

**PRESS RELEASE** : 呼吸器基礎疾患の有無に根差した、より安全で効果的な  
粘膜ワクチンの最適化の研究

## 特発性肺線維症の末梢血単核球トランスクリプトームへの 抗線維化薬の影響

### Effects of Anti-Fibrotic Drugs on Transcriptome of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis

本研究成果は、2024年3月28日に科学誌「International Journal of Molecular Sciences」  
に掲載されました。

#### 【要約】

特発性肺線維症(IPF)の治療には、ピルフェニドン(PFD)とニンテダニブ(NTD)の2種類の抗線維化薬が使用されています。末梢血単核球(PBMC)は免疫担当細胞であり、IPFの病態に関連する細胞間相互作用を制御している可能性があります。我々は、RNAシーケンシングを用いて、IPF患者のバルクPBMCにおけるトランスクリプトームについて健常者(HC)との比較、および抗線維化薬の効果について調べました。「IPF患者と健常対照者」、「抗線維化薬治療前後」の発現変動遺伝子(DEGs)を解析しました。エンリッチメント解析の結果、NTDによる治療は脂肪酸伸長酵素 *ELOVL6* の発現を上昇させることから、脂肪酸伸長はTGF- $\beta$ /Smadシグナル伝達と酸化ストレスの産生を抑制することが示唆されました。活性化された単球由来のマクロファージは組織損傷時にコラーゲン、I型、およびalpha 1の産生に関与しますが、PFDによる治療は、創傷治癒コラーゲンを生成する *COL1A1* の発現を低下させます。Plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1)は、プラスミンを介したマトリックスメタロプロテアーゼの活性化を阻害することにより創傷治癒を制御し、PAI-1活性の阻害は肺線維症を軽減します。DEG解析により、PFDとNTDの両方がPAI-1活性を制御する *SERPINE1* の発現を上昇させることが示唆されました。この研究は、RNAシーケンシングを用いて特発性肺線維症患者のPBMCを調べるという新しいアプローチを取り入れており、治療の標的となり得る全身的なバイオマーカーまたは経路を明らかにできる可能性が示唆されました。

キーワード：特発性肺線維症;末梢血単核球(PBMC);RNAシーケンシング;トランスクリプトーム;ピルフェニドン;ニンテダニブ

## 【研究成果】

### 1. 研究の背景

特発性肺線維症（IPF）は、未だその正確な病態は不明な肺の慢性的、進行性線維化を特徴とし、予後不良な疾患である。完全には解明されていないが、IPF の病態には、反復的な上皮傷害、傷害を受けた肺胞のその後の異常修復、活性化した線維芽細胞（筋線維芽細胞）による細胞外マトリックス（ECM）の広範な沈着が関与している可能性があります。現在、2 種類の抗線維化薬、ピルフェニドン（PFD）とニンテダニブ（NTD）が肺線維症の進行を遅らせるために使用されています。PFD は、TGF- $\beta$ 1 などの線維化促進因子や、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-13 などの炎症性サイトカインの発現を低下させます。NTD は、血管内皮増殖因子（VEGF）受容体 1、2、3、血小板由来増殖因子（PDGF）受容体  $\alpha$ 、 $\beta$ 、線維芽細胞増殖因子（FGF）受容体 1、2、3 を標的とするチロシンキナーゼ阻害剤です。しかしながら、進行性線維症におけるこれらの薬剤の詳細な作用機序は、依然として不明です。末梢血単核球（PBMC）は、おもに単球とリンパ球で構成されます。最近の多施設コホート研究で、単球数の多さは IPF を含む線維性疾患における予後不良のバイオマーカーであることが報告されています。リンパ球機能の低下は、IPF における呼吸機能障害と関連しています。これらの研究は、PBMC 機能と IPF との密接な関連を示唆しています。最近、上皮細胞と線維芽細胞間のクロストークなど、細胞間相互作用の調整における免疫細胞の重要な役割について述べた文献が増加しています。しかしながら、免疫担当 PBMC と IPF の病態との関係は、依然として不明です。

本研究では、バルク RNA シーケンシング解析を用いて、IPF 患者における PBMC トランスクリプトームについて健常者コントロール(HC)との比較、および抗線維化薬の効果について探索しました。

