

「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

H24 年度
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

- (1) 新規遺伝子改変マウスの開発
- (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
- (3) 正常および線維化誘導肺由来線維芽細胞の transcriptome 解析
- (4) サイトカインによる MSC 由来線維芽細胞分化系の確立

(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

- (5) 腎線維化に関わる細胞基盤の確立
- (6) 肝臓における線維化と炎症に関する基盤研究
- (7) S1P による炎症の遷延化、筋線維芽細胞分化・活性化の制御
- (8) 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

- (9) マウス γ 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
- (10) 筋線維芽細胞の発生・活性化制御因子の同定と機能解析

(4)「稲垣」グループ

① 主たる共同研究者: 稲垣 豊 (東海大学医学部、教授)

② 研究項目

(11) 肝線維化過程におけるコラーゲン産生細胞の由来と初期動態

§ 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:

昨年度作成した BAC-Tg マウス 4 系統において、期待した導入遺伝子の動作が確認出来なかったため、promotor 領域を改変した新たなコンストラクトを用いた新規 Tg マウスを作成し、導入遺伝子を確認した 3 系統について動作確認を進めている。

(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:

野生型および *Col1a2*-GFP マウスを用いて、bleomycin (BLM モデル) または silica (silica モデル) の気道内投与により病理像の異なる 2 種類の肺線維症モデルを作成し、組織細胞 (上皮細胞、内皮細胞、線維芽細胞) および炎症細胞画分を経時的に解析した。28 日目までの急性期において、両モデルともに day 7 から 14 をピークとする一過性の炎症細胞浸潤と線維芽細胞の減少を認めた。28 日以降の慢性期において、BLM モデルでは 63 日目にかけて各組織細胞数、炎症細胞数が定常状態レベルに戻る一方、silica モデルでは T 細胞および Ly-6C^{hi} 炎症性マクロファージを主体とする炎症細胞の浸潤が持続し、また各組織細胞数も増加した。Silica モデルでは結節様の線維化病巣が認められ、中心部に顕著な I 型コラーゲンの沈着、その周辺部に *Col1a2*-GFP シグナルを強く発現する線維芽細胞、また α SMA を共発現する筋線維芽細胞が集積しており、BrdU の取り込みで評価する細胞増殖の亢進も持続した (図 1)。今後、それぞれの肺線維症モデルにおける epigenome, transcriptome 解析、ネットワーク解析から、線維芽細胞における core signature, common pro-fibrotic signature, disease/phase specific signature の解析を進め、線維化と再生の運命決定に関わる分子動態を解明するとともに、治療標的となり得る主要制御因子を取得する予定である。

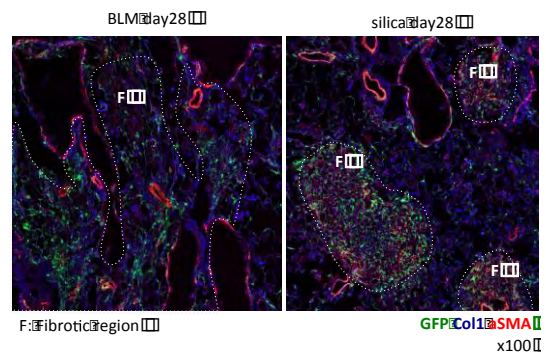


図 1

(3) 正常および線維化肺由来線維芽細胞の transcriptome 解析:

BLM 誘導肺線維症 14 日目の *Col1a2*-GFP 陽性細胞 (線維芽細胞) の transcriptome 解析を行った。Gene Ontology 解析から、線維芽細胞において最も顕著に発現上昇している遺伝子群が細胞外マトリックス構築関連遺伝子であることが明らかになり、また、発現変動している遺伝子の生物学的機能解析により、BLM 投与群の線維芽細胞において細胞増殖・細胞移動・細胞接着を促す遺伝子群の発現上昇を認めた。同様の傾向は線維化誘導 28 日目の *Col1a2*-GFP 陽性細胞でも認められ、線維芽細胞の活性化状態が急性期の炎症応答が収束した後も持続することが明らかになり、炎症記憶の存在が示唆された。また、BLM 投与群の線維芽細胞で強力に誘導される *Spp1* がコードする osteopontin の発現分布を調べたとこ

