

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860601

研究課題名(和文)肺線維化における好塩基球の役割

研究課題名(英文)The role of basophils in bleomycin induced lung fibrosis

研究代表者

立石 知也(TATEISHI, Tomoya)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40645636

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス肺線維症モデルにおいて、好塩基球を除去により肺線維化の悪化を認めた。マイクロアレイ法により好塩基球除去群とコントロール群の遺伝子発現を網羅的に解析したところ、好塩基球除去群においてHMGB1発現が強いことが確認された。またIL4受容体欠損マウスにおいてもHMGB1発現が増強していた。このことから好塩基球が産生するIL4がHMGB1の産生を抑制していると考えている。

研究成果の概要(英文)：Depletion of basophils augmented lung fibrosis induced by bleomycin in histological analysis. Microarray analysis revealed that Hmgb1 gene expression is significantly augmented in basophil-depleted mice. Besides, Hmgb1 gene expression is also augmented in IL4-depleted mice and IL4 receptor knock out mice. These findings support the hypothesis that basophils have anti-fibrotic role through suppressing HMGB1 production.

研究分野：間質性肺炎

キーワード：間質性肺炎 好塩基球

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 間質性肺炎と Th1/Th2 バランスの異常  
特発性間質性肺炎は原因不明であるが、この中で最も頻度の高い肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis :IPF) は不可逆性に進行する肺線維化のために呼吸不全をきたし致死的な経過をとる予後不良の難病である。IPF の病態の本質は繰り返す肺胞上皮傷害と修復異常であり、中でも Th1/Th2 バランスの異常が肺線維化の形成に重要と考えられている。CXCR3+CD4+細胞が CCR4+CD4+細胞に対して相対的に低下し、BALF 中の IP-10 (CXCL10) が低下していること、つまり Th1/Th2 バランスが Th2 にシフトしていることが示されている。BLM 肺線維症マウスモデルでも IP-10 は肺線維化を抑制しており、そのレセプターである CXCR3 も肺線維化に抑制的に働くことが報告されている。これに対して、Th2 ケモカインの TARC (CCL17) やそのレセプターである CCR4 は肺線維化を促進すると考えられている (J Immunol 173:4692,2004)。

### (2) Th2 誘導と好塩基球

Th17 は、IL-17 を産生する Th 細胞であり、好中球を遊走させ急性炎症にかかわっている。BLM 肺線維症モデルでは高容量の BLM 投与により強く Th17 を誘導すると早期の強い線維化に繋がること示されており (J Exp Med 207:535,2010)、肺線維化は Th17 と Th2 のバランスによって成り立つと考えられている。

Th17 は BLM が直接傷害する肺胞上皮細胞から産生される UA を中心とした danger signal が T 細胞を刺激することにより活性化されることが示されてきている (Am J Respir Crit Care Med 179:903,2009, J Exp Med 207:535,2010) が、Th2 系が活性化される機序は明確となっていない。

最近、好塩基球の新たな機能に関する研究が免疫、アレルギー分野でなされており、特に Th2 優位な病態において好塩基球が重要な役割をはたすことが注目されている。活性化された好塩基球はリンパ節に入り、IL-4 などの Th2 サイトカインを分泌する。我々は好塩基球が Th2 系の調節因子となっているとの仮説のもとに、BLM 肺線維症モデルにおける好塩基球の除去の効果を確認するために予備実験を行ったが、胞隔の炎症のみならず肺線維化が悪化していた。

### (3) 好塩基球と M2 マクロファージ

パピイン吸入による気道炎症モデル、IgE を介した皮膚アレルギーモデルでは好塩基球が自然リンパ球やマクロファージの分布を IL4, IL13 を産生しやすいいわゆる Th2 優位な環境に導くトリガーであることが示されてきている。M2 マクロファージは近年、総称治療に関わることが報告されてきており、線維化との関わりも検索されつつある。

