

論文の内容の要旨

論文題目 マウスモデルを用いた肺線維症の分子・細胞制御機構に関する研究

氏名

七野 成之

背景

肺線維症は、細胞外基質(ECM)が肺に過剰沈着し、呼吸不全に至る重篤な病態である。肺線維症は、原因不明の特発性肺線維症や、シリカ粒子・PM2.5等の環境汚染物質への暴露による慢性の間質性肺疾患において幅広く認められ、多くが進行性、不可逆性であり、有効な治療法に乏しい。また、肺線維症は、オプジーボ等の、免疫反応を増強する抗体によるがん治療の主要な致命的副作用でもある。ゆえに、肺線維症の機序解明、それに基づく新規早期診断・予防・介入法の創出は、医学的・社会的に極めて重大な課題だと言える。

肺線維症の病態制御において中心的な役割を果たしていると考えられている細胞として、貪食能・細胞外基質の分解能・炎症制御能を有する肺マクロファージ、および細胞外基質の主要な産生源である組織常在肺線維芽細胞がある。肺マクロファージの肺線維症への関与については、マクロファージによるECM分解は知られているものの、肺線維症の慢性的進行、組織細胞活性化への関与は未だ不明な点が多い。活性化肺線維芽細胞についても、その分子制御機構の解明に有効であると考えられる、モデルや種横断的な網羅的遺伝子発現解析データ解析は成されておらず、活性化制御機構に関する情報や理解が不十分な状態が続いている。本研究においては、上記2者の細胞に焦点をあて、肺マクロファージによるシリカ誘導肺線維症の病態制御、及び組織常在肺線維芽細胞の活性化制御の分子機構とその肺線維症病態への影響に関して検討した。

方法

上記の課題を解決するため、一過性の肺線維症を誘導するブレオマイシンモデル、および慢性の肺線維症を誘導するシリカモデルという、2者の性質の異なるマウスモデルを用いた。また、肺線維芽細胞を同定するため、Col1a2 プロモーターの下流にGFPを発現するCol1a2-GFPトランスジェニックマウスを用いた。骨髄由来の単球由来マクロファージの欠損による影響について検討するため、*Ccr2*^{-/-}マウスを用いた。肺における血球および組織細胞サブセットの数的・質的変動を定量的に評価するため、フローサイトメトリーによる1細胞解析、およびフローサイトメトリーにより分取した細胞のトランスクリプトーム解析を適用した。肺線維化を定量的に評価するため、コラーゲン特異的なアミノ酸であるヒドロキシプロリンの定量を実施した。肺線維化病変の形態学的変化を評価するため、組織切片のマッソントリクローム染色および染色像の定量評価を実施した。活性化肺線維芽細胞の転写ネットワークの実態を解明するため、遺伝子共発現ネットワーク解析および転写因子結合モチーフ濃縮解析を実施した。肺線維芽細胞特異的な介入試験のため、肺線維芽細胞の経気道的養子移入を実施した。上記の実験系を用い、肺マクロファージによるシリカ誘導肺線維症の病態制御、及び組織常在肺線維芽細胞の活性化制御の分子機構とその肺線維症病態への影響に関して検討した。

結果

初めに、肺マクロファージのサブセットのうち、肺胞マクロファージではなく、骨髄由来の炎症性単球と肺間質マクロファージがシリカ誘導肺線維症において持続的に増加することを見出した。骨髄由来の炎症性単球を遺伝的に欠失させた条件下では、通常結節性のシリカ線維化病変がびまん化し、ヒト肺線維症と相関する遺伝子発現変動が肺組織細胞において増強されることが明らかとなった。これらの結果より、シリカ誘導肺線維症において炎症性単球は防御的役割を果たしていることが示唆された。

次に、活性化組織常在肺線維芽細胞の分子制御機構を明らかとする為、ブレオマイシンおよびシリカ誘導肺線維症モデルの両者を用い、惹起、寛解、慢性の各過程について経時的に肺線維芽細胞を取得、トランスクリプトーム解析を実施した。トランスクリプトームデータのクラスタリング解析により、モデル非依存的に、線維症病態推移と相関して発現変動する遺伝子群が見出された。そ

れら遺伝子群の共発現ネットワーク解析および転写因子結合モチーフ解析により、活性化線維芽細胞の遺伝子発現ネットワーク中における 90 個の「ハブ」転写因子が見出された。それら 90 個のハブ転写因子には、脂質代謝において中心的な役割を果たしている Sterol regulatory element binding protein-1(Srebfl)をはじめとする、脂質関連転写因子が数多く含まれていた。Srebfl の肺線維芽細胞活性化および肺線維症病態に対する役割について、経気道的養子移入法やノックアウトマウスを用いて検証した所、Srebfl は活性化肺線維芽細胞の増殖、筋線維芽細胞マーカーの発現、線維症増悪因子の肺線維芽細胞における発現増強を広範に抑制し、線維症モデルにおけるコラーゲン沈着も抑制することが明らかとなった。さらに、Srebfl 経路の増強の、肺線維症治療への応用可能性を検討するため、Srebfl の発現を増強することが知られている liver X receptor(LXR)のアゴニストの治療的投与実験を行った。LXR アゴニストの投与により、肺線維芽細胞の活性化が抑制され、コラーゲン沈着も抑制されることが、ブレオマイシンおよびシリカ誘導肺線維症の両モデルにおいて見出された。これらの結果より、肺線維症の線維芽細胞活性化ネットワークにおいて、Srebfl は防御的ハブの一つとして働いていることが示唆された。

結論

以上の2つの研究結果により、これまで明らかでなかった炎症性単球のシリカ誘導肺線維症における防御的役割、活性化線維芽細胞におけるモデル非依存的転写ネットワーク、脂質代謝転写因子 Srebfl 経路による活性化線維芽細胞転写ネットワークの制御が解明された。本研究で得られた知見に基づき、制御性マクロファージの実態の更なる解明や、活性化線維化細胞内における Srebfl 経路のより詳細な分子制御機構（細胞内脂質組成の変化による制御や、Srebfl が慢性的に発現低下するメカニズムなど）についての更なる検討、新規 LXR アゴニストを始めとする様々な Srebfl の上流を増強する手段の開発などを将来的に実施することにより、肺線維症病態の生物学的理解、また肺線維症に対する新規治療手段の開発に繋がる可能性がある。