

「炎症の慢性化機構の解明と制御に向けた基盤技術の創出」  
平成22年度採択研究代表者

|                |
|----------------|
| H23 年度<br>実績報告 |
|----------------|

松島 綱治

東京大学大学院医学系研究科・教授

慢性炎症に伴う臓器線維化の分子・細胞基盤

## §1. 研究実施体制

### (1)「松島」グループ

① 研究代表者: 松島 綱治 (東京大学大学院医学系研究科、教授)

② 研究項目

- ・ 新規遺伝子改変マウスの開発
- ・ 肺線維症モデルにおける組織細胞、炎症細胞の動態解析
- ・ 正常および線維化誘導肺由来線維芽細胞の transcriptome 解析

### (2)「和田」グループ

① 主たる共同研究者: 和田 隆志 (金沢大学医薬保健研究域医学系、教授)

② 研究項目

- ・ 線維化に関わる細胞基盤の確立
- ・ 炎症の遷延化、筋線維芽細胞分化・活性化の分子基盤の確立

### (3)「義江」グループ

① 主たる共同研究者: 義江 修 (近畿大学医学部、教授)

② 研究項目

- ・ マウス  $\gamma$  ヘルペスウイルス誘導性肺線維症モデルの構築とその解析
- ・ ヘルペスウイルスによる肺上皮細胞の上皮間葉移行 (EMT) 誘導機構の解明
- ・ 滲出性マクロファージのサブセット化と炎症・線維化における機能解析

### (4)「上阪」グループ

① 主たる共同研究者: 上阪 等 (東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科、准教授)

② 研究項目

- 関節炎における病的滑膜線維芽細胞形成機構の解明
- 膠原病に伴う間質性肺炎の病態の解明
- 筋炎における筋由来細胞遊走因子の同定

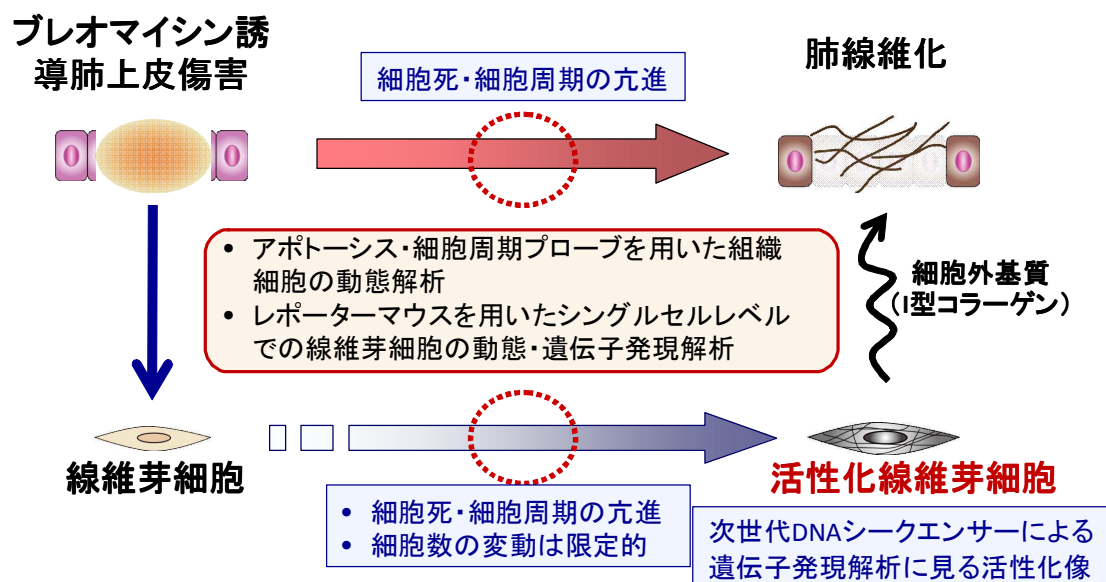
## §2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

「松島グループ」

1) 新規遺伝子改変マウスの開発: Bacterial artificial chromosome (Bac)を用いて、(筋)線維芽細胞の分離、細胞系譜解析、特異的遺伝子制御を可能にする Bac Tg マウスを作製し、導入遺伝子を確認した4系統を取得、交配を開始した。

