

特発性肺線維症における細菌由来ペプチドによる肺胞上皮細胞傷害機序の解明とそれを標的とする治療法の確立



三重大学大学院医学系研究科免疫学・助教 安間 太郎

1. 目的

特発性肺線維症（IPF）は慢性進行性に高度の線維化と肺胞構築の改変を呈する致死的な肺疾患である。IPFは診断後の中間生存期間平均3年、5年生存率が20~40%と極めて予後不良で、特にIPF急性増悪の致命率は高く、IPF患者の死亡の4割を占める。近年、薬物療法として抗線維化薬であるpirfenidoneやnintedanibが用いられ、線維化の進行を遅らせることが報告されているが、治療効果は限定的であり、新たな治療方法の開発が急務である。最近、我々は細菌由来ペプチドcorisinが肺胞上皮のアポトーシスを誘導し、肺線維症の病態に関与することを報告した（Nat Commun.24; 11 (1) : 1539）。本研究はcorisinの活性を阻害する中和モノクローナル抗体を作製し、遺伝子改変肺線維症マウスモデルを用いて、急性増悪に対する抗corisin抗体の効果を評価することにより、新しいIPF治療薬としての可能性を見出し、臨床応用への展開を計る研究基盤を構築する事を目的とする。

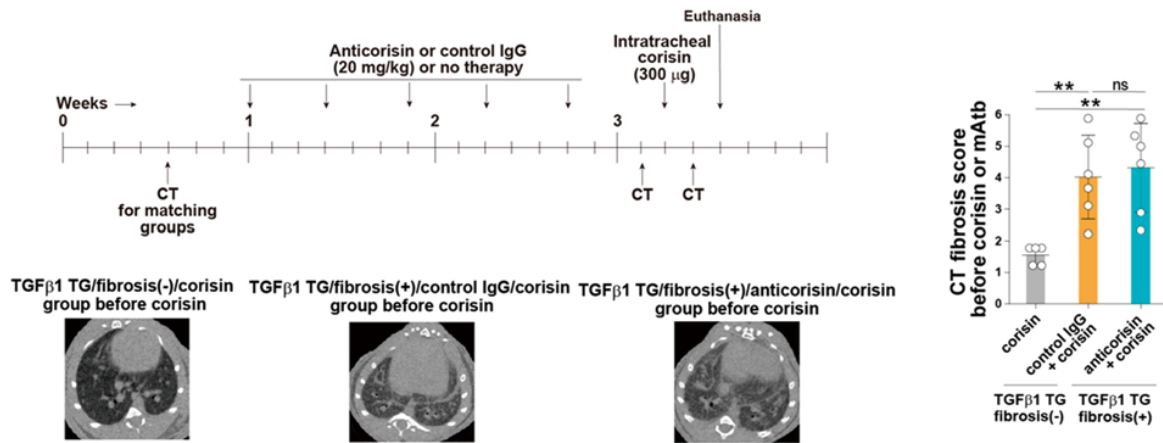
2. 方法

1) 抗corisinモノクローナル抗体の作製

corisinにより免疫したラットの脾臓B細胞よりハイブリドーマを作り、複数のモノクローナル抗corisin抗体を作製した。A549肺胞上皮細胞株を、モノクローナル抗corisin抗体の存在下でcorisinにより刺激し、FITC標識したAnnexin VとPIを用いてフローサイトメトリーによりアポトーシスを評価した。

2) TGF β 1過剰発現肺線維症モデルの急性増悪に対するcorisin抗体の効果

TGF β 1過剰発現マウスの肺micro CTを撮影し、肺線維化を有するマウスを選択し、線維化スコアが同等になるように群分けした。肺線維化を有さないマウスを陰性対照群とした。抗corisin抗体(20mg/kg)またはcontrol IgG (20mg/kg)を週3回腹腔内投与し、2週間後にcorisin300 μ gの気管内投与により急性増悪を誘導した。これらによりfibrosis (-) / corisin、fibrosis (+) / controlIgG+corisin、fibrosis (+) / anticorisin+corisinの3群に分類した（下図。実験スケジュール）。急性増悪誘導の前後で肺CTを撮影し、肺CTの変化を評価した。急性増悪誘導24時間後に気管支肺胞洗浄液（BALF）を採取し、採血と肺摘出を行った。肺組織のヘマトキシリン・エオジン染色およびマッソン・トリクローム染色を行い、線維化をAshcroft scoreにより評価した。BALFおよび血液中の炎症性サイトカイン、線維化関連因子を測定した。肺組織においてカスパーゼ3の発現をウエスタンブロット法により評価した。



実験スケジュール

3. 結果

1) 抗corisinモノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗corisin抗体21Aは、corisinにより誘導される肺胞上皮細胞のアポトーシスを有意に抑制した（図1）。このモノクローナル抗corisin抗体21Aを以下のin vivo実験に使用した。

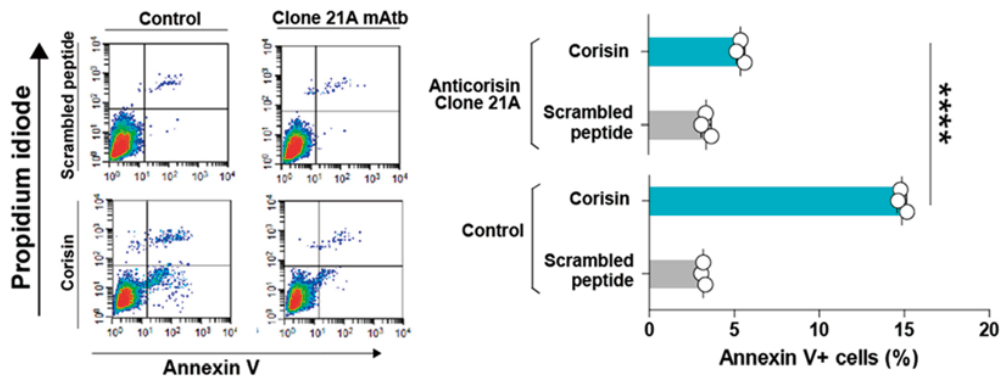


図1 A549 肺胞上皮細胞は、corisin によりアポトーシスが誘導されるが、抗 corisin 抗体によりその効果が打ち消される。

2) TGF β 1 過剰発肺線維症モデルの急性増悪に対する抗corisin抗体の効果

fibrosis (+) / controlIgG+corisin群は、fibrosis (-) / corisinと比較して、BALF中の総細胞数、リンパ球およびマクロファージの増加を認め、TGF β 1 過剰発肺線維症マウスがcorisinの気管内投与により急性増悪を来すことを確認した。fibrosis (+) / anticorisin+corisin群ではfibrosis (+) / controlIgG+corisin群と比較してこれらの上昇が抑制された。また、fibrosis (+) / controlIgG+corisin群は、fibrosis (-) / corisinと比較してまた血中およびBALF中のSP-D、MUC5B、MMP-1が有意に上昇したが、fibrosis (+) / anticorisin+corisin群ではこれらの上昇がいずれも有意に抑制された（図2）。

corisin投与前後の肺CTスコアはfibrosis (+) / controlIgG+corisin群で悪化した、fibrosis (+) / anticorisin+corisin群では、有意に改善した (図3)。Ashcroft scoreによる肺線維化の評価では、fibrosis (+) / controlIgG+corisin群において、fibrosis (-) / corisinと比較して有意に悪化し、fibrosis (+) / anticorisin+corisin群ではfibrosis (+) / controlIgG+corisin群と比較して改善傾向を認めた (図4)。

