

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461176

研究課題名(和文) Mast cellによる肺線維化促進メカニズム解析と治療への応用

研究課題名(英文) The involvement of mast cells in the development of lung fibrosis

研究代表者

海江田 信二郎 (Kaieda, Shinjiro)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：20330798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：特発性肺線維症におけるmast cellのfibroblast myofibroblast分化誘導を介した肺線維化病変促進メカニズムについて解析を行った。当初mast cellはmyofibroblast分化を誘導すると仮説を立て検証を行ったが、myofibroblast分化誘導を阻害する実験結果を得た。しかしmast cellとpulmonary fibroblastを共培養すると肺線維化に促進的に作用するTGF- β やVEGFの発現が亢進するため、mast cellはfibroblastの活性化を介した肺線維化病態形成に關与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that the expansion of mast cells in lung tissue obtained from idiopathic interstitial pneumonia patients. Mast cells are close proximity to fibroblast and myofibroblasts. We hypothesized that mast cells contribute to lung fibrosis via myofibroblast differentiation from pulmonary fibroblasts. In vitro coculture experiments, human mast cells did not induce fibroblasts to myofibroblast differentiation. α -SMA mRNA expression was not upregulated during coculture with mast cells. However, mast cells activated fibroblasts to produce fibrogenic factors including TGF- β and VEGF. Amplification loop between mast cells and pulmonary fibroblasts were generated. Mast cells may be involved in the lung fibrosis via inducing pulmonary fibroblast activation.

研究分野：リウマチ膠原病内科

キーワード：Mast cell Myofibroblast TGF VEGF

1. 研究開始当初の背景

特発性肺線維症は、様々な程度の炎症や線維化が混在する原因不明の間質性肺疾患であり、その長期予後は不良で、5年生存率は20%程度と報告される (Scotton CJ et al. CHEST 132: 1311-1321, 2007)。その病因は未だに不明な点が多く、初期に生ずる原因不明の肺障害に続いて、fibroblast および myofibroblast による過剰修復が起こり、それらの細胞が産生する細胞外マトリックス蛋白が肺胞壁に沈着することから正常肺構造の破綻を来すことが推測されている (Hinz B et al. Am J Pathol. 170: 1807-1816, 2007)。Myofibroblast の分化およびその数の増加は間質性肺炎の病態形成に重要な役割を果たすことが報告されているが、その機序に関しては不明な点が多い。我々は肺病変部における mast cell の数の増加と、その myofibroblast 近位の位置関係に注目し、mast cell が lung fibroblast の myofibroblast への分化誘導を介して、肺線維化を促進すると仮説を立て、そのメカニズム解明の研究を立案した。

2. 研究の目的

Mast cell は myofibroblast 分化を誘導すると仮説を立て、その阻害による肺線維化への新たな治療法確立を目的に研究を行った。

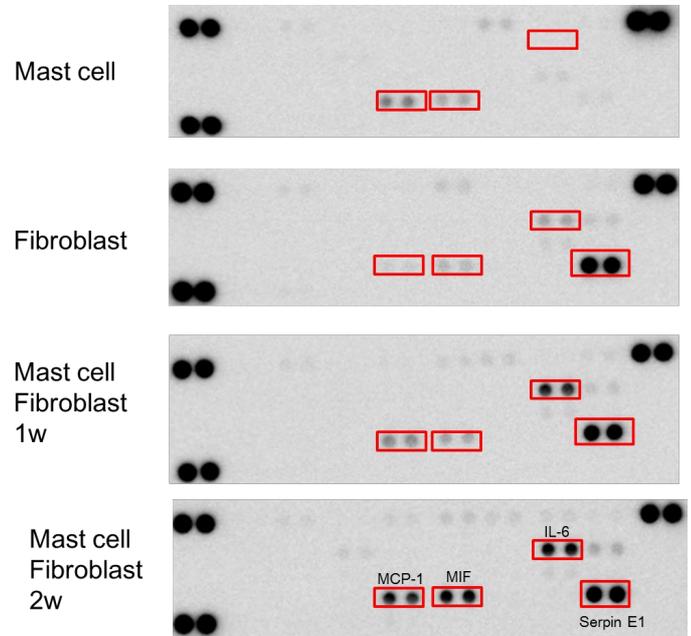
3. 研究の方法

Human mast cell line-1 (HMC-1) および pulmonary fibroblast を用い、in vitro で coculture 実験を行った。Mast cell による fibroblast myofibroblast への分化誘導について検討を行い、Coculture 後の α -SMA mRNA を RT-PCR 法を用いて定量した。また、mast cell および pulmonary fibroblast との相互作用を解析するために Cytokine Array Kit を用いた網羅的解析を行った。また線維化促進因子である TGF β および VEGF の発現を RT-PCR 法や ELISA 法を用いて評価した。

