

【要約】

**Pulmonary transplantation of bone marrow-derived macrophages
exacerbates bleomycin-induced inflammation and fibrosis
in mouse lung**

(骨髄由来マクロファージ肺移植はマウス肺における
ブレオマイシン誘導性炎症・線維化を増悪する)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：鈴木拓児教授)

鈴木 英子

【背景】

特発性肺線維症（IPF）は原因不明の進行性間質性疾患であり、全世界で約 300 万人が罹患している予後不良な疾患である。持続的な微小肺損傷により肺胞上皮細胞が減少し、異常な筋線維芽細胞が産生する細胞外マトリックスの蓄積により肺線維化が進行する。マクロファージ(M ϕ)は肺の防御免疫系に必須であるが、IPF などの肺線維化の病因にも寄与している。

肺胞 M ϕ は、炎症、宿主防御機構など、複数の状態において重要な役割を果たしている。肺胞 M ϕ は、肺損傷時に炎症性サイトカインや様々な成長因子を産生し、周囲の上皮細胞、内皮細胞、線維芽細胞などの組織細胞を活性化する。活性化した線維芽細胞は、細胞外マトリックス（ECM）の蓄積を引き起こし組織修復を促進する。しかし、修復反応が過剰となると線維化が生じると考えられている。

正常または炎症組織に存在する M ϕ は様々な外的環境因子に応答して機能や形態を変え、古典的にはM1/M2-M ϕ に極性化することが知られている。一般的にM1は炎症促進性で感染防御に働く一方、M2-M ϕ は抗炎症作用、組織修復などにかかわるといわれている。肺損傷初期では、M ϕ はM1表現型に分極して炎症を促進する。肺損傷の修復期では、M2-M ϕ に分極し、IL-4、IL-10、血小板由来成長因子 subunit A (PDGF α)、Arginase-1 (ARG-1)、matrix metalloproteinase 13 (MMP-13)、TGF- β 1などのメディエーターを過剰発現し、肺線維芽細胞の増殖と分化を誘導し肺線維化を促進すると考えられている。

近年、細胞治療は組織修復の治療法として注目されており、肺疾患領域でも様々な取り組みがなされ、M ϕ 移植の治療効果も報告されている。遺伝性肺胞蛋白症モデルマウスに骨髄由来 M ϕ (bone marrow-derived macrophages : BMDM) 移植を行うと、肺胞蛋白症および生存率が改善した。経気管移植 BMDM はレシピエントマウスの肺に 1 年以上生着したことから、BMDM 移植の肺疾患治療への有効性が示唆された。また、肝線維化モデルマウスにおいて、経門脈的に BMDM を移植すると、肝機能や線維化が改善した。機序として、BMDM は抗炎症サイトカインレベルを上昇させ、肝筋線維芽細胞の数を減少させ、BMDM が微小環境を変化させ線維化を抑制する可能性が示唆された。

一方、肺線維化と M ϕ に関しては、不明な点も多い。線維化を促進する骨髄単球系由来の細胞の存在が報告されているが、逆に抗線維化的に作用する細胞も報告されている。また、肺線維化環境において M ϕ が線維化促進性もしくは抑制性に機能を変化させるのかは不明である。そこで本研究では、肺線維症モデルマウスにおいて BMDM 移植を行い、肺線維症における M ϕ の役割を明らかにすることを目的とした。

【方法】

C57BL/6 野生型マウスの骨髄単核細胞を M-CSF および GM-CSF の存在下で 7 日間 *in vitro* で培養し、BMDM を作製し、鏡検による形態学的特徴とフローサイトメトリーによる細胞表面分子の解析を行った。M1 分化を促す IFN- γ と M2 分化を促す IL-4 で 24 時間追加刺激した BMDM を作成し、線維化プロファイルを定量的リアルタイム PCR で解析した。

