

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23790926

研究課題名(和文) 間質性肺疾患の末梢血中線維細胞に関する研究

研究課題名(英文) Study of peripheral blood fibrocyte in patients with pulmonary interstitial disease

研究代表者

根井 貴仁 (Nei, Takahito)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：30597670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：健康者及び間質性肺炎患者末梢血から末梢血単核球系細胞(PBMCs)を分離し、磁気ビーズを用いCD14陽性細胞を単離しIL-13やIL-4の刺激によるfibrocyte(CD45, collagenI陽性細胞と定義)への分化の可能性を検討した。形態的に明らかな変化は見られず、FACS解析でもfibrocyteの増加は認めなかった。間葉系マーカーのmRNAレベルでの増加も認めなかった。さらに単球系の細胞株であるU937細胞を用いた同様の実験でも有意な差は認めなかった。以上より少なくともin vitroの系では、Th2系サイトカインによるfibrocyteへの分化誘導の可能性は低いことが考えられた。

研究成果の概要(英文)：There was no significant change of the number of fibrocyte on fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis in peripheral blood monocytes from healthy control cultured with IL-13 or IL-4 for 5 days. CD14 positive mononuclear cells selected by magnetic beads from PBMCs of healthy control and patients with nonspecific interstitial pneumonia were cultured with IL-13 or IL-4, and the number of the cultured cells and analysis of polymerase chain reaction (PCR) of CD14 and S100A4 of cell lysate from cultured cells did not significantly changed from non-stimulated cells. U937 cells were cultured with IL-13 and IL-4, however there was no significant change of the number of fibrocyte on FACS analysis. Analysis of PCR of cell lysate from cultured U937 cells and cultured spleen cells from bleomycin induced fibrosis model of mice with IL-13 did not significantly changed compared with non-stimulated cells.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：間質性肺炎 fibrocyte IL-13 特発性肺線維症 プレオマイシン誘発肺障害モデルマウス

### 1. 研究開始当初の背景

近年の間質性肺炎の分子病態学的な背景の一つに線維芽細胞を中心としたサイトカインネットワークの異常亢進が報告されてきた。殊に Th2 型ヘルパー T 細胞から分泌される IL-13 は強力な線維芽細胞の刺激性因子であり、線維芽細胞やその前駆細胞とされる末梢血液中の fibrocyte が特発性肺線維症の病態と関連していることが報告されてきた。間質性肺炎は予後不良な特発性肺線維症を含めて幾つかの病型があるが、病型によるこれらの線維化促進因子の存在や、末梢血中の fibrocyte の存在の較差に関しては、まだ不明な部分が多い。また IL-13 の間質性肺炎各病態における刺激作用に関してはまだ研究されていない。

### 2. 研究の目的

特発性肺線維症に限らず、他の間質性肺炎も含めて線維化促進因子としての IL-13 と末梢血中に存在する fibrocyte の IL-13 に対する応答性を検討することで、間質性肺炎の病態解明やバイオマーカー・新規治療薬開発に資するために検討を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

Fibrocyte と IL-13 との関連を評価するため、健常者と間質性肺炎患者の末梢血 (20-50ml) から密度勾配遠心法にて単球系細胞 peripheral blood monocytes (PBMCs) を分離し IL-13 刺激群、非刺激群を 5 日間無血清で培養後、fibrocyte (CD45, collagen-I 陽性細胞と定義) を flow cytometry で解析した。

次に、密度勾配遠心法にて PBMCs を分離した後に、magnetic beads を用いて CD3、CD56 陽性細胞や接着系細胞の negative selection、CD14 陽性細胞の positive selection を行い、その後 5 日間無血清で培養し、cell lysate を用いて collagen-I、 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1、stat6、vimentin、CXCR4、CD14、CD33、S100A4 の mRNA の発現を解析した。培養においては、IL-4、IL-13、SEMA7a、GM-CSF との共培養、またファイブロンクチンコート下での培養を行い解析した。

*In vitro* の実験では、単球系の細胞株である U937 細胞を用いて IL-4 (10ng/ml)、IL-13 (10ng/ml)、IL-4 (10ng/ml) + IL-13 (10ng/ml) とともに 5 日間培養し FACS で CD45・Collagen-I 陽性細胞を解析し、IL-13 (10ng/ml) とともに 5 日間培養した

cell lysate において CD14、S100A4、IL-13R、IL-4R を定量的 PCR で解析した。さらに U937 を PMA でマクロファージに分化させた後、IL-13 (10ng/ml) とともに 5 日間培養し同様に定量的 PCR で解析した。

### 4. 研究成果

(1) 健常者及び間質性肺炎患者の末梢血を用いた解析

健常者の末梢血から PBMCs を分離 (平均  $2.4 \times 10^7$  個) し、IL-13 (5ng/ml、10ng/ml) 刺激群と IL-13 非刺激群で 5 日間の培養後、fibrocyte を解析した。Flow cytometry の結果は、IL-13 非刺激群で fibrocyte は平均 5.0% であったのに対し、IL-13 刺激群では平均 3.4% と上昇は認められなかった (図 1)。同様の実験で、cell lysate を用いた定量的 PCR では、 $\alpha$ -SMA、TGF- $\beta$ 1、Stat6、Vimentin において IL-13 刺激の有無による発現の差に傾向はみられなかった。

