

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461201

研究課題名(和文)自家骨髄細胞の肺線維化病態への臨床応用に向けた培養系構築と脾臓の役割に関する研究

研究課題名(英文) Investigation of the effects of autologous bone marrow and spleen cells on pulmonary fibrosis

研究代表者

神尾 孝一郎 (Kamio, Koichiro)

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：20465305

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)：本研究の目的は自家細胞を用いた肺線維化病態の改善である。自家細胞としてC57BL/6マウスから抽出した骨髄細胞と脾臓細胞を使用。同系統のマウスにブレオマイシン(BLM)を投与し肺線維症モデルを作成(day 0)。BLM投与後7(day 7)あるいは14日目(day 14)にこれらの細胞を尾静脈より単回養子移入した所、脾臓細胞のday 14の投与で肺線維化が有意に抑制された。

この作用は抗CD25モノクローナル抗体により消失したため、脾臓細胞中の制御性T細胞(Treg)の関与が推定された。このためマウス脾臓よりTregを単離しBLM肺線維症モデルマウスに投与した所、線維化は有意に抑制された。

研究成果の概要(英文)： In the current study, we aimed at the resolution of pulmonary fibrosis using autologous bone marrow or spleen cells. Pulmonary fibrosis was induced by bleomycin (BLM) (day 0), then, bone marrow cells or spleen cells were adoptively transferred via tail veins on day 7 or 14.

Adoptive transfer of spleen cells significantly ameliorated BLM-induced murine pulmonary fibrosis on day14. This effect was abrogated by neutralization of CD25 by anti-CD25 monoclonal antibody, which suggests that regulatory T cells (Tregs) are involved in the effect of spleen cells.

To further characterize the mechanisms by which Tregs exert anti-fibrotic effects, we isolated Tregs from spleens of C57BL/6 mice using magnetic beads, then, adoptively transferred them into BLM-induced pulmonary fibrosis mice on day 14. Tregs significantly ameliorated pulmonary fibrosis which was measured by Ashcroft score and hydroxyproline. This was accompanied by reduced expression of fibroblast growth factor 9 and IL-10.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：制御性T細胞 特発性肺線維症 ブレオマイシン FGF9 IL-10

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis; IPF) は肺間質の線維化と共に進行性に呼吸機能の低下を来す呼吸器難病であり、診断からの生存期間の中央値は 2.5~3.5 年である。IPF の病態には不明な部分が多いが、様々な要因による肺胞上皮細胞の障害に引き続いて起こる組織修復不全が想定され、筋線維芽細胞の異常な増殖から細胞外基質の過剰な沈着が起こり、線維化が進行するものと推定されている。現在作用機序の異なる 2 つの抗線維化薬 (ピルフェニドン、ニンテダニブ) が使用可能となったが、いずれも肺活量の低下抑制が主たる作用であり、疾患の進行を完全に停止せしめるものではないのが現状である。このため肺線維化病態の解明のための基礎研究と、さらなる病態への介入手段の開発は喫緊の課題である。

(2) IPF の病態において、T リンパ球が果たす役割は明確にはなっていないが、線維芽細胞巢における T リンパ球の浸潤が報告されている。T リンパ球の中でも CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells (制御性 T 細胞; Tregs) は免疫寛容において重要な役割を果たしている細胞であるが、IPF 患者では Treg 活性の低下が報告されている<sup>1)</sup>。また肺線維症モデルマウスの線維化期において、Treg の作用を抗 CD25 抗体を用いて抑制すると線維化が悪化することが報告されており、Treg の抗線維化作用が期待されている<sup>2)</sup>。

しかしながら IPF でも肺線維症モデルマウスにおいても Treg の作用は未だに明確になっておらず、ブレオマイシン誘発肺線維症モデルマウス前半の炎症相での Treg の投与は却って線維化を悪化させるとの報告もなされている<sup>3)</sup>。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究は骨髄細胞や脾臓細胞などの自家細胞を用いた肺線維化病態の改善効果を検討する事を目的としている。

## 3. 研究の方法

(1) マウスは C57BL/6 マウスを使用。浸透圧ポンプを用いてブレオマイシン 100 mg/kg を投与し肺線維症モデルを作成した。ブレオマイシン投与開始後、7 日目あるいは 14 日目に  $1 \times 10^5$  の脾臓細胞をマウス尾静脈より投与、28 日目に sacrifice し、摘出した肺組織で hematoxylin and eosin (HE) 染色を行った。線維化の評価には Ashcroft score を使用した。また Treg の関与を評価するために、CD25 に対するモノクローナル抗体を用いて Treg 表面上の CD25 の中和を行い、Treg の抑制を試みた。

(2) C57BL/6 マウスの脾臓より、磁気ビーズを用いて Treg を単離、C57BL/6 マウスにブレオマイシンを投与し肺線維症モデルマウスを作成、14 日目にマウス尾静脈より  $1 \times$

