

特発性肺線維症における M2 様マクロファージの機能解析

久留米大学医学部内科学講座呼吸器・神経・膠原病内科部門¹⁾、放射線科・画像診断センター²⁾、熊本大学大学院生命科学研究部細胞病理学分野³⁾、長崎大学医学部病理診断科⁴⁾、近畿大学医学部病理学講座⁵⁾
南野高志¹⁾、岡元昌樹¹⁾、大西紘二³⁾、富永正樹¹⁾、財前圭晃⁴⁾、福岡順也⁴⁾、
清水重喜⁵⁾、藤本公則²⁾、菰原義弘³⁾、星野友昭 (研究協力者)¹⁾

研究要旨

【背景と目的】最近、臓器特異的なマクロファージフェノタイプが注目されている。線維化性マクロファージとも呼ばれるM2様マクロファージは特発性肺線維症 (IPF) の過剰修復に関与する可能性がある。我々はM2様マクロファージマーカー；CD163、CD204陽性細胞のIPF増悪における役割を解析した。【方法と結果】IPF連続症例の外科的肺生検組織、急性増悪剖検組織においてCD163、CD204、CD68 (汎マクロファージマーカー) の免疫染色を行った。CD163/CD68、CD204/CD68陽性細胞数比はIPF肺組織ではコントロール肺組織よりも高値であり、生存期間および無急性増悪期間の短縮と関連していた。急性増悪群 (剖検群) では外科的肺生検群よりもCD163/CD68陽性細胞数比が高値であったが、CD204/CD68陽性細胞数比に差はなかった。RNA scope[®]によるTGF- β 1のmRNA in situ hybridizationでは、CD163陽性細胞と一致して強発現が認められた。IL-6、IL-10刺激によりCD163発現誘導した健常人由来末梢血単核細胞の培養上清中TGF- β 1濃度はコントロール群よりも高値であった。CD204発現はマクロファージのM2分化抑制薬であるペントラキシン2投与により低下した。【結論】IPFの慢性的な増悪や急性増悪にCD163、CD204陽性細胞マクロファージが関与しており、M2分化の抑制はIPFの新規治療のターゲットとなり得る。

A. 研究目的

特発性肺線維症(IPF)は、特発性間質性肺炎の一つに分類される特定疾患治療研究事業の対象疾患であり、平均生存期間3-5年の予後不良疾患である。病態の中心は肺胞上皮細胞の傷害に伴う修復異常と遺伝子異常などで説明され、病気が進行すると拘束性換気障害を呈し、呼吸不全に至る。本邦におけるコホート研究¹⁾では、IPF患者のおよそ4割が急性増悪、2割が緩徐な増悪に伴う呼吸不全で死亡しており、本疾患の病態解明が急務である。

microRNA (miRNA)は、1993年に発見された20-25塩基長の微小RNAとなる機能性核酸であり、様々な遺伝子の発現を調整している²⁾。近年では、癌を中心とした様々な病態に深く関与していることが多数報告されており、疾病のスクリーニングや疾患活動との関連が注目されている。また、難治性呼吸器疾患であるIPF患者におけるmiRNAの探索や機能解析が既に先行研究で報告されている^{3) 4)}。しかしながら、IPF急性増悪期におけるmiRNAの発現および病態への関与については十分に検討されていない。今回我々は、IPF患者の安定期と急性増悪期に採取したペア血清を用いて血清内miRNAの発現を網羅的に解析し、急性増悪期に発現が増減するmiRNAとそのmiRNAによって発現が制御される遺伝子を同定することとした。

B. 研究方法

(1) 具体的方法

当院を初診となったIPF患者のうち1年以内に急性増悪を発症した7名を対象とした。各々の患者における安定期および急性増悪時に採取したペア血清を用いてmiRNAを抽出・調整した後、マイクロアレイ法(3D-Gene[®])を用いて網羅的に比較解析を行い、

急性増悪期で発現が増減するmiRNAを同定する。同定したmiRNAについて、real-time PCR法を用いて検証し、有意に増減しているmiRNAを絞り込む。絞り込んだmiRNAについて各々miRNAをsmall interfering RNA (siRNA)を用いたRNA干渉技術を用いてA549細胞に導入し、細胞内で過剰発現または抑制させ、次世代シーケンシング解析(HiSeq 2500[®])を行い、発現が増減している遺伝子を同定する。

(2) 倫理面への配慮

本研究は、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針を遵守しており、本学倫理委員会の承認(承認番号:H27-127)及び遺伝子組み換え実験安全委員会の承認(承認番号:DP170023)を得ている。