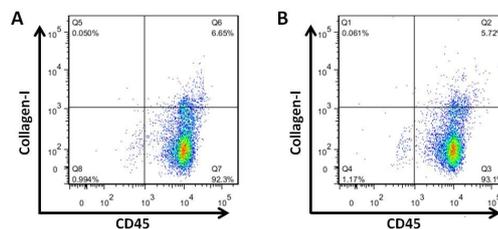


図1 CD45, collagen-I による FACS 解析。A: 無刺激群、B: IL-13 刺激群

健常者の末梢血から PBMCs を分離 (平均  $3.4 \times 10^7$  個) 後、T 細胞、NK 細胞を除去するため magnetic beads を用いて CD3、CD56 陽性細胞を negative selection し (平均  $9.6 \times 10^6$  個)、IL-4 (10ng/ml)、IL-13 (10ng/ml)、Sema7a (10ng/ml) とともに 5 日間培養した。目視では非刺激群と比較し細胞形態や細胞数に差は認められなかった (図 2)。cell lysate を用いた定量的 PCR では、CXCR4 の発現は非刺激群と比較し発現の差に傾向は認められなかった。

健常者の末梢血から PBMCs を分離 (平均  $4.1 \times 10^7$  個) 後、マクロファージを除去するため接着細胞を除去し、magnetic beads を用いて CD14 陽性細胞を positive selection し (平均  $1.2 \times 10^6$  個)、IL-4 (10ng/ml)、IL-13 (10ng/ml)、Sema7a (10ng/ml) とともに 5 日間培養した。目視では非刺激群と比較し細胞形態や細胞数に差は認められなかった。cell lysate を用いた定量的 PCR では、CD14 の発現は非刺激群

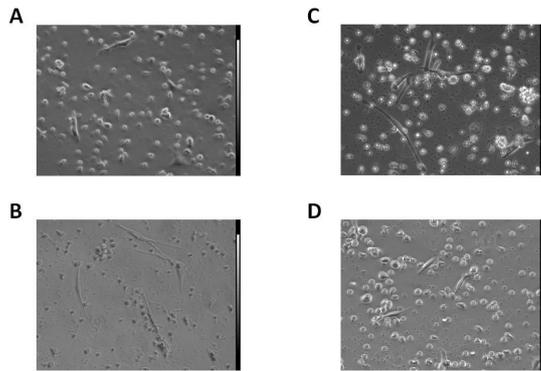


図2 培養後の細胞形態  
A:無刺激群、B:IL-4 刺激群  
C:IL-13 刺激群、D:Sema7a 刺激群

と比較し IL-4、IL-13 刺激群で減少していたが(図3)、間葉系マーカーの発現には差は見られなかった。

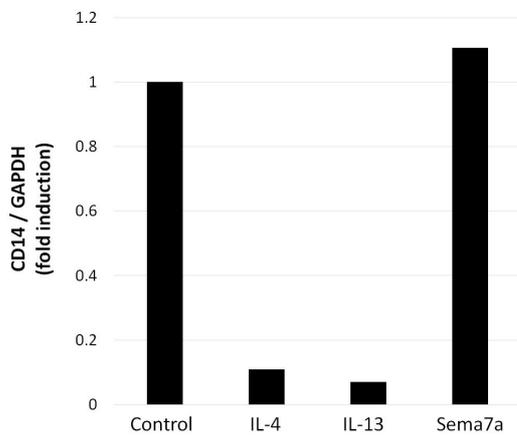


図3 CD14 の発現の比較

健康者の末梢血から PBMCs を分離(平均  $3.1 \times 10^7$  個)後、マクロファージを除去するため magnetic beads を用いて CD14 陽性細胞を positive selection し(平均  $4.1 \times 10^6$  個)、IL-4 (10ng/ml)、IL-13 (10ng/ml)、TGF- $\beta$ 1 (10ng/ml)、Sema7a (10ng/ml)、IL-13 (10ng/ml) + TGF- $\beta$ 1 (10ng/ml)、IL-4 (10ng/ml) + IL-13 (10ng/ml)とともに5日間培養した。目視では非刺激群と比較し細胞形態や細胞数に差は認められなかった。cell lysate を用いた定量的 PCR では、CD14 の発現は非刺激群と比較し IL-4、IL-13、IL-13 + TGF- $\beta$ 1、IL-4+IL-13 刺激群で減少傾向を示し(図4)、TGF- $\beta$ 1 刺激群では増加傾向であった。S100A4 の発現は非刺激群と比較し発現の差に傾向は認められなかった。

