

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08940

研究課題名(和文) マクロファージ表面マーカーを指標とした間質性肺炎の新規診断法の開発と病態機序解明

研究課題名(英文) Development of diagnostic methods in interstitial pneumonia via surface markers of macrophages

研究代表者

山下 雅大 (YAMASHITA, MASAHIRO)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：10606685

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：D14strongCD16negative単球におけるS100A9/CD163の発現を指標にしたflowcytometerを用いた間質性肺炎の鑑別診断法を開発した。IPF/UIPにおいてS100A9+CD163-陽性細胞比率が上昇しておりNSIPとの鑑別においてROC-AUC0.838を示し、本方法がIPFの臨床診断に有用であることを示した。慢性閉塞性肺疾患(COPD)についてもCOPD群では有意にS100A9+CD163-陽性細胞比率が上昇しており、現喫煙者に対するCOPDの診断的価値はROC-AUC0.719を示し、本方法がCOPDの臨床診断に有用であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
特発性間質性肺炎診断の補助診断として有用である。また喫煙者における早期COPD診断の補助診断に使用できる。

研究成果の概要(英文)：We determined whether cellular phenotypes on circulating monocytes could be helpful for discriminating IPF from idiopathic nonspecific interstitial pneumonia (iNSIP). Using flowcytometer, we found that S100A9+CD163- cell rates in classical monocytes were significantly increased in IPF relative to iNSIP, and yielded the independent association with IPF in multivariate regression analyses and a receiver operating characteristic-area under the curve of 0.838 (95% CI [0.715-0.961], $p < 0.0001$) for the diagnoses. In addition, the ratio yielded a ROC-AUC value of 0.719 (95% CI = 0.567-0.871) for discrimination between smokers with normal lung functions and COPD patients. Our results demonstrated increased pro-inflammatory phenotypes in circulating classical monocytes in IPF and COPD, providing novel insights to elucidate their roles in the pathogenesis of these conditions.

研究分野：病態検査学 呼吸器病学

キーワード：間質性肺炎 慢性閉塞性肺疾患 単球 表面マーカー

1. 研究開始当初の背景

特発性間質性肺炎 (IIPs) は 9 つの病型からなり特発性肺線維症 (IPF/UIP)、非特異的間質性肺炎 (NSIP)、特発性器質性肺炎 (COP) の頻度が高く、この順序で予後が悪い。COP や NSIP がステロイドなどの抗炎症治療に比較的良く反応し予後良好であるのに対して、IPF/UIP はステロイドが返って予後を悪化させる場合がある。従ってその鑑別診断は治療法選定および予後予測の点で極めて重要である。鑑別診断に病理学的アプローチは重要なものと位置づけられている。しかしながら、臨床病理医による間質性肺炎診断は一定ではないという問題を孕んでおり、新たな鑑別診断マーカーの考案が求められていた。また IPF/UIP はここ数年抗線維療法の普及により予後の改善が得られたものの未だ治癒には至らず、本病態のさらなる解明が急がれている。

マクロファージには M1 型と M2 型に代表されるように複数のサブセットを認め、表面マーカーや機能が異なる。特に M2 型については線維化を助長するとする報告と線維化を阻害する報告など、役割は定まっていない。IIPs においてそのサブセットを特徴付けた報告は未だ無い。そこで、我々はこれまでにマクロファージの表面マーカーを指標として IIPs の各病型におけるマクロファージのサブセット構成を外科的肺生検によって得られた肺組織における免疫組織化学的方法と形態計測を用いた検討を行ってきた。本学にて診断された IPF/UIP21 例、NSIP17 例、COP8 例、肺癌の手術標本の健常部 12 例を対象とし、M1 型および M2 型マクロファージのマーカーとして各々 S100A9 と CD163 および CD206 を用い解析した。研究成果は S100A9 は IPF、NSIP、COP の 3 群とも上昇していたが、CD163 は NSIP や COP でのみ上昇していた。また CD206 は COP でのみ顕著な増加を認め、その差は $10E2$ のオーダーに及んだ。以上の結果から、IIPs においてマクロファージ表面マーカーの発現状況は病型によって大きく異なることが明らかとなった。さらに、IIPs において特に重要とされている IPF/UIP と NSIP との鑑別に対する CD163 の診断的価値は Receiver-operating characteristic- the area under the curve (ROC-AUC) 0.898 となり、かなり有望な診断マーカーとなる可能性を示した。以上の結果を踏まえ CD163 および CD206 などの M2 マーカーは (仮説 1) CD163 と CD206 の発現は各々 IPF/UIP の予後不良病巣である腔内線維化病変 (所謂、線維芽細胞巣) と NSIP の肺泡間質線維化病変の出現に抑制的に作用する、(仮説 2) CD163 と CD206 の発現は各々 NSIP にみられる肺泡壁線維化と COP にみられる腔内線維化病変を助長する、(仮説 3) 仮説 1 と 2 の混合タイプ、(仮説 4) IPF/UIP では線維化形成に関与する別のマクロファージが存在するかそもそもマクロファージの関与が低いなどの可能性が考えられた。

