

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

科学研究費助成事業

研究成果報告書



令和 5 年 5 月 17 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08564

研究課題名（和文）MUC5B過剰発現マウスを用いた肺線維症の細菌叢異常におけるムチンの役割の検討

研究課題名（英文）Investigating the role of mucin in pulmonary fibrosis-associated microbiota dysbiosis using MUC5B overexpressing mice

研究代表者

G a b a z z a E s t e b a n (Gabazza, Esteban)

三重大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00293770

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000 円

研究成果の概要（和文）：MUC5Bの単塩基多型（rs35705950）を有する患者では肺線維症の発症の危険度が約20倍になることが示されている。また、肺内細菌叢のアンバランスは肺線維症の病態の進行に関わっていると知られている。そこで、我々はMUC5Bの過剰発現TGマウス及び野生型マウスを用いて肺内細菌叢の特徴と肺線維症の病態形成への関与の検討を行った。その結果、肺線維症が発症したMUC5B-TGマウスと野生型マウスでは細菌叢由来の細胞死因子であるcorisinの発現が高く、炎症の昇進と肺線維症の病態形成に関与することが明らかになった。さらに、抗corisin抗体は肺線維症に対する抑制効果を示すこともわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、肺線維症マウスモデルを用いて、細菌由来細胞死誘導ペプチドが肺線維症の病態形成に関与することと抗corisinモノクローナル中和抗体が治療薬として有効であることを明らかにした。本研究で得た結果は抗肺線維化剤の開発につながる可能性があり、社会的意義が高いと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Genome-wide linkage study has shown that patients with a single nucleotide polymorphism (rs35705950) of MUC5B have a 20-fold increased risk of developing idiopathic pulmonary fibrosis. Recently, it has been reported that microbiota dysbiosis in the lungs is involved in the progression of idiopathic pulmonary fibrosis. Therefore, in this study, we used MUC5B overexpression transgenic (TG) mice and wild-type mice to examine the characteristics of microbiota in the lungs and its involvement in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. As a result, we found that the expression of corisin, a microbiota-derived cell death inducer, was high in MUC5B-TG mice and wild-type mice with pulmonary fibrosis and that it was involved in the promotion of inflammation and the pathogenesis of pulmonary fibrosis. Furthermore, we also found that anti-corisin monoclonal antibody had an inhibitory effect on pulmonary fibrosis.

研究分野：呼吸器内科・免疫

キーワード：細菌叢 細胞死 corisin 肺線維症 ムチン MUC5B 抗線維化剤 予後

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症(IPF)は慢性の進行性の線維化を伴う間質性肺炎であり、中間生存期間平均3年で、5年生存率が20~40%の予後不良の慢性難治性疾患である。最近、genome-wide linkage studyの結果により11番染色体にIPFの関連遺伝子があると明らかになっている。遺伝子の塩基配列の解析により、MUC5Bの単塩基多型(rs35705950)を有する患者ではIPF発症の危険度が約20倍になることが示されている。最近では、肺内細菌叢のアンバランスは肺線維症の病態の進行、患者の肺機能検査の悪化、死亡リスクなどと有意に関連していることが報告され、肺線維症の原因として肺内細菌叢が注目を浴びている。そこで、今回、我々はMUC5B(rs35705950)の過剰発現トランジェニックマウスを用いて肺線維症マウスモデルを作製し、肺内細菌叢の特徴と肺線維症の病態形成への関与を検討した。

## 2. 研究の目的

最近のgenome-wide linkage studyによりMUC5Bの単塩基多型であるrs35705950の過剰発現がIPFの病態形成に関わると報告され、また、肺特異的MUC5BトランジェニックマウスにおいてもMUC5Bの過剰発現が肺線維症の病態形成に関与することが確認された。しかし、どのようなメカニズムでMUC5Bが関与するのか未だ不明である。本研究では、肺線維症の発症機序に重要な役割を果たしている肺内細菌叢のアンバランスに対して、MUC5Bの過剰分泌の影響を解析し、治療標的としての有用性を評価した。さらに、本研究では、肺内細菌叢のアンバランスから肺線維症の急性増悪の進行に至る過程でのMUC5B過剰発現の役割を明らかにした。