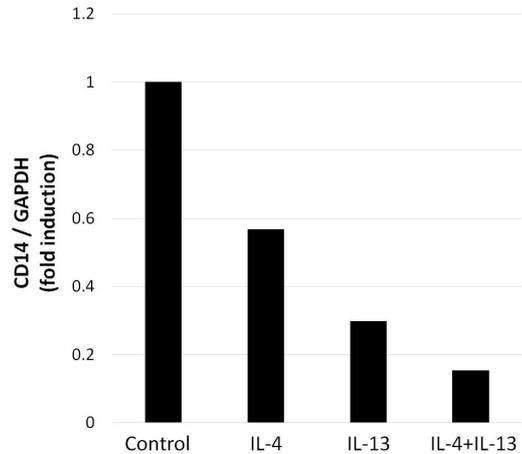


図4 CD14 発現の比較

非特異性間質性肺炎患者3名の末梢血から PBMCs を分離(平均  $3.9 \times 10^7$  個)後、マクロファージを除去するため magnetic beads を用いて CD14 陽性細胞を positive selection し(平均  $3.4 \times 10^6$  個)、IL-4 (10ng/ml)、IL-13 (10ng/ml)、IL-4 (10ng/ml) + IL-13 (10ng/ml)とともに5日間培養した。目視では非刺激群と比較し細胞形態や細胞数に差は認められなかった。cell lysate を用いた定量的 PCR では、CD14 の発現は非刺激群と比較し IL-4、IL-13、IL-4+IL-13 刺激群で減少傾向を示したが(図5)、S100A4 に関しては発現の差に傾向は認められなかった。

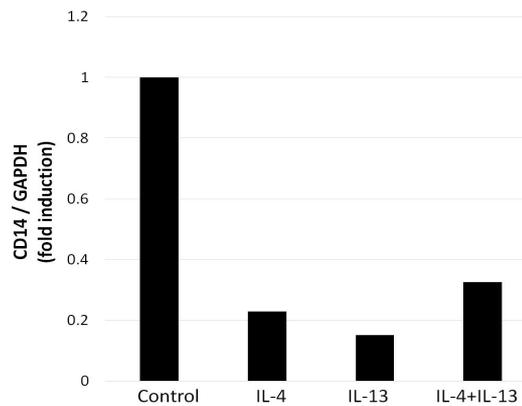


図5 CD14 発現の比較

## (2) U937 を用いた検討

FACS で fibrocyte を解析した所、Control 群で平均 12.0%、IL-4 群で 9.5%、IL-13 群で 9.9%、IL-4+IL-13 群で 12.7%と差は認めなかった。定量的 PCR の解析では、Control 群と IL-13 群との比較において、CD14、S100A4、IL-13R、IL-4R の発現に差は認められなかった。U937 を PMA で

マクロファージに分化させた細胞における検討では、Control群と比較しIL-13群で、CD14(図6)、IL-13Ra1(図7)、IL-4R(図8)の発現は低下し、S100A4の発現は増加する傾向を認めた。

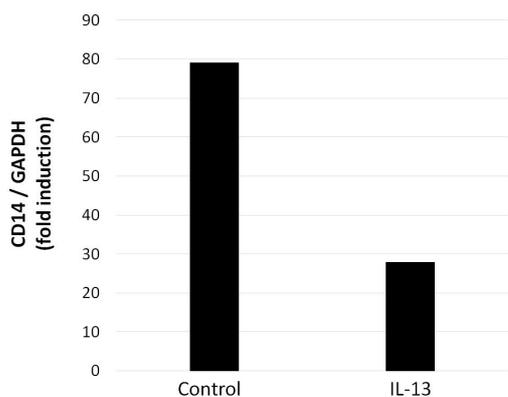


図6 マクロファージにおけるCD14発現の比較

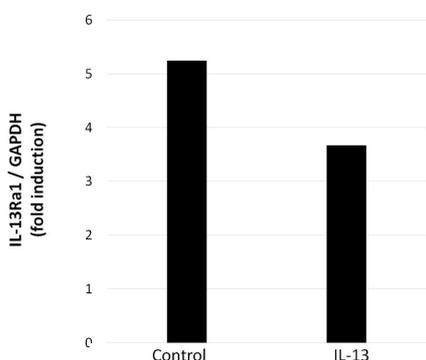


図7 マクロファージにおけるIL-13Ra1発現の比較

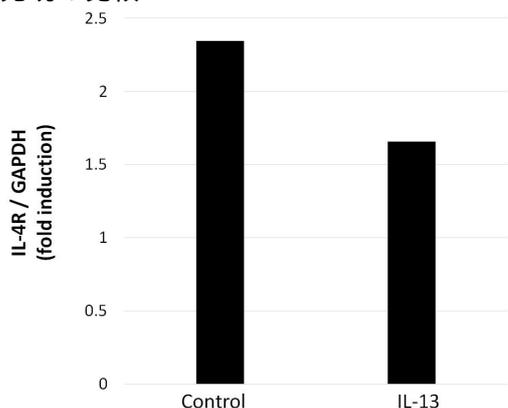


図8 マクロファージにおけるIL-4R発現の比較

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

根井 貴仁(Nei, Takahito)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号: 30597670

(2)研究分担者

(なし)

研究者番号:

(3)連携研究者

(なし)

研究者番号: