

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：24303

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16304

研究課題名（和文）進行性線維化を伴う膠原病関連間質性肺疾患における肺胞マクロファージの役割の解明

研究課題名（英文）Investigation of the roles of alveolar macrophages in connective tissue disease-associated interstitial lung disease with progressive fibrosis

研究代表者

藤井 渉 (Fujii, Wataru)

京都府立医科大学・医学部附属病院・専攻医

研究者番号：60755643

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：膠原病関連間質性肺疾患(CTD-ILD)などの間質性肺疾患では、適切な治療にも関わらず進行性肺線維化をきたす病態（PF-ILD）が問題となっているが、その病態には不明な点が多く特異的バイオマーカーもない。本研究ではPF-ILDの特徴を示すCTD-ILD患者の気管支肺胞洗浄液(BALF)中で、炎症性サイトカインIL-6と補体成分C3a, C4a, C5aが上昇していることを見出した。またscRNA-seqによりケモカイン陽性肺胞マクロファージとMMP9陽性好中球、未成熟好中球がPF-ILDで増加していることを発見した。これらの知見から自然免疫系異常が進行性肺線維化の病態に関与すると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって膠原病関連間質性肺疾患(CTD-ILD)の中で免疫抑制治療にも関わらず進行性肺線維化をきたすPF-ILDの免疫学的特徴が明らかとなった。すなわち、PF-ILD患者BALF中でIL-6と補体成分C3a, C4a, C5aが上昇し、ケモカイン陽性肺胞マクロファージとMMP9陽性好中球、未成熟好中球が増加していた。これらの研究結果から肺胞マクロファージと好中球の相互作用と機能変化がPF-ILDの主たる病態であると考えられ、これら自然免疫系細胞サブセットや液性因子の変化がPF-ILDを予測するバイオマーカーや新たな治療標的候補となり得るか、今後前向き試験により検証を進める予定である。

研究成果の概要（英文）：Progressive fibrosing interstitial lung disease (PF-ILD) is a problem in interstitial lung diseases such as connective tissue disease-associated interstitial lung disease (CTD-ILD), despite appropriate treatment, but its pathogenesis is still unclear and there are no specific biomarkers. In this study, we found that the inflammatory cytokine IL-6 and the complement C3a, C4a and C5a levels were elevated in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of patients with CTD-ILD who fulfilled the PF-ILD definition. We also found by scRNA-seq that chemokine-positive alveolar macrophages and MMP9-positive neutrophils and immature neutrophils were increased in PF-ILD patients. These findings suggest that abnormalities in the innate immune system are involved in the pathogenesis of progressive pulmonary fibrosis.

研究分野：膠原病、間質性肺疾患、トランスクリプトーム

キーワード：膠原病関連間質性肺疾患 進行性線維化を伴う間質性肺疾患 肺胞マクロファージ 好中球 気管支肺胞洗浄液 scRNA-seq

1. 研究開始当初の背景

全身性強皮症、関節リウマチ、多発性筋炎・皮膚筋炎などの膠原病ではしばしば間質性肺疾患を合併し膠原病関連間質性肺疾患(CTD-ILD)と呼ばれるが、その病因、分子病態について十分解明されているとは言い難い。また間質性肺疾患の中で免疫抑制治療にも関わらず進行性肺線維化をきたす病態はPF-ILDと呼ばれ臨床問題となっているが、その病態には不明な点が多く、早期診断のためのバイオマーカーも存在しない。

2. 研究の目的

本研究ではPF-ILDの特徴を示すCTD-ILD患者気管支肺胞洗浄液(BALF)中の免疫細胞をシングルセルRNA-seq(scRNA-seq)、フローサイトメトリー、ELISAにより統合的に解析し、進行性線維化に関わる因子を同定することを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

PF-ILDの基準(治療にも関わらず24ヶ月以内に10%以上の努力性肺活量の低下、または5%以上の努力性肺活量の低下かつ呼吸困難症状の悪化または画像評価で肺線維化領域の拡大)を満たすCTD-ILD患者12症例、対照群としてPF-ILD基準を満たさない31症例からBALF検体と末梢血液検体を採取し解析を行った。