### (4) 好塩基球と肺線維化の関わり

我々は本研究では、BLM 肺線維症マウスモデルにおいて好塩基球と線維化との関係を明らかにすることを目的とした。BLM 肺線維症マウスモデルはヒト IPF にみられる蜂巣肺の形成にはいたらず不可逆的な肺線維化のモデルとしての弱点はあるが、他の肺線維症動物モデルも同様の限界があり、動物疾患モデルとしてより一般的で国内外で種々の知見が集積されている BLM 肺線維症マウスモデルを用いることとした。

## 2. 研究の目的

(1) BLM 肺線維症マウスモデルにおいて、抗好塩基球中和抗体および遺伝子操作マウス (Mcpt8<sup>DTR</sup> マウス) を用いた好塩基球除去が肺線維化に与える修飾作用を明らかにする。

(2) 線維化形成において好塩基球に関わるサイトカイン、ケモカインを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 好塩基球除去による肺線維化への修飾  
BLM 肺線維症マウスモデルは Saito らの既報 (Am J Respir Cell Mol Biol 38:566,2008) に基づき作製する。すなわち浅い麻酔下で C57BL/6 マウスを挿管後、経気道的 BLM 1 μg/g-Wt をマイクロスプレー法により吸入曝露する。曝露 10 日目に sacrifice を行い、気管支肺胞洗浄液、肺組織を採取する。抗好塩基球中和抗体 (Ba103) や Mcpt8<sup>DTR</sup> マウスにジフテリアトキシンを注射することにより好塩基球除去を行い、好塩基球除去群とコントロール群を比較する。

### (2) 病理組織所見

マウスの両肺 10 cmH<sub>2</sub>O 下のホルマリンで固定する。病理組織像は、HE 染色標本により観察する。

### (3) フローサイトメトリー

BLM 吸入後、肺中に好塩基球の増多がみられるか評価する。好塩基球の測定はフローサイトメトリーを用い、Fcγ1 陽性、CD49b 陽性、c-kit 陰性細胞を好塩基球と考え測定する。

### (4) マイクロアレイによる比較

好塩基球除去した BLM 線維化モデルの肺全体と、コントロールの RNA 発現をマイクロアレイ法により比較することにより、好塩基球に関連するサイトカイン、ケモカインを網羅的に探索する。

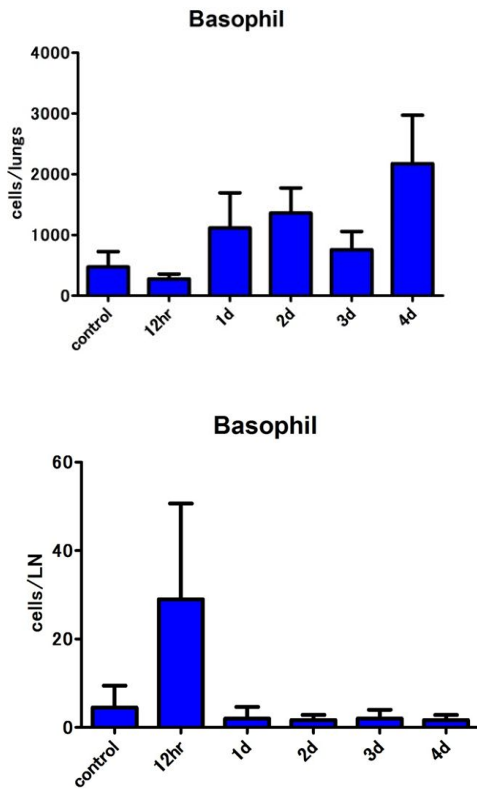
### (5) マイクロアレイ法により疑われた線維化誘導物質の探索

上記 (3) により関与が疑われた線維化誘導物質について動物実験や細胞実験を行う。

## 4. 研究成果

(1) プレオマイシン吸入による好塩基球増多

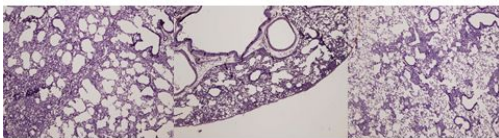
C57B/6 マウスに BLM を吸入させると吸入 12 時間後に一時的に肺中の好塩基球は減少したが、その後好塩基球増多を認めた。肺中で減少する 12 時間後には縦隔リンパ節に好塩基球が集簇することが確認された。