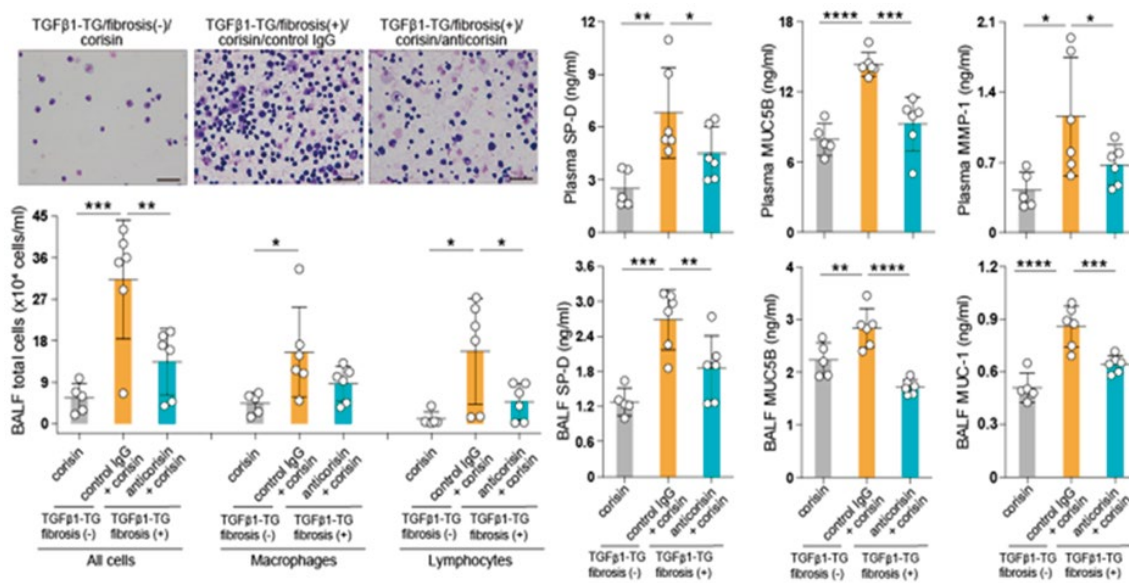


図2 抗 corisin 抗体により BALF 中の炎症性細胞、肺傷害マーカーが抑制された。

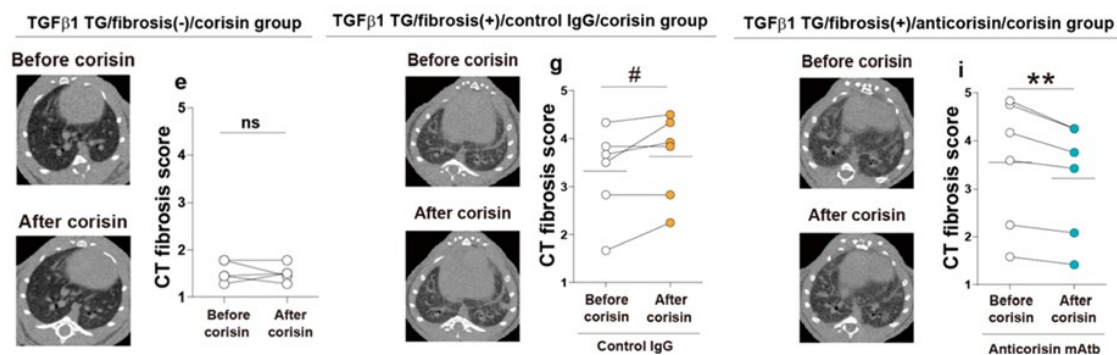


図3 抗 corisin 抗体により肺 CT スコアが改善した。

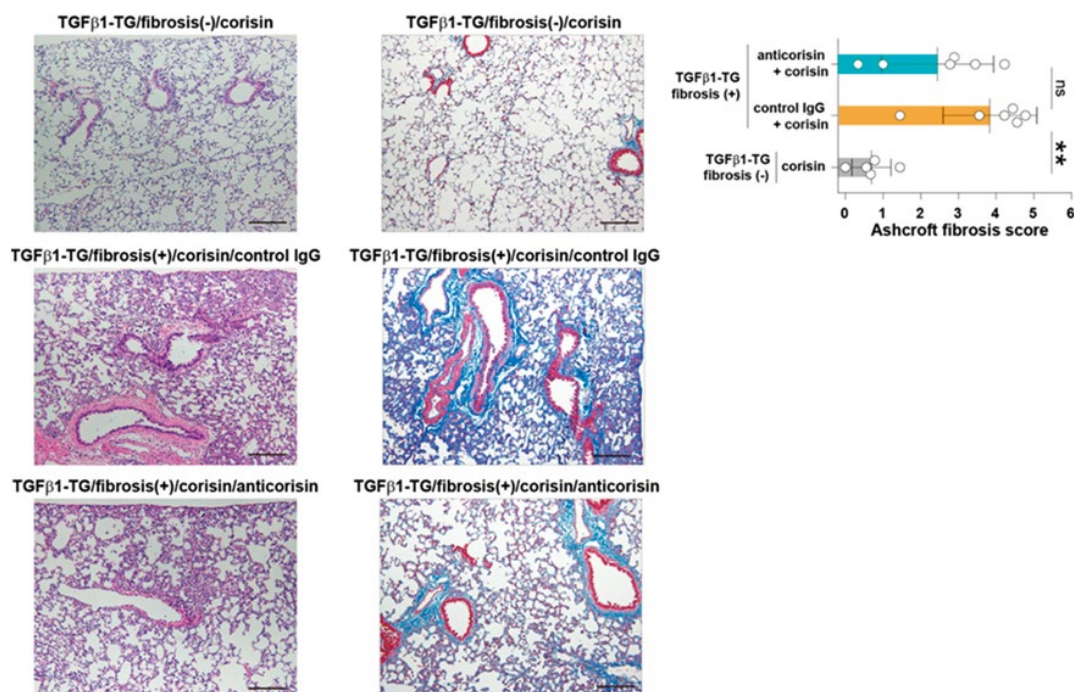


図4 抗 corisin 抗体により肺組織の線維化が抑制された。

4. 考察

本研究は、細菌由来ペプチドcorisinの肺線維症、とくに致死率の高い急性増悪における治療標的としての有用性を明らかにするため、モノクローナル抗corisin抗体を作製し、その効果について検討を行った。その結果、細菌叢由来ペプチドcorisinの気管内投与により肺線維症急性増悪が誘導され、corisinを阻害することにより、肺の炎症および線維化が改善することが明らかとなった。本研究成果は、有効な治療法が確立されていない肺線維症急性増悪において、新規の治療開発につながる可能性がある。なお本研究成果はNATURE COMMUNICATIONS誌に掲載された (Nat Commun. 2022 Mar 23 ; 13 (1) : 1558.)。

謝 辞

本研究に多大なご支援を賜りました難病医学研究財団ならびに関係者の皆様に心より感謝申し上げます。