ろ、芽球化線維芽細胞に高発現することが明らかになった。組織における osteopontin 陽性 GFP 陽性活性化線維芽細胞は、リモデリングが進行する領域や線維化部位の辺縁部に存在し (leading edge)、線維化巣の中心部に分布する筋線維芽細胞とは異なる特徴的な局在を示した。これらの結果から、BLM モデルでは osteopontin 陽性線維芽細胞が筋線維芽細胞とは異なる、より高い活性状態にある線維化の effector 細胞であることが示唆された (図 2)。

今後、この osteopontin 陽性線維芽細胞の特性と線維症の病態形成に果たす役割を検証する予定である。

- (4) サイトカインによる MSC 由来線維芽細胞分化系の確立:
臓器線維化に中心的な役割を果たす筋線維芽細胞は、間葉系幹細胞 (MSC) から線維芽細胞を経て分化していると考えられている。我々は、

Col1a2-GFP マウスの骨髄より CD45(-)CD31(-)Ter-119(-)GFP(-)PDGF α (+)ScaI(+)細胞をクローニングし、モノクローナル間葉系幹細胞の初代培養細胞株を樹立した。これらの細胞はおおの分化誘導条件下で脂肪細胞や骨芽細胞に分化する多分化能を有していた。さらに、この MSC 初代培養細胞株に CTGF と bFGF を添加するとコラーゲンの産生を示す GFP の発現が見られ線維芽細胞への分化能を有

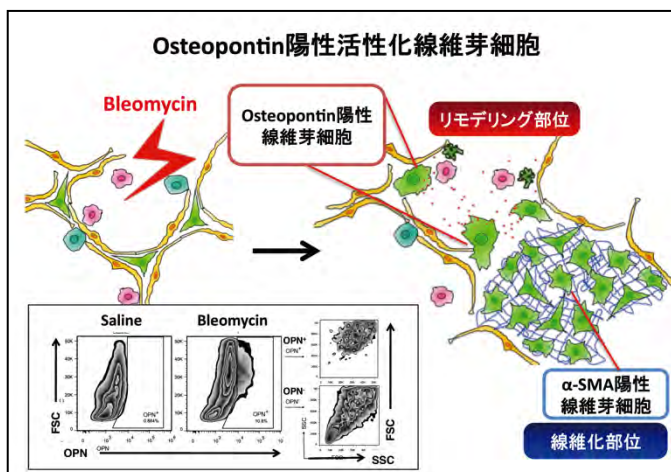


図 2

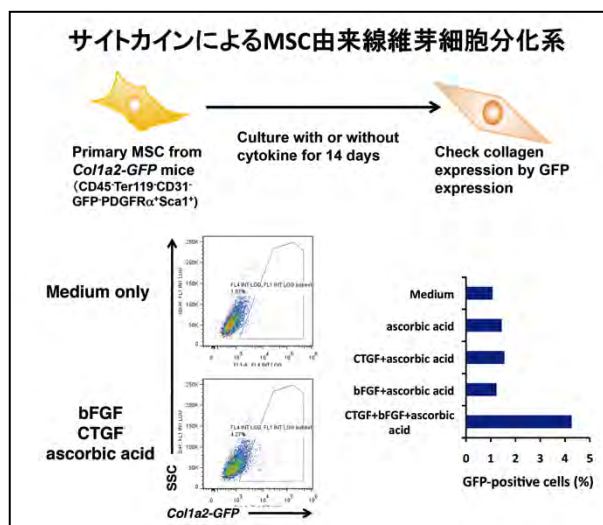


図 3

することも示唆された (図 3)。今後これらの MSC 細胞株を用いて、線維芽細胞分化に重要な転写因子、epigenetic signature の探索から、線維化病態への関与に重要な因子の解明を行う予定である。

