mattoli, S. Fibrocytes contribute to the myofibroblast population in wounded skin and originate from the bone marrow. *Exp Cell Res* **304**, 81-90 (2005).
  44. Galligan, C.L. & Fish, E.N. The role of circulating fibrocytes in inflammation and autoimmunity. *J Leukoc Biol* **93**, 45-50 (2013).
  45. Phillips, R.J., Burdick, M.D., Hong, K., Lutz, M.A., Murray, L.A., Xue, Y.Y., Belperio, J.A., Keane, M.P. & Strieter, R.M. Circulating fibrocytes traffic to the lungs in response to CXCL12 and mediate fibrosis. *J Clin Invest* **114**, 438-446 (2004).
  46. Boban, I., Barisic-Dujmovic, T. & Clark, S.H. Parabiosis and transplantation models show no evidence of circulating dermal fibroblast progenitors in bleomycin-induced

- skin fibrosis. *J Cell Physiol* **214**, 230-237 (2008).
47. Higashiyama, R., Moro, T., Nakao, S., Mikami, K., Fukumitsu, H., Ueda, Y., Ikeda, K., Adachi, E., Bou-Gharios, G., Okazaki, I. & Inagaki, Y. Negligible Contribution of Bone Marrow-Derived Cells to Collagen Production During Hepatic Fibrogenesis in Mice. *Gastroenterology* **137**, 1459-1466.e1451 (2009).
  48. Kleaveland, K.R., Velikoff, M., Yang, J., Agarwal, M., Rippe, R.A., Moore, B.B. & Kim, K.K. Fibrocytes are not an essential source of type I collagen during lung fibrosis. *J Immunol* **193**, 5229-5239 (2014).
  49. Kalluri, R. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *Journal of Clinical Investigation* **112**, 1776-1784 (2003).
  50. Kim, K.K., Kugler, M.C., Wolters, P.J., Robillard, L., Galvez, M.G., Brumwell, A.N., Sheppard, D. & Chapman, H.A. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13180-13185 (2006).
  51. Kasai, H., Allen, J.T., Mason, R.M., Kamimura, T. & Zhang, Z. TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir Res* **6**, 56 (2005).
  52. Kim, K.K., Wei, Y., Szekeres, C., Kugler, M.C., Wolters, P.J., Hill, M.L., Frank, J.A., Brumwell, A.N., Wheeler, S.E., Kreidberg, J.A. & Chapman, H.A. Epithelial cell alpha3beta1 integrin links beta-catenin and Smad signaling to promote myofibroblast formation and pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* **119**, 213-224 (2009).
  53. Rock, J.R., Barkauskas, C.E., Counce, M.J., Xue, Y., Harris, J.R., Liang, J., Noble, P.W. & Hogan, B.L.M. PNAS Plus: Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, E1475-E1483 (2011).
  54. Kriz, W., Kaissling, B. & Le Hir, M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in kidney fibrosis: fact or fantasy? *Journal of Clinical Investigation* **121**, 468-474 (2011).
  55. Taura, K., Miura, K., Iwaisako, K., Osterreicher, C.H., Kodama, Y., Penz-Osterreicher, M. & Brenner, D.A. Hepatocytes do not undergo epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis in mice. *Hepatology* **51**, 1027-1036 (2010).
  56. Chu, A.S., Diaz, R., Hui, J.J., Yanger, K., Zong, Y., Alpini, G., Stanger, B.Z. & Wells, R.G. Lineage tracing demonstrates no evidence of cholangiocyte epithelial-to-mesenchymal transition in murine models of hepatic fibrosis. *Hepatology* **53**, 1685-1695 (2011).
  57. Grande, M.T., Sanchez-Laorden, B., Lopez-Blau, C., De Frutos, C.A., Boutet, A., Arevalo, M., Rowe, R.G., Weiss, S.J., Lopez-Novoa, J.M. & Nieto, M.A. Snail1-