4. 研究成果

①解析の結果、全BALF中免疫細胞をその遺伝子発現パターンに基づいてアノテーションを行った(図1)。またフローサイトメトリーにより蛋白レベルでも同様の免疫細胞分画を同定できることを確認した。その後、単球、肺胞マクロファージ、樹状細胞を含む単核球骨髄系細胞について再解析を行い、その遺伝子発現パターンに基づき14のサブセットを同定した(図2)。

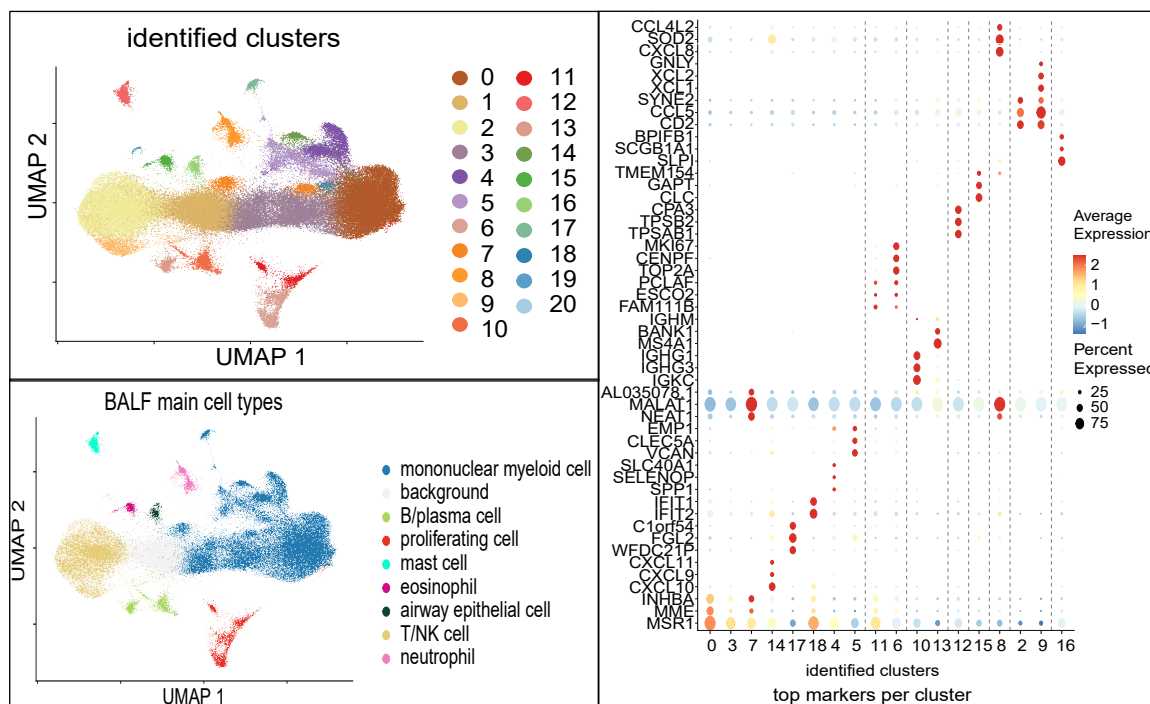


図1: BALF中免疫細胞の同定

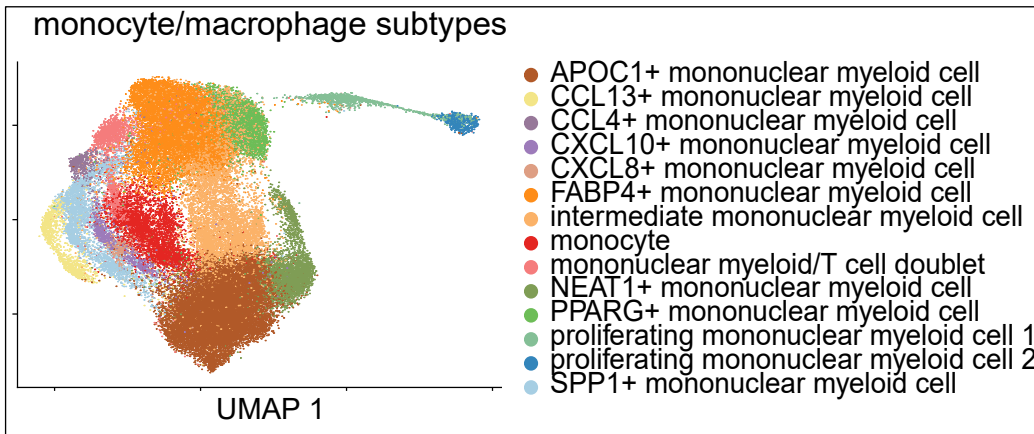


図 2: 単核球骨髄系細胞サブセットの同定

単核球骨髄系細胞サブセットの中で、CXCL10 や CCL4, CCL13 などのケモカインの発現が高いサブセットが PF-ILD 群で有意に増加していた (図 3)。

