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　６ 年　６ 月 ２４ 日現在

機関番号：３２６４３
研究種目：若手研究
研究期間：2020～2023
課題番号：２０Ｋ１７２２８

研究課題名（和文）肺線維化におけるIL-9の機能の解明

研究課題名（英文）Elucidating the role of IL-9 in pulmonary fibrosis

研究代表者
杉本　直也（Sugimoto, Naoya）

帝京大学・医学部・客員研究員

研究者番号：４０７２４１７５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,200,000円

研究成果の概要（和文）：肺線維化の病態研究に利用されるシリカモデルにおいて、以前我々は慢性進行期の肺線維化におけるIL-9の重要性を明らかにした。今回、IL-9が気道上皮細胞に及ぼす影響と、マクロファージとIL-9の相互作用による線維化機構への関わりを検討した。
気道上皮細胞株であるBEAS-2Bを用いた実験では、IL-9刺激で向線維化因子産生、サイトカイン産生がmRNAレベルで確認できた。シリカで刺激したマクロファージの検討では、IL-9を含めたサイトカイン産生について、Cell lineごとの結果に違いがあり、解釈や再現性については今後も検証が必要と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義
肺線維化のメカニズムは不明な点が多い。特にIL-9が肺構築細胞や炎症細胞に及ぼす効果や、IL-9の産生細胞について、さらに検討する必要がある。今回、気道上皮細胞およびマクロファージを用いてIL-9と肺線維化に関わる因子の解析を行ったが、引き続きIL-9の肺線維化における役割を明らかにすることで、肺線維症診療の進歩に貢献できればと考えている。

研究成果の概要（英文）：In a silica mouse model used to study the pathogenesis of pulmonary fibrosis, we previously demonstrated the importance of IL-9 in lung fibrosis in the chronic advanced stage. In this study, we investigated the effects of IL-9 on airway epithelial cells and the involvement of macrophage-IL-9 interaction in the fibrotic mechanism. In the experiment of cell lines using BEAS-2B, IL-9 stimulation showed production of pro-fibrotic factor and cytokine production at the mRNA level. In the study of silica stimulation of macrophages, there were differences in the results of cytokine production, including IL-9, from one cell line to another, and the interpretation and reproducibility of the results need further verification.

研究分野：間質性肺炎

キーワード：肺線維化　IL-9　気道上皮細胞　マクロファージ

※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。

肺線維化における IL-9 の機能の解明
Elucidating the role of IL-9 in pulmonary fibrosis

1.　研究開始当初の背景

特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF)は、線維化が関与する原因不明の炎症性肺疾患である。本疾患の予後はいまだに不良であり、抗線維化薬も既存病変の改善効果には乏しい。さらに、肺線維化の病態研究に頻用されるブレオマイシンモデルは、病態が自然軽快に向かうモデルであるため、慢性進行性のヒト肺線維症のモデルとしての妥当性には疑問が残り、実際ヒトへの創薬に繋がった治療薬はほとんどない。一方、シリカモデルは、緩徐に肺線維化が進行することから、よりヒトの IPF に近い病態を反映する可能性があると考え、これまで中心的に検討を行ってきた。

以前我々は、シリカモデルを用いて、慢性進行期の肺線維化における IL-9 の重要性を明らかにした。IL-9 抗体で線維化と、肺局所における様々な液性因子が抑制された。さらに、ヒト IPF 検体でも、IL-9 陽性マクロファージが増加し、肺胞上皮細胞では IL-9 受容体が高発現していることが示され、ヒト IPF においても、IL-9 が線維化機構における重要な役割を担っていることが示唆された (Sugimoto N. et al. Am J Respir Cell Mol Biol. 2019;60:232)。

肺線維化には、気道上皮細胞の上皮間葉転換 (Epithelial mesenchymal transition; EMT)の関与が示唆されている。また、上皮細胞は向線維化成長因子の産生源としても重要である。一方で、気道上皮細胞の EMT や向線維化因子産生に IL-9 が及ぼす影響については報告がない。

そこで今回我々は、IL-9 が気道上皮細胞に及ぼす影響および、マクロファージが IL-9 の相互作用によって線維化機構に関わるかを検討した。

2. 研究の目的

本研究は、IL-9 が肺線維化に及ぼすメカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 気道上皮細胞における IL-9 と肺線維化に関わる因子の解析

気道上皮細胞である BEAS-2B を IL-9 濃度別に刺激し、刺激後 48 時間後に向線維化因子(PDGF, IGF, CTGF)産生、サイトカイン (IL-33: ILC2 活性化因子)産生を mRNA レベルで検討した。

