

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860650

研究課題名(和文)サルコイドーシスにおける肉芽腫形成修飾因子の臨床的応用

研究課題名(英文)Clinical application of granuloma formation modifying factor in sarcoidosis

研究代表者

竹中 隆一 (Takenaka, Ryuichi)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：90457606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：サルコイドーシス(n=72)と健常者(n=15)の血清および気管支肺胞液中(以下BALF)のHMGB1値をELISA法にて測定した。BALF中のHMGB1値は健常者と比較しサルコイドーシス群で有意に上昇していた。一方血清中HMGB1値は有意な差は見られなかった。サルコイドーシス患者の肺VATS組織を用いてHMGB1の免疫染色を行ったところ、肉芽腫周囲のリンパ球、マクロファージなどの単球系やⅡ型肺胞上皮細胞にHMGB1が発現していた。HMGB1がサルコイドーシスの局所で何らかの役割を持って上昇していることが示唆されたが、現時点ではその役割までは解明できていない。今後の研究で明確にする予定である。

研究成果の概要(英文)：The HMGB1 BALF concentrations of were significantly higher in patients with sarcoidosis (n=72) compared with healthy volunteers (n=15). We could not find significant difference in the serum levels of HMGB1 between sarcoidosis and healthy volunteers. Immunohistochemistry showed HMGB1-positive staining in lymphocytes around the granuloma, macrophage, and alveolar epithelial type II cells of the lung specimen from patient with sarcoidosis obtained by video-assisted thoracoscopic surgery lung biopsy. The increased levels of HMGB1 may play some roles in the pathogenesis of sarcoidosis. Further study is in progress to clarify the detailed roles of HMGB1 in sarcoidosis.

研究分野：呼吸器内科

キーワード：サルコイドーシス HMGB1 肉芽腫 RAGE

### 1. 研究開始当初の背景

HMGB1 は本来細胞核内に存在する DNA 結合蛋白であり、種々の重症病態において活性化されたマクロファージや血小板から能動的に分泌され、receptor for advanced glycation end-product (RAGE)を介して NF- $\kappa$ B を活性化し、炎症反応や細胞遊走を促進することが知られている。

肉芽腫性腎炎ラットモデルにおいて、HMGB1 が MCP-1 ( monocyte chemoattractant protein-1) を介した肉芽形成に関与していることが報告された (*Lab Invest.* 2010)。また、*Propionibacterium acnes* 誘発肺肉芽腫モデルにおいて肉芽腫周囲のマクロファージに MCP-1 が発現し、この MCP-1 により T リンパ球の遊走が活性化されていることが報告されている (*Microsc Res Tech.* 2001)。さらには肺サルコイドーシスにおいては、T リンパ球が産生する IFN- $\gamma$  が肉芽腫形成に最も重要なサイトカインであることが報告されている (*J Clin Invest.* 1985)。これらのことからサルコイドーシスにおいて HMGB1 が何らかの関与をしている可能性が示唆される。これまでサルコイドーシスにおける HMGB1 と肉芽腫形成に関連した研究報告はされていない。

### 2. 研究の目的

サルコイドーシスにおける HMGB1 の肉芽腫形成における役割を解明し、最終目標は治療応用へ発展させることである。

### 3. 研究の方法

(1) サルコイドーシスの気管支肺胞洗浄液・肺組織中 HMGB1, MCP-1, IFN- $\gamma$  発現検討  
サルコイドーシスと健常ボランティアの気管支肺胞洗浄液中 HMGB1, MCP-1, IFN- $\gamma$  の濃度を ELISA 法にて測定する。

凍結保存肺組織 (サルコイドーシス、肺癌切除組織健常部分) での HMGB1, MCP-1, IFN-

蛋白発現はウエスタンブロット法にて行い、デンシトメトリー解析により定量化する。HMGB1, MCP-1, IFN- $\gamma$  の mRNA 発現を Real-time PCR 法により解析する。

(2) サルコイドーシスにおける HMGB1 産生細胞の同定

ホルマリン固定したサルコイドーシスと対象群の胸腔鏡下肺生検組織に対して抗 HMGB1 抗体、抗 S-100 抗体 (類上皮細胞のマーカー)、抗 RAGE 抗体、抗 CD68 抗体 (肺胞マクロファージのマーカー) を用いて、二重免疫染色を行う。

