

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 21 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590868

研究課題名（和文）間質性肺炎におけるマイクロパーティクルの役割と情報伝達としての意義

研究課題名（英文）Role and significance for signaling system of microparticles in interstitial pneumonia

研究代表者

長友 安弘（NAGATOMO YASUHIRO）

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：20268600

研究成果の概要（和文）：

マイクロパーティクル（MP）の間質性肺炎（IP）病態形成への関与、臨床応用への可能性を明らかにすることを目的とし、気管支肺胞洗浄液（BALF）中の MP を測定した。IP の BALF 中の MP は増加しており、MP 濃度は BALF 中の総細胞数、特にリンパ球数と正の相関をしたが、好中球数や LDH 濃度とは相関しなかった。これらの結果から MP は抗炎症性に働いている可能性が考えられた。今後さらに研究を進めたい。

研究成果の概要（英文）：

Interstitial pneumonia (IP) is a poor-prognosis disease and its causative agent is still not clear. Micro particle (MP)s are small vesicles derived from the activated cells and known to have function like cytokines. In the present study, MPs in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were measured by FACS to clarify its relationship to the pathogenesis of IP. MPs were found to be measurable in BALF of IP patients. The levels of MPs were positively correlated with total WBC counts, especially counts of lymphocytes, in BALF, not with granulocytes counts in BALF and serum LDH levels. These data suggested that MPs in BALF is not reflected the disease activity of IP and there is a possibility that MPs may have anti-inflammatory effect. Further study is necessary to include more number of patients and methodology to assess the regulatory factors in the pathogenesis of IP.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：呼吸器内科学

科研費の分科・細目：

キーワード：マイクロパーティクル・情報伝達物質，間質性肺炎

1. 研究開始当初の背景

間質性肺炎（IP）は、その原因として100種類を超える病態が存在する。自己免疫性疾患の代表である膠原病においても、IPの合併が起こることが認識されている。一般にIPの診断には血液検査、画像検査、組織学的検査、肺胞洗浄液が用いられ、総合的に判断されている。それにも関わらず、原因不明の特発性間質性肺炎がIPの多くを占めている。現在、特発性間質性肺炎は病理学的に分類されており、同じ疾患名であってもheterogeneousな病態の集まりであると言える。肺局所にはリンパ球、好中球、マクロファージ等の炎症細胞が集積し、病勢の悪化および線維化に関連していると一般に考えられているが、そのなかに抗炎症に作用し、病勢を抑える作用を持つ制御性の細胞の存在も否定できない。同時に、治療法もステロイドを中心に免疫抑制剤の併用が推奨されてはいるが、何を標的に治療薬が作用しているのかについても明らかではない。そのため、治療効果もエビデンスが得られていないのが実情である。以上から、IPの診断・治療における新たなアプローチが必要と考えられた。

マイクロパーティクル（MP）は細胞由来の小胞であり、活性化白血球や血小板、滑膜細胞、内皮細胞より放出される新規の情報伝達物質である。MPは関節リウマチ（RA）のような炎症性疾患に対して重要な役割を果たしており、特に血小板由来MPは炎症性メディエータとして機能し、RAの病態に関与すると考えられる。一方、活性化顆粒球由来MPは抗炎症性メディエータとして作用する可能性がある。このためMPを測定し、IPの病態解明に応用す

ることを試みた。

2. 研究の目的

MPがIPの病態形成に如何に関与しているか明らかにし、さらにはMPの臨床応用・治療へと展開するための研究基盤を確立することが目的である。

1) 呼吸器疾患におけるMPのスクリーニング：IPを主な対象とし、対照疾患、あるいは関連疾患として、細菌性肺炎、ニューモシチス肺炎、サルコイドーシスについても検討対象とした。気管支肺胞洗浄液（BALF）中におけるMPの探索を行い、感染性疾患の細菌性肺炎およびニューモシチス肺炎と非感染性炎症性疾患のIPの比較を試みた。またその検出されたMPについては表面マーカー検索を行いその由来についても分析を試みた。

2) IPにおけるMPと細胞成分、血清成分との関連の検討：BALF中のMPと相関性を示すマーカーの有無を、血液およびBALFを用いて検討を試みた。

3) IPの治療反応性とMPとの関連：BALF採取後のIPの臨床経過や使用薬剤との関連を、経過を一定期間追跡し、IPの治療反応性とMPとの関連について検討を試みた。

3. 研究の方法

1) 呼吸器疾患におけるMPのスクリーニング：対象は当科で診療をうけている間質性肺炎（特発性、膠原病肺、Castleman病、薬剤性）患者及び、他の呼吸器疾患患者（感染性肺炎、サルコイドーシス）のなかでインフォームドコンセントを得た患者とした。研究プロトコールは倫理委員会に申請し承認を得

