

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461193

研究課題名(和文) 炎症性肺疾患におけるマイクロパーティクルの役割と治療戦略としての意義

研究課題名(英文) Role and significance for therapy of microparticles in inflammatory lung disease

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

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)：マイクロパーティクル(MP)の炎症性肺疾患での意義を検討した。炎症性肺疾患のBALF中のMPは検出可能であり、BALF中の好中球数との間に弱い相関があったが、血清CRPやLDH、KL-6とは相関しなかった。また、死亡した症例の治療前MP濃度には差がなかった。MP濃度は生命予後因子とは言えなかったが、培養細胞A549株を用いた実験ではアポトーシスや細胞活性化誘導によりMP産生の増加がみられた。これらの結果から、炎症性肺疾患におけるMPの意義について、現時点で臨床的マーカーとしては用いがたいが、さらに検討を要すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated whether microparticle (MP) can be one of the clinical markers for inflammatory lung diseases (ILD). MP was detectable in bronchoalveolar lavage fluid by FACS and its concentration was correlated with number of white blood cells, but not with serum markers such as CRP, LDH and KL-6. The patients with ILD who eventually died did not show high MP. When a cell line (A549) was induced to apoptosis or activated state, MP concentration in the supernatant was increased. These data suggested that MP may have certain significance in ILD, but still not be available as a clinical marker.

研究分野：膠原病肺

キーワード：マイクロパーティクル 炎症性肺疾患 間質性肺炎 サルコイドーシス

## 1. 研究開始当初の背景

間質性肺炎 (IP) に代表される炎症性肺疾患ではその原因は一様でなく、200 種類を越えると言われる。様々な検査で原因解析がなされるが、血液検査や胸部 CT 画像などでは肺局所に集積しているリンパ球、好中球、マクロファージ等の炎症細胞の同定をすることができない。肺組織を採取して検討することもあるが、一般的に侵襲性が高く、また得られる情報も限られているため、気管支肺泡洗浄液 (BALF) を回収して解析することが多い。しかし BALF から得られたこれまでの報告からは、細胞種類の解析だけでは、炎症性肺疾患が炎症終息による改善に向かうのか、過剰免疫による線維化に進展するのかが、わかっていないのが現状である。と同時に、非感染性の炎症性肺疾患ではステロイドを中心に免疫抑制剤の併用も実践されてはいるが、標的物質が不明のまま免疫抑制剤を選択しているのが実情である。そのため、IP の治療戦略に関しては高いエビデンスが依然得られていない。以上から、炎症性肺疾患 (特に IP) の診断・治療において、これまでとは全く違う戦略が必要と考えられる。マイクロパーティクル (MP) は細胞膜に付着した小胞であり、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。我々は MP を炎症性肺疾患の病態解明に用いるべく、研究を進めた。

## 2. 研究の目的

研究の大きな目的は炎症性肺疾患における MP の関わりを病態解析することにある。また炎症性肺疾患の予後予測・治療法の確立を目指すために、詳細な解析を行う。

1) 炎症性肺疾患における MP の解析: 膠原病肺、それ以外の間質性肺炎 (器質性肺炎、薬剤性肺炎、非特異的間質性肺炎)、サルコイドーシス、感染性肺炎を対象とし、BALF

中における MP の探索を行った。

2) 炎症性肺疾患の治療反応性と MP との関連性: 対象疾患の治療反応性を、胸部画像や生命予後などで検討した。

3) 炎症性肺疾患 (特に間質性肺炎) の治療選択における MP の応用: 炎症性肺疾患と肺野病変を有するサルコイドーシスとを比較検討した。

4) MP をターゲットにした炎症性肺疾患に対する創薬アプローチ: 抗 MP 物質の探索を目指し、ヒト肺胞基底上皮細胞株 A549 細胞を用いた刺激下での *in vitro* での MP 測定系の開発について検討を行った。