2. 研究の目的

IPF/UIP と NSIP の新規鑑別診断マーカーの開発

UIP と NSIP の鑑別診断には外科的肺生検を介した病理組織学的方法による鑑別が重要とされるが、この方法は患者に外科的侵襲を強い、初診から治療開始までの時間が長くなるため、より低侵襲で簡便な診断方法の開発が望まれる。本研究では気管支肺泡洗浄液 (BALF) と末梢血から得られた肺泡マクロファージあるいは末梢血単球の各病型におけるこれらの S100A9 (MAC387) と CD163 の発現をフローサイトメーター (FACS) によって解析し、FACS を用いたこれらのマーカーが外科的肺生検にとって変わる新たな鑑別診断マーカーとなり得るか検討する。

CD206 陽性マクロファージの肺線維化形成における役割の解明 (仮説 1~3 の検証)

CD163 にはまだノックアウトマウスは作製の報告はなく、他方 CD206 ではノックアウトマウスが既に作製されているが線維化病変への関わりを直接確認した報告はない。本研究では、COP において著増を示した CD206 に注目する。プレオマイシン誘発動物モデルは可逆性の腔内線維化病変である一方パラコートモデルは非可逆性肺胞間質性病変を形成し、病変分布及び可逆性の有無という観点においてそれぞれヒト COP あるいは IPF/UIP や NSIP と近似する。FACS を用いた予備的検討では前者では対照と比較して CD206 陽性マクロファージ数は増加するが、後者では同陽性細胞数がむしろ低下しており、やはり各々ヒト IIPs における CD206 の発現パターンと類似する。今後 CD206 ノックアウトマウスを用いてそれぞれ可逆性線維化および非可逆性線維化を形成するプレオマイシンとパラコート誘発の各モデルにおいて同分子が線維化形成を助長するかあるいは阻害するかその役割を確定させる予定である。

3. 研究の方法

IPF/UIP と NSIP の新規鑑別診断マーカーの開発

IPF/UIP, NSIP と各々診断された患者および健常コントロール (血痰の出血部位確認のため行う気管支鏡の際、無理のない状況下で健常部位から BALF を行う) から得られた BALF、末梢血検体を対象とする。BALF 中肺胞マクロファージについては標的マーカーが重複しうる顆粒球およびリンパ球からの負の選択を行った上で、正の選択マーカーとして CD11b, CD11c, CD14 などによる正の選択を行う予定である。また末梢血単核球は、PercolI など赤血球および顆粒球の除去を行った後、CD14 による正の選択を行う予定である。それらの選択によって得られた細胞における CD163 および MAC387 の発現の解析を行った上で病態間比較を行い、さらに診断マーカーとしての有用性を ROC 解析によって行い、得られたカットオフ値に基づいて感度・特異度を算出する。

CD206 陽性マクロファージの肺線維症の病態形成における役割の解明

前述のとおり予備的検討において C57BL/6J マウスに気道注入したプレオマイシン誘発モデル (3.0U/kg) では CD206 陽性細胞の増加をパラコート誘発モデル (1.0mg/Kg) では投与後 7 日目にその発現の低下を認めている。その投与後 4 週間までの経時的な陽性細胞数の推移を明らかにする。加えて、現在 B6.129P2-Mrc1^{tm1Mmz}/J マウス:CD206(+/-)を繁殖中である。CD206(-/-)および CD206(+/-)マウスを用いプレオマイシンを気道注入し、線維化病変が形成される投与 2 から 3 週間後にマウスを解剖する。BALF 中に含まれる血球細胞の計測、肺組織を用いた I 型コラーゲン組織の免疫染色、トリクローム線維染色による病理形態学およびハイドロキシプロリンを計測した生化学的評価により CD206 の有無による線維化病変形成の差異を明らかにする。