2) 肺線維症モデルにおける組織細胞、炎症細胞の動態解析: 野生型、線維芽細胞可視化マウス(*Col1α2*-GFP)、アポトーシス可視化マウス(SCAT3.1)、細胞周期可視化マウス(Fucci)を用いて bleomycin 気道内投与急性肺線維症モデルを作製した。上皮細胞、内皮細胞、線維芽細胞画分について細胞数を経時的に解析したところ、上皮細胞、内皮細胞では細胞数の著明な変化を認めず、線維芽細胞は減少傾向にあった。一方、線維化肺由来線維芽細胞では細胞の芽球化と *Col1α2*-GFP シグナルの増強を認め、活性化状態が示唆された。上皮細胞および線維芽細胞において、それぞれ投与14日目および7日目にアポトーシス亢進のピークを認める一方、内皮細胞におけるアポトーシス亢進は軽度であった。アポトーシス亢進と平行して、各細胞画分における細胞周期の亢進を認めた(図1、2)。これらの結果から、本モデルにおける膠原線維の過剰沈着は線維芽細胞の数的増加ではなく、機能亢進によるものであることが示唆された。



**図1 蛍光プローブ・レポーターマウスを用いた肺線維症モデルにおける組織細胞の動態解析**  
 プレオマイシン誘導肺線維症モデルにおける上皮・内皮・線維芽細胞の動態を、細胞死プローブ(SCAT3.1)、細胞周期プローブ(Fucci)および*Col1α2*-GFPレポーターマウスを用いて解析した。本モデルでは上皮、内皮、線維芽細胞における細胞死および細胞周期の亢進を認めたが、線維芽細胞の著明な増殖は認められなかった。一方、線維化誘導時の線維芽細胞において活性化を示唆する細胞形質および遺伝子発現プロファイルの変化を認め、本モデルにおける線維化病態形成は、線維芽細胞の質的な変化に起因する可能性が示唆された。

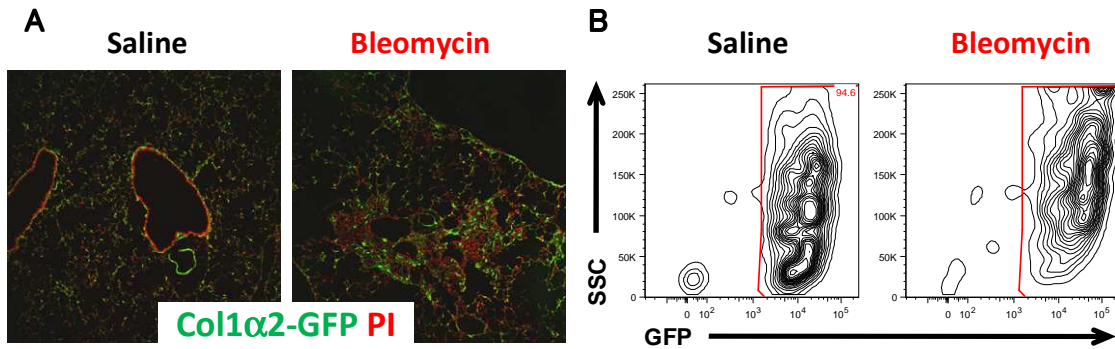


図2. プレオマイシン投与後のCol1α2<sup>+</sup>線維芽細胞の分布と形質変化

Col1α2-GFPトランスジェニックマウスに生理食塩水またはプレオマイシンを投与し、2週間後にCol1α2-GFP陽性細胞の組織分布と免疫表現型を解析した。プレオマイシン投与群の肺線維化部位においてGFP<sup>+</sup>細胞のクラスター形成を認め(A)、また1細胞当たりのCol1α2発現レベルの亢進と芽球化を認めた(B)。

また、末梢血循環を介して骨髄から線維化組織に供給される線維細胞または間葉系幹細胞の、線維化部位線維芽細胞プールへの相対的寄与度を検証するため、(*Coll α2*-GFP BM→Wt)骨髄キメラマウスおよび(*Coll α2*-GFP/Wt)並体結合マウスを作製した。今後、これらのマウスをbleomycin誘導急性肺線維症モデルに供する予定である。