## 3. 研究の方法

1) 対象と MP 測定: 対象は当科で診療をうけている間質性肺炎 (膠原病肺とそれ以外) 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。患者の病変部から診断目的で行った気管支内視鏡検査により採取された BALF のうち検査の残サンプルについて、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 のマーカーである細胞表面 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。本研究は宮崎大学の倫理委員会承認のもと行われた。

2) 炎症性肺疾患における 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・好中球数・リンパ球数、また液性因子として血清中の KL-6・SP-D との比較を行った。

3) 肺胞上皮細胞のアポトーシスや活性化と MP 産生との関連性: ヒト肺胞基底上皮細胞株 A549 細胞をマイトマイシン C (MMC) Lipopolysaccharide (LPS) 及び Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) / Ionomycin で処理し、アポトーシス細胞の検出や MP

を測定した。細胞の活性化は定量 PCR 法による IL-6 mRNA の発現量の変化で評価した。

#### 4. 研究成果

1) BALF 中の MP 濃度を測定した患者数は 32 例で、膠原病肺 13 例、それ以外の間質性肺炎 6 例（器質化肺炎 3 例、薬剤性 2 例、非特異的間質性肺炎 1 例）、感染性肺炎 7 例、肺野病変を有するサルコイドーシス 6 例であった。

MP 濃度は膠原病肺では  $0.8 \sim 56.2 \times 10^2 / \mu\text{l}$ （中央値  $4.1 \times 10^2 / \mu\text{l}$ ）、その他の間質性肺炎では  $0.8 \sim 20.7 \times 10^2 / \mu\text{l}$ （同  $2.1 \times 10^2 / \mu\text{l}$ ）、サルコイドーシスでは  $3.0 \sim 7.4 \times 10^2 / \mu\text{l}$ （同  $4.3 \times 10^2 / \mu\text{l}$ ）、感染性肺炎では  $0.7 \sim 19.4 \times 10^2 / \mu\text{l}$ （同  $4.9 \times 10^2 / \mu\text{l}$ ）となり、各疾患で測定感度以上であった。

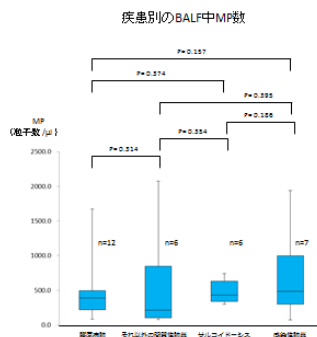


図 1. 各呼吸器疾患における BALF 中 MP 濃度

2) 間質性肺炎（膠原病肺及びそれ以外の間質性肺炎）に対して免疫抑制剤を投与し、胸部画像上改善した 8 例の治療前 MP 濃度は  $0.8 \sim 16.7 \times 10^2 / \mu\text{l}$ （中央値  $2.2 \times 10^2 / \mu\text{l}$ ）であった。対照群の症例数が少なく、残念ながら群間比較をすることはできなかった。最終的に死亡した 3 例（観察期間 5～20 ヶ月）の治療前 MP 濃度は各々  $0.7$ 、 $3.1$ 、 $5.0 \times 10^2 / \mu\text{l}$  であり、必ずしも高い濃度ではなく、MP 濃度が生命予後因子とは言えなかった。