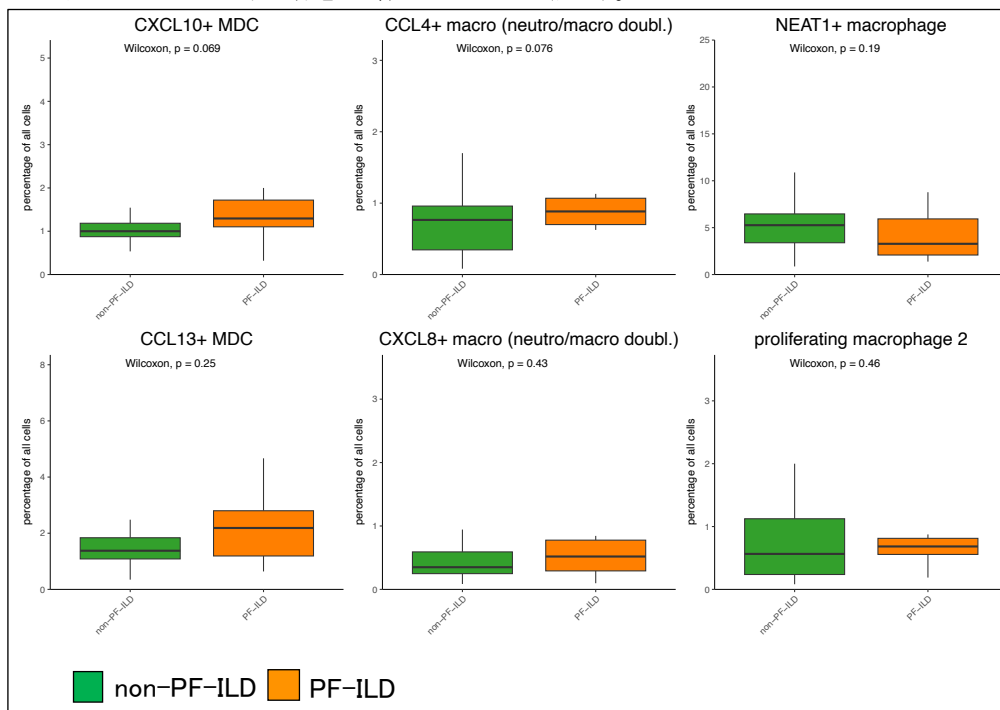


図 3: 単核球骨髄系細胞サブセットの PF-ILD における変化

②さらに末梢血好中球について再解析を行い、7つの好中球サブセットを同定した (図 4)。

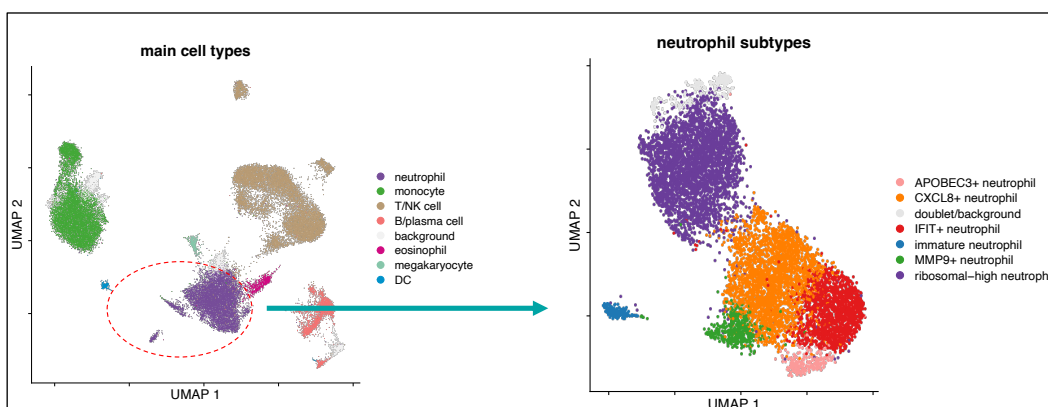


図 4: 単核球骨髄系細胞サブセットの同定

好中球サブセットの中で、MMP-9 陽性好中球、1 型インターフェロン関連蛋白 (IFIT) 陽性好中球や未成熟好中球サブセットが PF-ILD 群で有意に増加していた (図 5)。