- induced partial epithelial-to-mesenchymal transition drives renal fibrosis in mice and can be targeted to reverse established disease. *Nat Med* **21**, 989-997 (2015).
58. Lovisa, S., LeBleu, V.S., Tampe, B., Sugimoto, H., Vадnagara, K., Carstens, J.L., Wu, C.C., Hagos, Y., Burckhardt, B.C., Pentcheva-Hoang, T., Nischal, H., Allison, J.P., Zeisberg, M. & Kalluri, R. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis. *Nat Med* **21**, 998-1009 (2015).
  59. Armulik, A., Genové, G. & Betsholtz, C. Pericytes: Developmental, Physiological, and Pathological Perspectives, Problems, and Promises. *Developmental Cell* **21**, 193-215 (2011).
  60. Diaz-Flores, L., Gutierrez, R., Madrid, J.F., Varela, H., Valladares, F., Acosta, E., Martin-Vasallo, P. & Diaz-Flores, L., Jr. Pericytes. Morphofunction, interactions and pathology in a quiescent and activated mesenchymal cell niche. *Histol Histopathol* **24**, 909-969 (2009).
  61. Goritz, C., Dias, D.O., Tomilin, N., Barbacid, M., Shupliakov, O. & Frisen, J. A Pericyte Origin of Spinal Cord Scar Tissue. *Science* **333**, 238-242 (2011).
  62. Dulauroy, S., Di Carlo, S.E., Langa, F., Eberl, G. & Peduto, L. Lineage tracing and genetic ablation of ADAM12(+) perivascular cells identify a major source of profibrotic cells during acute tissue injury. *Nat Med* **18**(2012).
  63. Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C.W., Corselli, M., Park, T.S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., Norotte, C., Teng, P.N., Traas, J., Schugar, R., Deasy, B.M., Badylak, S., Buhring, H.J., Jacobino, J.P., Lazzari, L., Huard, J. & Peault, B. A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* **3**, 301-313 (2008).
  64. LeBleu, V.S., Taduri, G., O'Connell, J., Teng, Y., Cooke, V.G., Woda, C., Sugimoto, H. & Kalluri, R. Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med* **19**, 1047-1053 (2013).
  65. Soderblom, C., Luo, X., Blumenthal, E., Bray, E., Lyapichev, K., Ramos, J., Krishnan, V., Lai-Hsu, C., Park, K.K., Tsoulfas, P. & Lee, J.K. Perivascular fibroblasts form the fibrotic scar after contusive spinal cord injury. *J Neurosci* **33**, 13882-13887 (2013).
  66. Pellicoro, A., Ramachandran, P., Iredale, J.P. & Fallowfield, J.A. Liver fibrosis and repair: immune regulation of wound healing in a solid organ. *Nat Rev Immunol* **14**, 181-194 (2014).
  67. Mederacke, I., Hsu, C.C., Troeger, J.S., Huebener, P., Mu, X., Dapito, D.H., Pradere, J.P. & Schwabe, R.F. Fate tracing reveals hepatic stellate cells as dominant contributors to liver fibrosis independent of its aetiology. *Nat Commun* **4**, 2823