3) 膠原病肺の 1 例で著明高値の結果が得られたが、この 1 例を除くと、膠原病肺・そ

れ以外の間質性肺炎・サルコイドーシス・感染性肺炎群間での MP 濃度の差はなかった（図 1）。

4) 炎症性肺疾患 32 例の BALF 中 MP 濃度と血液中の WBC・CRP・LD との相関を検討した（図 2～4）。

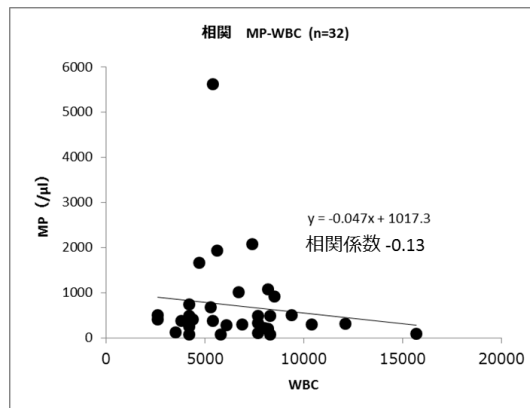


図 2. BALF 中 MP 濃度と WBC 数の関係

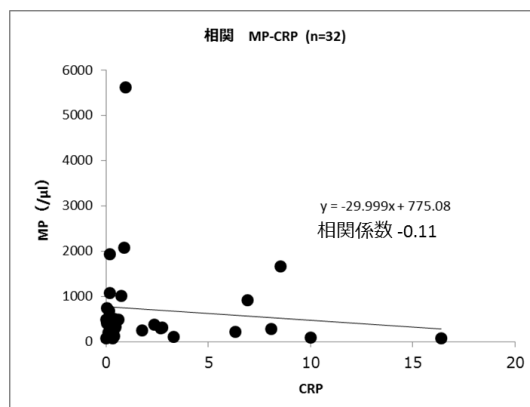


図 3. BALF 中 MP 濃度と CRP の関係

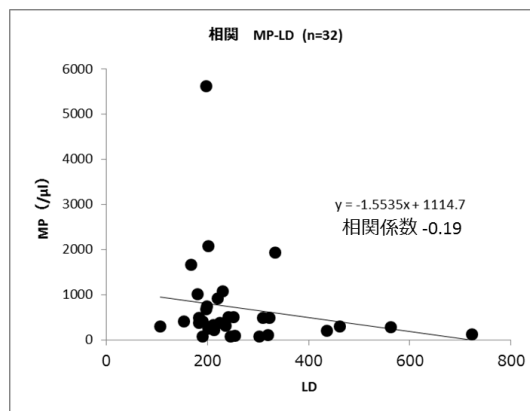


図 4. BALF 中 MP 濃度と LDH の関係

これらからは、BALF 中 MP 濃度と血液中の

炎症マーカーやLDHに明らかな相関が見られなかった。

5) BALF中MP濃度と血清KL-6・SP-D濃度との相関を検討した(図5、6)。

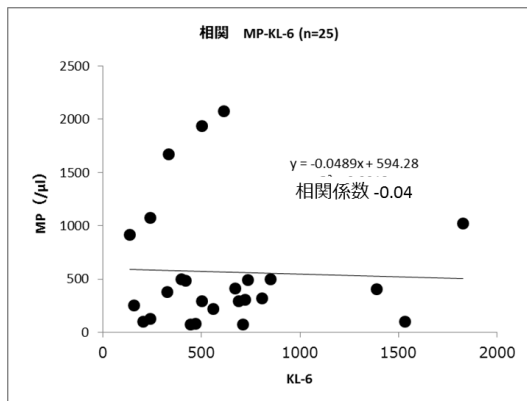


図5. BALF中MP濃度と血清KL-6の関係

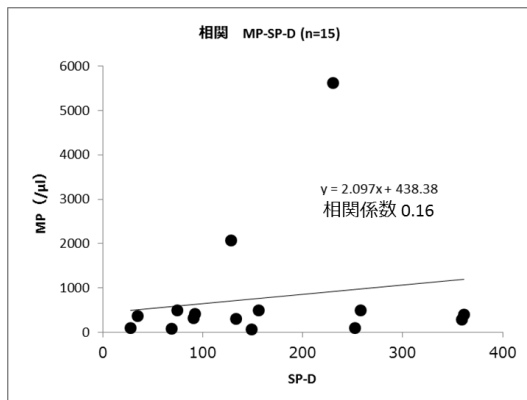


図6. BALF中MP濃度と血清SP-Dの関係

BALF中MP濃度と血清KL-6/SP-D濃度(間質性肺炎マーカー)の間には明らかな相関は見られなかった。

6) 炎症性肺疾患のBALF中MP濃度とBAL中の総細胞数・好中球数・リンパ球数との相関を検討した(図7~9)。

