

主論文の要旨

**Fibroblasts positive for meflin have anti-fibrotic  
property in pulmonary fibrosis**

〔 肺線維症において抗線維化作用を持つメフリン陽性線維芽細胞 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
病態内科学講座 呼吸器内科学分野

(指導：橋本 直純 准教授)

中原 義夫

## 【緒言】

特発性肺線維症 (IPF) に対する薬物療法のアプローチは臨床的に進歩しているが、IPF の予後は依然として不良である。IPF の病因は未だ不明であるが、線維芽細胞や上皮細胞の細胞老化などの加齢に伴う反応が関与している可能性が示唆されている。一方、IPF 肺の線維芽細胞は、正常な肺線維芽細胞とは異なる不均一な表現型を持っており、その多様性が肺線維症の病因の理解を困難にしている。IPF の病態を解明するためには、特定の機能を持った線維芽細胞の集団を同定する必要がある。シングルセル RNA シーケンシング (scRNA-seq) の登場により、肺線維症の発症過程における様々な細胞集団の不均一性が明らかになった。しかし線維芽細胞に関しては、IPF 肺から線維化を促進または抑制するような表現型を持つ集団を同定できていない。こうした中、メフリン (ISLR) が線維芽細胞や周皮細胞などの間葉系間質細胞 (MSC) の潜在的なマーカーとして同定されたが、肺線維症におけるメフリン陽性線維芽細胞の発現プロファイルやその機能は明らかではなかった。本研究の目的は、肺線維症の発症におけるメフリン陽性線維芽細胞の機能を明らかにすることである。

## 【方法】

肺組織を構成する各細胞における ISLR の発現プロファイルを調べるため、移植ドナー肺及び IPF 肺から採取した細胞を scRNA-seq によって解析した。IPF 肺組織中のメフリンの局在を *in situ hybridization* (ISH) を用いて検討した。C57BL/6J (WT) マウスおよびメフリン欠損マウス (KO マウス) を用いてブレオマイシン (BLM) 肺線維症モデルを作成し、肺組織および気管支肺胞洗浄液 (BALF) を評価した。WT マウス及びメフリン KO マウスから初代肺線維芽細胞を単離 (WT 線維芽細胞及び KO 線維芽細胞) し、Transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 誘導表現型に対するメフリンの効果の評価した。レンチウイルスを用いて、KO 線維芽細胞におけるメフリン再構成モデルを構築し、メフリンが線維芽細胞における TGF- $\beta$  誘導表現型を抑制できるかを検証した。ヒト肺線維芽細胞に対してレンチウイルスを用いてメフリンを安定発現させ、TGF- $\beta$  誘導表現型に対する抗線維化効果の評価した。細胞外に分泌されたメフリンの抗線維化効果の評価するために、KO 線維芽細胞及びマウス肺上皮細胞株 (MLE-12) をメフリン安定発現 HEK293FT 細胞の培養上清で処理し、TGF- $\beta$  誘導表現型に与える影響を検証した。

## 【結果】

### 1. scRNA-seq 解析に基づくヒト肺における ISLR 発現細胞の特徴

移植ドナー肺 29 例および IPF 肺 32 例から採取した 243,472 個の細胞を scRNA-seq 解析したところ、各細胞は 38 個の異なる遺伝子発現を示すクラスターに分けられ、さらに古典的なマーカーの発現パターンによって 6 つのグループに大別された (Fig.1B)。ISLR はこのうち線維芽細胞および筋線維芽細胞を示すグループに特異的に発現していた (Fig.1C)。

### 2. IPF 肺組織における ISLR 陽性細胞の局在評価

IPF 肺の組織切片を ISH によって評価したところ、活動性の線維化病変を示唆する fibroblastic foci (FF) において、線維芽細胞の 70% に ISLR が発現していた (Fig.2E-I,M)。一方で癒痕化した線維化病変においては、ISLR 陽性細胞はわずかであり、70% 以上が筋線維芽細胞のマーカーである ACTA2 を発現していた (Fig.2J-L,M,O)。

### 3. BLM 肺線維症モデルにおけるメフリンの抗線維化作用

WT マウスに対して BLM 肺線維症を作成したところ、肺ホモジネート中のメフリンの発現は肺線維化の進行に伴い時間依存的に増加していた (Fig.3A-C)。BALF 上清中においても BLM 投与マウスでメフリンの蛋白発現が増加していた (Fig.3D)。メフリン KO マウスで BLM 誘発肺線維症モデルを作成したところ、BLM を投与した KO マウスの肺は、組織学的に高度の線維化が見られ、肺内の細胞外マトリックス (ECM) 量が WT マウスと比較して有意に増加していた (Fig.3E-R)。

### 4. 肺線維芽細胞への TGF- $\beta$ 刺激に対するメフリンの抗線維化作用

マウス肺より単離した WT 線維芽細胞を TGF- $\beta$  刺激すると、細胞内のメフリンの発現が 80% 以上減少した (Fig.4A-B)。KO 線維芽細胞を TGF- $\beta$  刺激すると、WT 線維芽細胞と比較して、Smad2/3 の活性化に加えて ECM や  $\alpha$  平滑筋アクチン ( $\alpha$ SMA) の発現が有意に増加し (Fig.4A,C-E)、さらに細胞増殖能が低下していた (Fig.4F)。TGF- $\beta$  刺激した KO 線維芽細胞では、SA- $\beta$ gal (senescence-associated  $\beta$ -galactosidase) 陽性細胞が多く (Fig.4G)、p16ink4a、p19arf といった細胞老化マーカーや Il6、Il1b などの SASP (senescence-associated secretory phenotype)、さらに Tgfb1 の遺伝子発現が有意に増加していた (Fig.4H-L)。レンチウイルスを用いて、KO 線維芽細胞におけるメフリン再構成モデルを構築した。メフリン遺伝子を導入した KO 線維芽細胞では、TGF- $\beta$  刺激による Smad2/3 活性化及び ECM、 $\alpha$ SMA の発現が抑制された (Fig.4M,O-Q)。さらに、TGF- $\beta$  による細胞増殖の抑制が緩和され (Fig.4R)、SA- $\beta$ gal 陽性細胞の割合が減少し (Fig.4S)、細胞老化マーカーや SASP の遺伝子発現も抑制された (Fig.4T-X)。正常ヒト肺線維芽細胞に対してもレンチウイルスを用いてメフリン遺伝子を導入したところ、同様に TGF- $\beta$  によって誘導される Smad2/3 の活性化や ECM、 $\alpha$ SMA の発現が抑制された (Fig.5A-J)。

### 5. 肺線維芽細胞への TGF- $\beta$ 刺激に対する細胞外分泌メフリンの抗線維化作用

TGF- $\beta$  刺激したマウス肺上皮細胞株 (MLE-12) および KO 線維芽細胞を、可溶性メフリンを含む培養液で処理したところ、KO 線維芽細胞では ECM の発現抑制が見られた (Fig.5L-N)。一方、MLE-12 ではフィブロネクチン、E カドヘリンの発現抑制が見られなかった (Fig.5O-S)。

## 【結語】

メフリン陽性線維芽細胞は肺線維症の病態形成において抗線維化作用を示す、機能的な細胞集団であることが明らかになった。