対象者は研究に参加することの利益と不利益を説明された上で、研究への参加または不参加を自由に選択することができること、また、いつでも同意の撤回ができることが保障されている。データは被験者が特定できないように、研究実施責任者の厳重な管理のもと、研究実施分担者が個人を識別することができる記述を削除または当該個人と関わりのない記述などに置き換えるなど安全管理措置を行った上で匿名化し、その対応表とともに本学医学部呼吸器内科学教室の鍵のかかる保管庫に保管している。試験開始前には、対象者の担当医師または研究実施分担者が、本研究の意義、目的、方法、被験者が被りうる不利益及び危険性について説明文書を作成し、文書及び口頭で十分な説明を行い、同意書への記載を依頼した。

C. 結果

7名のIPF患者の安定期と増悪期の血清内miRNAを網羅的に解析した結果、複数のmiRNAが増減して

いることが確認された(図1)。さらに、real-time PCR を用いて追加検証を行い、急性増悪期で発現亢進している miR-122-5p と、逆に発現抑制されている miR-151b を同定した。その後、miR-122-5p 及び miR-151b を各々 A549 細胞に導入し、細胞内における各 miRNA を増減させ次世代シーケンシング解析を行ったところ、これらの miRNA は複数の遺伝子発現の調節に関与していることが判明した。

D. 考察

IPF 急性増悪期に miRNA の増減に伴い発現量が変動する遺伝子を特定した。本研究で使用した血清内 miRNA の解析は、微量血液から miRNA を効率的に抽出し、さらに高い再現性を有するため、多くの疾病においてバイオマーカーや治療ターゲットとして研究が盛んに行われている。今回特定した miRNA は、これまで他疾患において病態への関与をうかがわせる既報はあるが、IPF に関する既報は存在しない。そのため本研究結果は、未だに十分に解明されていない IPF 急性増悪期の病態解明の手がかりとなるだけでなく、バイオマーカーや治療ターゲットとしての創薬の可能性も秘めており、引き続き機能解析に関する研究を継続する予定である。

E. 文献

1 Natsuizaka M, Chiba H, Kuronuma K, Otsuka

M, Kudo K, Mori M, Bando M, Sugiyama Y, Takahashi H. Epidemiologic survey of Japanese patients with idiopathic pulmonary fibrosis and investigation of ethnic differences. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014; **190**: 773-9.

2 Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993; **75**: 843-54.

3 Milosevic J, Pandit K, Magister M, Rabinovich E, Ellwanger DC, Yu G, Vuga LJ, Weksler B, Benos PV, Gibson KF, McMillan M, Kahn M, Kaminski N. Profibrotic role of miR-154 in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2012; **47**: 879-87.

4 Li H, Zhao X, Shan H, Liang H. MicroRNAs in idiopathic pulmonary fibrosis: involvement in pathogenesis and potential use in diagnosis and therapeutics. *Acta Pharm Sin B.* 2016; **6**: 531-9.

F. 健康危険情報：なし

G. 研究発表

1. 論文発表：なし

2. 学会発表：なし

H. 知的財産権の出願・登録状況：なし

図 1

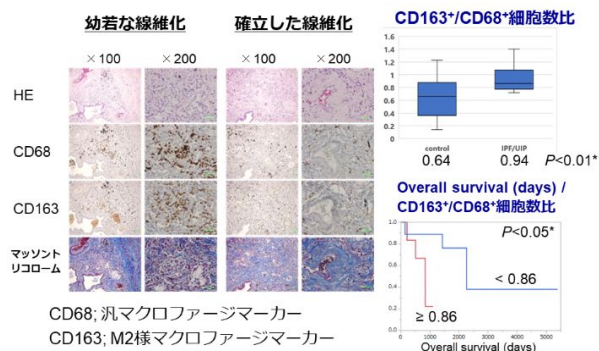


図 1 . 汎マクロファージマーカー; CD68 と M2 様マクロファージマーカー; CD 168 は、共に IPF の確立した線維化巣よりも幼弱な線維化巣でより多く発現しており、CD163+/CD68+細胞数比は、IPF ではコントロールよりも有意に高値であり、overall survival の不良因子であった。

図 2

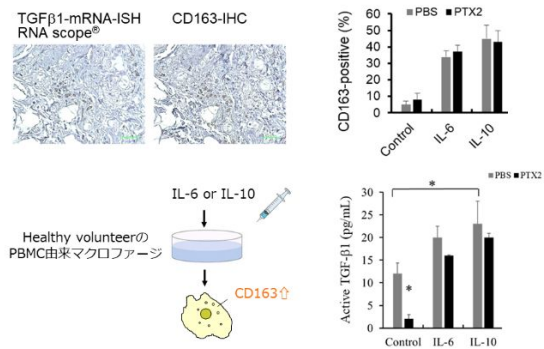


図 2 . ISH では、CD163 陽性細胞に一致して、TGF-β1-mRNA 発現増加していた。*In vitro* にて IL-6、IL-10 刺激によるマクロファージの CD163 発現増加と共に培養上清中 TGF-β1 濃度上昇が認められた。Recombinant PTX2/SAP は、無刺激のマクロファージの CD204 発現と培養上清中 TGF-β1 濃度を有意に減少したが、CD163 発現には影響しなかった。