4. 研究成果

- (1) 末梢血 CD14^{strong}CD16⁻単核球(classical monocytes)における S100A9(alternatively MAC387)/CD163 の発現が iNSIP(n = 25)と比較して IPF(n = 25)において有意に上昇し多変量解析において独立した関連を認めた (exponent 1.1949, 95% confidence interval 1.0112-1.4119, p value < 0.05)。また ROC 解析において AUC0.838, (95% CI [0.715-0.961], p < 0.0001)を示し、同時に測定した血清 SP-D

値における AUC(0.616 , 95% CI [0.446-0.786])と比較して有意に高値を示した (p value < 0.05)。従って、本方法は IPF 診断の新たな診断法になる可能性があり、さらに大規模研究で検証される必要がある。

また同法を COPD 患者に対しても同様の方法で検討した。末梢血 CD14^{strong}CD16⁻単球(classical monocytes)における S100A9(alternatively MAC387)/CD163 の発現は喫煙者 (current smoker, n = 19) に対して COPD(n = 36)で有意に上昇し多変量解析において独立した関連を認めた (exponent 1.0336, 95% confidence interval [CI] 1.0063-1.0617, p value < 0.05)。また ROC 解析において AUC 0.719 (95% CI = 0.567-0.871)を示した。同方法は COPD の早期診断の有望な補助診断法となる可能性があり大規模研究によって検証される必要がある。以上の結果は、第 59 回日本呼吸器学会総会で報告された。また Journal of Chronic Obstructive Pulmonary Disease に accept され現在 in press である (DOI: 10.1080/15412555.2020.1793925)。

- (2) CD206 ノックアウトマウス (KO, C57BL/6J 背景) および対照として C57BL/6J 野生型マウス (WT) を用いてパラコート誘発性肺傷害モデルにおいて比較検討した。KO マウスは WT と比較して有意に生存期間が短かった。また投与 3 日後の炎症細胞数 (好中球数等)、気管支肺胞洗浄液中蛋白量、投与 10 日後の線維化病理スコアおよび組織中コラーゲン量は KO 群で有意に上昇しており CD206 の肺傷害に対する保護的作用が明らかとなった。

