

論文の内容の要旨

論文題目 肺線維症における線維芽細胞の動態及び系譜に関する研究

津久井達哉

背景

特発性肺線維症は慢性的に進行する致死的な疾患であり、その発症原因は不明で有効な治療法に乏しい。不可逆的に細胞外マトリックスが組織に沈着し、やがて臓器不全に陥る。診断後の生存期間は数年であり、病態のメカニズム解明とそれに基づいた新規治療標的の発見が望まれている。特発性肺線維症の病理学的な特徴として、肺泡構造が崩壊し線維芽細胞巣が形成されることが挙げられる。線維芽細胞巣は活性化線維芽細胞のクラスターであり、細胞外マトリックスが活発に産生されている線維化の最前線であると考えられている。しかしながら、線維芽細胞巣がどのように形成されるのかは不明な点が多い。最大の問題点として、細胞外マトリックス沈着のエフェクター細胞である活性化線維芽細胞の起源が未だ不明な点が挙げられる。過去には上皮細胞が上皮間葉転移を介して分化することや、線維細胞(fibrocyte)が循環血を介して供給されることが報告されている。さらに近年では血管周囲細胞も活性化線維芽細胞の起源として報告されている。一方で、古典的に活性化線維芽細胞の起源であると考えられてきた常在性線維芽細胞に関する知見は乏しい。本研究において私は、肺線維症における活性化線維芽細胞の動態及び起源を明らかにすることを目的とし、主に常在性線維芽細胞に着目して解析を行った。

方法

間葉系の細胞を新鮮な状態で解析するため、常在性線維芽細胞が標識される 1 型コラーゲンのレポーターである Col-GFP マウスと、血管周囲細胞が標識される NG2-DsRed マウスを使用した。肺線維症モデルとして、マウスにブレオマイシンを経気道投与した。測定に際しては肺をプロテアーゼ溶液で消化し、シングルセル懸濁液を作製した後にフローサイトメトリーで解析した。カスパーゼ 3 の活性化や BrdU の取り込みを調べて細胞死や増殖応答を測定した。遺伝子発現解析は、サンプルから RNA を抽出した後に cDNA を作製し、定量的リアルタイム PCR で解析した。また、肺切片において種々の抗原を染色し、共焦点顕微鏡で観察した。肺の線維化は組織中のヒドロキシプロリン量を指標に定量した。細胞の経気道移入に際しては、磁気分離やセルソーターを用いて純化した細胞を移入した。

結果

まず間葉系細胞のレポーターマウスを用い、肺間葉系細胞の免疫学的・解剖学的な特徴付けを行い、常在性線維芽細胞、血管周囲細胞、平滑筋細胞等の同定及び単離方法を確立した。次に、Col-GFP マウスにおいてブレオマイシン誘導性肺線維症を起こし、1 型コラーゲンを産生する活性化線維芽細胞の動態と活性化様式を解析した。Col-GFP 陽性の活性化線維芽細胞は線維化部位でクラスターを形成していた。純化した活性化線維芽細胞の網羅的な遺伝子発現解析により、種々の線維化関連遺伝子が発現上昇している事が分かり、線維化への寄与が示唆された。一方で、肺全体における Col-GFP 陽性細胞の数は線維化のピーク時においても変化しておらず、活性化線維芽細胞による創傷部位形成に増殖以外の要因がある可能性が示唆された。

次に、活性化線維芽細胞の細胞起源を探索した。並体結合によって Col-GFP マウスと野生型マウスを結合し、ブレオマイシンによって肺線維症を誘導したところ、Col-GFP 陽性活性化線維芽細胞は循環血を介して供給されないことが明らかになった。さらに他の細胞サブセットが活性化線維芽細胞に分化できるか検討するため、私はブレオマイシン誘導性肺線維症における経気道細胞移入系を確立した。ブレオマイシン投与後初期において、活性化線維芽細胞が上皮基底膜の外側である肺胸腔に移動していることが観察された。そこで、Col-GFP マウスから単離した常在性線維芽細胞を、あらかじめブレオマイシンを投与した野生型マウスに経気道移入したところ、移入した Col-GFP 陽性細胞が線維芽細胞巣を形成することが明らかになった。移入した常在性線維芽細胞は活性化マーカーを劇的に発現上昇し、可動性上昇や形態変化など内因性活性化線維芽細胞の変化を再現していた。また、常在性線維芽細胞を移入したマウスにおいて細胞外マトリックスの沈着が亢進しており、移入した常在性線維芽細胞が組織に細胞外マトリックスを沈着させている可能性が示唆された。同様の移入系を用いて血管周囲細胞や上皮細胞を移入したところ、それらは活性化線維芽細胞に分化せず、線維芽細胞巣も形成しなかった。

結論

1 型コラーゲンを産生する活性化線維芽細胞は、肺線維症において線維化部位を形成し、細胞外マトリックスの過剰な沈着において中心的な役割を担っている可能性が示唆された。並体結合や経気道移入法を用いた系譜追跡により、活性化線維芽細胞は常在性線維芽細胞を起源としていることが明らかになった。常在性線維芽細胞活性化の分子機構や、線維芽細胞巣形成機構を解析することで、特発性肺線維症の新規治療法の発見へと繋がることが期待される。