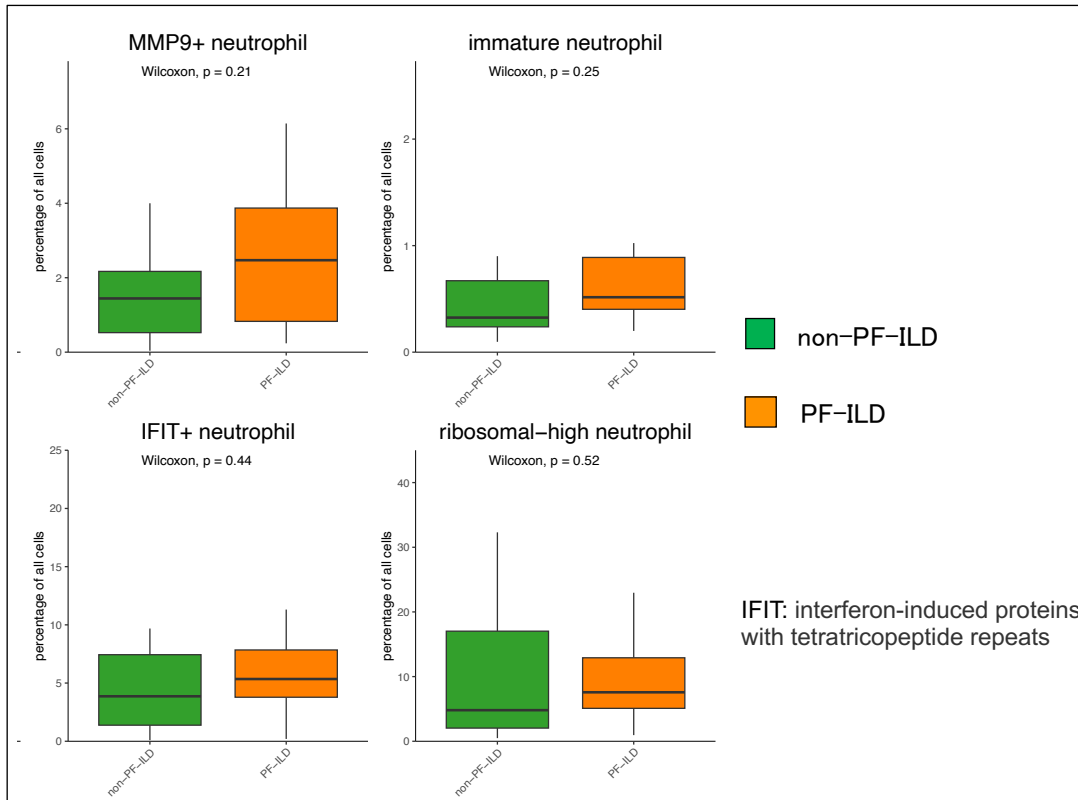


図 5:末梢血好中球サブセットの PF-ILD における変化

これらの結果から、PF-ILD 群で上昇していた BALF 中単核球骨髄系細胞および末梢血好中球サブセットが進行性線維化の病態への関与が示唆された。

③BALF 上清および血漿中の液性成分を multiplex ELISA により分析した。その結果、PF-ILD 患者 BALF 上清中で炎症性サイトカインである IL-6 と補体成分 C3a, C4a, C5a が上昇していることを見出した (図 6)。

