

論 文 内 容 要 旨

題目 Functional analysis of human fibrocytes derived from monocytes reveals their profibrotic phenotype through paracrine effects

(単球由来線維細胞のパラクライン効果を介した線維化促進作用の機能解析)

著者 Shuichi Abe, Seidai Sato, Yoshinori Aono, Momoyo Azuma, Masami Kishi, Kazuya Koyama, Naoki Takahashi, Kozo Kagawa, Hiroshi Kawano, Yasuhiko Nishioka  
令和2年2月発行 The Journal of Medical Investigation  
第67巻第1,2号に掲載予定

内容要旨

特発性肺線維症(idiopathic pulmonary fibrosis ; IPF)は、肺における線維芽細胞の増殖と細胞外基質の異常な蓄積を特徴とする予後不良の慢性肺疾患である。近年、IPFの細胞分子病態研究から肺常在の線維芽細胞に加え、様々な起源の線維芽細胞が報告されている。Fibrocyteは血球系マーカー(CD45, CXCR4)と細胞外基質(コラーゲン, フィブロネクチン)を発現するユニークな骨髄由来細胞である。これまでの報告から骨髄由来のfibrocyteが線維芽細胞に分化し肺線維症の病態に関与することが示唆されているが、その線維化促進作用については不明な点が多い。そこで本研究では、ヒト末梢血単球由来のfibrocyteを用い、その線維化促進作用について解析した。

最初に単球とfibrocyteの遺伝子発現をマイクロアレイ解析により比較検討した。その結果、fibrocyteは単球に比較し、PDGF-B, FGF-7, VEGF-Bを含む増殖因子やコラーゲンのmRNA発現量が増強していた。さらにqPCRによる検討では、fibrocyteは単球に比較して有意に高いPDGF-BBおよびFGF-2 mRNAの発現を示した。Fibrocyte培養上清を用いたELISAの結果、単球に比較してPDGF-BBおよびFGF-2産生が亢進していることが確認された。

次にfibrocyteが肺線維芽細胞MRC-5の増殖に及ぼす効果をトリチウム-チミン取り込みアッセイにより検討した。その結果、fibrocyte自身はPDGFに反応した増殖能を示さなかったが、fibrocyteとの共培養の実験において肺線維

## 様式(8)

芽細胞の増殖促進効果が確認された。Fibrocyte の肺線維芽細胞増殖促進効果は、その培養上清によっても確認された。そこで培養上清に各種増殖因子の中和抗体を添加し、肺線維芽細胞の増殖促進効果を検討した結果、抗 PDGF-BB 抗体の添加により肺線維芽細胞 MRC-5 の増殖が抑制された IPF 患者由来線維芽細胞を用いた実験においても同様の効果が認められた。一方、抗 TGF- $\beta$  1 抗体及び抗 FGF-2 抗体は fibrocyte による肺線維芽細胞増殖刺激活性を抑制しなかった。

ウエスタンブロット法による検討から、fibrocyte は TGF- $\beta$  存在下で 3 週間の長期培養下においても  $\alpha$  平滑筋アクチンをほとんど発現せず、筋線維芽細胞への分化能は低いことが明らかとなった。また、肺線維芽細胞に比較してコラーゲン産生量は明らかに少なかった。

最後に IPF 患者の線維化肺の免疫組織化学染色を行い fibrocyte の局在と PDGF-BB 発現および増殖細胞について検討した。その結果、IPF 肺に fibrocyte と同じ表現型を持つ CD45<sup>+</sup>Collagen-I<sup>+</sup>FSP-1<sup>+</sup>細胞が確認され、PDGF-BB と共染された。IPF 肺組織の Ki67 陽性細胞は主に CD45 陰性細胞に認めており、肺線維芽細胞などの血球系以外の細胞の増殖が示唆された。

以上から、fibrocyte は PDGF-BB 産生を介して肺線維芽細胞の増殖を促進することにより肺線維症の病態に関与していることが示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

|      |                                  |     |       |
|------|----------------------------------|-----|-------|
| 報告番号 | 甲医第 <b>1446</b> 号                | 氏 名 | 阿部 秀一 |
| 審査委員 | 主査 安友 康二<br>副査 常山 幸一<br>副査 峯岸 克行 |     |       |

題目      Functional analysis of human fibrocytes derived from monocytes reveals their profibrotic phenotype through paracrine effects .  
 (単球由来線維細胞のパラクライン効果を介した線維化促進作用の機能解析)

著者      Shuichi Abe, Seidai Sato, Yoshinori Aono, Momoyo Azuma, Masami Kishi, Kazuya Koyama, Naoki Takahashi, Kozo Kagawa, Hiroshi Kawano, and Yasuhiko Nishioka  
 令和2年2月発行 The Journal of Medical Investigation 第67巻第1, 2号に掲載予定  
 (主任教授 西岡安彦)

要旨      特発性肺線維症(IPF)は、肺における線維芽細胞の増殖と細胞外基質の異常な蓄積を特徴とする予後不良の慢性肺疾患である。近年のIPFにおける細胞分子病態研究から、肺常在の線維芽細胞に加え様々な起源の線維芽細胞の関与が報告されている。Fibrocyteは血球系マーカーと細胞外基質を発現する骨髓由来の線維芽細胞の起源の一つと考えられており、fibrocyteを標的とした薬剤のIPFに対する臨床試験が進められているが、その線維化促進作用については不明な点が多い。

そこで本研究では、ヒト末梢血単球由来の fibrocyte を用い、その線維化促進作用について解析した。さらに蛍光免疫染色を用いてIPF患者肺組織における fibrocyte の局在について検討した。

得られた結果は以下のとおりである。

- 1) DNA マイクロアレイ解析の結果、fibrocyte では単球に比較して線維化に関連する増殖因子や細胞外基質遺伝子の発現が亢進していた。
- 2) qPCR と ELISA による解析では、fibrocyte は単球に比較して血小板由来増殖因子 (PDGF-BB) と線維芽細胞増殖因子-2 の発現が亢進していた。
- 3) Fibrocyte は PDGF 刺激に対して増殖能を示さなかったが、共培養やその培養上清の添加によって肺線維芽細胞の増殖能を増強した。
- 4) Fibrocyte 培養上清による肺線維芽細胞増殖刺激活性は、抗 PDGF-BB 中和抗体の添加によって阻害された。
- 5) IPF 患者肺組織の蛍光免疫染色により、fibrocyte 様細胞の存在と線維化肺における fibrocyte 様細胞の PDGF-BB 発現が確認された。

以上より、fibrocyte は IPF 線維化肺において PDGF-BB 産生を介して肺常在線維芽細胞の増殖を刺激し肺線維化の促進に働いている可能性が示唆された。

本研究は、肺線維症に対する疾患分子病態の解明と、新たな治療法の開発研究に寄与するところ大であり、学位授与に値すると判定した。