

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870463

研究課題名(和文)肺線維症において骨髄に保存される傷害記憶システムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of memory system preserved in bone marrow in pulmonary fibrosis

研究代表者

中島 拓(Nakashima, Taku)

広島大学・大学病院・病院助教

研究者番号：90643792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は肺線維症において、体内における傷害物質の侵入を速やかに認識し反応を起こす「傷害記憶システム」が構築され、疾患の進行に関わっている可能性があるとして仮説を立て、骨髄移植を用いた系により検討を行った。健常マウスおよびブレオマイシン誘導性肺線維症マウスより得られた骨髄細胞を用いた移植を行い、レシピエントマウスに再度ブレオマイシンを用いて肺線維症を誘導したところ、肺線維症ドナー骨髄細胞を移植した群で著しく肺線維症が悪化した。その主たる悪化の要因は肺線維症マウス骨髄における単球系細胞によるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that in patients with pulmonary fibrosis, there exist memory system which accelerate pulmonary fibrosis by reacting with unknown antigen. To prove this, we performed bone-marrow transplantation using healthy and bleomycin-induced pulmonary fibrosis mouse as a donor. As a result, the pulmonary fibrosis induced in recipient mice got worse when bone marrow were transplanted from donor mice with pre-established pulmonary fibrosis. In this system, monocytes lineage in donor mice with pre-established pulmonary fibrosis might play a key role.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：線維化 骨髄移植 肺線維症 間質性肺炎 肺障害

### 1. 研究開始当初の背景

肺線維症は、有効な治療法がなく生命予後の著しく不良な疾患であり、今日に至るまでそのメカニズムは不明である。近年、未知の傷害物質が原因となり、繰り返される傷害とその傷害を修復するための宿主の応答により、肺の線維化が発症、進行してゆく病態が本疾患のメカニズムの1つとして提唱されている。申請者らはマウス肺線維症モデルを用いて、骨髄細胞が肺線維症の病態に関与することを報告し、肺線維症における骨髄細胞の重要性を指摘してきた。さらに、ある種のヒト肺線維症においても、骨髄移植後に肺線維症が改善する症例報告も散見される。これらの知見より、肺線維症において宿主の体内には傷害物質の侵入を速やかに認識し反応を起こす「傷害記憶システム」が構築され、疾患の進行に関わっている可能性があると考えられるが未だその機序は不明である。

### 2. 研究の目的

「傷害記憶システム」を保持する細胞が骨髄に存在するとの仮説を立て行った予備実験では、健常マウスおよびプレオマイシン誘導性肺線維症モデルマウスより全骨髄細胞をドナー細胞として抽出し(健常ドナーおよび肺線維症ドナー)、得られたドナー細胞を、放射線照射で前処置をした健常レシピエントマウスに移植し(健常骨髄移植群および肺線維症骨髄移植群)、移植が確立したマウスにプレオマイシンを用いて肺線維症を誘導したところ、健常ドナー骨髄細胞を移植した群と比較して、肺線維症ドナー骨髄細胞を移植した群で著しく肺線維症が悪化した。

以上の背景および予備実験から、プレオマイシンによる「傷害記憶システム」を保持し、肺線維症を悪化させる細胞が骨髄中に存在することが示唆され、本研究では骨髄における「傷害記憶システム」を解析することでその病態を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

本研究において、実験は承認された計画書に基づき「広島大学組換え DNA 実験安全管理規則」および「広島大学動物実験等規則」に従うものとし、全ての動物実験は広島大学附属動物実験施設において実施した。全ての動物実験には7~10週齢雌の

C57BL/6 マウス野生型を用いた。

「プレオマイシン肺線維症モデル」は、経気道的にPBSに溶解したプレオマイシン1.5mg/kgを投与して作成し、コントロール群には同量PBSのみの投与を行った。

「マウス骨髄移植モデル」の作成には540cGyの放射線照射を3時間間隔で2度照射することで照射するものとし、2度目の放射線照射後速やかに骨髄細胞を尾静脈より静脈注射により移植して作成した。

上記の動物モデルを用いて、以下の方法で実験を行った。

1) 「傷害記憶システム」は、それら骨髄細胞のうちどの群に属する細胞に保持されているのかを同定し、その表現型を明らかにするため、ドナーマウス骨髄から a) 造血幹細胞、b) 分化した血液細胞(リンパ球、好中球、マクロファージ)をセルソーティングにより別個に採取し、各々の細胞を移植したマウスにプレオマイシンを用いて肺線維症を誘導することで、どの細胞が肺線維症悪化に決定的な役割を担うかを解析した。