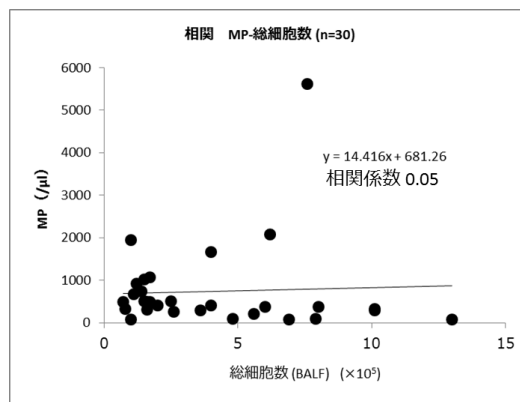


図7. BALF中MP濃度とBALF中総細胞数の関係

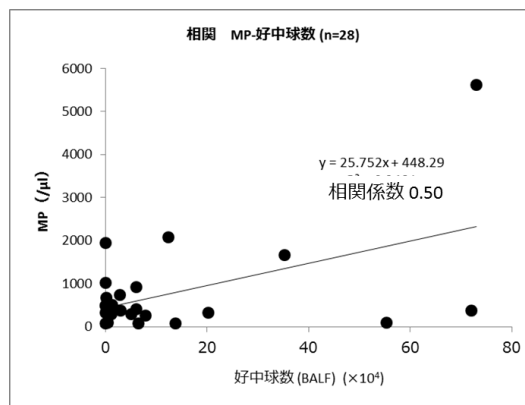


図8. BALF中MP濃度とBALF中好中球数の関係

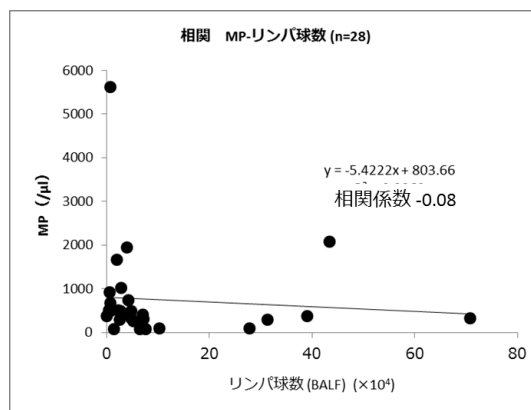


図9. BALF中MP濃度とBALF中リンパ球数の関係

BALF中のMP濃度とBALF中の好中球数との間には弱い相関があった。

これまでの結果から、肺局所に起こった炎症性病変に対しては、血液検査や画像検査よりもBALF中のMP濃度や好中球数を直接測定した方が、より炎症を反映することが

わかった。

7)A549 細胞のアポトーシスを誘導し、MP を人工的に産生させ、これを測定することで標準的な MP 測定系を開発する目的で、MMC、LPS、PMA/Ionomycin を用いた検討を行った。アポトーシス細胞は、細胞表面にフォスファチジルセリンを露出し、Annexin V と結合する特徴を有するため、フローサイトメトリー法による Annexin V 陽性細胞をアポトーシス細胞として検討した(図 10)。

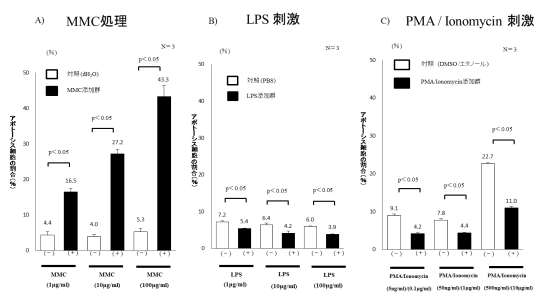


図 10. A549 アポトーシス細胞の割合

A549 細胞は MMC 処理により、アポトーシスが誘導された。一方 LPS や PMA/Ionomycin 刺激によって、A549 細胞のアポトーシス細胞の割合は減少した。