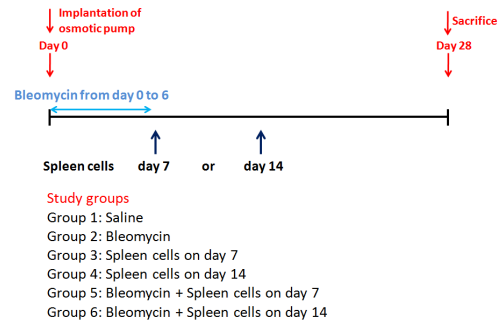
$10^6$  の Treg を投与した。28 日目に sacrifice し肺組織を摘出、また同時に血液を採取した。肺組織は HE ならびに Masson trichrome 染色を行い、Ashcroft score を用いて線維化の程度を評価した。さらに肺組織中の hydroxyproline の定量を行った。また肺組織では fibroblast growth factor (FGF) 9 の発現の定量を免疫染色で行った。血液中の FGF9 および Interleukin (IL)-10 を ELISA 法で定量した。

## 4. 研究成果

### (1) ブレオマイシン誘発肺線維症の脾臓細胞投与による改善

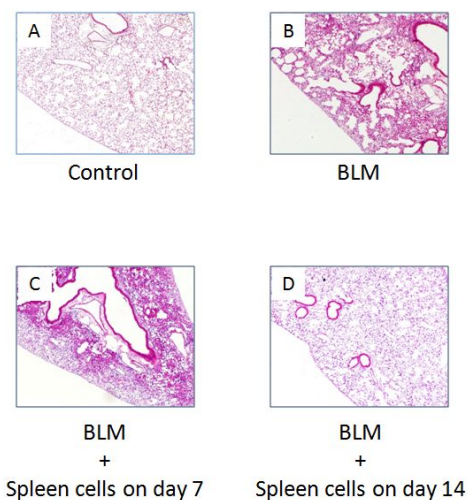
C57BL/6 マウスに浸透圧ポンプを用いてブレオマイシン 100 mg/kg を投与。投与後 7 日目あるいは 14 日目に脾臓細胞  $1 \times 10^5$  をマウス尾静脈より投与した (図 1)。

#### 図 1 脾臓細胞投与のプロトコール



28 日目に肺組織を摘出し HE 染色を行った (図 2A-D)。ブレオマイシン (BLM) 投与により形成された線維化は (図 2B)、脾臓細胞の 14 日目の投与で抑制されたが、7 日目の投与では抑制効果は明らかでは無かった。

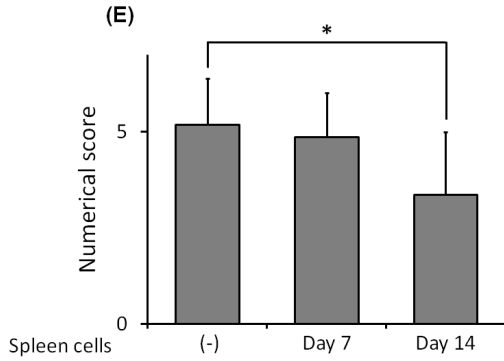
#### 図 2A-D 脾臓細胞投与肺の HE 染色



Ashcroft score を用いて線維化の定量を行った所、脾臓細胞の 14 日目の投与で、線維化は有意に抑制された (図 2E)。

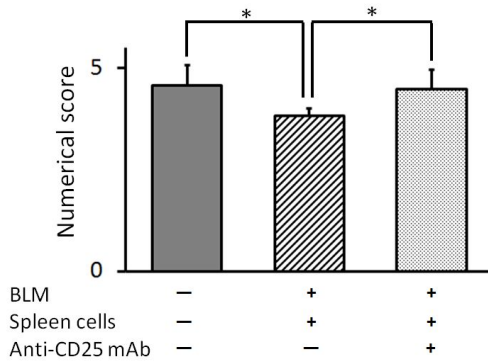
### (2) 脾臓細胞の抗線維化効果に対する抗 CD25 モノクローナル抗体の影響

**図 2 E** 脾臓細胞投与肺の線維化の定量



C57BL/6 マウスの脾臓細胞を抗 CD25 モノクローナル抗体と反応させ、Treg の抑制を試みた。これらの細胞を ( $1 \times 10^5$ )、プレオマイシン (BLM) 誘発肺線維症モデルマウス尾静脈より 14 日目に投与した。抗 CD25 抗体投与により、脾臓細胞が有する抗線維化作用は消失した (図 3)。