## 3. 研究の方法

(1)ヒトMUC5B過剰発現トランジェニックマウスを用いた肺線維症における肺内細菌叢の変化の検討：C57BL/6のmucin 5B過剰発現トランジェニックマウスの背部の皮下に埋め込んだ浸透圧ポンプを用いてブレオマイシンを一週間連続皮下投与し、肺線維症モデルを作製した。気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid: BALF)、肺組織を採取する。BALF中の肺内細菌叢由来の細胞死誘導因子をELISA法で測定する。

(2)肺内細菌叢由来の細胞死誘導因子(corisin)による肺胞上皮細胞の活性化の検討：A549の肺胞上皮細胞株をcorisinで刺激して、chemokine (C-C motif) ligand 2 (CCL2)、CXCL1, interleukin-8などのmRNA発現をRT-PCR法で確認した。また、炎症性サイトカインに関わるNF- $\kappa$ Bの経路の活性化をWestern blottingで検討した。

(3)肺線維症における肺内細菌叢由来の細胞死因子(corisin)に対するモノクローナル抗体の効果の検討：野生型マウスの背部の皮下に埋め込んだ浸透圧ポンプを用いてブレオマイシン(BLM群)を一週間連続で皮下投与し、肺線維症モデルを作製した。また、野生型マウスの背部の皮下に埋め込んだ浸透圧ポンプを用いて生理食塩(Saline群)を一週間連続で皮下投与し、コントロール群を作製した。ブレオマイシン又は生理食塩の投与後、抗corisin抗体又はcontrol IgGを毎週2回、3週間、腹腔内投与した。BALF、肺組織を採取した。

## 4. 研究成果

(1)MUC5Bトランジェニックマウスを用いたブレオマイシン誘発肺線維症の検討：ブレオマイシンを投与した野生型マウス(WT/BLM)とMUC5Bトランジェニックマウス(MUC5B TG/BLM)では肺

線維症が認められた (図 1)。

(2) MUC5B トランジェニックスマウスを用いたブレオマイシン誘発肺線維症における corisin の検討 : WT/BLM 群では WT/SAL 群に比べ、BALF 中の corisin の濃度は有意に上昇した (図 2)。また、MUC5B /BLM 群では MUC5B /SAL 群に比べ、BALF 中の corisin の濃度は有意に上昇した (図 2)。

