

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：17401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22591095
 研究課題名（和文）
 肺障害に対する血液浄化療法におけるガレクチン・骨髄由来免疫抑制性細胞の役割の解明
 研究課題名（英文）
 Role of galectin-9 and myeloid derived suppressor cells in patients with lung injury
 研究代表者
 一安 秀範（ICHIYASU HIDENORI）
 熊本大学・医学部附属病院・講師
 研究者番号：50419636

研究成果の概要（和文）：

ガレクチン 9 による免疫制御機構の解明のため、ヒト末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) をガレクチン 9 の存在下で刺激培養することによる骨髄由来免疫抑制性細胞 (myeloid derived suppressor cells, MDSCs) 誘導能を健常人群と肺障害群で比較検討した。いずれの群においても培養された PBMC 中に HLA-DR(-)CD33(+) の MDSCs が 2-10% の割合で検出されたが、疾患特異性を示す結果は得られなかった。次に、解析対象を plasmacytoid DC (pDC, HLA-DR(+)CD123(+)) と myeloid DC (mDC, HLA-DR(+)CD11c(+)) に変更し、健常人と肺病変を有するサルコイドーシス症例（以下、サ症）で同様に解析を行った。未刺激下では、健常人群に比較してサ症群で pDC、mDC いずれも減少傾向にあった。一方、ガレクチン 9 刺激下では、pDC 誘導抑制と mDC 誘導亢進を認めたが、両群間に反応性の違いは認められなかった。以上の結果から、ガレクチン 9 による DC 誘導能は、DC のサブタイプにおいて異なることが判明したが、肺疾患の病態形成におけるガレクチン 9 の役割についてはさらなる検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：

To examine immunomodulating activity of galectin-9, the inducibility of HLA-DR⁺CD33⁺ myeloid derived suppressor cells (MDSCs) and dendritic cells (DC) in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) by galectin-9 were compared between healthy volunteers group (HV group) and patients with lung diseases group (LD group). Culture of PBMC with galectin-9 exhibited the induction of MDSCs, there was no difference between those groups. In the absence of galectin-9, percentage of cultured plasmacytoid DC (pDC) and myeloid DC (mDC) in patients with sarcoidosis were lower than those in HV group. In the presence with galectin-9, suppression of pDC induction and enhancement of mDC induction were observed in both groups. These findings indicated that galectin-9 induced differential responses in subtypes of DC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	700,000	210,000	910,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病アレルギー内科学

キーワード：肺障害・ガレクチン 9・骨髄由来免疫抑制性細胞・樹状細胞

1. 研究開始当初の背景

ガレクチンファミリーは、 β ガラクトシド結合レクチンで構成されるタンパク質であり、現在までに十数種類のアイソタイプが知られており、免疫応答に対する新たな調節因子として認識されつつある。しかしながら、肺内の炎症・免疫反応におけるガレクチンの詳細な役割については、解明されていない。

肺の急性炎症でのガレクチンや免疫調節細胞である骨髄由来免疫抑制性細胞 (myeloid derived suppressor cells, MDSCs) の役割を明らかにすることで、この分子を標的にする新たな治療法の開発が可能になると思われる。

2. 研究の目的

ガレクチンファミリーの中でガレクチン 9 は、マクロファージ活性化や好酸球走化作用、Tim-3 (T cell immunoglobulin- and mucin domain-containing molecule 3) リガンドとしてアポトーシス誘導作用を有しており、免疫担当細胞の機能調節に深く関与することが証明されている。従って、肺障害の病態解明のため、ガレクチン 9 や MDSCs、樹状細胞 (DC) などの免疫調節細胞の炎症・免疫制御機構への関与の観点から検討を行うことを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

肺疾患群と健常群の末梢血から Ficoll-Paque 密度勾配遠心法により末梢血単核球 (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) を分離回収し、 5×10^5 /ml に調整した。この PBMC を PBS (未刺激) あるいはガレクチン 9 (30ng/ml)、LPS (30ng/ml) で 24 時間培養し FACS 解析にて HLA-DR(-) CD33(+) MDSCs の定量を行った。また、同様の方法でガレクチン 9 や LPS 刺激による plasmacytoid DC (pDC, HLA-DR(+) CD123(+)), myeloid DC (mDC, (HLA-DR(+) CD11c(+)), plasmacytoid DC 様マクロファージ (pDC like M ϕ , PDCA-1(+), B220(+) CD86(+)) の誘導能の解析を両群間で比較検討した。