- (2013).
68. Sato, M., Suzuki, S. & Senoo, H. Hepatic stellate cells: unique characteristics in cell biology and phenotype. *Cell Struct Funct* **28**, 105-112 (2003).
  69. Friedman, S.L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver. *Physiol Rev* **88**, 125-172 (2008).
  70. Iwaisako, K., Jiang, C., Zhang, M., Cong, M., Moore-Morris, T.J., Park, T.J., Liu, X., Xu, J., Wang, P., Paik, Y.H., Meng, F., Asagiri, M., Murray, L.A., Hofmann, A.F., Iida, T., Glass, C.K., Brenner, D.A. & Kisseleva, T. Origin of myofibroblasts in the fibrotic liver in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, E3297-3305 (2014).
  71. Hogan, B.L., Barkauskas, C.E., Chapman, H.A., Epstein, J.A., Jain, R., Hsia, C.C., Niklason, L., Calle, E., Le, A., Randell, S.H., Rock, J., Snitow, M., Krummel, M., Stripp, B.R., Vu, T., White, E.S., Whitsett, J.A. & Morrissey, E.E. Repair and regeneration of the respiratory system: complexity, plasticity, and mechanisms of lung stem cell function. *Cell Stem Cell* **15**, 123-138 (2014).
  72. Herzog, E.L., Brody, A.R., Colby, T.V., Mason, R. & Williams, M.C. Knowns and Unknowns of the Alveolus. *Proceedings of the American Thoracic Society* **5**, 778-782 (2008).
  73. Barkauskas, C.E., Crouce, M.J., Rackley, C.R., Bowie, E.J., Keene, D.R., Stripp, B.R., Randell, S.H., Noble, P.W. & Hogan, B.L. Type 2 alveolar cells are stem cells in adult lung. *J Clin Invest* **123**, 3025-3036 (2013).
  74. Sirianni, F.E., Chu, F.S. & Walker, D.C. Human alveolar wall fibroblasts directly link epithelial type 2 cells to capillary endothelium. *Am J Respir Crit Care Med* **168**, 1532-1537 (2003).
  75. McGowan, S.E. & Torday, J.S. The pulmonary lipofibroblast (lipid interstitial cell) and its contributions to alveolar development. *Annu Rev Physiol* **59**, 43-62 (1997).
  76. Ahlbrecht, K. & McGowan, S.E. In search of the elusive lipofibroblast in human lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **307**, L605-608 (2014).
  77. Tahedl, D., Wirkes, A., Tschanz, S.A., Ochs, M. & Muhlfield, C. How common is the lipid body-containing interstitial cell in the mammalian lung? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **307**, L386-394 (2014).
  78. Zhang, H.Y., Gharaee-Kermani, M., Zhang, K., Karmioli, S. & Phan, S.H. Lung fibroblast alpha-smooth muscle actin expression and contractile phenotype in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* **148**, 527-537 (1996).
  79. Barkauskas, C.E. & Noble, P.W. Cellular mechanisms of tissue fibrosis. 7. New insights into the cellular mechanisms of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Cell Physiol* **306**, C987-996 (2014).
  80. Mouratis, M.A. & Aidinis, V. Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin. *Current*

- Opinion in Pulmonary Medicine* **17**, 355-361 (2011).
81. Moore, B.B. & Hogaboam, C.M. Murine models of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **294**, L152-160 (2008).
  82. Moeller, A., Ask, K., Warburton, D., Gauldie, J. & Kolb, M. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? *Int J Biochem Cell Biol* **40**, 362-382 (2008).
  83. Wallach-Dayana, S.B., Izbicki, G., Cohen, P.Y., Gerstl-Golan, R., Fine, A. & Breuer, R. Bleomycin initiates apoptosis of lung epithelial cells by ROS but not by Fas/FasL pathway. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **290**, L790-L796 (2006).
  84. Szapiel, S.V., Elson, N.A., Fulmer, J.D., Hunninghake, G.W. & Crystal, R.G. Bleomycin-induced interstitial pulmonary disease in the nude, athymic mouse. *Am Rev Respir Dis* **120**, 893-899 (1979).
  85. Helene, M., Lake-Bullock, V., Zhu, J., Hao, H., Cohen, D.A. & Kaplan, A.M. T cell independence of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J Leukoc Biol* **65**, 187-195 (1999).
  86. Wolters, P.J., Collard, H.R. & Jones, K.D. Pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis. *Annu Rev Pathol* **9**, 157-179 (2014).
  87. Cabrera, S., Selman, M., Lonzano-Bolanos, A., Konishi, K., Richards, T.J., Kaminski, N. & Pardo, A. Gene expression profiles reveal molecular mechanisms involved in the progression and resolution of bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **304**, L593-601 (2013).
  88. Chung, M.P., Monick, M.M., Hamzeh, N.Y., Butler, N.S., Powers, L.S. & Hunninghake, G.W. Role of repeated lung injury and genetic background in bleomycin-induced fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **29**, 375-380 (2003).
  89. Scotton, C.J., Hayes, B., Alexander, R., Datta, A., Forty, E.J., Mercer, P.F., Blanchard, A. & Chambers, R.C. Ex vivo micro-computed tomography analysis of bleomycin-induced lung fibrosis for preclinical drug evaluation. *Eur Respir J* **42**, 1633-1645 (2013).
  90. Limjunyawong, N., Mitzner, W. & Horton, M.R. A mouse model of chronic idiopathic pulmonary fibrosis. *Physiol Rep* **2**, e00249 (2014).
  91. du Bois, R.M. Strategies for treating idiopathic pulmonary fibrosis. *Nature Reviews Drug Discovery* **9**, 129-140 (2010).
  92. Ahluwalia, N., Shea, B.S. & Tager, A.M. New therapeutic targets in idiopathic pulmonary fibrosis. Aiming to rein in runaway wound-healing responses. *Am J Respir Crit Care Med* **190**, 867-878 (2014).
  93. Tomura, M., Mori, Y.S., Watanabe, R., Tanaka, M., Miyawaki, A. & Kanagawa, O. Time-lapse observation of cellular function with fluorescent probe reveals novel