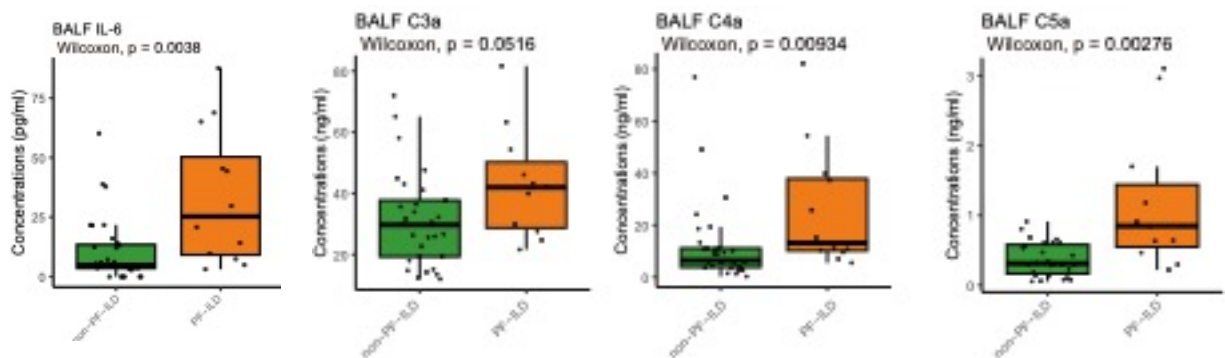


図 6:PF-ILD における BALF 上清、血漿中サイトカイン/ケモカイン/補体成分の変化

これらの研究結果から、単球/肺胞マクロファージの機能変化が好中球の活性化を促し、進行性肺線維化をきたすことが PF-ILD の主たる病態であると考えられた (図 7)。