た。

患者の病変部から気管支内視鏡検査によりBALFを採取し、3.2%クエン酸Naを加え、超遠心で処理することによってMPペレットを精製・回収した。またMPのマーカである細胞表面Annexin V陽性粒子をフローサイトメトリー (BD FACSCalibur) を用いて、測定した。

2) IPにおけるMPと細胞成分、血清成分との関連の検討： BALF中のMP濃度とBALF中の総細胞数、細胞種類、また液性因子として血清およびBALF中のLDHなどとの比較を行った。また各種抗体を用いてMPを染色し、その由来細胞の同定を行った。

3) IPの治療反応性とMPとの関連：ステロイドや免疫抑制剤治療によるIPの治療反応性とBALF中MPとの関連性を検討した。IPの治療反応性の有無とどの細胞由来のMPが発現しているか、さらに使用薬剤による検討も行った。

4. 研究成果

1)BALF 中の MP 濃度を測定した患者数は 25 例で、IP 9 例 (特発性 3 例、膠原病肺 4 例、Castleman 病 1 例、薬剤性 1 例)、細菌性肺炎 3 例、ニューモシスチス肺炎 5 例、サルコイドーシス 8 例であった。

MP 濃度は IP では $0.5 \sim 5.7 \times 10^5/\text{ml}$ (中央値 $2.0 \times 10^5/\text{ml}$)、細菌性肺炎では $0.3 \sim 3.1 \times 10^5/\text{ml}$ (同 $1.4 \times 10^5/\text{ml}$)、ニューモシスチス肺炎では $0.1 \sim 1.3 \times 10^5/\text{ml}$ (同 $0.9 \times 10^5/\text{ml}$)、サルコイドーシスでは $0.1 \sim 1.1 \times 10^5/\text{ml}$ (同 $0.4 \times 10^5/\text{ml}$) となり、各疾患で測定感度以上であった。この結果から、これら疾患の気管支肺胞内には有意な MP の産生があることが判明した。

各疾患の BALF 中 MP 濃度を比較した。IP と

細菌性肺炎で高い傾向にあり、特に Castleman 病に伴った IP の 1 例では著明高値を認めた。サルコイドーシスでは MP 濃度は IP に比して有意に低かった ($p=0.043$)。但しサルコイドーシスだけで検討すると、肺野病変を有する群 5 例 (62.5%) の MP 濃度は $0.6 \times 10^5/\text{ml}$ で、有さない群の $0.4 \times 10^5/\text{ml}$ に比してやや高い傾向にあり MP 濃度が肺野病変に関連していることを示唆した。

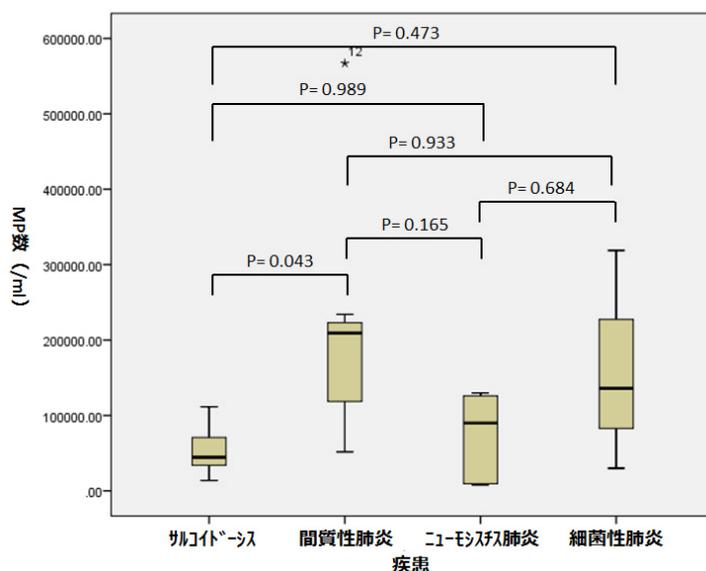


図1 各呼吸器疾患における BALF 中 MP 濃度

2) IP における MP と細胞成分、血清成分との関連の検討

上記の結果から、IP の肺内に MP が発現していることが証明できたため、BALF 中の MP 濃度と BALF 中の総細胞数、リンパ球数、好中球数との相関性を検討した。その結果 BALF 中 MP 濃度と BALF 中総細胞数には正の相関が見られた (図2)。細胞の分類では、特にリンパ球数との相関性が強く見られ、好中球数との関連は明確でなかった (図3)。さらに IP における BALF 中の MP 濃度は、血清 LDH と負の相関を示した (図4)。