- CTL-target cell interactions. *Int Immunol* **21**, 1145-1150 (2009).
94. Tomura, M., Sakaue-Sawano, A., Mori, Y., Takase-Utsugi, M., Hata, A., Ohtawa, K., Kanagawa, O. & Miyawaki, A. Contrasting quiescent G0 phase with mitotic cell cycling in the mouse immune system. *PLoS ONE* **8**, e73801 (2013).
  95. Sakaue-Sawano, A., Hoshida, T., Yo, M., Takahashi, R., Ohtawa, K., Arai, T., Takahashi, E., Noda, S., Miyoshi, H. & Miyawaki, A. Visualizing developmentally programmed endoreplication in mammals using ubiquitin oscillators. *Development* **140**, 4624-4632 (2013).
  96. Foster, W.M., Walters, D.M., Longphre, M., Macri, K. & Miller, L.M. Methodology for the measurement of mucociliary function in the mouse by scintigraphy. *J Appl Physiol* **90**, 1111-1117 (2001).
  97. Donskoy, E. & Goldschneider, I. Thymocytopoiesis is maintained by blood-borne precursors throughout postnatal life. A study in parabiotic mice. *J Immunol* **148**, 1604-1612 (1992).
  98. Huang, D.W., Sherman, B.T. & Lempicki, R.A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols* **4**, 44-57 (2008).
  99. Tsukui, T., Ueha, S., Abe, J., Hashimoto, S., Shichino, S., Shimaoka, T., Shand, F.H., Arakawa, Y., Oshima, K., Hattori, M., Inagaki, Y., Tomura, M. & Matsushima, K. Qualitative rather than quantitative changes are hallmarks of fibroblasts in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* **183**, 758-773 (2013).
  100. Tsukui, T., Ueha, S., Shichino, S., Inagaki, Y. & Matsushima, K. Intratracheal Cell Transfer Demonstrates the Profibrotic Potential of Resident Fibroblasts in Pulmonary Fibrosis. *Am J Pathol* **185**, 2939-2948 (2015).
  101. Raghu, G., Masta, S., Meyers, D. & Narayanan, A.S. Collagen synthesis by normal and fibrotic human lung fibroblasts and the effect of transforming growth factor-beta. *Am Rev Respir Dis* **140**, 95-100 (1989).
  102. Bou-Gharios, G., Garrett, L.A., Rossert, J., Niederreither, K., Eberspaecher, H., Smith, C., Black, C. & Crombrughe, B. A potent far-upstream enhancer in the mouse pro alpha 2(I) collagen gene regulates expression of reporter genes in transgenic mice. *J Cell Biol* **134**, 1333-1344 (1996).
  103. De Val, S., Ponticos, M., Antoniv, T.T., Wells, D.J., Abraham, D., Partridge, T. & Bou-Gharios, G. Identification of the key regions within the mouse pro-alpha 2(I) collagen gene far-upstream enhancer. *J Biol Chem* **277**, 9286-9292 (2002).
  104. Middleton, J., Americh, L., Gayon, R., Julien, D., Mansat, M., Mansat, P., Anract, P., Cantagrel, A., Cattan, P., Reimund, J.M., Aguilar, L., Amalric, F. & Girard, J.P. A comparative study of endothelial cell markers expressed in chronically inflamed