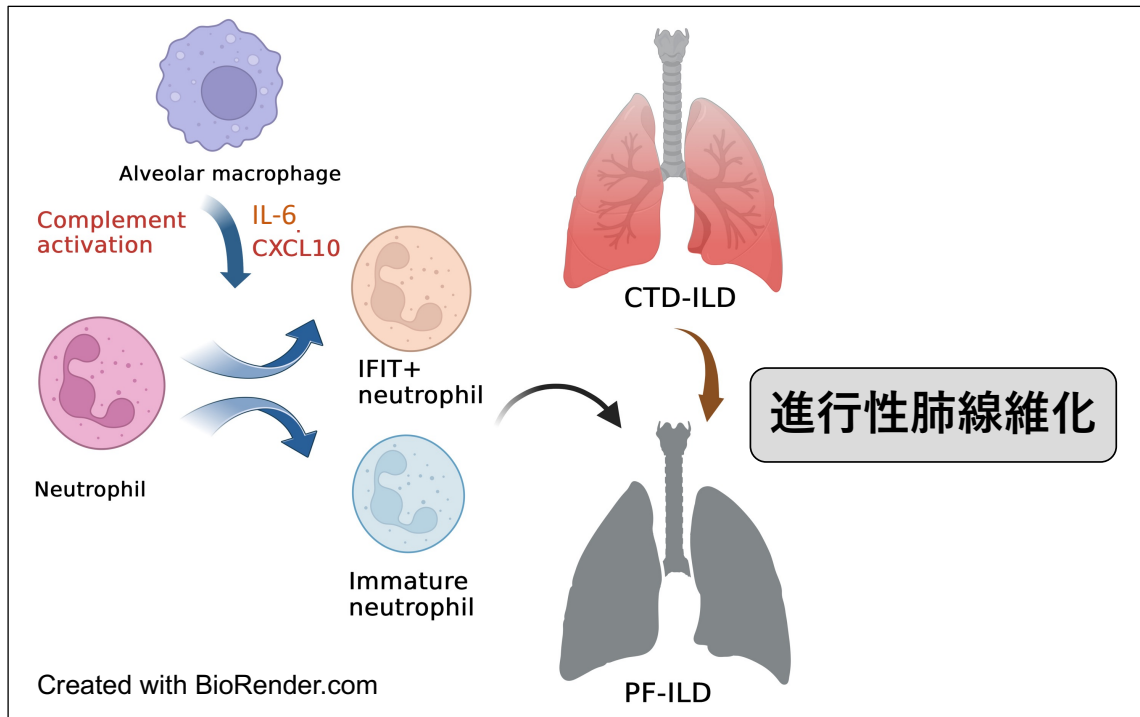


図 7:PF-ILD の病態仮説

以上の研究により判明した免疫細胞サブセットや液性因子の変化が、PF-ILD の進展を予測するバイオマーカーや、新たな治療標的候補となる可能性があり、前向き試験や動物モデルを用いた検証実験を今後予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Aiko Hirano, Aki Sakashita, Wataru Fujii, Kevin Bassler, Taisuke Tsuji, Masatoshi Kadoya, Atsushi Omoto, Noriya Hiraoka, Tatsuya Imabayashi, Yoshiko Kaneko, Hideaki Sofue, Yosuke Maehara, Takahiro Seno, Makoto Wada, Masataka Kohno, Wataru Fukuda, Kei Yamada, Koichi Takayama, Yutaka Kawahito | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Immunological characteristics of Bronchoalveolar Lavage Fluid and Blood across Connective Tissue Disease- associated Interstitial Lung Diseases | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Immunology | 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） なし | 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 Fujii W, Chang L, Inui T, Ishizaka S, Kawahito Y | 4. 巻 133 |
| 2. 論文標題 Cervical lymphadenitis caused by Mycobacterium avium in a patient treated with Janus kinase inhibitors | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Infectious Disease | 6. 最初と最後の頁 57-59 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ijid.2023.05.006 | 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 - |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 藤井 渉、平野愛子、阪下 暁、辻 泰佑、平岡 範也、今林達哉、金子美子、高山浩一 |
| 2. 発表標題 シングルセルRNA-seqによる膠原病関連間質性肺疾患の病態解析 |
| 3. 学会等名 第62回日本呼吸器学会学術講演会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 藤井 渉 |
| 2. 発表標題 シングルセルRNAシーケンスによる膠原病関連間質性肺疾患の病態解析 |
| 3. 学会等名 第9回JCRベーシックリサーチカンファレンス |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Wataru Fujii, Takahiro Seno, Kazuki Fujioka, Yutaka Kawahito |
| 2. 発表標題 Multiple alveolar macrophage states in connective tissue disease-associated interstitial pneumonia patients revealed by single-cell RNA-seq |
| 3. 学会等名 第50回日本免疫学会総会・学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 藤井 渉 |
| 2. 発表標題 呼吸器免疫疾患におけるシングルセル解析による病態解明 |
| 3. 学会等名 第64回日本呼吸器学会学術講演会 Emerging Talent Symposium 8 びまん性肺疾患のエレガントな基礎研究 (招待講演) |
| 4. 発表年 2024年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Wataru Fujii, Aki Sakashita, Aiko Hirano, Kevin Bassler, Masatoshi Kadoya, Atsushi Omoto, Wataru Fukuda, Takahiro Seno, Makoto Wada, Masataka Kohno, Yutaka Kawahito |
| 2. 発表標題 The characteristics of progressive fibrosing interstitial lung disease in connective tissue diseases with single-cell RNA sequencing of bronchoalveolar lavage fluid |
| 3. 学会等名 European Congress of Rheumatology 2023 (国際学会) |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Wataru Fujii, Aiko Hirano, Aki Sakashita, Hideaki Sofue, Masatoshi Kadoya, Atsushi Omoto, Wataru Fukuda, Makoto Wada, Masataka Kohno, Yutaka Kawahito |
| 2. 発表標題 Alveolar macrophage subpopulations and immature neutrophils are hallmark of progressive pulmonary fibrosis in connective tissue disease-associated interstitial lung disease patients |
| 3. 学会等名 第67回日本リウマチ学会総会・学術集会 |
| 4. 発表年 2023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 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|