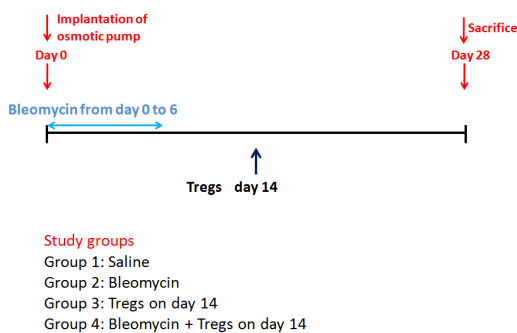
**図 3** 脾臓細胞の抗線維化作用に対する抗 CD25 モノクローナル抗体の効果



**(3) Treg の抗線維化作用に関する検討**

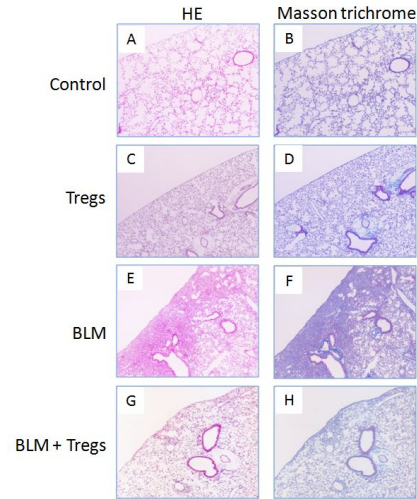
以上より、脾臓細胞の抗線維化効果には Treg が関与することが予想されたため、プレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスを用いて、Treg の抗線維化作用を検討した。C57BL/6 マウスに浸透圧ポンプを用いてプレオマイシン 100 mg/kg を投与。プレオマイシン無投与のマウス脾臓細胞より磁気ビーズを用いて Treg を単離し、肺線維症モデルマウスに 14 日目に  $1 \times 10^6$  の Treg をマウス尾静脈より投与した (図 4)。

**図 4** Treg 投与の実験計画



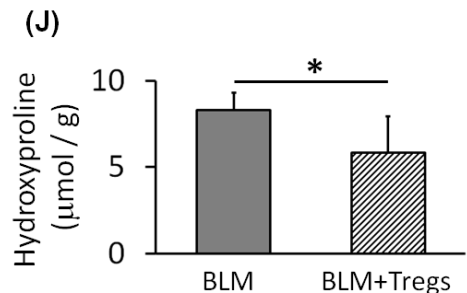
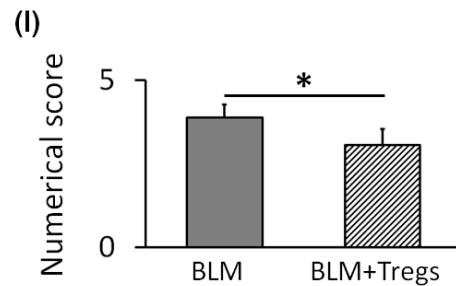
28 日目に肺組織を摘出し、HE 染色および Masson trichrome 染色を行った。組織学的に、Treg の投与によりプレオマイシン (BLM) 誘発の線維化が軽減される事が確認された (図 5 A-H)。

**図 5 A-H** Treg 投与肺の HE 染色および Masson trichrome 染色



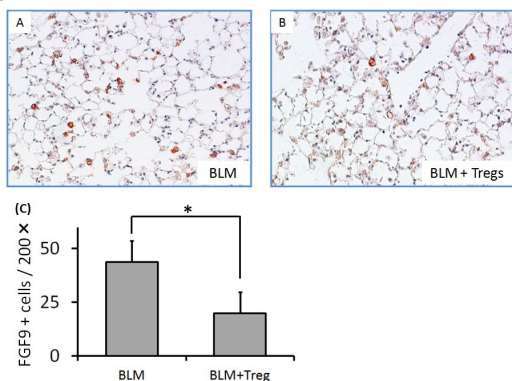
これは Ashcroft score を用いた線維化の定量 (図 5 I) および肺組織中の hydroxyproline の定量 (図 5 J) でも確認された。

**図 5 I, J** Treg 投与肺の線維化の定量

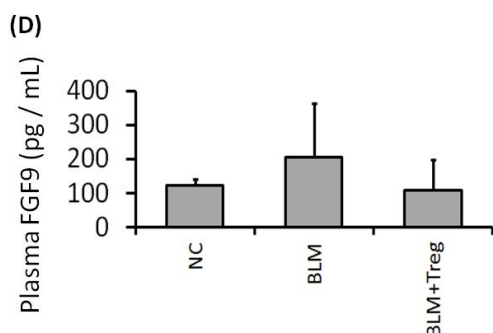


さらに Treg の FGF9 発現に対する効果を検討した。プレオマイシン (BLM) の投与により、FGF9 の発現は肺泡マクロファージと肺上皮細胞で増加した (図 6 A)。Treg の投与により、これらの FGF9 陽性細胞は有意に減少した (図 6 B,C)。血漿中の FGF9 はプレオマイシン投与で増加したが、Treg の投与によりこの FGF9 は低下する傾向が認められた (図 6 D)。