- human tissues: MECA-79, Duffy antigen receptor for chemokines, von Willebrand factor, CD31, CD34, CD105 and CD146. *J Pathol* **206**, 260-268 (2005).
105. Kisseleva, T., Cong, M., Paik, Y., Scholten, D., Jiang, C., Benner, C., Iwaisako, K., Moore-Morris, T., Scott, B., Tsukamoto, H., Evans, S.M., Dillmann, W., Glass, C.K. & Brenner, D.A. From the Cover: Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 9448-9453 (2012).
  106. Henderson, W.R., Jr., Chi, E.Y., Ye, X., Nguyen, C., Tien, Y.T., Zhou, B., Borok, Z., Knight, D.A. & Kahn, M. Inhibition of Wnt/beta-catenin/CREB binding protein (CBP) signaling reverses pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 14309-14314 (2010).
  107. Zhang, K., Rekhter, M.D., Gordon, D. & Phan, S.H. Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol* **145**, 114-125 (1994).
  108. Wynn, T.A. Integrating mechanisms of pulmonary fibrosis. *Journal of Experimental Medicine* **208**, 1339-1350 (2011).
  109. Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., van der Wath, R.C., Blanco-Bose, W., Jaworski, M., Offner, S., Dunant, C.F., Eshkind, L., Bockamp, E., Lio, P., Macdonald, H.R. & Trumpp, A. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* **135**, 1118-1129 (2008).
  110. Pardo, A., Gibson, K., Cisneros, J., Richards, T.J., Yang, Y., Becerril, C., Yousem, S., Herrera, I., Ruiz, V., Selman, M. & Kaminski, N. Up-regulation and profibrotic role of osteopontin in human idiopathic pulmonary fibrosis. *PLoS Med* **2**, e251 (2005).
  111. Kaminski, N., Allard, J.D., Pittet, J.F., Zuo, F., Griffiths, M.J., Morris, D., Huang, X., Sheppard, D. & Heller, R.A. Global analysis of gene expression in pulmonary fibrosis reveals distinct programs regulating lung inflammation and fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 1778-1783 (2000).
  112. Kass, D.J., Yu, G., Loh, K.S., Savir, A., Borczuk, A., Kahloon, R., Juan-Guardela, B., Deiuliis, G., Tedrow, J., Choi, J., Richards, T., Kaminski, N. & Greenberg, S.M. Cytokine-Like Factor 1 Gene Expression Is Enriched in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Drives the Accumulation of CD4+ T Cells in Murine Lungs. *The American Journal of Pathology* **180**, 1963-1978 (2012).
  113. Berman, J.S., Serlin, D., Li, X., Whitley, G., Hayes, J., Rishikof, D.C., Ricupero, D.A., Liaw, L., Goetschkes, M. & O'Regan, A.W. Altered bleomycin-induced lung fibrosis in osteopontin-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **286**, L1311-1318 (2004).