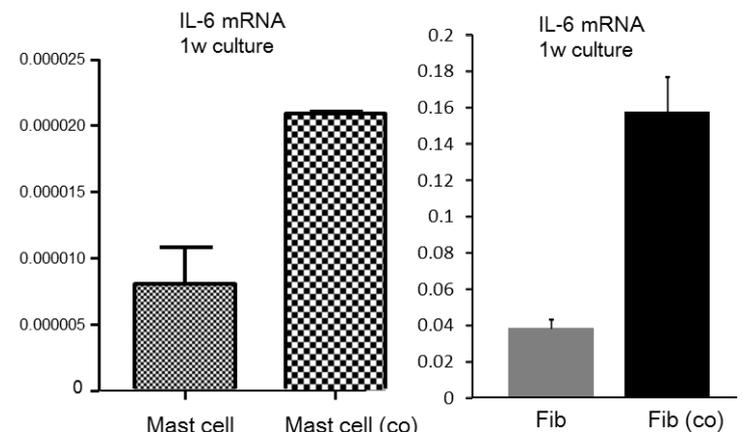
4. 研究成果

Mast cell は myofibroblast 分化を誘導すると仮説を立て検証を行ったが、mast cell は fibroblast における α -SMA mRNA の発現上昇に寄与しなかった。しかし、mast cell と pulmonary fibroblast を共培養すると培養液中に IL-6 の有意な産生上昇を認め、2細胞間の相互作用によりサイトカインなどの液性因子の産生が亢進することが明らかになった (図A)。Mast cell、Fibroblast culture と比較し、共培養群で IL-6 や MCP-1 の産生亢進を認めている。また、coculture を行った mast cell (Mast cell(co)) および fibroblast (Fib(CO)) : 図Bは IL-6 mRNA の有意な発現上昇を認め、2細胞間で amplification loop の形成が推測された。

図A

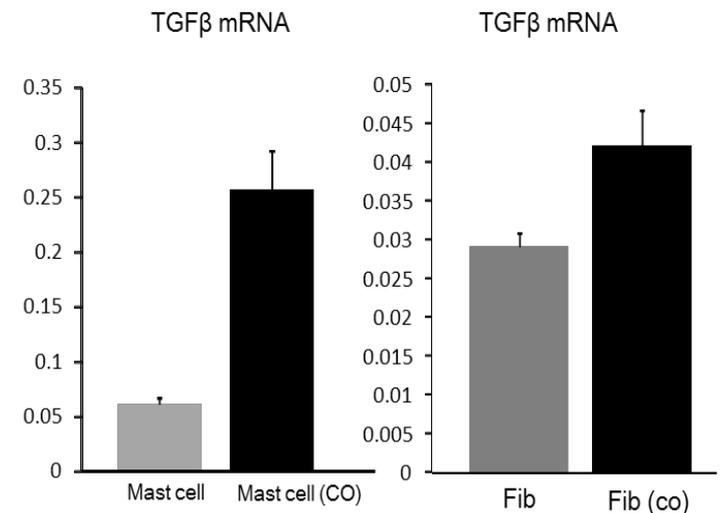


図B



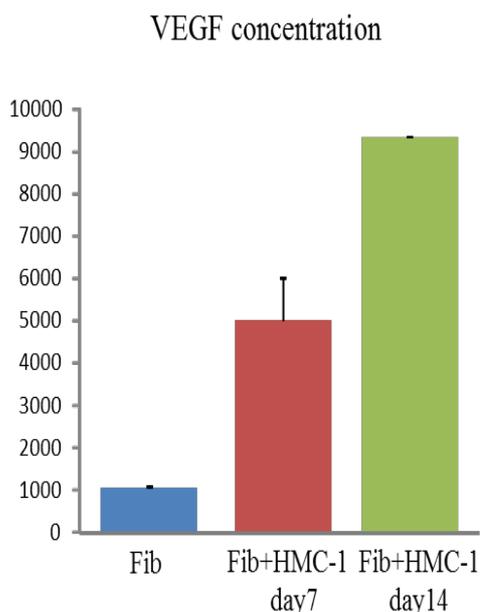
さらに、線維化促進因子である TGF β の測定を coculture 実験で行った (図C)