「和田」グループ

(5) 腎線維化に関わる細胞基盤の確立:

本研究では、腎臓線維化ならびに腎臓と各臓器の線維化をつなぐ細胞基盤ならびに分子基盤の構築を目指している。本邦において、末期腎不全による新規の透析導入の原疾患として糖尿病性腎症が最も多い。本研究では、ヒト線維細胞を用いて、糖尿病状態における活性化ならびに線維化機序を検討した。その結果、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(文献 B-1)。一方、腹膜透析は血液透析とならぶ血液浄化療法の重要な手段であり、腹膜線維化が臨床最大の克服課題である。本研究では、線維細胞が p38 MAPK 活性化を介して腹膜線維化に関与することを明らかにした(図 4、文献 B-2)。さらに、慢性炎症と線維化は密接にリンクする。我々は、進行性腎臓病において、M2マクロファージが抗炎症から線維化を抑制することを明らかにした(文献 B-3)。これらの研究

は臓器線維化の細胞機序、分子機序の解明に貢献するものであり、病態解明や治療法へ示唆を与える結果である。今後、腎臓、心臓、腹膜等の線維化の機序解明を一層進める予定である。(和田／古市／松郷)

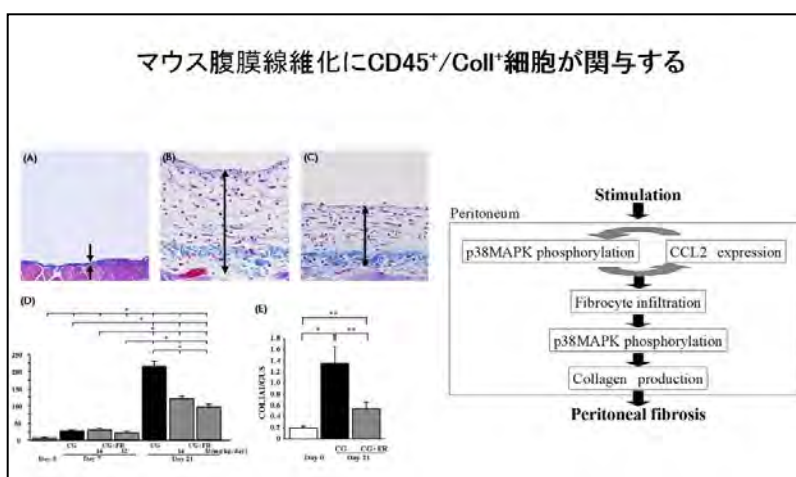


図 4

(6) 肝臓における線維化と炎症に関する基盤研究:

肝臓の線維化機序に関する分子ならびに細胞基盤の確立を目的として研究を行っている。肝臓の慢性炎症状態において線維化が進行する機序を解明するために、動物実験モデル、ヒトの肝臓組織の解析を行っている。肝臓の線維化では、ウイルス感染による慢性炎症と、脂肪化に伴う慢性炎症が臨床的に重要である。これまでに、ウイルス感染に伴う細胞内の分子変動を解析し、線維化の成立と線維化に伴う分子の変動を明らかにしてきた。91 例の Affimetrix チップを用いた包括的遺伝子発現解析を行い、線維化が進行した症例では、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が存在することを明らかにした。本年度は、自然に脂肪化、肝線維化をきたし最終的に肝発がんをみる platelet-derived growth factor (PDGF)-C Tg マウスを用いて肝線維化モデルを作成し、レチノイドによる線維化進展阻止の解析を行った(文献 B-4)。レチノイドを投与することによって、肝線維化を低下させ、最終的に発がんも低下させた(図 5)。トランスジェニックの肝臓に