114. Kunz-Schughart, L.A., Wenninger, S., Neumeier, T., Seidl, P. & Knuechel, R. Three-dimensional tissue structure affects sensitivity of fibroblasts to TGF-beta 1. *Am J Physiol Cell Physiol* **284**, C209-219 (2003).
115. Mio, T., Nagai, S., Kitaichi, M., Kawatani, A. & Izumi, T. Proliferative characteristics of fibroblast lines derived from open lung biopsy specimens of patients with IPF (UIP). *Chest* **102**, 832-837 (1992).
116. Moseley, P.L., Hemken, C. & Hunninghake, G.W. Augmentation of fibroblast proliferation by bleomycin. *J Clin Invest* **78**, 1150-1154 (1986).
117. Ramos, C., Montano, M., Garcia-Alvarez, J., Ruiz, V., Uhal, B.D., Selman, M. & Pardo, A. Fibroblasts from idiopathic pulmonary fibrosis and normal lungs differ in growth rate, apoptosis, and tissue inhibitor of metalloproteinases expression. *Am J Respir Cell Mol Biol* **24**, 591-598 (2001).
118. Xia, H., Nho, R., Kleidon, J., Kahm, J. & Henke, C.A. Polymerized Collagen Inhibits Fibroblast Proliferation via a Mechanism Involving the Formation of a  $\beta$ 1 Integrin-Protein Phosphatase 2A-Tuberous Sclerosis Complex 2 Complex That Suppresses S6K1 Activity. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 20350-20360 (2008).
119. Uede, T. Osteopontin, intrinsic tissue regulator of intractable inflammatory diseases. *Pathology International* **61**, 265-280 (2011).
120. Mori, R., Shaw, T.J. & Martin, P. Molecular mechanisms linking wound inflammation and fibrosis: knockdown of osteopontin leads to rapid repair and reduced scarring. *Journal of Experimental Medicine* **205**, 43-51 (2008).
121. Lenga, Y., Koh, A., Perera, A.S., McCulloch, C.A., Sodek, J. & Zohar, R. Osteopontin expression is required for myofibroblast differentiation. *Circ Res* **102**, 319-327 (2008).
122. Takahashi, F., Takahashi, K., Okazaki, T., Maeda, K., Ienaga, H., Maeda, M., Kon, S., Uede, T. & Fukuchi, Y. Role of osteopontin in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **24**, 264-271 (2001).
123. Anwar, A., Li, M., Frid, M.G., Kumar, B., Gerasimovskaya, E.V., Riddle, S.R., McKeon, B.A., Thukaram, R., Meyrick, B.O., Fini, M.A. & Stenmark, K.R. Osteopontin is an endogenous modulator of the constitutively activated phenotype of pulmonary adventitial fibroblasts in hypoxic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **303**, L1-L11 (2012).
124. Vij, R. & Noth, I. Peripheral blood biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis. *Transl Res* **159**, 218-227 (2012).
125. Fukuda, Y., Basset, F., Ferrans, V.J. & Yamanaka, N. Significance of early intra-alveolar fibrotic lesions and integrin expression in lung biopsy specimens from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Pathol* **26**, 53-61 (1995).