3) 正常および線維化誘導肺由来線維芽細胞の transcriptome 解析: 生理食塩水またはbleomycin 気道内投与後 14 日目の *Coll α2*-GFP マウス肺から酵素処理、磁気細胞分離、セルソーティングにより CD45(-)CD31(-)EpCAM-1(-)Ter-119(-)*Coll α2*-GFP(+)線維芽細胞を純化し、Ion Torrent DNA sequencerを用いた transcriptome 解析を行った。Bleomycin 投与(+)または(-)線維芽細胞について、それぞれ 1,080,798Tag および 1,893,139Tag の mRNA 由来配列が得られ、bleomycin 投与で線維芽細胞に誘導または抑制される遺伝子、また投与に関わらず発現量が維持される細胞表面マーカー候補分子などを取得した(表1)。今後これらの遺伝子群についてRT-PCRによる発現検証と*in vitro/ex vivo*における機能検証を行い、最終的に線維化病態への関与および診断・予防・治療標的としての可能性を検証する予定である。

表1. プレオマイシン肺線維症モデルにおいて線維芽細胞に発現誘導される遺伝子群

| Tag count |           | Bleo/Cont ratio | gene                                                            |
|-----------|-----------|-----------------|-----------------------------------------------------------------|
| Cont      | Bleomycin |                 |                                                                 |
| 0         | 118       | #DIV/0!         | cell adhesion molecule with homology to L1CAM (Ch1)             |
| 0         | 92        | #DIV/0!         | cyclin-dependent kinase 1 (Cdk1)                                |
| 95        | 20538     | 217             | secreted phosphoprotein 1 ( <i>Spp1</i> ), transcript variant 5 |
| 2         | 361       | 206             | cytokine receptor-like factor 1 ( <i>Crfl1</i> )                |
| 2         | 186       | 106             | annexin A8 ( <i>Anxa8</i> )                                     |
| 2         | 172       | 98              | leucine-rich alpha-2-glycoprotein 1 ( <i>Lrg1</i> )             |
| 2         | 162       | 92              | collagen triple helix repeat containing 1 ( <i>Cthrc1</i> )     |
| 2         | 135       | 77              | cell adhesion molecule with homology to L1CAM (Ch1)             |
| 4         | 166       | 47              | syndecan 1 ( <i>Sdc1</i> )                                      |
| 12        | 542       | 44              | epiregulin ( <i>Ereg</i> )                                      |

#### 「和田グループ」

- 1) 肝臓の慢性炎症の状態において線維化が進行する機序について、最近インターフェロン療法を行った C 型慢性肝炎 168 例の血液中アミノ酸分析、うち、91 例の Affimetrix チップを用いた包括的発現遺伝子解析を行い、線維化が進行した症例における、細胞内の mTOR シグナルと FoxO シグナルを介したインターフェロン反応性低下機序を明らかにした。本年は分子機序について培養細胞を用いた解析を進めた。
- 2) 心筋線維化・肥大モデルとして、平滑筋  $\alpha$ アクチン ( $\alpha$ SMA) プロモーター下に S1P1 を発現するマウスを確立し、S1P1 がアンギオテンシン II 系との間に相互作用を有することを見出した。
- 3) 無菌下における皮膚の打ち抜き損傷の創傷治癒モデルにおいて、血流中の骨髄由来血管内皮前駆細胞 (EPC) が、皮膚損傷部位で産生されるケモカイン CCL5 と、EPC に発現している CCL5 のレセプターである CCR5 に作用することによって、EPC を損傷部位に集積、VEGF および TGF- $\beta$  産生を介して新生血管形成をさらに促進することを明らかとした (B-1)。また、化学物質の反復投与により大腸に多発性腫瘍を発症させるモデルマウスにおいて、線維化の程度と大腸発がん発症との間に相関を認め、また腫瘍部位での線維化への骨髄由来線維細胞 (fibrocyte) の関与が示唆された。
- 4) 糖尿病性腎症の進展機序である炎症細胞浸潤と線維化に着目し、ヒト線維細胞の活性化と線維化機序にはたす CCL2/CCR2 の関与を検討した。高糖濃度下での CCL2 刺激により 1 型コラーゲンおよび TGF- $\beta$ 1 の発現が亢進すること、高糖濃度下ではヒト線維細胞に CCR2 が発現すること、さらに CCR2 阻害により、1 型コラーゲンおよび TGF- $\beta$ 1 の発現が抑制されることが明らかとなり、ヒト線維細胞は高血糖および MCP-1/CCR2 を介して糖尿病性腎症の進展に関与することが示唆された。

#### 「義江グループ」

特発性肺線維症 (IPF) の発症・増悪への関与が示唆されているヘルペスウイルス感染に着目し、マウス  $\gamma$  ヘルペスウイルス (MHV68) 誘導性肺線維症モデルの樹立を試みた。本モデルでは、従来のブレオマイシン単独投与に比べ炎症の激化とヒドロキシプロリン量の増加を確認しており、ヘルペスウイルス感染を伴うヒト IPF 病態形成を解析するのに有用な実験モデルであると考えられた。そこでまず、ウイルス誘導性の炎症反応過程を評価するため、ウイルス感染後の肺胞洗浄液中のサイトカイン量および浸潤細胞種を経時的に解析した。その結果、1) Th1/Th2/Th17 サブセット機能に関与するサイトカインのうち IL-27 が感染後 14 日まで増加すること、2) 感染後 7 日からマクロファージ、T 細胞、NK 細胞の浸潤が顕著に増加すること、3) 抗 IL-27 抗体の連続投与により、いずれの細胞亜集団の浸潤も有意に抑制され、間質性肺炎の病像が軽減されることを見出した。以上の結果、ヘルペスウイルス感染は肺線維症の増悪因子であること、IL-27 が肺線維症発症を抑制するための標的分子となる可能性があること、が示唆された。

#### 「上阪グループ」

線維細胞の滑膜炎病態形成への関与を検討するため、マウスの末梢血・骨髄細胞からの線維細

胞の同定と培養系の条件検討を行った。また、膠原病にしばしば合併する間質性肺炎の病態解明、治療法の開発を目的として、関節炎を発症した後に間質性肺炎を併発するモデルマウスの樹立を試みた。D1CC マウスは、MHC クラス II 発現の制御を行う CIITA 遺伝子を II 型コラーゲン (Col II) プロモーター、エンハンサー下に導入し、関節軟骨特異的に MHC クラス II の発現を誘導したマウスである。D1CC マウスに Col II を免疫(0 週、および 3 週に)すると、関節炎発症に引き続き、33 週目頃より間質性肺炎が発症する。現在、2 度のコラーゲン免疫を終え、間質性肺炎発症前の肺サンプルを採取している。今後、間質性肺炎発症時、および進行期(線維化期)に肺サンプルを採取し、浸潤細胞の同定、発現分子の比較など行っていく。さらに、筋炎モデルにおいて、筋組織にリンパ球・マクロファージ・線維芽細胞などの遊走を起こす因子を同定するため、筋肉の壊死・再生過程や前駆細胞からの分化過程において、筋肉に発現する細胞遊走因子のスクリーニングを行った。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

- A-1. Jun Abe, Satoshi Ueha, Hiroyuki Yoneyama, Yusuke Shono, Makoto Kurachi, Akiteru Goto, Masashi Fukayama, Michio Tomura, Kazuhiro Kakimi and Kouji Matsushima; B cells regulate antibody responses through the medullary remodeling of inflamed lymph nodes. *Int Immunol.* vol. 24, No.1, pp.17-27, 2012 (doi:10.1093/intimm/dxr116).
- A-2. Kayoko Kaneko, Yoshishige Miyabe, Aiko Takayasu, Shin Fukuda, Chie Miyabe, Masashi Ebisawa, Waka Yokoyama, Kaori Watanabe, Toshio Imai, Kenzo Muramoto, Yuya Terashima, Takahiko Sugihara, Kouji Matsushima, Nobuyuki Miyasaka, and Toshihiro Nanki; Chemerin activates fibroblast-like synoviocytes in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther.* 2011;13(5):R158 (doi: 10.1186/ar3475)
- A-3. Katsumi Ogoshi, Shinichi Hashimoto, Yoichiro Nakatani, Wei Qu, Kenshiro Oshima, Katsushi Tokunaga, Sumio Sugano, Masahira Hattori, Shinichi Morishita, Kouji Matsushima; Genome-wide profiling of DNA methylation in human cancer cells. *Genomics.* 2011 98(4):280-7 (doi:10.1016/j.ygeno.2011.07.003).
- B-1. Yuko Ishida Y, Akihiko Kimura, Yumi Kuninaka, Masanori Inui, Kouji Matsushima K, Naofumi Mukaida N, and Toshikazu Kondo; Pivotal role of the CCL5-CCR5 interaction for recruitment of endothelial progenitor cells in mouse wound healing. *Journal of Clinical Investigation*, vol. 122, No.2, pp.711-721, 2012 (DOI: 10.1172/JCI43027).
- B-2. Hironori Sugiyama, Seiichi Matsugo, Tetsuya Konishi, Toshinari Takamura, Shuichi Kaneko, Yukari Kubo, Kyouhei Sato, and Kan Kanamori; Synthesis, Structure, and Physiological Effects of Peroxovanadium(V) Complexes Containing Amino Acid Derivatives as Ancillary Ligands. *Chemistry Letters*, vol. 41, pp.711-721, 2012 (doi:10.1246/cl.2012.377).
- C-1. Ah-Mee Park, Sumio Hayakawa, Eiko Honda, Yoshirito Mine, Koji Yoshida, Hiroshi Munakata; Conditioned media from lung cancer cell line A549 and PC9 inactivate pulmonary fibroblasts by regulating protein phosphorylation. *Arch Biochem Biophys.* vol. 15, No. 518(2), pp. 133-141, 2012. (DOI:10.1016/j.abb.2011.12. 012)
- C-2. O Kaminuma, T Ohtomo, A Mori, Daisuke Nagakubo, Kunio Hieshima, Y Ohmachi, Y Noda, K Katayama, K Suzuki, Y Motoi, N Kitamura, M Saeki, T Nishimura, Osamu Yoshie, T Hiroi; Selective down-regulation of Th2 cell-mediated airway inflammation in mice by pharmacological intervention of CCR4. *Clinical and Experimental Allergy*, vol. 42, No. 2, pp.315-325, 2012. (DOI: 10.1111/j.1365-2222.2011.03847.x)
- C-3. Takeshi Kadowaki, Tomohiro Arikawa, Rika Shinonaga, Soichi Oomizu, Hiroyuki Inagawa, Genichiro Soma, Toshiro Niki, Mitsuomi Hirashima; Galectin-9 signaling prolongs survival in

murine lung-cancer by inducing macrophages to differentiate into plasmacytoid dendritic cell-like macrophages. *Clin Immunol*, vol. 142, No.3, pp.296-307, 2012 (DOI: 10.1016/j.clim.2011.11.006).

- C-4. Soichi Oomizu, Tomohiro Arikawa, Toshiro Niki, Takeshi Kadowaki, Masaki Ueno, Nozomu Nishi, Akira Yamauchi, and Mitsuomi Hirashima. "Galectin-9 suppresses Th17 cell development in an IL-2-dependent but Tim-3-independent manner", *Clin Immunol*, vol. 143, No.1, pp.51-58, 2012 (DOI: 10.1016/j.clim.2012.01.004).
- C-5. Satoru Hagiwara, Masatoshi Kudo, Hobyung Chung, Kazuomi Ueshima, Tatsuo Inoue, Seiji Haji, Tomohiro Watanabe, Ah-Mee Park, Hiroshi Munakata H, Toshiharu Sakurai; Activation of c-Jun N-terminal kinase in non-cancerous liver tissue predicts a high risk of recurrence after hepatic resection for hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.*, vol. 42, No.4, pp.394-400, 2012 (doi: 10.1111/j.1872-034X.2011.00932.x).
- C-6. Ah-Mee Park, Masatoshi Kudo, Satoru Hagiwara, Masaki Tabuchi, Tomohiro Watanabe, Hiroshi Munakata, Toshiharu Sakurai; p38MAPK suppresses chronic pancreatitis by regulating HSP27 and Bad expressions. *Free Radical Biology & Medicine*, (in press).
- C-7. Takashi Nakayama, Tomonori Higuchi, Naoki Oiso, Akira Kawada and Osamu Yoshie; Expression and Function of FRA2/JUND in Cutaneous T-Cell Lymphomas. *Anticancer Res.*, (in press).