2) 肺線維症の悪化に関わるサイトカインなどの分子が知られている。「傷害記憶システム」を保持する細胞が、どのようなメカニズムで肺線維症の悪化をもたらすのかを明らかにするため、「傷害記憶システム」を保持する細胞を移植した際の、肺線維症の悪化に関わる因子を解析した。

3) 「傷害記憶システム」を保持する細胞がどの程度の期間、傷害の記憶を保持することができるのかを明らかにするため肺線維症を誘導して長期に経過したマウスの骨髄を採取し移植を行い、レシピエントのマウスの肺線維症を誘導した。

### 4. 研究成果

放射線照射された全てのマウスが14日以内に死亡すること、またドナーマウスから採取した全骨髄細胞20万個をレシピエントマウス尾静脈より静脈注射して骨髄細胞を移植することで、注射されたレシピエントマウスが安定して生存することを確認した。

また前述した方法により得られた結果は以下の通りである。

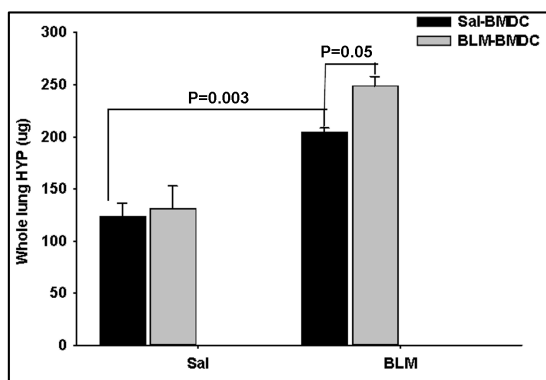
1) 肺線維症ドナーから得られた「a) 造血幹細胞(cKit+/Sca1+/Lineage-細胞)」のみの移植ではレシピエントに誘導された肺線維症の悪化は認められなかった。しかし「b) ドナー骨髄より得られた分化した単球系細胞」を移植することで、レシピエントに誘導された肺線維症が悪化することを明らかにした。

2) 健常ドナーから骨髄移植した群と比較して、肺線維症ドナーから得られた骨髄細胞を移植したレシピエントに肺線維症を誘導すると、Th2 サイトカインであるIL-4、IL-13やTGF- $\beta$ などのmRNA発現が肺において亢進することを明らかにした。

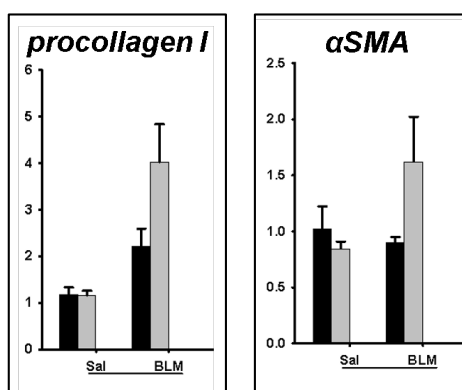
3) 肺線維症を誘導して18週間と長期に経過したマウスの骨髄細胞をドナー細胞として移植を行い、レシピエントマウスの肺線維症が悪化することを明らかとした。

さらに「傷害記憶システム」を保持する細胞のより詳細な検討を行うため、プレオマイシン肺線維症モデルあるいはコントロール群より骨髄細胞を採取し、GM-CSFの存在下に培養し、樹状細胞へと分化誘導を行った。得られた細胞からさらにCD11cを発現した細胞分画をソーティングにより採取し、肺線維症マウス骨髄より得られた「肺線維症樹状細胞(BLM-BMDC)」およびコントロールマウスより

得られた「コントロール樹状細胞 (Sal-BMDC)」を準備した。これらの樹状細胞はマウス肺より得られた線維芽細胞と共培養することで、線維芽細胞増殖を促進し、線維芽細胞における向線維化蛋白 (SMA および procollagen I) の mRNA 発現を増強させる作用を持つことを明らかにした。さらに in vivo において得られた「肺線維症樹状細胞」および「コントロール樹状細胞」をそれぞれブレオマイシン肺線維症モデルマウスに経気道的に投与すると、「コントロール樹状細胞」を投与した群と比較して、「肺線維症樹状細胞」を投与した群において肺におけるハイドロキシプロリンが有意に増加しており、肺線維症が増強することを明らかにした (下図)。