126. Brody, A.R. & Craighead, J.E. Interstitial associations of cells lining air spaces in human pulmonary fibrosis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* **372**, 39-49 (1976).
127. Moore, B.B., Kolodsick, J.E., Thannickal, V.J., Cooke, K., Moore, T.A., Hogaboam, C., Wilke, C.A. & Toews, G.B. CCR2-mediated recruitment of fibrocytes to the alveolar space after fibrotic injury. *Am J Pathol* **166**, 675-684 (2005).
128. Moore, B.B., Murray, L., Das, A., Wilke, C.A., Herrygers, A.B. & Toews, G.B. The role of CCL12 in the recruitment of fibrocytes and lung fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **35**, 175-181 (2006).
129. Kelley, J.L., Rozek, M.M., Suenram, C.A. & Schwartz, C.J. Activation of human blood monocytes by adherence to tissue culture plastic surfaces. *Exp Mol Pathol* **46**, 266-278 (1987).
130. Wells, C.M., Walmsley, M., Ooi, S., Tybulewicz, V. & Ridley, A.J. Rac1-deficient macrophages exhibit defects in cell spreading and membrane ruffling but not migration. *J Cell Sci* **117**, 1259-1268 (2004).
131. Gabbiani, G., Ryan, G.B. & Majne, G. Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and their possible role in wound contraction. *Experientia* **27**, 549-550 (1971).
132. Hinz, B., Mastrangelo, D., Iselin, C.E., Chaponnier, C. & Gabbiani, G. Mechanical tension controls granulation tissue contractile activity and myofibroblast differentiation. *Am J Pathol* **159**, 1009-1020 (2001).
133. Suganuma, H., Sato, A., Tamura, R. & Chida, K. Enhanced migration of fibroblasts derived from lungs with fibrotic lesions. *Thorax* **50**, 984-989 (1995).
134. Tager, A.M., LaCamera, P., Shea, B.S., Campanella, G.S., Selman, M., Zhao, Z., Polosukhin, V., Wain, J., Karimi-Shah, B.A., Kim, N.D., Hart, W.K., Pardo, A., Blackwell, T.S., Xu, Y., Chun, J. & Luster, A.D. The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nat Med* **14**, 45-54 (2008).
135. Li, Y., Jiang, D., Liang, J., Meltzer, E.B., Gray, A., Miura, R., Wogensen, L., Yamaguchi, Y. & Noble, P.W. Severe lung fibrosis requires an invasive fibroblast phenotype regulated by hyaluronan and CD44. *J Exp Med* **208**, 1459-1471 (2011).
136. Zuo, W., Zhang, T., Wu, D.Z., Guan, S.P., Liew, A.A., Yamamoto, Y., Wang, X., Lim, S.J., Vincent, M., Lessard, M., Crum, C.P., Xian, W. & McKeon, F. p63(+)/Krt5(+) distal airway stem cells are essential for lung regeneration. *Nature* **517**, 616-620 (2015).
137. Vaughan, A.E., Brumwell, A.N., Xi, Y., Gotts, J.E., Brownfield, D.G., Treutlein, B., Tan, K., Tan, V., Liu, F.C., Looney, M.R., Matthay, M.A., Rock, J.R. & Chapman, H.A. Lineage-negative progenitors mobilize to regenerate lung epithelium after

- major injury. *Nature* **517**, 621-625 (2015).
138. Moodley, Y., Ilancheran, S., Samuel, C., Vaghjiani, V., Atienza, D., Williams, E.D., Jenkin, G., Wallace, E., Trounson, A. & Manuelpillai, U. Human amnion epithelial cell transplantation abrogates lung fibrosis and augments repair. *Am J Respir Crit Care Med* **182**, 643-651 (2010).
  139. Bhaskaran, M., Kolliputi, N., Wang, Y., Gou, D., Chintagari, N.R. & Liu, L. Trans-differentiation of alveolar epithelial type II cells to type I cells involves autocrine signaling by transforming growth factor beta 1 through the Smad pathway. *J Biol Chem* **282**, 3968-3976 (2007).
  140. Levinson, R.S., Batourina, E., Choi, C., Vorontchikhina, M., Kitajewski, J. & Mendelsohn, C.L. Foxd1-dependent signals control cellularity in the renal capsule, a structure required for normal renal development. *Development* **132**, 529-539 (2005).
  141. Hatini, V., Huh, S.O., Herzlinger, D., Soares, V.C. & Lai, E. Essential role of stromal mesenchyme in kidney morphogenesis revealed by targeted disruption of Winged Helix transcription factor BF-2. *Genes Dev* **10**, 1467-1478 (1996).
  142. Omatsu, Y., Seike, M., Sugiyama, T., Kume, T. & Nagasawa, T. Foxc1 is a critical regulator of haematopoietic stem/progenitor cell niche formation. *Nature* **508**, 536-540 (2014).
  143. Morikawa, S., Mabuchi, Y., Kubota, Y., Nagai, Y., Niibe, K., Hiratsu, E., Suzuki, S., Miyauchi-Hara, C., Nagoshi, N., Sunabori, T., Shimmura, S., Miyawaki, A., Nakagawa, T., Suda, T., Okano, H. & Matsuzaki, Y. Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *Journal of Experimental Medicine* **206**, 2483-2496 (2009).
  144. Kramann, R., Schneider, R.K., DiRocco, D.P., Machado, F., Fleig, S., Bondzie, P.A., Henderson, J.M., Ebert, B.L. & Humphreys, B.D. Perivascular Gli1+ progenitors are key contributors to injury-induced organ fibrosis. *Cell Stem Cell* **16**, 51-66 (2015).
  145. Duffield, J.S., Lupper, M., Thannickal, V.J. & Wynn, T.A. Host responses in tissue repair and fibrosis. *Annu Rev Pathol* **8**, 241-276 (2013).
  146. Smith, M., Dalurzo, M., Panse, P., Parish, J. & Leslie, K. Usual interstitial pneumonia-pattern fibrosis in surgical lung biopsies. Clinical, radiological and histopathological clues to aetiology. *J Clin Pathol* **66**, 896-903 (2013).
  147. Gurtner, G.C., Werner, S., Barrandon, Y. & Longaker, M.T. Wound repair and regeneration. *Nature* **453**, 314-321 (2008).