単位面積当たりの HMGB1 陽性細胞数をカウントし、比較する。

(3) サルコイドーシスでの HMGB1 特異的なマクロファージからの MCP-1 産生亢進の検討

サルコイドーシスと対照群 (健常ボランティア) の気管支肺胞洗浄液から肺胞マクロファージを接着法にて分離する。1.0 x 10<sup>5</sup> /ml に細胞濃度調整後、ヒト HMGB1 組換えタンパク質添加後、さらに 37 $^{\circ}$ C、5 時間培養した後に培養上清を回収し、培養上清中 HMGB1 濃度を ELISA 法にて測定する。

上記と同様に肺胞マクロファージを分離・培養し、抗 HMGB1 中和抗体添加時 (1  $\mu$ g/ml, 10  $\mu$ g/ml, 100  $\mu$ g/ml) において MCP-1 産生が抗体濃度依存性に抑制されることを検証する。

(4) HMGB1 過剰による肺肉芽腫形成への影響

ATCC 標準株の *Propionibacterium acnes* 加熱死菌でウサギの皮下に前感作後、再度経静脈的に *Propionibacterium acnes* を経静脈的に投与することで、肺内の病変形成を誘導し、経時的に屠殺して以下の解析を感作群と生食を投与した対照群とで比較検討する。HMGB1 組換え蛋白を投与開始3日前から連日、1) 経静脈的と 2) 経腹腔的 (それぞれ 0.1

mg/day) に投与する。

*Propionibacterium acnes* を経静脈的投与後、day1, day3, day7, day14, day28 にウサギを安楽死させ、肺組織における HMGB1, MCP-1, IFN- のタンパク発現をウェスタンブロット法にて行い、デンシトメトリー解析をする。また HMGB1, MCP-1, IFN- の mRNA 発現を Real-time PCR にて測定する。各群の経時的な病変形成の推移を、肉芽腫 1 個あたりの平均面積、単位面積当たりの肉芽腫の個数により、定量的に評価する。

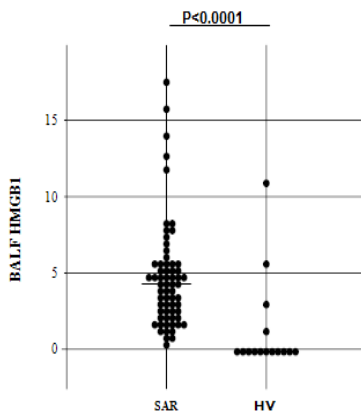
#### (5) HMGB1 抑制による肺線維化への影響

上記(4)の *Propionibacterium acnes* 誘発肺肉芽腫モデルにおいて、*Propionibacterium acnes* を経静脈的投与後に抗 HMGB1 中和抗体 (0.2 mg/回) を day-3, 0, 4, 8, 12 に腹腔内に投与し、上記(1)と同様に HMGB1, MCP-1, IFN- の測定、肺肉芽腫の評価を行う。

#### 4. 研究成果

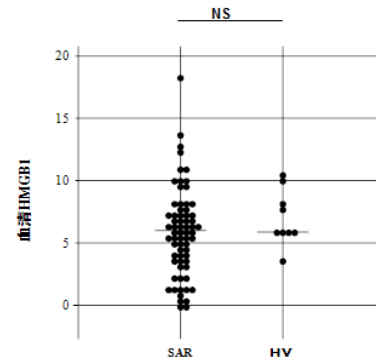
サルコイドーシス (n=72) と健常者 (n=15) の血清および気管支肺胞液中 (以下 BALF) の HMGB1 値を ELISA 法にて測定し比較検討した結果、BALF 中の HMGB1 値は健常者と比較しサルコイドーシス群で有意に上昇していることが判明した。

BALF中HMGB-1濃度



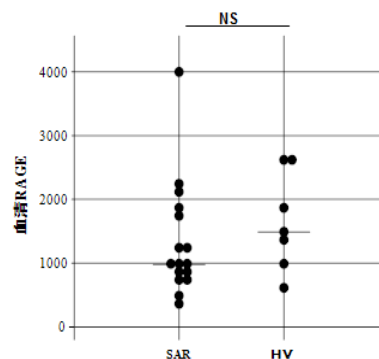
しかし一方血清中 HMGB1 値はサルコイドーシス群と健常者で有意な差はみられなかった。