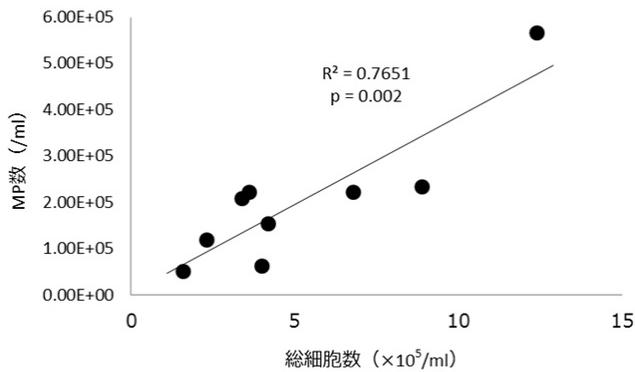


図2 IPのBALF中MP濃度と総細胞数の関係

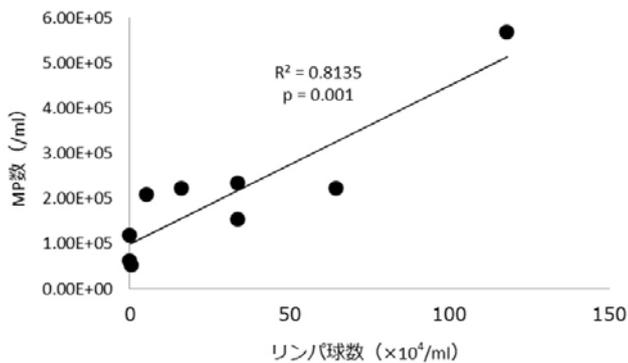


図3 IPのBALF中MP濃度とリンパ球数の関係

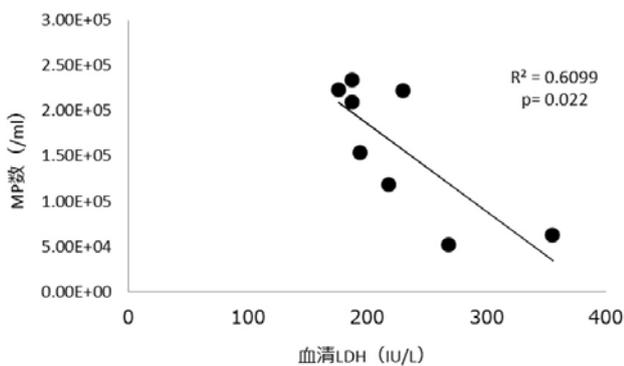


図4 IPのBALF中MP濃度と血清LDHの関係

これらの結果は、BALF中のMPは細胞数、特にリンパ球を反映しており、病勢のマーカである好中球数や血清LDHと相関しなかったことから、MPの増加が炎症そのものを反映しているとは考えにくい、と思われた。

さらに各種抗体を用いてMPを染色し、その由来細胞の同定を行った。IP患者を対象に、

顆粒球由来MP表面マーカーであるAnnexin V/CD 66b、単球由来MP表面マーカーであるAnnexin V/CD 14、血小板由来MP表面マーカーであるAnnexin V/CD 42aの各MP濃度を測定し、BALF中総細胞数との相関性を検討した。その結果、顆粒球由来MP濃度と総細胞数の間には相関する傾向はみられたが、有意ではなかった。また単球由来MP、血小板由来MPと総細胞数との間には有意な相関は見られなかった。

I Pの対照疾患、関連疾患である、細菌性肺炎、ニューモシスチス肺炎、サルコイドーシスでも同様な検討を行ったが、血清およびBALF中のLDHなどとBALF MP濃度との間には、有意な相関は得られなかった。

サルコイドーシスのBALF中のMP濃度とリンパ球数との比較では、弱い正の相関傾向があったが、有意ではなかった。そのほかCastleman病に伴ったIP（非改善群）では顆粒球由来であるAnnexin V/CD 66bのMP濃度が $4.5 \times 10^3/\text{ml}$ 、薬剤性IP（改善群）では単球由来であるAnnexin V/CD 14のMP濃度が $3.4 \times 10^3/\text{ml}$ とやや上昇していたが、特発性IPや膠原病肺ではAnnexin V/CD 66b、Annexin V/CD 14、血小板由来であるAnnexin V/CD 42aの上昇は明らかでなかった。

3) IPの治療反応性とMPとの関連

治療反応性については、特発性IPでは全例改善していたが、膠原病性IPでは改善群：非改善群が1:3であった（表1）。また治療による改善群と非改善群との間で、ステロイドを含め治療内容に大きな違いがなく、未治療でも改善するIPがある一方、多剤併用治療でも改善しないIPが存在した（表2）。