## 謝辞

本研究の遂行にあたり、終始温かい励ましをもって手厚いご指導を頂いた東京大学大学院医学系研究科分子予防医学教室 松島綱治教授に心からの敬意を表し、深い感謝を申し上げたいと思います。

また、研究の遂行にあたって常に協力的にご指導いただいた同教室の構成員の皆様に深く感謝を申し上げたいと思います。上羽悟史講師には、実験を遂行するためのご指導や、研究を進めるために不可欠な議論に、常に快く応じてくださいました。阿部淳助教（現ベルン大学）は免疫組織化学の基礎をご指導頂くと同時に、論文構成や実験手技に関して温かいご助言を下さりました。倉知慎助教（現ペンシルベニア大学）は、私が修士1年で分子予防医学教室に参加した際にご指導いただき、実験計画の作製法やフローサイトメトリーに関してご指導を頂きました。橋本真一特任准教授（現金沢大学）は網羅的遺伝子発現解析に際してご指導して頂きました。七野成之大学院生は同じ線維症チームとして研究に関する議論に応じてくださったり、時に実験や解析の補助を担当してくださったりしました。Francis Shand 博士は論文作成の際に、言語的な側面のみならず論理的にも深くクリティカルなご助言を頂きました。小杉瑞葉博

士（現北海道大学）は臨床の視点からご助言を頂きました。また、マウスの維持や研究室の環境整備、実験の補助など多方面に渡って研究にご協力頂いた藤田俊一技術員、青木晋技術員、山下愛技術員に感謝を申し上げます。

東海大学医学部 稲垣豊教授は本研究に必要不可欠であった Col-GFP マウスを提供して下さり、同時に研究に関して温かいご助言を頂きました。深く感謝の念を申し上げたいと思います。

学部研究室の指導教員であり、卒業後もネットワーク形成等の貴重な機会を与えて下さった東京大学大学院薬学系研究科 入村達郎名誉教授（現順天堂大学）に感謝を申し上げます。さらに、学部研究室の同期である村上龍一博士と高橋恵生大学院生には、勉強会における議論が研究の手助けとなったことに関して感謝を申し上げます。

セルソーターを用いた細胞純化に際して、東京大学医科学研究所幹細胞治療センターFACS コラボラトリーと東京大学医学部ライフサイエンス研究機器支援室にご協力いただきましたことに感謝を申し上げます。

本研究は 2012 年度より東京大学ライフイノベーション・リーディング大学院「ライフイノベーションを先導するリーダー養成プログラム」(GPLLI)の支援を受けました。この場を借りて GPLLI においてご指導頂いた先生方に感謝を申し上げます。

最後に、本研究の遂行にあたり支えて下さった家族及び友人に、心からの感謝を申し上げたいと思います。