における発現遺伝子の経路解析を行ったところ、線維化および血管新生、Wnt/ β -catenin 経路が活性化していた。また、レチノイドは hepatic stellate cells (HSC)、肝がん培養細胞、線維芽細胞、内皮細胞における PDGF レセプターの発現を低下させた。また HSC の myofibroblast への分化を抑制した。これらの結果は、肝臓における線維化の進展および線維化を背景に発生する肝がんの発症機序と HSC など肝内における細胞と線維化との関連を明らかにするものであった。また、レチノイドの投与によって発がんが押さえられることは、今後の治療薬を開発するうえで重要な知見であった。今後さらに、PDGF を介する線維化病態の解明と線維化の抑制戦略について、またレチノイドの作用機序の研究を進める予定である。(金子)

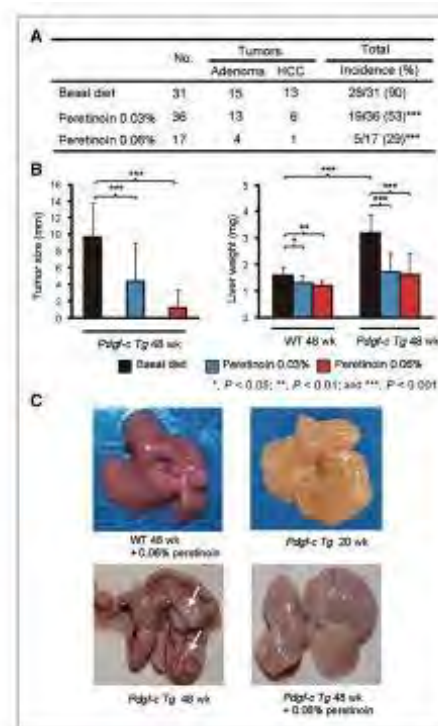


図 5

(7) S1P による炎症の遷延化、筋線維芽細胞分化・活性化の制御:

胆管結紮肝線維化マウスモデルにおいて、肝星細胞(HSC)に由来する S1P2 が筋線維芽細胞増殖とコラーゲン産生に関わることを見出した(文献 B-5)。心筋線維化・肥大モデルとして、平滑筋 α アクチン(α SMA)プロモーター下に S1P1 を発現する Tg マウスを確立した。本 Tg マウスでは、Gi 共役型である S1P1 受容体の活性亢進により、線維芽細胞は過形成を引き起こすのみならず、アンギオテンシン II の関与するパラクリン作用により IL-6 産生を促進して心筋肥大の発症に関与した(投稿準備中)。S1P1 のシグナル産生の一部は内在化された細胞内小胞膜上の S1P1 により担われ、これらの内在化 S1P1 によるシグナリングに II 型 PI3-キナーゼ PI3K-C2 α が関与することを解明した(文献 B-6, B-7)。高脂肪食は脂肪組織において脂肪細胞の肥大と慢性炎症を引き起こし、インスリン抵抗性を惹起する。S1P 産生酵素スフィンゴシンキナーゼ-1 の過剰発現は細胞内セラミドのレベル低下を介して、インスリン抵抗性の発症を抑制した(文献 B-8)。(多久和)

(8) 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:

マウスの腹腔内に発がん剤アゾキシメタン(AOM)を投与後に、硫酸デキストラン(DSS)溶液を間歇的に反復飲用させることによって、大腸に多発性腫瘍を発症させるモデルの検討から、DSS 溶液飲用によって起きる大腸組織で産生される、TNF α とケモカイン CCL2 との協調的作用によって、シクロオキシゲナーゼ-2(COX-2)発現マクロファージが大腸組織に浸潤することが腫瘍の発症に重要であることをこれまで我々は報告してきた。今回、この大腸がん発