上記の結果より LPS や PMA/Ionomycin 刺激を用いて、細胞の転写制御因子である NF- $\kappa$ B を活性化させて炎症を誘導し、それによって増加する IL-6 mRNA 発現量をマーカーとしてリアルタイム PCR 法によって検討した(図 11)。

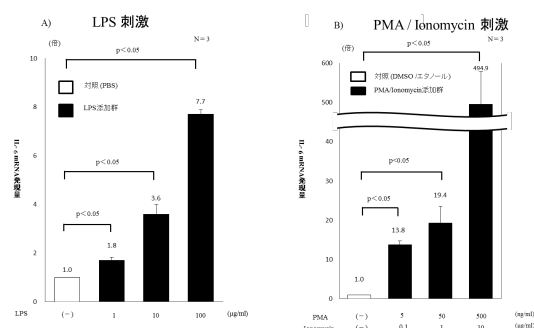


図 11. A549 細胞の IL-6 mRNA 発現量

LPS や PMA/Ionomycin 刺激はともに A549 細胞における IL-6 mRNA の発現を亢進させた。これは A549 細胞が活性化したものと考えられた。

次に MMC、LPS、PMA/Ionomycin を用いて刺激した A549 細胞の培養上清中の MP 測定を行った(図 12)。

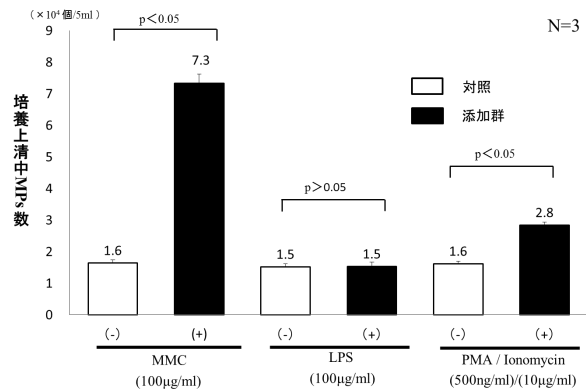


図 12. A549 細胞培養上清 5ml 中の MP 数

MMC や PMA/Ionomycin で刺激した A549 細胞の培養上清中の MP 数は増加していた。一方、LPS で刺激した A549 細胞の培養上清中の MP 数は増加していなかった。

以上からは、A549 細胞をアポトーシスに誘導させたり、活性化する際に MP 数が増加することがわかった。LPS で活性化した A549 細胞において MP 数が増加しなかった機序は不明であるが、LPS の標的細胞の性状の違いによるのかも知れない。

本研究により、MP は炎症性肺疾患の新規マーカーとなりえる可能性が考えられた。一方課題としては、免疫抑制薬治療を要した膠原病肺患者群と肺野病変に対しては治療が不要であったサルコイドーシス群の比較において MP 濃度に差が見られなかった点からは、診断や治療のターゲットとして現状のままでは MP を臨床的に用いることは困難と考えられた。

今後さらに検討を行いたい。

## 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, 宮内俊一, 楠元規生, 梅北邦彦,  
岡山昭彦 ( 学会員外共同研究者 : 高木覚,  
梅木一美, 山本成郎 ). 炎症性肺疾患におけ  
るマイクロパーティクル発現に関する検  
討 . 第 38 回日本呼吸器内視鏡学会学術集  
会・Poster セッション 38 内科症例 8 . 2015.  
6 月 11 日 - 12 日 ( 12 日発表 ) , 東京 , 新宿  
京王プラザホテル .

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 0 件 )

取得状況 ( 計 0 件 )

[ その他 ]

なし

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

長友 安弘 ( Yasuhiro Nagatomo )

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 ( Akihiko Okayama )

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号 : 70204047