また線維化を増強させるメカニズムとして、「コントロール樹状細胞」を投与した群と比較して、「肺線維症樹状細胞」を投与した群のマウス肺において肺線維化を増強させる蛋白である procollagen I や SMA の mRNA 発現が亢進していた。



以上の得られた知見からブレオマイシン投与により肺線維症を誘導したマウス個体において、骨髓の単球系分画に線維化を増強させる作用があることを明確にした。これらの細胞群を制御することで肺線維症自体を改善できる可能性があり、今後ヒトにおいても同様のメカニズムが認められるか否かを明らかにしてゆく必要があると考えている。

## 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3件)

1. Fioravanti M, Nakashima T, Xu J, Garg A., A systematic review and meta-analysis assessing adverse event profile and tolerability of nicergoline. *BMJ open* 査読有, 2014, 4, p.e005090, DOI:10.1136/bmjopen-2014-005090
2. Nakashima T, Liu T, Yu H, Ding L, Ullenbruch M, Hu B, Wu Z, Oguro H, Phan SH., Lung Bone Marrow-Derived Hematopoietic Progenitor Cells Enhance Pulmonary Fibrosis. *American journal of respiratory and critical care medicine* 査読有, 2013, 188, pp.976-984, DOI:10.1164/rccm.201303-04790C

3. Ding L, Dolgachev V, Wu Z, Liu T, Nakashima T, Wu Z, Ullenbruch M, Lukacs NW, Chen Z, Phan SH., Essential role of stem cell factor-c-Kit signalling pathway in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *The Journal of pathology* 査読有, 2013, 230, pp.205-214, DOI:10.1002/path.4177

[学会発表](計4件)

1. 中島 拓, 服部 登, 中増昭久, 沖本真史, 柳田実郎, 岩本博志, 石川暢久, 藤高一慶, 春田吉則, 村井 博, 河野修興. アンギオテンシン変換酵素阻害薬による嚔下改善作用は女性でより顕著である, 第54回日本呼吸器学会学術講演会, 2014年4月25日~27日, 東京
2. 大崎慶子, 中島 拓, 山口覚博, 益田 武, 岩本博志, 藤高一慶, 春田吉則, 村井 博, 服部 登, 河野修興. クリゾチニブ投与により制御可能であった癌性心膜炎の1例, 第51回日本呼吸器学会中国・四国地方会, 2014年7月12日, 米子
3. 中島 拓. 肺線維症と骨髓由来細胞, 第53回日本呼吸器学会学術講演会(招請講演), 2013年4月19日~21日, 東京

4. 稲田修吾, 中島 拓, 岩本博志, 石川暢久, 藤高一慶, 濱田泰伸, 春田吉則, 村井博, 服部 登, 河野修興. イレウスを契機に診断された肺浸潤性粘液腺癌の一例, 第109回日本内科学会中国地方会, 2013年11月23日, 岡山

[図書](計4件)

1. 中島 拓, 肺線維症と骨髓由来細胞, 呼吸器内科, 科学評論社, 2014, 25,

pp132-137.

2. 中島 拓, 服部 登, 河野修興.  
これでわかる! 最新のバイオマーカー,  
Respiratory Medical Research, 先端医学社,  
2014, 2, pp.44-47.

3. 中島 拓, 服部 登, 河野修興.  
特発性器質化肺炎 (COP), インフォームド  
コンセントのための図説シリーズ,  
びまん性肺疾患と特発性間質性肺炎, 医薬  
ジャーナル社, 2014, pp.106-113.

4. 中島 拓, 服部 登.  
薬剤性肺障害の免疫反応,  
日本胸部臨床, 克誠堂, 2013, 72,  
pp.1346-1354.

〔その他〕

[http://scatalog.hiroshima-u.ac.jp/files/ebook/results2014-1/\\_SWF\\_Window.html?pagecode=137](http://scatalog.hiroshima-u.ac.jp/files/ebook/results2014-1/_SWF_Window.html?pagecode=137)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中島 拓 (NAKASHIMA TAKU)  
広島大学病院・病院助教  
研究者番号: 90643792