#### 2.1. IPF と HC の PBMC におけるトランスクリプトームの比較

まず、IPF 患者における PBMC のトランスクリプトームの特徴を探索しました。抗線維化療法を受けていない IPF 患者(n=6)と HC(n=6)の遺伝子発現レベルを主成分分析（PCA）により比較すると、2 群間の違いが明らかになりました（図 1a）。12,347 遺伝子の log<sub>2</sub>-fold change と p-value の分布をボルケーノプロットで示し、207 の DEGs（発現変動 > 2 または < 0.5 倍）を色でハイライトしました（図 1b）。HC と比較した IPF 患者の PBMC における 127 の発現低下遺伝子と 80 の発現上昇遺伝子を持つ 207 の DEGs のヒートマップは、2 群間のトランスクリプトームの違いを示しました（図 1c）。HC と比較した IPF 患者の PBMC におけるトランスクリプトームをさらに探索するために、DEGs を用いてエンリッチメント解析を行いました。遺伝子オントロジー（GO）解析の結果、様々な生物学的プロセスと分子機能が有意に多く観測できました。また、KEGG pathway 解析の結果、「Synaptic vesicle cycle (DEGs ; RAB3A and STX1A) 」および「Insulin secretion (DEGs ; RAB3A and STX1A) 」を含む複数のパスウェイが上昇し、「Calcium signaling pathway (DEGs : EGF, TNNC2, PDGFB, CACNA1A, PDGFA and AVPR1A) 」、および「Fatty acid elongation (DEGs ; ACOT7 and ELOVL7) 」は低下していました。

## 2.2. PFD 投与前後の PBMC におけるトランスクリプトームシグネチャーの比較

IPF 患者の PBMC のトランスクリプトームに対する PFD 治療の潜在的な影響を調べるため、PFD 投与前後で解析を行いました（各々n=3）。

遺伝子発現レベルを PCA により比較した結果、PFD 投与前後 2 群間の違いが明らかであり、ボルケーノプロットで示された 170 の DEGs のヒートマップは、PFD 投与前と比較して、PFD 投与後の PBMC で 98 の発現低下遺伝子と 72 の発現上昇遺伝子を示し、PFD 治療によるトランスクリプトームの変化を検出しました。潜在的な PFD 作用メカニズムに関連する既知の分子である TGF- $\beta$ 1、TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  のトランスクリプトームレベルを評価しましたが、PFD 投与前後間に有意差は認められませんでした。

PFD 治療後の PBMC のトランスクリプトームの GO 解析の結果、様々な生物学的プロセスと分子機能が有意に多く観測できました。KEGG pathway 解析の結果、「p53 signaling pathway (DEGs ; CCNE1 and SERPINE1) 」は上昇し、「Ameobiasis (DEGs ; COL1A1, GNAL and C8G) 」は低下していました。

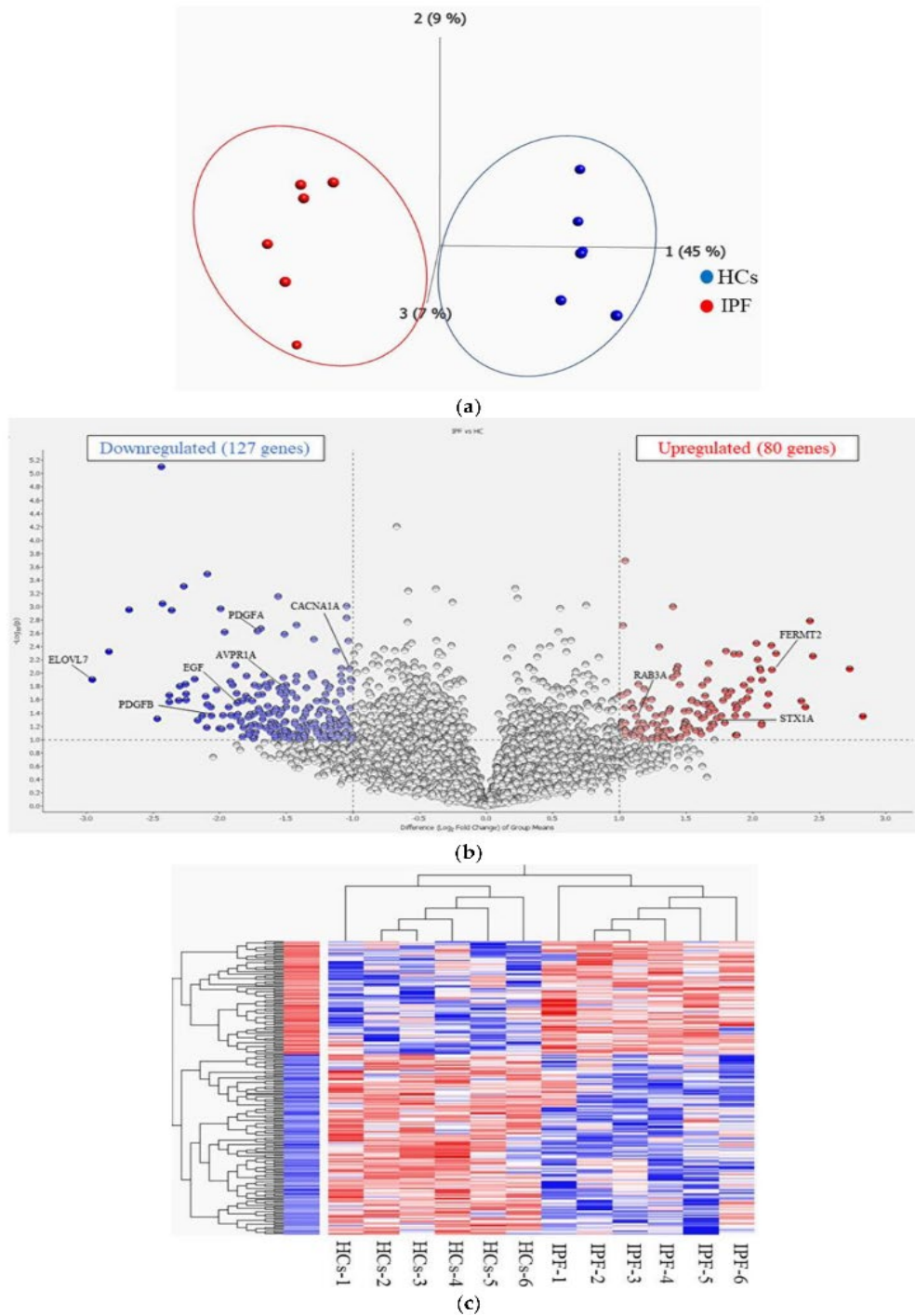


図 1 (a) 主成分分析 (PCA)。特発性肺線維症 (IPF) と健常コントロール (HC) が大きな 2 つのグループに分けられます。(b) 発現差のある遺伝子 (DEGs) のボルケーノプロット。12,347 遺伝子の  $\log_2$ -fold change と  $p$ -value の分布を示すボルケーノプロット。色のついた点は IPF と HC の間の 207 の DEGs を表す。赤い点は高発現、青い点は低発現を示す。(c)。IPF と HC の DEGs のヒートマップ。赤い棒は高発現、青い棒は低発現を示す。

### 2.3. NTD 投与前後の PBMC におけるトランスクリプトームシグネチャーの比較

IPF 患者の PBMC のトランスクリプトームに対する抗線維化薬 NTD の潜在的効果を探るために、上記と同様に NTD 投与前後で解析を行いました (各 n=3)。

NTD 投与前後の PBMC のトランスクリプトームは PCA を行った結果、2 つのグループに明らかに違いがあり、ボルケーノプロットで示された 198 個の DEGs のヒートマップは、NTD 投与前の遺伝子と比較して、NTD 投与後の PBMC で 103 個の発現低下遺伝子と 95 個の発現上昇遺伝子を示し、NTD 投与によるトランスクリプトームの変化を検出しました。潜在的な NTD メカニズムに関連する分子として知られる VEGFR、PDGFR、FGFR のトランスクリプトームレベルを評価したところ、NTD 投与前後で有意差は認められませんでした。NTD 治療後に PBMC で調節されたトランスクリプトームをさらに探索するため、DEGs を用いたエンリッチメント解析を行いました。GO 解析の結果、様々な生物学的プロセスと分子機能が有意に多く観測できました。KEGG pathway 解析の結果、「Fatty acid elongation (DEGs ; ACOT7、ELOVL6 and PPT2)」および「p53 signaling pathway (DEGs ; CCNB2、SERPINE1 and CDK1)」を含むパスウェイが上昇し、「Insulin secretion (DEGs ; KCNN3 and CACNA1F)」が低下していました。

### 3. まとめ

本研究は、PBMC のバルク遺伝子発現パターンが IPF 患者と HC で異なり、IPF の抗線維化治療によって影響を受けることを示唆しています。PBMC の遺伝子発現パターンの変化は、IPF の病態とこれら 2 種類の抗線維化薬の薬理効果を反映しています。本研究の結果は、PFD または NTD による抗線維化治療が PBMC のトランスクリプトームに影響を及ぼし、これら 2 つの抗線維化薬の機能におけるメカニズム上の違いの可能性を示唆しました。これらの新たな知見は、IPF の病態の理解を深め、IPF の潜在的な治療標的を同定することにつながり、新しい治療法の開発に寄与することが期待されます。

また、呼吸器基礎疾患の有無に根差した、より安全で効率的な粘膜ワクチンの最適化を得ることを目的に、呼吸器疾患患者を中心に末梢血単球の網羅的な遺伝子発現解析を進めています。RNA シーケンシングを用いて特発性肺線維症患者の末梢血単核球を調べるという新しいアプローチを取り入れることにより、ヒト末梢血単核球は免疫担当細胞であり、特発性肺線維症の病態に関連する細胞間相互作用を制御している可能性が示唆され、特発性肺線維症の病態の理解を深めることができました。

発表詳細は下記の URL からご覧ください。

#### 【掲載誌名】

International Journal of Molecular Sciences

#### 【論文タイトル】

Effects of Anti-Fibrotic Drugs on Transcriptome of Peripheral Blood Mononuclear Cells in Idiopathic Pulmonary Fibrosis

**【著者】**

Daisuke Ishii <sup>1</sup>, Takeshi Kawasaki <sup>1,\*</sup>, Hironori Sato <sup>2</sup>, Koichiro Tatsumi <sup>1</sup>, Takuro Imamoto <sup>1</sup>, Keiichiro Yoshioka <sup>1</sup>, Mitsuhiro Abe <sup>1</sup>, Yoshinori Hasegawa <sup>3</sup>, Osamu Ohara <sup>3</sup> and Takuji Suzuki <sup>1,4</sup>

**【著者（日本語表記）】**

石井 大典 <sup>1</sup>, 川崎 剛 <sup>1,\*</sup>, 佐藤 裕範 <sup>2</sup>, 巽 浩一郎 <sup>1</sup>, 今本 拓郎 <sup>1</sup>, 吉岡 慶一郎 <sup>1</sup>, 安部 光洋 <sup>1</sup>, 長谷川 嘉則 <sup>3</sup>, 小原 収 <sup>3</sup>, 鈴木 拓児 <sup>1,4</sup>

**【著者所属】**

1. 千葉大学大学院医学研究院 呼吸器内科学
2. 千葉大学大学院医学研究院 小児病態学
3. 公益財団法人かずさDNA 研究所 ゲノム事業推進部
4. 千葉大学未来粘膜ワクチン研究開発シナジー拠点

\*Correspondence:kawatake@chiba-u.jp

**【DOI】**10.3390/ijms25073750

**【URL】**<https://doi.org/10.3390/ijms25073750>

**【研究助成】**

本研究は、日本学術振興会科学研究費助成事業(課題番号 19K17663、22K16163、22H03076); 2019年度「GSKジャパン研究助成」; Therapeutics Research Initiative Grant from Chiba University School of Medicine 2019-G6; AMED-CREST「革新的先端研究開発支援事業ユニットタイプ」気道組織における病的リモデリング(線維化)機構の解明と病態制御治療戦略の基盤構築(JP21gm1210003); AMED SCARDA「ワクチン開発のための世界トップレベル研究開発拠点の形成事業」ワクチン開発のための世界トップレベル研究開発拠点群 千葉シナジーキャンパス(千葉大学 未来粘膜ワクチン研究開発シナジー拠点)(JP223fa627003); AMED-CREST「免疫記憶の理解とその制御に資する医療シーズの創出」外部環境刺激による組織炎症記憶形成機構の解明と難治性アレルギー性疾患の病態制御治療戦略の基盤構築(JP23gm1810009); 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業(課題番号 20FC1027、23FC1031)の支援の下で実施されました。

**【本リリースに関するお問い合わせ先】**

千葉大学未来粘膜ワクチン研究開発シナジー拠点 (cSIMVa) URA 大江洋子