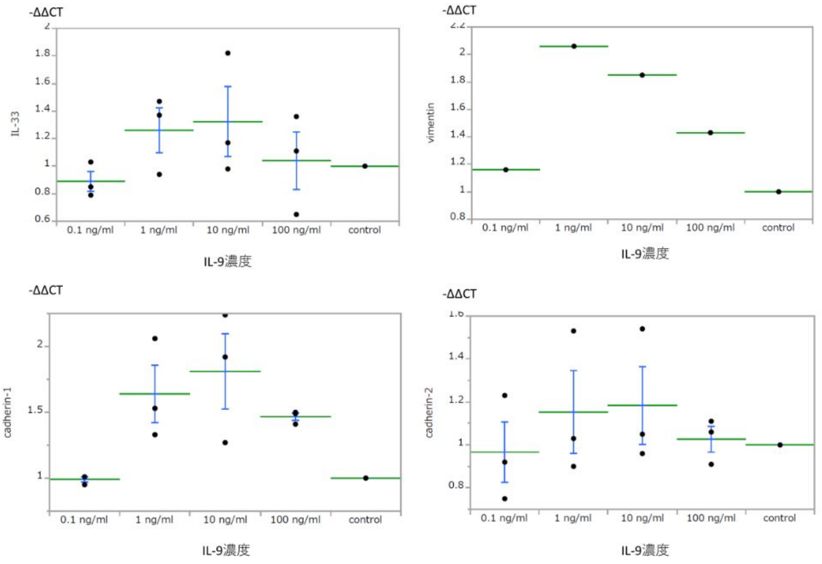
(2) マクロファージにおける IL-9 の役割

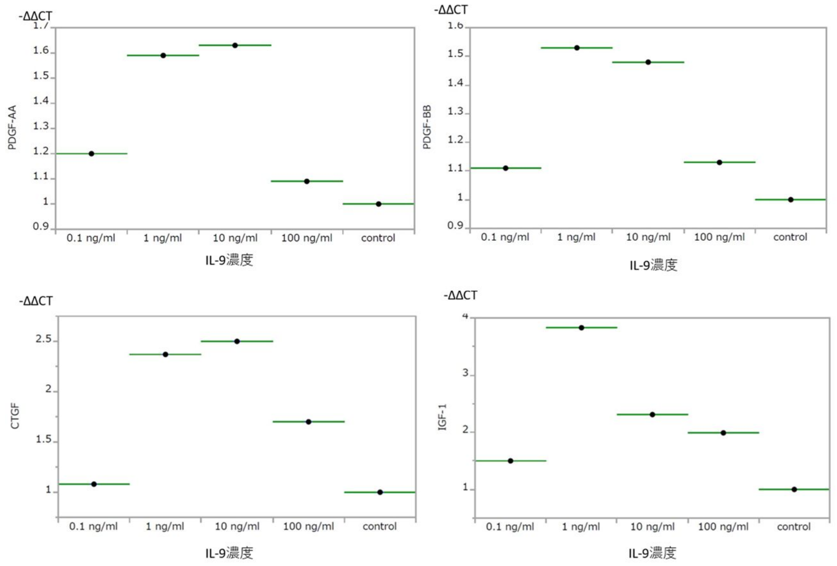
肺線維化機構における IL-9 およびマクロファージの機能を明らかにするため、THP-1 細胞および U937 細胞を用い、シリカおよび LPS + IFN-γ もしくは IL-4 +IL-13 刺激で、マクロファージの M1 および M2 分化を誘導し、CCL17 および CCL26、IL-1β、TNF-α、IL-9 等のサイトカイン産生について検討した。

3. 研究の成果

(1) 気道上皮細胞における IL-9 と肺線維化に関わる因子の解析

まず、気道上皮細胞である BEAS-2B を IL-9 で刺激し、向線維化因子 (PDGF, IGF, CTGF)産生、サイトカイン (IL-33: ILC2 活性化因子)産生を mRNA レベルで検討したところ、PDGF-AA, PDGF-BB, IGF-1, CTGF, IL-33 の mRNA 発現が亢進していた。また、EMT への関与を検討するため、vimentin や cadherin mRNA 発現を検討したところ、同様に vimentin, cadherin ともに発現の亢進がみられた。また、気道上皮細胞に対する IL-9 の効果の用量依存性は現在十分確立していないため、annexin-V と propidium iodide を用いて細胞生存への影響も基礎検討として行い、実験の濃度の範囲内では IL-9 による気道上皮細胞死は起こらないことも確認した。





(2) マクロファージにおける IL-9 の役割

肺線維化機構における IL-9 およびマクロファージの機能を明らかにするため、THP-1 細胞および U937 細胞を用い、シリカおよび LPS & IFN-γ、IL-4 & IL-13 刺激で、マクロファージの M1 および M2 分化を誘導し、CCL17 および CCL26、IL-1β、TNF-α、IL-9 等のサイトカイン産生について検討した。

THP-1 細胞を LPS & IFN-γ で刺激し、48 時間培養したところ、シリカ添加で濃度依存的に IL-1β, TNF-α の mRNA 発現は亢進していた。また、CCL17, CCL26 はシリカ高濃度で mRNA 発現が亢進していた。次に、THP-1 細胞を IL-4&IL-13 で刺激し、48 時間培養したところ、LPS & IFN-γ と同様にシリカ添加で濃度依存的に IL-1β, TNF-α の mRNA 発現は亢進しており、CCL17, CCL26 はシリカ高濃度で mRNA 発現が亢進していた。両者ともに IL-9 の mRNA 発現は検出できなかった。

一方、U937 細胞では、LPS & IFN-γ の刺激とシリカ添加で、CCL17 の mRNA 発現は低下、IL-9 は亢進、CCL26、IL-1β、TNF-α は不変であった。また、IL-4&IL-13 で刺激すると、IL-9 は亢進したが、CCL17, CCL26, IL-1β, TNF-α は不変であった。

4. 結語

本研究で、BEAS-2B を IL-9 で刺激すると向線維化因子産生、サイトカイン産生を mRNA レベルで確認することができた。シリカで刺激したマクロファージの検討では、IL-9 を含めたサイトカイン産生について、Cell line ごとの結果の違いがあり、解釈や再現性については今後も検証が必要と考えられた。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計0件

〔学会発表〕　計0件

〔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

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