以上の結果は、第 59 回日本呼吸器学会総会で報告された。

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 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamashita M, Ogasawara M, Kawasaki Y, Niisato M, Saito H, Kasai S, Maesawa C, Maemondo M, Yamauchi K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Deficiency of protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyl-transferase expression under endoplasmic reticulum stress promotes epithelial mesenchymal transition in lung adenocarcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 13287-13300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.24324	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 Yamashita M, Saito R, Yasuhira S, Fukuda Y, Sasamo H, Sugai T, Yamauchi K, Maemondo M.	4. 巻 4
2. 論文標題 Distinct Profiles of CD163-Positive Macrophages in Idiopathic Interstitial Pneumonias.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Immunol Res.	6. 最初と最後の頁 1436236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/1436236	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 Yamashita M, Ogasawara M, Kawasaki Y, Niisato M, Saito H, Kasai S, Maesawa C, Maemondo M, Yamauchi K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Deficiency of protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyl-transferase expression under endoplasmic reticulum stress promotes epithelial mesenchymal transition in lung adenocarcinoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 13287-13300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.24324.	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 Yamashita M, Niisato M, Hanasaka T, Iwama N, Takahashi T, Sugai T, Ono M, Yamauchi K.	4. 巻 14
2. 論文標題 Development of Lymphatic Capillary Network Along the Alveolar Walls of Autopsied Human Lungs with Pneumonia.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Lymphat Res Biol.	6. 最初と最後の頁 210-219
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 1089/lrb.2015.0042.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogasawara M, Otani M, Takano M, Shudou M, Inaba Y, Nirasawa S, Takahashi S, Kiyoi T, Tanaka Y, Kameda K, Kunugita N, Maeyama K, Sano K, Yamashita M, Yamauchi K.	4. 巻 42
2. 論文標題 The protective role of protein L-isoaspartyl (D-aspartate) O-methyltransferase for maintenance of mitochondrial morphology in A549 cell.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Exp Lung Res.	6. 最初と最後の頁 245-62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/01902148.2016.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamashita M, Shibanoi M, Sekimura K, Nitani H, Ogasawara M, Kobayashi H, Yamauchi K.	4. 巻 54
2. 論文標題 Fractional exhaled nitric oxide levels as a predictor of long-term prognoses in patients with mild asthma.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Respir Investig.	6. 最初と最後の頁 139-47.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.resinv.2015.11.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saito H, Yamashita M, Ogasawara M, Yamada N, Niisato M, Tomoyasu M, Deguchi H, Tanita T, Ishida K, Sugai T, Yamauchi K.	4. 巻 50
2. 論文標題 Chaperone protein L-isoaspartate (D-aspartyl) O-methyltransferase as a novel predictor of poor prognosis in lung adenocarcinoma.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Hum Pathol.	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.humpath.2015.11.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamashita M, Utsumi Y, Yamauchi K.	4. 巻 in press
2. 論文標題 S100A9/CD163 expression in circulating classical monocytes in chronic obstructive pulmonary disease	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 COPD	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15412555.2020.1793925	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Masahiro Yamashita, Miyuki Niisato, Yasushi Kawasaki, Masao Ono, Kohei Yamauchi, Makoto Maemondo
2. 発表標題 Reparable roles of VEGFR-3/VEGF-C signaling on macrophages in acute lung inflammation
3. 学会等名 American Thoracic Society2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Yamashita, M. Niisato, Y. Kawasaki, M. Maemondo
2. 発表標題 Protective roles of mannose receptor in an experimental pulmonary fibrosis model
3. 学会等名 European Respiratory Society2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山下雅大、山内広平、前門戸任
2. 発表標題 パラコート誘発肺傷害モデルにおけるマンノース受容体の役割
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下雅大、内海裕、前門戸任
2. 発表標題 単球表面マーカーのreprogramingを指標とした間質性肺炎の新規バイオマーカー
3. 学会等名 第59回日本呼吸器学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山下雅大、前門戸任
2. 発表標題 急性呼吸窮迫症候群におけるVEGF-C/-Dレベル
3. 学会等名 第58回日本呼吸器学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山下雅大 小笠原正人 齋藤平佐 山内広平 前門戸任
2. 発表標題 小胞体ストレスに対するProtein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase (PIMT)
3. 学会等名 第57回日本呼吸器学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山下雅大 小笠原正人 齋藤平佐 山内広平 前門戸任
2. 発表標題 小胞体ストレスに対するProtein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase (PIMT)
3. 学会等名 第76回日本癌学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山下雅大 山内広平
2. 発表標題 急性肺傷害の修復におけるVEGFR-3陽性マクロファージの関与
3. 学会等名 第57回日本呼吸器学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山下雅大 前門戸任
2. 発表標題 急性呼吸窮迫症候群におけるVEGF-C/-Dレベル
3. 学会等名 第58回日本呼吸器学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 M. Yamashita, R. Saito, M. Ogasawara, Y. Fukuda, H. Sasano, T. Sugai, K. Yamauchi
2. 発表標題 Distinct profiles of M2 macrophage markers among idiopathic interstitial pneumonias
3. 学会等名 American Thoracic Society (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 山下雅大、山内広平
2. 発表標題 急性肺傷害の修復におけるVEGFR-3陽性マクロファージの関与
3. 学会等名 日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 山下雅大、小笠原正人、斉藤平佐、山内広平
2. 発表標題 小胞体ストレスに対するProtein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase代償発現の不足は肺腺癌浸潤を促す
3. 学会等名 日本呼吸器学会学術講演会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 特発性間質性肺炎の亜型診断における新規診断法の開発	発明者 山下雅大	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、097519	出願年 2016年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 特発性間質性肺炎の病型の鑑別方法	発明者 山下雅大	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2016-097519	出願年 2016年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----