表 1: IP 原因別の治療反応性

	改善	不変	悪化
特発性	3	0	0
膠原病性	1	2	1
Castleman病	0	0	1
薬剤性	1	0	0

表 2: 治療薬別の治療反応性と MP 濃度

	改善	非改善
ステロイド	3	3
CPM	1	2
CyA	2	1
その他	0	2
なし	2	0
MP濃度	$1.5 \times 10^5 / \text{ml}$	$3.7 \times 10^5 / \text{ml}$

CPM: cyclophosphamide

CyA: cyclosporine A

BALF MP 濃度の検討では改善群 5 例の BALF 中 MP 濃度は $1.5 \times 10^5 / \text{ml}$ (中央値) で、非改善群 (不変+悪化) 4 例の MP 濃度は $3.7 \times 10^5 / \text{ml}$ (中央値) と、非改善群で高値であったが、有意差は見られなかった (表 2、図 5)。

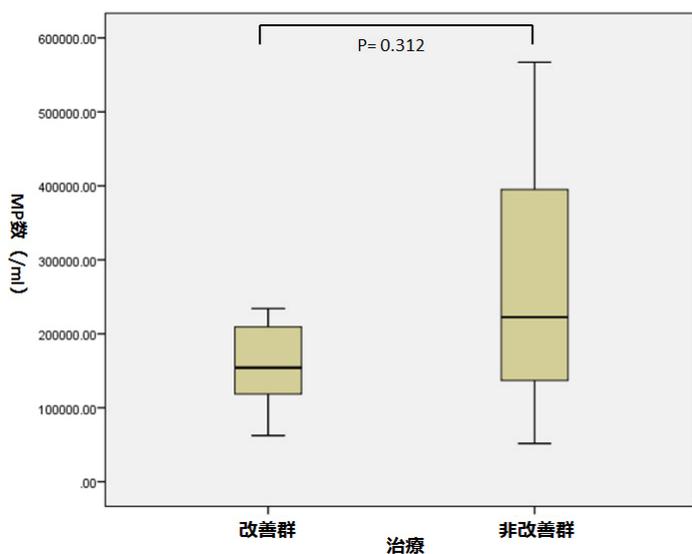


図 5 BALF 中 MP 濃度と治療反応性の比較

以上の結果より今回の検討から、まず MP は呼吸器疾患の肺内に発現していることが明らかとなった。肺野病変が少なかったサルコイドーシスでは MP の発現が少なく、細菌性肺炎やびまん性肺疾患である IP で発現が高かったことから、肺の侵襲度と関連している可能性があった。

IP においては BALF 中の MP 濃度と総細胞数、特にリンパ球数との間に相関が見られた。このことは肺内のリンパ球が MP 由来と推測された。しかしながら今回の検討では MP 表面マーカーとしてリンパ球由来のものを測定していなかったため、明確な結論を得ることができなかった。さらなる検討を要する。BALF 中の MP が細胞数、特にリンパ球を反映しており、病勢のマーカーである好中球数や血清 LDH と相関しなかったことから、MP の増加が炎症そのものを反映しているとは考えにくく、制御性 T 細胞の様な抗炎症性細胞を反映し、生体内の防衛反応である可能性も否定できないと思われた。この点についても MP のみならず BALF 中のリンパ球表面マーカーを測定する等の更なる検討を要する。

IP の治療反応性に関する検討では、非改善群で MP 濃度が高い傾向にあったが、治療薬をふくめて明確な関連はあきらかでなかった。このため MP 濃度を予後予測や治療薬の選択に使用可能かどうかの結論を得るには至らなかった。

本研究の問題点としては、まず現時点では症例数が少なく、さらに非炎症性疾患もふくめた対照疾患との比較や健常者との比較検討も不十分であった。今後さらに幅広く呼吸器炎症性疾患の検討が必要である。さらに方法論としては、BALF 中の MP のみならず、細胞成分についても分析し、特異抗体を用いて

その由来を明らかにし、とくに、白血球のみならず肺胞上皮など由来の MP の有無についても検討する必要があると考えられた。これには培養細胞等を用いた研究も必要と思われた。

本研究をすすめていく中で IP の治療薬の選択や予後予測が可能となれば、その後の治療薬の開発など臨床応用に発展するものと思われる。対象疾患の蓄積とともに、今後の研究課題としたい。

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 1 件)

- 1) 長友安弘、上野史朗、楠元紀生、川口剛、松田基弘、宮内俊一、高城一郎、梅北邦彦、岡山昭彦、サルコイドーシスにおけるマイクロパーティクル発現に関する検討. 第 53 回日本呼吸器学会学術総会. 2013 年 4 月 19 日発表. 東京都.

[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]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長友 安弘 (NAGATOMO YASUHIRO)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：20268600

(2) 研究分担者

岡山 昭彦 (OKAYAMA AKIHIKO)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：70204047

(3) 連携研究者

()

研究者番号：