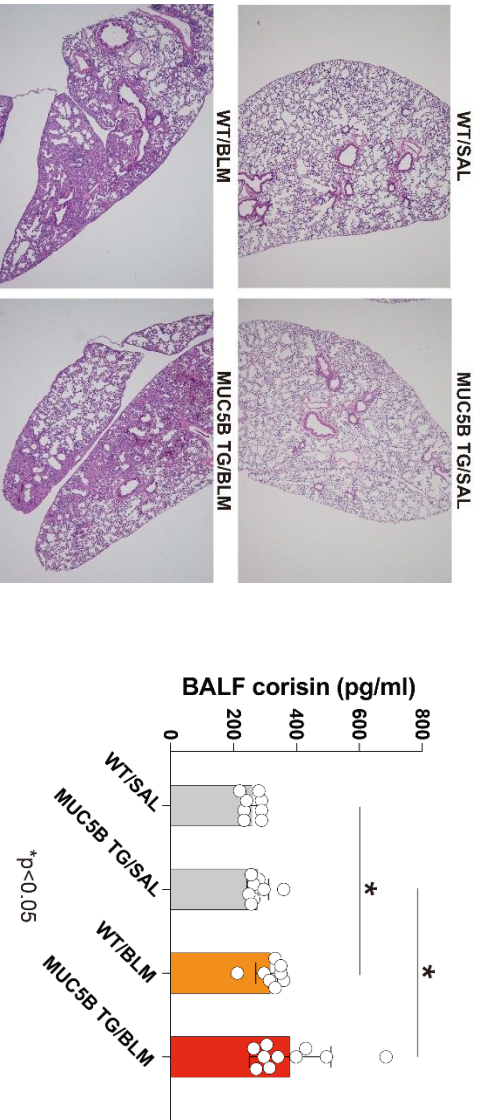


図 1. ブレオマイシン誘発肺線維症マウスモデル

図 2. BALF 中の corisin 濃度

(3) 肺胞上皮細胞における corisin の炎症促進作用 : A549 細胞を corisin と scrambled peptide の存在下で培養して 48 時間後にケモカインの mRNA 発現と NF B 経路を検討した。Corisin で刺激した肺胞上皮細胞では scrambled peptide で刺激した細胞に比べ、CCL2、CXCL1、IL-8 のケモカインの mRNA 発現は有意に上昇した。また、corisin で刺激した肺胞上皮細胞では scrambled peptide で刺激した細胞に比べ、NF B 経路は有意に活性化した (図 3) (Nat Commun. 2022;13:1558)。

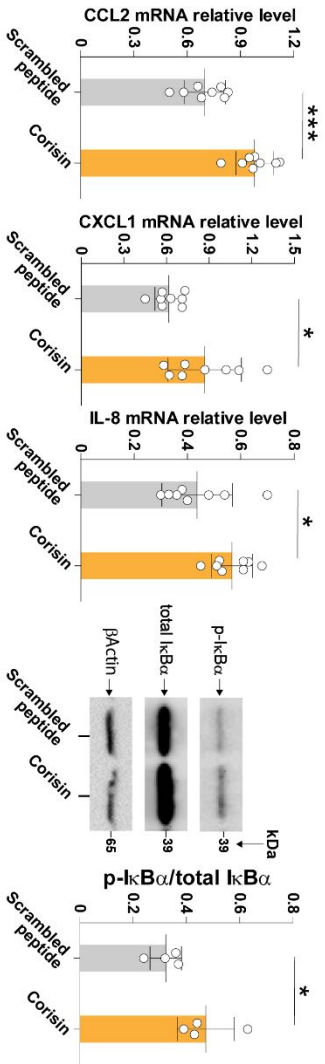


図 3. Corisin による肺胞上皮細胞の活性化

(4) 急性肺組織損傷に対する抗 corisin モノクローナル抗体投与の効果 : Control IgG を投与した BLM 群では control IgG を投与した Saline 群に比べ、血漿と BALF 中の osteopontin は有意に上昇した。しかし、抗 corisin モノクローナル抗体を投与した BLM 群では control IgG を投与した BLM 群に比べ、血漿と BALF 中の osteopontin の濃度は有意に低下した (図 4) (Nat Commun. 2022;13:1558)。

(5) ブレオマイシン誘発肺線維症に対する抗 corisin モノクローナル抗体投与の効果 : Control IgG を投与した BLM 群では control IgG を投与した Saline 群に比べ、肺線維症の程度は有意

に上昇した。しかし、抗 corisin モノクローナル抗体を投与した BLM 群では control IgG を投与した BLM 群にくらべ、肺線維症の程度は有意に低下した( 図 5 )( Nat Commun. 2022;13:1558 )。