図C



TGF β の発現は mast cell および fibroblast でそれぞれ発現の上昇を認めた。以上の実験結果から、mast cell は fibroblast と

amplification loop を形成し、線維化促進因子である TGF の産生を促進させ肺線維化促進的に作用する可能性が示唆された。さらに血管新生促進因子である VEGF の coculture 培養液中の濃度を ELISA 法で測定を行った(下図)。



Coculture により VEGF の産生は有意に上昇を認め、肺線維化促進に血管新生を介して関与する可能性が示唆された。

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 5 件)

1. 海江田信二郎 Mast cell と関節リウマチアレルギーと臨床 36, 2016, 44-47. (査読無)
2. Kaieda S., Takenaka S, Kawayama T, Matsuoka M, Kaku Y, Kinoshita T, Sakazaki Y, Okamoto M, Tominaga M, Kanesaki K, Chiba A, Miyake S, Ida H, Hoshino T. IL-38: A new factor in rheumatoid arthritis. *Biochemistry and Biophysics Reports*. 2015;4:386-91. (査読有)
3. Sano K, Miura S, Fujiwara T, Fujioka R, Yorita A, Noda K, Kida H, Azuma K, Kaieda S., Yamamoto K, Taniwaki T, Fukumaki Y, Shibata H. A novel missense mutation of RYR1 in familial idiopathic hyper CK-emia. *J Neurol Sci*. 2015 ;356:142-7. (査読有)
4. Kaieda S., Yoshida N, Yamashita F, Okamoto M, Ida H, Hoshino T., Fukuda T. Successful treatment of macrophage activation syndrome in a patient with dermatomyositis by combination with immunosuppressive therapy and

plasmapheresis. *Mod Rheumatol*. 2015;25:962-6. (査読有)

5. Kaieda S., Zaizen Y, Nomura Y, Okabe K, Honda S, Kage M, Ida H, Hoshino T., Fukuda T. An autopsy case of refractory vasculo-Behcet's disease. *Mod Rheumatol*. 2015: 25:307-11. (査読有)

[学会発表](計 6 件)

1. Kaieda S., Yoshida N, Kunitake Y, Wakasugi D, Fujiwara Y, Komohara Y, Ida H, Hoshino T. Involvement of M2 macrophages in the pathogenesis of Arthritis in a Mouse Model. 60th Academic meeting of American College of Rheumatology. 2015. Nov. 9. San Francisco (U.S.A)
2. IL-38: A new factor in rheumatoid arthritis Kaieda S., Takenaka S, Hoshino T. 12th World Congress. 2015.Aug.9. Boston (USA)
3. Kaieda S., Okamoto M, Tominaga M, Yoshida N, Hidaka Y, Wakasugi D, Kanezaki K, Ida H. IL-38: A New Factor in Rheumatoid Arthritis. 第 59 回日本リウマチ学会総会・学術集会. 2015.4.24. 名古屋国際会議場(愛知県 名古屋市)
4. Kaieda S. IL-38: A New Factor in Rheumatoid arthritis. 78th Annual Scientific Meeting on American College of Rheumatology. 2014.Nov. 12 Boston (USA)
5. The involvement of mast cells in the development of lung fibrosis Kaieda S., Tajiri M, Okamoto M, Yoshida N, Ida H, Hoshino T., Fukuda T. Annual meeting of Japan College of Rheumatology 2014 年 4 月 25 日 高輪プリンスホテル(東京)
6. The involvement of mast cells in the development of lung fibrosis Kaieda S., Tajiri M, Okamoto M, Yoshida N, Ida H, Hoshino T., Fukuda T. Annual meeting of American College of Rheumatology 2013 Oct 29. San Diego (USA)

[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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海江田信二郎 (Shinjiro Kaieda)

久留米大学・医学部・講師

研究者番号：20330798

(2) 研究分担者

星野友昭 (Tomoaki Hoshino)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：261066

(3) 連携研究者 なし