症過程の大腸組織において、別のケモカイン CCL3 の産生が亢進することを見出した(図 7)。

さらに、AOM 投与後に高濃度(4.5%)DSS 溶液を反復飲用させると、CCL3 遺伝子欠損マウスならびに CCL3 のレセプターである CCR1 遺伝子あるいは CCR5 遺伝子を欠損したマウスでは、同程度のマクロファージ浸潤が認められた。しかし、CCR1 欠損マウスに比べて、CCL3 欠損マウスあるいは CCR5 欠損マウス

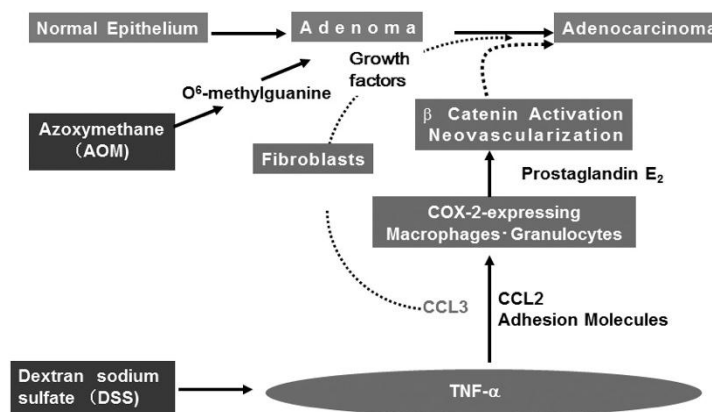


図 7

ウスでは形成される腫瘍の数・大きさが著明に軽減した。CCR1 欠損マウスで認められた大腸がん組織内への I 型コラーゲン産生線維芽細胞の集積が、CCL3 欠損マウスならびに CCR5 欠損マウスでは顕著に軽減していた。線維芽細胞による産生が報告されている複数の増殖因子の発現の亢進が、CCL3 欠損マウスならびに CCR5 欠損マウスでは軽減していた。以上の結果から、大腸がん発症過程にはマクロファージなどの炎症性細胞浸潤のみならず、CCL3-CCR5 系を介して大腸組織に集積する線維芽細胞が複数の増殖因子を産生することが、大腸がん発症・進展過程に関与している可能性が強く示唆された。(向田)

「近畿大学グループ」

(9) マウスγ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:

ヘルペスウイルス感染による炎症反応およびそれに伴う線維化の重篤化機序を解明するため、マウスγヘルペスウイルス(MHV68)誘導性肺線維症モデルを構築し解析を進めている(図 8)。本年度はMHV68の肺感染に伴い肺に発現誘導され炎症惹起への関与が示唆されたタンパク質 X に注目し機能解析を行った。その結果、1)タンパク質 X はもともとウイルス感染サイトである気管支上皮細胞に存在しており、MHV68 の感染に伴って速やかに放出されること、2)肺胞マクロファージはその刺激を受けて炎症細胞浸潤に関わる一連のケモカイン遺伝子を発現することをみいだした。さらにタンパク質 X

の中和抗体処理はブレオマイシン+MHV68 感染により誘導される肺線維化を軽減することから、肺線維症重篤化を抑制するための標的分子となる可能性が示唆された(図 9)。

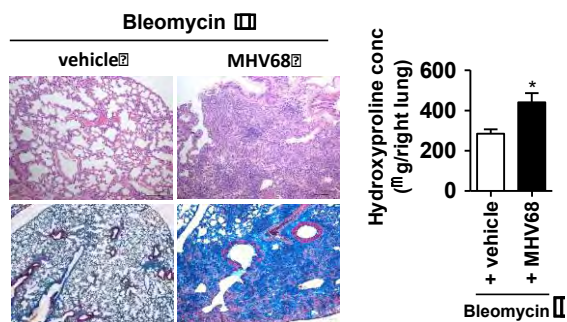


図 8

(10) 筋線維芽細胞の発生・活性化制御因子の同定と機能解析:

筋線維芽細胞の発生と活性化が肺線維症の主要因であることに着目し、ヒト肺由来線維芽細胞株 MRC-5 を TGF- β 刺激してタンパク量が変化する分子をプロテオーム解析により同定した。本年度はなかでも siRNA によりマウス BLM 誘導性の肺線維化を劇的に抑制したタンパク質 Y に注目し機能の詳細を解析した。その結果、1) マウス線維化肺の筋線維芽細胞で強く発現していること、2) 培養ヒト肺由来線維芽細胞での発現を siRNA によりノックダウンすると細胞遊走能が消失し、また細胞増殖が著しく抑制されたことから、タンパク質 Y は主に TGF- β や BLM 刺激により誘導される(筋)線維芽細胞の過剰な増殖に寄与する可能性が示唆された(図 9)。

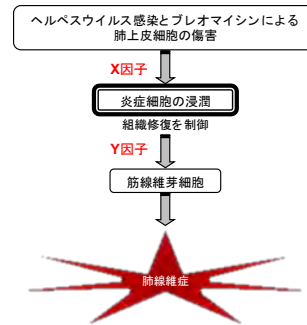


図 9

「稲垣」グループ

(11) 肝線維化過程におけるコラーゲン産生細胞の由来と初期動態:

線維化組織における主要なマトリックス成分である I 型コラーゲン $\alpha 2$ 鎖遺伝子 (*colla2*) の組織特異的エンハンサー/プロモーターをルシフェラーゼ遺伝子に連結した Tg マウスに対して総胆管結紮を行い、肝組織におけるルシフェラーゼ活性を経時的に測定すると、胆管結紮翌日から既に約3倍へと増加した。さらに、2日目に約6倍、3日目に約7倍、7日目には約9倍の活性を示し、初めの1ないし3日目にプロモーターの急激な活性化が認められた。そこで、*colla2* 遺伝子の EGFP レポーターマウスを用いてコラーゲン産生細胞の初期動態を観察したところ、胆管結紮後1日目から胆管上皮下に EGFP 陽性細胞が出現し始め、2日目には EGFP 陽性細胞は胆管周囲の実質領域にまで拡がった。しかしながら、胆管上皮細胞のマーカーである CK19 を染色すると EGFP の局在とは一致せず、胆管上皮細胞によるコラーゲン産生は否定的であった(図 10)。これらの研究成果に基づいて、次年度には胆汁うっ滞を原因としてコラーゲン線維を産生する細胞の起源は何か、肝星細胞と portal fibroblasts はそれぞれどの程度に関与するのかを検討するとともに、その活性化機序を明らかにしていきたい。

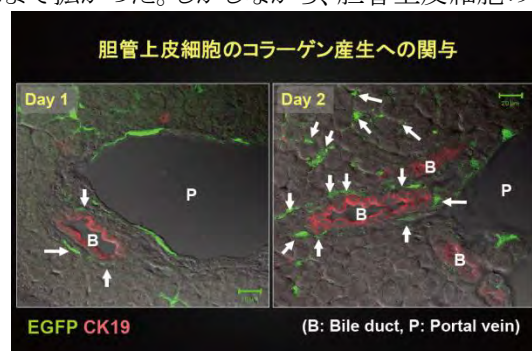


図 10

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表(公開)

● 論文詳細情報

1. Fujimura S, Takahashi H, Yuda K, Ueta T, Iriyama A, Inoue T, Kaburaki T, Tamaki Y, Matsushima K, Yanagi Y. Angiostatic effect of CXCR3 expressed on choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 53(4):1999-2006, 2012. (doi: 10.1167/iovs.11-8232.)
2. Hashimoto SI, Ogoshi K, Sasaki A, Abe J, Qu W, Nakatani Y, Ahsan B, Oshima K, Shand FH, Ametani A, Suzuki Y, Kaneko S, Wada T, Hattori M, Sugano S, Morishita S, Matsushima K. Coordinated Changes in DNA Methylation in Antigen-Specific Memory CD4 T Cells. *J Immunol.* 2013. In press
3. Sekiguchi S, Kimura K, Chiyo T, Ohtsuki T, Tobita Y, Tokunaga Y, Yasui F, Tsukiyama-Kohara K, Wakita T, Tanaka T, Miyasaka M, Mizuno K, Hayashi Y, Hishima T, Matsushima K, Kohara M. Immunization with a recombinant vaccinia virus that encodes nonstructural proteins of the hepatitis C virus suppresses viral protein levels in mouse liver. *PLoS One.* 7(12):e51656, 2012. (doi: 10.1371/journal.pone.0051656.)
4. Miyabe C, Miyabe Y, Miura NN, Takahashi K, Terashima Y, Toda E, Honda F, Morio T, Yamagata N, Ohno N, Shudo K, Suzuki J, Isobe M, Matsushima K, Tsuboi R, Miyasaka N, Nanki T. Am80, a retinoic acid receptor agonist, ameliorates murine vasculitis through the suppression of neutrophil migration and activation. *Arthritis Rheum.* 65(2):503-12, 2013. (doi: 10.1002/art.37784.)
5. Nagao K, Kobayashi T, Moro K, Ohyama M, Adachi T, Kitashima DY, Ueha S, Horiuchi K, Tanizaki H, Kabashima K, Kubo A, Cho YH, Clausen BE, Matsushima K, Suematsu M, Furtado GC, Lira SA, Farber JM, Udey MC, Amagai M. Stress-induced production of chemokines by hair follicles regulates the trafficking of dendritic cells in skin. *Nat Immunol.* 24;13(8):744-52, 2012. (doi: 10.1038/ni.2353.)
6. Qu W, Hashimoto S, Shimada A, Nakatani Y, Ichikawa K, Saito TL, Ogoshi K, Matsushima K, Suzuki Y, Sugano S, Takeda H, Morishita S. Genome-wide genetic variations are highly correlated with proximal DNA methylation patterns. *Genome Res.* 22(8):1419-25, 2012. (doi: 10.1101/gr.140236.112.)
7. Yamada Y, Okubo Y, Shimada A, Oikawa Y, Yamada S, Narumi S, Matsushima K, Itoh H. Acceleration of diabetes development in CXC chemokine receptor 3

- (CXCR3)-deficient NOD mice. *Diabetologia*. 55(8):2238-45, 2012. (doi: 10.1007/s00125-012-2547-8.)
8. Hara A, Sakai N, Furuichi K, Sakai Y, Takeya M, Bucala R, Mukaida N, Takuwa Y, Matsushima K, Kaneko S, Wada T. CCL2/CCR2 augments the production of TGF-beta1, type 1 collagen and CCL2 by human CD45+/Col1+ cells under high glucose concentrations. *Clin Exp Nephrol* 2013. In press.
 9. Kokubo S, Sakai N, Furuichi K, Toyama T, Kitajima S, Okumura T, Matsushima K, Kaneko S, Wada T. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase promotes peritoneal fibrosis by regulating fibrocytes. *Perit Dial Int*. 32(1):10-9, 2012. (doi: 10.3747/pdi.2010.00200.)
 10. Iwata Y, Boström EA, Menke J, Rabacal WA, Morel L, Wada T, Kelley VR. Aberrant macrophages mediate defective kidney repair that triggers nephritis in lupus-susceptible mice. *J Immunol*. 188(9):4568-80, 2012. (doi: 10.4049/jimmunol.1102154.)
 11. Okada H, Honda M, Campbell JS, Sakai Y, Yamashita T, Takebuchi Y, Hada K, Shirasaki T, Takabatake R, Nakamura M, Sunagozaka H, Tanaka T, Fausto N, Kaneko S. Acyclic retinoid targets platelet-derived growth factor signaling in the prevention of hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma development. *Cancer Res*. 72(17):4459-71, 2012. (doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-0028.)
 12. Kageyama Y, Ikeda H, Watanabe N, Nagamine M, Kusumoto Y, Yashiro M, Satoh Y, Shimosawa T, Shinozaki K, Tomiya T, Inoue Y, Nishikawa T, Ohtomo N, Tanoue Y, Yokota H, Koyama T, Ishimaru K, Okamoto Y, Takuwa Y, Koike K, Yatomi Y. Antagonism of sphingosine 1-phosphate receptor 2 causes a selective reduction of portal vein pressure in bile duct-ligated rodents. *Hepatology*. 56(4):1427-38, 2012. (doi: 10.1002/hep.25780.)
 13. Bruce CR, Risis S, Babb JR, Yang C, Kowalski GM, Selathurai A, Lee-Young RS, Weir JM, Yoshioka K, Takuwa Y, Meikle PJ, Pitson SM, Febbraio MA. Overexpression of sphingosine kinase 1 prevents ceramide accumulation and ameliorates muscle insulin resistance in high-fat diet-fed mice. *Diabetes*. 61(12):3148-55, 2012. (doi: 10.2337/db12-0029.)
 14. Yoshioka K, Yoshida K, Cui H, Wakayama T, Takuwa N, Okamoto Y, Du W, Qi X, Asanuma K, Sugihara K, Aki S, Miyazawa H, Biswas K, Nagakura C, Ueno M, Iseki S, Schwartz RJ, Okamoto H, Sasaki T, Matsui O, Asano M, Adams RH, Takakura N, Takuwa Y. Endothelial PI3K-C2α, a class II PI3K, has an essential role in angiogenesis and vascular barrier function. *Nat Med*. 18(10):1560-9, 2012. (doi: 10.1038/nm.2928.)

15. Biswas K, Yoshioka K, Asanuma K, Okamoto Y, Takuwa N, Sasaki T, Takuwa Y. Essential role of class II phosphatidylinositol-3-kinase-C2 α in sphingosine 1-phosphate receptor-1-mediated signaling and migration in endothelial cells. *J Biol Chem*. 288(4):2325-39, 2013. (doi: 10.1074/jbc.M112.409656.)
16. Kitade H, Sawamoto K, Nagashimada M, Inoue H, Yamamoto Y, Sai Y, Takamura T, Yamamoto H, Miyamoto K, Ginsberg HN, Mukaida N, Kaneko S, Ota T. CCR5 plays a critical role in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance by regulating both macrophage recruitment and M1/M2 status. *Diabetes*. 61(7):1680-90, 2012. (doi: 10.2337/db11-1506.)
17. Lu P, Li L, Liu G, Baba T, Ishida Y, Nosaka M, Kondo T, Zhang X, Mukaida N. Critical role of TNF- α -induced macrophage VEGF and iNOS production in the experimental corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 53(7):3516-26, 2012. (doi: 10.1167/iovs.10-5548.)
18. Arai M, Ikawa Y, Chujo S, Hamaguchi Y, Ishida W, Shirasaki F, Hasegawa M, Mukaida N, Fujimoto M, Takehara K. Chemokine receptors CCR2 and CX3CR1 regulate skin fibrosis in the mouse model of cytokine-induced systemic sclerosis. *J Dermatol Sci*. 69(3):250-8, 2013. (doi: 10.1016/j.jdermsci.2012.10.010.)
19. Egawa M, Mukai K, Yoshikawa S, Iki M, Mukaida N, Kawano Y, Minegishi Y, Karasuyama H. Inflammatory Monocytes Recruited to Allergic Skin Acquire an Anti-inflammatory M2 Phenotype via Basophil-Derived Interleukin-4. *Immunity*. 38(3):570-80, 2013. (doi: 10.1016/j.immuni.2012.11.014.)

(3-2) 知財出願

- ① 平成 24 年度特許出願件数(国内 2 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 2 件)