4. 研究成果

(1) ガレクチン 9 存在下では、両群ともに PBMC 中に 2-10% の割合で MDSCs が誘導されていたが、疾患群と健常群との比較において有意な差を認めなかった。

(2) 健常群や肺疾患群として肺病変を有するサルコイドーシス患者由来の PBMC をガレクチン 9 や LPS で刺激培養し pDC や mDC を誘導し反応性の違いを比較検討した。pDC と mDC いずれも未刺激下では、健常群 (pDC 3.6 \pm 3.1%, mDC 14.7 \pm 4.1%) に比してサ症群 (pDC

0.9 \pm 0.6%, mDC 7.2 \pm 4.6%) でその割合は低い傾向にあった。一方、ガレクチン 9 刺激下では、健常群で (pDC 1.3 \pm 1.1%, mDC 19.8 \pm 8.3%)、サ症群 (pDC 0.3 \pm 0.03%, mDC 13.7 \pm 10.4%) であり、ガレクチン 9 の pDC 誘導抑制と mDC 誘導亢進作用を認めたが、両群間に反応性の違いは認めなかった。また LPS 刺激やガレクチン 9+LPS 共刺激による pDC や mDC の誘導能に関しても、両群間で有意な差は観察されなかった。

(3) pDC like M ϕ は、未刺激状態下では、健常群で 7.5 \pm 3.7%、サ症群で 10.6 \pm 3.8% の割合で検出された。ガレクチン 9 刺激下では、健常群は pDC like M ϕ の誘導抑制 (6.1 \pm 4.4%)、サ症群は誘導亢進 (11.1 \pm 6.0%) が観察され、LPS 刺激下やガレクチン 9+LPS 共刺激下では、両群ともに誘導抑制を認めていた。

(4) 考察

以上の結果から、ガレクチン 9 による DC 誘導能は、DC のサブタイプにおいて異なることが判明したが、肺疾患の病態形成におけるガレクチン 9 やそれにより誘導される免疫調節細胞の役割についてはさらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

1. Sato N, Kojima K, Horio Y, Goto E, Masunaga A, Ichiyasu H, Kohrogi H. Successful treatment of severe amiodarone pulmonary toxicity with polymyxin B immobilized fiber column direct hemoperfusion (PMX-DHP). Chest 2013, 143:1146-50. 査読有り.
2. Ichiyasu H, Horio Y, Tsumura S, Hirotsako S, Sakamoto Y, Sakata S, Nakashima K, Komatsu T, Kojima K, Masunaga A, Fujii K, Saita N, Kohrogi H. Favorable outcome with hemoperfusion of polymyxin B-immobilized fiber column for rapidly progressive interstitial pneumonia associated with clinically amyopathic dermatomyositis: report of three cases. Mod Rheumatol. 2013. (in press). 査読有り.
3. Fukuoka J, Tominaga M, Ichikado K, Tanaka T, Ichiyasu H, Kohrogi H, Ishizawa S, Suga M. Lung miliary micro-nodules in human T-cell leukemia