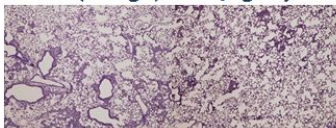
(2) 病理組織所見

好塩基球の除去モデルにおいては、Ba103 抗体を用いた場合と Mcpt8DTR マウスを用いた場合両方で、好塩基球がある野生型マウスに比して病理学的に線維化の悪化を認めた。

WT-B6 (Ba103) BLM25ug day10



WT-B6 (Rat IgG) BLM25ug day10



X40

(3) マイクロアレイによる比較

好塩基球除去したマウスと対照群のマウスに BLM 吸入を行い、4 日後の肺から RNA を採取し、マイクロアレイ法により発現を比較し

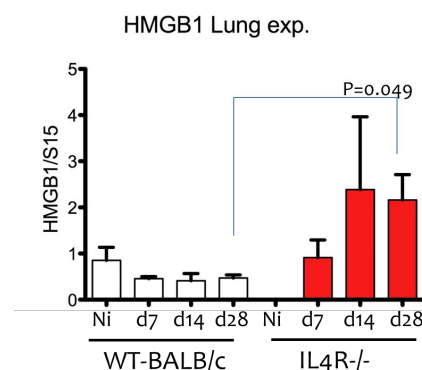
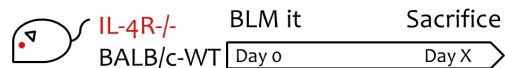
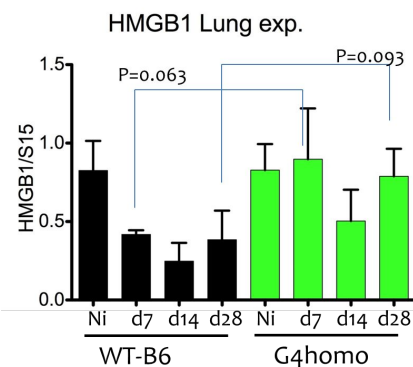
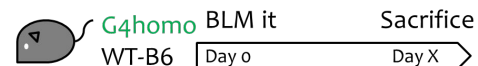
た。好塩基球除去群では Col22a1 などの線維化マーカーの上昇を認めたほか Hmgb1 遺伝子の上昇とその偽遺伝子である Gm5176, Gm6175 などの上昇を認めた。

(4) 好塩基球除去での HMGB1

同様に蛋白レベルにおいても HMGB1 の発現を ELISA 法で確認したところ、好塩基球除去群では BALF 中で HMGB1 の高値を認めた。血清では有意差は認めなかったが HMGB1 が高くなる傾向を認めた。

(5) IL4 と HMGB1

好塩基球はアレルギー疾患において IL4 を早期に産生し、Th2 分化のトリガーとなることが知られている。BLM 肺線維症モデルも Th2 分化が病態の一因となっているため、IL4 を欠損するホモ型の G4 マウスと IL4 受容体欠損マウスにおいて HMGB1 の発現レベルを mRNA による定量的 PCR 法により比較した。G4 ホモマウスでは野生型に比べて有意差は認めなかったが、Hmgb1 発現が高くなる傾向を認めた。また IL4 受容体欠損マウスでは野生型マウスに比し Hmgb1 発現の有意な上昇を認めた。



(6) 細胞株での HMGB1 産生

HMGB1 はネクローシスに陥った細胞から放出されるほか、単球、マクロファージが最も多い産生原であるとの報告がある。マウス肺細胞マクロファージ由来細胞である AMJ2-C8 において BLM 刺激により HMGB1 の産生が起こるか測定した。BLM 濃度を 1  $\mu$ g/mL 以上とすると濃度依存性に AMJ2-C8 は HMGB1 を産生すると考えられた。

現在、我々は好塩基球と AMJ2-C8 の共培養や、好塩基球培養細胞上清の添加により AMJ2-C8 からの HMGB1 産生が低下するかどうか、検討中である。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

#### 6．研究組織

##### (1)研究代表者

立石 知也 (TATEISHI, Tomoya)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40645636