**図6A - C** Treg 投与による FGF9 発現の変化

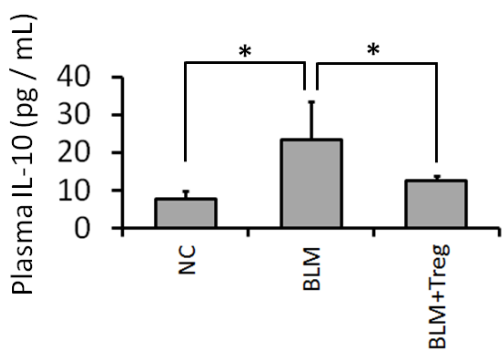


**図6D** Treg 投与による血漿中 FGF9 の変化



最後に Treg 投与による血漿中の抗炎症性のサイトカインである interleukin (IL)-10 の変化を確認した。Treg の投与により血漿中の IL-10 は増加する事が予想されたが、これに反してプレオマイシン (BLM) の投与で増加した血漿中 IL-10 は、Treg の投与で有意に低下した (図7)。

**図7** Treg 投与による血漿中 IL-10 の変化



**(4) 得られた成果の位置づけと今後の展望**

本研究では、プレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスの線維化相での Treg の抗線維化作用が示された。これは Boveda-Ruiz らの知見と一致するものであり、線維化病態における Treg の有用性を示唆するものである。本研究成果は現在 Cytotherapy に投稿中である。(Resolution of bleomycin-induced murine pulmonary fibrosis via a splenic lymphocyte subpopulation. Kamio K, Azuma A, Matsuda K, Usuki J, Inomata M,

Morinaga A, Nishijima N, Itakura S, Hayashi H, Kashiwada T, Kokuho N, Atsumi K, Yamaguchi T, Fujita K, Saito Y, Abe S, Kubota K, Gemma A.)

本研究においては Treg の抗線維化作用の詳細なメカニズムの解明には至らなかった。また Treg は単回投与であり、その抗線維化作用が十分に引き出せていない可能性がある。今後の研究においては Treg の抗線維化作用の詳細なメカニズムの解明が課題であり、この解析は肺線維化病態の解明に繋がるものと考えられる。また今後は Treg の複数回投与での検討や、ex vivo での Treg expansion も行い、これらの細胞を用いた抗線維化作用の有無も確認する。以上の研究を通じて、Treg の IPF に対する臨床応用の可能性を模索したい。

尚、本研究の初期において骨髓細胞の抗線維化作用も検討したが、骨髓細胞では Treg に見られた様な作用は認められなかった。

<引用文献>

- 1) Kotsianidis I, Nakou E, Bouchliou I, Tzouveleakis A, Spanoudakis E, Steiropoulos P, et al. Global impairment of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2009;179:1121–1130.
- 2) Boveda-Ruiz D, D'Alessandro-Gabazza CN, Toda M, Takagi T, Naito M, Matsushima Y, et al. Differential role of regulatory T cells in early and late stages of pulmonary fibrosis. *Immunobiology* 2013;218:245–254.
- 3) Birjandi SZ, Palchevskiy V, Xue YY, Nunez S, Kern R, Weigt SS, et al. CD4(+)CD25(hi)Foxp3(+) cells exacerbate bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 2016;186:2008–2020.

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 1 件)

Kamio K, Azuma A, Usuki J, Matsuda K, Inomata M, Nishijima N, Itakura S, Hayashi H, Kashiwada T, Kokuho N, Atsumi K, Yamaguchi T, Fujita K, Saito Y, Abe S, Kubota K, Gemma A. XPLN is modulated by HDAC inhibitors and negatively regulates SPARC expression by targeting mTORC2 in human lung fibroblasts. *Pulm Pharmacol Ther.* (査読有) 2017; 44:61-69.

〔学会発表〕(計 1 件)

Kamio K, Azuma A, Usuki J, Matsuda K, Inomata M, Nishijima N, Itakura S,

Hayashi H, Kashiwada T, Kokuho N, Atsumi K, Yamaguchi T, Fujita K, Saito Y, Abe S, Kubota K, Gemma A. XPLN Negatively Regulates SPARC Expression by Targetting mTORC2 in Human Lung Fibroblasts. American Thoracic Society. 2016、米国サンフランシスコ

〔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 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

神尾孝一郎 (KAMIO, Koichiro)  
日本医科大学・医学部・助教  
研究者番号：20465305

### (2) 研究分担者

吾妻安良太 (AZUMA, Arata)  
日本医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10184194

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

松田久仁子 (MATSUDA, Kuniko)  
日本医科大学・実験助手