血清中HMGB-1濃度



この結果より、HMGB1 はサルコイドーシスにおいて全身反応として上昇しているのではなく、局所において何らかの役割を持って上昇していることが考えられた。また、HMGB1 のレセプターの 1 つである RAGE についても同様に ELISA 法で検討を行った。その結果、RAGE は血清中も BALF 中もともにサルコイドーシス群と健常者では有意な差を認めなかった。

血清中sRAGE濃度

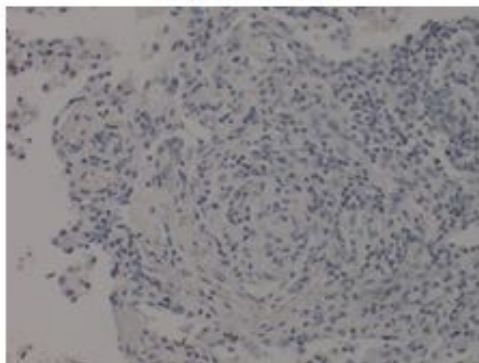


この結果の解釈は難しいが、今回 ELISA で測定した RAGE は活性をもつ可溶性 RAGE と相関しないとの報告もあり、今回の結果は RAGE の実態をうまく把握できていない可能性もあると考えられた。今後可溶性 RAGE などを測定した検討が望ましいと考えられる。

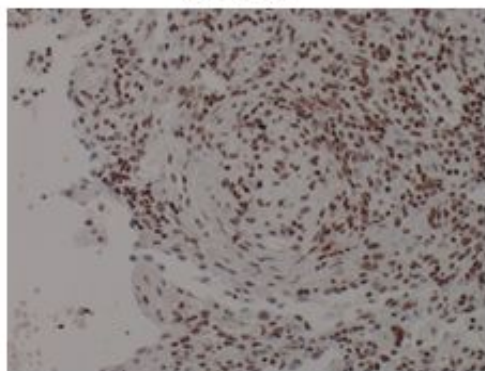
これまでの結果より HMGB1 がサルコイドーシスの局所において何らかの役割を持っていることが示唆された。その機能を解明すべく、サルコイドーシス患者の肺 VATS 組織を用いて免疫染色にてその発現細胞の同定をここ

るみた。その結果、サルコイドーシスの肺組織において HMGB1 が肉芽腫周囲のリンパ球、マクロファージなど単球系や Ⅱ型肺胞上皮細胞などに発現していることを確認した。

Negative Control



HMGB-1



発現細胞を特定するべく CD3 や CD20 や SP-A などとの二重染色を行ったが上記結果で矛盾しない結果であった。

次に HMGB1 が肉芽腫形成に関わっていることを証明すべく、MCP1 との関連に注目し検討した。これまでに MCP1 は肉芽腫疾患において有意に上昇しておりサルコイドーシスの肉芽腫形成に関わっているとの報告もある。サルコイドーシス患者および健常者の血清および BALF 中の MCP1 の ELISA 測定をこころみたが手技的な問題かうまく結果が得られず、再度 ELISA 測定を検討している。今回の研究期間中にはここまでの成果しか得られなかった。

現時点ではその役割までは明確に出来ないが、HMGB1 がサルコイドーシスの局所で

増加しておりその発現細胞が肉芽腫周囲の単球系や Ⅱ型肺胞上皮細胞と複数にわたり複雑な役割を担っていること示唆された。今後、MCP1 を始め、様々なケモカインなどを測定し HMGB1 との相関を検討し、その役割を明確にしていく予定である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計1件)

菅貴将、当科における高齢者サルコイドーシスの検討、日本サルコイドーシス・肉芽腫性疾患学会、2014年11月2日、新潟医療育成センター(新潟県新潟市)

〔その他〕

ホームページ

<http://www.med.oita-u.ac.jp/naika2/>

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

竹中 隆一 (TAKENAKA, Ryuichi)

大分大学・医学部 助教

研究者番号：90457606