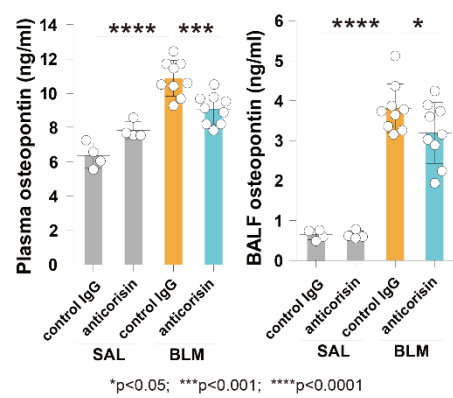


図 4. 血漿と BALF 中の osteopontin の濃度

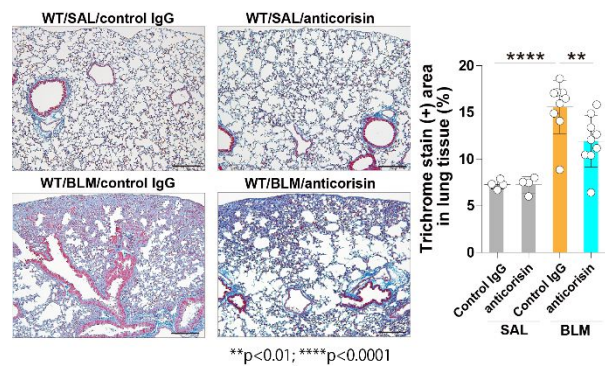


図 5. 肺線維症の組織所見

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 D ' Alessandro-Gabazza CN, Yasuma T, Kobayashi T, Toda M, A-H AM, Fujimoto H, Hataji O, Nakahara H, Takeshita A, Nishihama K, Okano T, Saiki H, Okano Y, Tomaru A, F D V, Shiraishi M, Mizoguchi A, Ono R, Ohtsuka J, Fukumura M, Nosaka T, Mi X, S D, Kataoka K, Kondoh Y, Hirose M, Arai T, Inoue Y, Yano Y, M RI, Cann I, Gabazza EC	4. 巻 13
2. 論文標題 Inhibition of lung microbiota-derived proapoptotic peptides ameliorates acute exacerbation of pulmonary fibrosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1558 ~ 1558
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-29064-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Abdel-Hamid Ahmed M, D ' Alessandro-Gabazza Corina N, Yasuma Taro, Walden Kimberly K. O, Fields Christopher J, Gabazza Esteban C, Cann Isaac	4. 巻 -
2. 論文標題 Complete Genome Sequences of Three Staphylococcus haemolyticus Strains Isolated from the Lung of a TGF 1 Transgenic Mouse with Lung Fibrosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e0117621
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mra.01176-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yasuma Taro, D ' Alessandro-Gabazza Corina N., Fujimoto Hajime, Kobayashi Tetsu, Gabazza Esteban C.	4. 巻 205
2. 論文標題 Response of Lung Microbiota to Changes of Pulmonary Innate Immunity under Healthy Conditions	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine	6. 最初と最後の頁 477 ~ 477
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1164/rccm.202109-2187LE	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nishii Yoichi, Furuhashi Kazuki, Nakamura Saki, Nishio Miho, Nakamura Yuki, Ushiro Kengo, Ito Kentaro, Sakaguchi Tadashi, Suzuki Yuta, Fujiwara Kentaro, Yasuma Taro, Kobayashi Tetsu, D'Alessandro-Gabazza Corina, Gabazza Esteban C, Taguchi Osamu, Hataji Osamu	4. 巻 Volume 14
2. 論文標題 The Potential of Digital Polymerase Chain Reaction for Improving Diagnostic Yield of Nontuberculous Mycobacteria Pulmonary Disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Infection and Drug Resistance	6. 最初と最後の頁 5079 ~ 5087
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/IDR.S338165	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Saiki Haruko, Okano Yuko, Yasuma Taro, Toda Masaaki, Takeshita Atsuro, Abdel-Hamid Ahmed M., Fridman D' Alessandro Valeria, Tsuruga Tatsuki, D' Alessandro-Gabazza Corina N., Katayama Kan, Sugimoto Masahiko, Fujimoto Hajime, Yamanaka Keiichi, Kobayashi Tetsu, Cann Isaac, Gabazza Esteban C.	4. 巻 10
2. 論文標題 A Microbiome-Derived Peptide Induces Apoptosis of Cells from Different Tissues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 2885 ~ 2885
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10112885	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kobayashi Tetsu, Hataji Osamu, Fujimoto Hajime, D' Alessandro-Gabazza Corina, Yasuma Taro, Gabazza Esteban C.	4. 巻 201