- virus type I carriers. *Pathol Int.* 2013, 63:108-112. 査読有り.
4. Ichikado K, Muranaka H, Gushima Y, Kotani T, Nader HM, Fujimoto K, Johkoh T, Iwamoto N, Kawamura K, Nagano J, Fukuda K, Hirata N, Yoshinaga T, Ichiyasu H, Tsumura S, Kohrogi H, Kawaguchi A, Yoshioka M, Sakuma T, Suga M. Fibroproliferative changes on high-resolution CT in the acute respiratory distress syndrome predict mortality and ventilator dependency: a prospective observational cohort study. *BMJ Open.* 1:2:e000545, 2012. 査読有り.
 5. Ichiyasu H, Ichikado K, Yamashita A, Iyonaga K, Sakamoto O, Suga M, Kohrogi H. Pneumocyte biomarkers KL-6 and surfactant protein D reflect the distinct findings of high-resolution computed tomography in nonspecific interstitial pneumonia. *Respiration.* 2012, 83:190-197. 査読有り.
 6. Sato R, Ichiyasu H, Saeki S, Sakata S, Sasaki J, Fujii K, Saita N, Kohrogi H. FDG-PET and chemotherapy for successful diagnosis and treatment of cardiac metastasis from non-small cell lung cancer. *Intern Med.* 2012, 51(14):1909-1912. 査読有り.
 7. 岡林比呂子, 増永愛子, 一安秀範, 津村真介, 小嶋圭介, 佐伯祥, 濱本淳二, 藤井一彦, 税田直樹, 興梠博次. リンパ管筋腫症 7 例の臨床像と血清 VEGF-C, -D および VEGF-R3 値の相関. *日呼吸誌*, 1: 89-94, 2012. 査読有り.
 8. 佐藤奈穂子, 向笠洋介, 増永愛子, 佐伯祥, 一安秀範, 佐々木治一郎, 藤井一彦, 池田理, 山下康行, 興梠博次. 肺癌に伴う上大静脈症候群に対する血管内ステント留置 15 症例の有効性と安全性. *日呼吸誌*, 1: 374-380, 2012. 査読有り.
- [学会発表] (計 8 件)
1. 増永愛子, 税田直樹, 小嶋圭介, 堀尾雄甲, 津村真介, 一安秀範, 興梠博次. サルコイドーシス患者における末梢血マクロファージの機能特異性と Galectin-9 刺激による反応性の検討. 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会. 2013. 4. 19-21. 東京国際フォーラム (東京) .
 2. Okamoto S, Hirosako S, Ichiyasu H, Fujii K, Saita N, Kohrogi H. Rebamipide reduces risk of hospital-acquired pneumonia (HAP) in patients receiving proton pump inhibitor. 17th Congress of the Asian Pacific Society of Respiriology, 2012, December, 14-16. Hong Kong .
 3. 坂本安見子, 小嶋圭介, 一安秀範, 増永愛子, 堀尾雄甲, 津村真介, 廣佐古進, 興梠博次. 人工呼吸管理を行った間質性肺疾患患者に対する PMX-DHP 療法の検討. 第 34 回日本呼吸療法医学会学術集会. 2012. 7. 14-15. 沖縄コンベンションセンター (宜野湾市) .
 4. Horio Y, Ichiyasu H, Masunaga A, Sakamoto Y, Sakata S, Tsumura S, Kojima K, Saeki S, Hirosako S, Okamoto S, Fujii K, Saita N, Kohrogi H. Effect Of Direct Hemoperfusion Using Polymixin B-Immobilized Fiber Column For Patients With Rapidly Progressive Interstitial Pneumonias. American Thoracic Society International conference, May 18-23, 2012, San Francisco, California, USA.
 5. Tsumura S, Fujii K, Horio Y, Hirosako S, Sakamoto Y, Sakata S, Sato R, Masunaga A, Saeki S, Kojima K, Okamoto S, Ichiyasu H, Saita N, Kohrogi H. High Prevalence of Sleep Disordered Breathing In Chronic Respiratory Diseases: Usefulness of Nocturnal Oximetry Screening. American Thoracic Society International conference, May 18-23, 2012, San Francisco, California, USA.
 6. 小嶋圭介, 税田直樹, 増永愛子, 津村真介, 一安秀範, 興梠博次. LPS 誘起性肺損傷マウスにおける Galectin-9 誘導 plasmacytoid dendritic cell-like macrophage による炎症抑制効果. 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会. 2012. 4. 20-22. 神戸国際会議場 (神戸) .
 7. 一安秀範, 増永愛子, 小嶋圭介, 堀尾雄甲, 坂本安見子, 坂田晋也, 津村真介, 廣佐古進, 岡本真一郎, 藤井一彦, 税田直樹, 興梠博次. 急性呼吸不全を呈する間質性肺疾患に対する PMX-DHP 療法施行症例の臨床的検討. 第 52 回日本呼吸器学会学術講演会. 2012. 4. 20-22. 神戸国際会議場 (神戸) .
 8. 堀尾雄甲, 一安秀範, 津村真介, 小嶋圭介, 坂本安見子, 廣佐古進, 岡本真一郎, 藤井

一彦，税田直樹，興梠博次．多発性筋炎・皮膚筋炎に伴う間質性肺炎急性増悪症例の臨床的検討．第 52 回日本呼吸器学会学術講演会．2012. 4. 20-22. 神戸国際会議場（神戸）．

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.respir-med-kumamoto-u.com/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

一安 秀範 (ICHIYASU HIDENORI)

熊本大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50419636

(2) 連携研究者

岡本 真一郎 (OKAMOTO SHINICHIRO)

熊本大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：20419633

(3) 研究協力者

増永 愛子 (MASUNAGA AIKO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・大学院生

研究者番号：なし

小嶋 圭介 (KOJIMA KEISUKE)

熊本大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：80467985

堀尾 雄甲 (HORIO YUKO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・大学院生

研究者番号：なし