2. 論文標題 Too Premature to Deny the Potential of Thrombomodulin Alfa in Idiopathic Pulmonary Fibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine	6. 最初と最後の頁 1449 ~ 1450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1164/rccm.202002-0271LE	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Okano Tomohito, Kobayashi Tetsu, Yasuma Taro, D' Alessandro-Gabazza Corina N., Toda Masaaki, Fujimoto Hajime, Nakahara Hiroki, Okano Yuko, Takeshita Atsuro, Nishihama Kota, Saiki Haruko, Tomaru Atsushi, Fridman D' Alessandro Valeria, Ishida Satoru, Sugimoto Hiromi, Takei Yoshiyuki, Gabazza Esteban C.	4. 巻 11
2. 論文標題 Low-Dose of Intrapulmonary Pirfenidone Improves Human Transforming Growth Factor 1-Driven Lung Fibrosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Pharmacology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphar.2020.593620	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Pereira Gabriel V., Abdel-Hamid Ahmed M., Dutta Soumajit, D' Alessandro-Gabazza Corina N., Wefers Daniel, Farris Jacob A., Bajaj Shiv, Wawrzak Zdzislaw, Atomi Haruyuki, Mackie Roderick I., Gabazza Esteban C., Shukla Diwakar, Koropatkin Nicole M., Cann Isaac	4. 巻 12
2. 論文標題 Degradation of complex arabinoxylans by human colonic Bacteroidetes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-20737-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Asturo Takeshita, Taro Yasuma, Yuko Okano, Kota Nishihama, Valeria Fridman D'Alessandro, Masaaki Toda, Corina N. D'Alessandro-Gabazza, Yutaka Yano, Esteban C. Gabazza
2. 発表標題 Amelioration of kidney fibrosis and dysfunction by recombinant thrombomodulin
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yuko Okano <sup>1</sup> , Atsuro Takeshita, Kota Nishihama, Valeria Fridman, Taro Yasuma, Corina Gabazza, Masaaki Toda, Yutaka Yano, Esteban Gabazza
2. 発表標題 A microbiome-derived peptide induces apoptosis of cells from different tissues
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Valeria Fridman D'Alessandro, Taro Yasuma, Masaaki Toda, Atsuro Takeshita, Corina D'Alessandro Gabazza, Yuko Okano, Yutaka Yano, Esteban Gabazza
2. 発表標題 Thrombomodulin suppresses apoptosis of podocytes by activating Akt signal pathway
3. 学会等名 第50回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡野 智仁、鶴賀 龍樹、齊木 晴子、藤原 拓海、浅山 健太郎、高橋 佳紀、都丸 敦史、中原 博紀、藤本 源、小林 哲、ガバザ エステバン
2. 発表標題 抗甲状腺薬によるANCA関連間質性肺炎と考えられた1例
3. 学会等名 第117回日本呼吸器学会東海地方会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中原 博紀、小林 哲、齊木 晴子、藤原 拓海、岡野 智仁、浅山 健太郎、都丸 敦史、高橋 佳紀、藤本 源、ガバザ コリナ、ガバザ エステバン
2. 発表標題 TGF- 1過剰発現マウスを用いた肺線維化と発癌に関する検討
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 都丸 敦史、小林 哲、齊木 晴子、浅山 健太郎、岡野 智仁、藤原 拓海、高橋 佳紀、中原 博紀、藤本 源、ガバザ エステバン
2. 発表標題 MUC5Bのrs35705950単塩基多型過剰発現トランスジェニックマウスの作製
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohito Okano, Tetsu Kobayashi, Haruko Saiki, Takumi Fujiwara, Kentaro Asayama, Yoshinori Takahashi, Atsushi Tomaru, Hiroki Nakahara, Hajime Fujimoto, Corina N. D ' Alessandro-Gabazza, Esteban C. Gabazza
2. 発表標題 The Role of Matrix Metalloproteinase-2 in Pulmonary Fibrosis
3. 学会等名 第60回日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	戸田 雅昭  (Toda Masaaki)  (10202201)	三重大学・医学系研究科・講師   (14101)	



6．研究組織（つづき）

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
研究 分担者	竹下 敦郎  (Takeshita Atsuro)  (10830490)	三重大学・医学系研究科・助教    (14101)	
研究 分担者	安間 太郎  (Yasuma Taro)  (80773887)	三重大学・医学系研究科・助教    (14101)	
研究 分担者	小林 哲  (Kobayashi Tetsu)  (20437114)	三重大学・医学部附属病院・教授    (14101)	

7．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------