次に bleomycin (BLM)誘導性肺線維症モデルを作成し、BMDM 移植を行った。day1 に PBS を投与し、day7 に を投与する 2 群 (PBS+PBS 群、PBS+BMDM 群) と、day1 に BLM を投与し、day7 に PBS または BMDM を投与する 2 群 (BLM+PBS 群、BLM+BMDM 群) を作製した。21 日目に肺の炎症、線維化、肺胞 M ϕ の線維化関連遺伝子発現を解析した。

【結果】

鏡検像では、培養細胞は大型泡沫状、低 N/C 比、腎臓形核を示し、M ϕ の形態的特徴と一致した。フローサイトメトリーでは細胞表面マーカー (CD45⁺/CD64⁺/F4/80⁺/CD11b⁺/CD11c⁺/SiglecF⁻) は M ϕ とプロファイルと一致し、培養細胞は BMDM の形質を示した。

IFN- γ で刺激された M1 様-BMDM は、*Il10* 発現が増加し *Pdgfa* 発現は減少した。IL-4 で刺激された M2 様-BMDM は、*Arg1* と *Mmp12* 発現の増加を示し、*Il10* の発現は比較的減少した。Naïve な BMDM は *Arg1* 発現が減少し、*Pdgfa* の発現が増加しは M1/M2 様 BMDM とは異なる形質を示した。

In vivo では PBS+PBS 群、PBS+BMDM 群では体重減少はみられなかったが、BLM+PBS 群、BLM+BMDM 群では投与約 10 日まで体重が減少し、その後緩徐に体重が増加した。BLM+BMDM 群では BLM+PBS 群よりも体重は低い傾向がみられたが、有意差は認めなかった。PBS+PBS 群、PBS+BMDM 群では死亡個体は認めなかった。BLM+PBS 群、BLM+BMDM 群は死亡率が上昇した。BLM+BMDM 群で生存率は BLM+PBS 群より低い傾向がみられたが、有意差は認めなかった。

線維化により乾燥肺重量と乾燥肺対体重比が増加することが知られている。BLM+PBS と BLM+BMDM 群の乾燥肺重量は、それぞれ PBS+PBS、PBS+BMDM 群と比較して有意に増加した。BLM+BMDM 群は、BLM+PBS 群に比し、肺乾燥重量が増加したが統計的有意性は認めなかった。BLM+BMDM 群は、他群と比較し乾燥肺対体重比の有意な増加を示した。以上より、肺線維化は BLM+BMDM 群で他群より増強したことが示唆された。

次に、肺内の炎症細胞浸潤を評価する目的で Day21 に気管支肺胞洗浄 (BAL) を施行した。PBS+PBS と PBS+BMDM 群で総細胞、M ϕ 、リンパ球、好中球の細胞数に有意差は認めなかった。BLM+PBS 群と BLM+BMDM 群では後者で総細胞、M ϕ 数が有意に上昇した。また BLM+PBS 群と BLM+BMDM 群ではリンパ球、好中球数に有意差を認めなかったが、後者で上昇する傾向を認めた。

day21 に肺組織病理学的検討を行った。Masson's trichrome 染色では、PBS+PBS 群と PBS+BMDM 群では線維化はほぼ認めなかった。BLM+BMDM 群は、BLM+PBS 群と比較し線維化や炎症細胞浸潤が増強した。修正 Ashcroft score と肺内 collagen assay により肺線維化を定量化した。Ashcroft score とコラーゲン量は、PBS+BMDM と PBS+PBS 群間に有意差は認めず、両群とも低値であったが、BLM+PBS 群よりも BLM+BMDM 群で高いスコア、コラーゲン量を示した。以上より、PBS 投与下では BMDM 移植は炎症や肺線維症を誘発しないものの、BLM 投与下では肺線維症が増強したと考えられた。

肺組織での線維化関連遺伝子の発現をリアルタイム PCR で解析した。*Ccl2* や *Il13* の遺

伝子発現が、BLM+PBS 群と比較し BLM+BMDM 群で有意に上昇した。PBS+BMDM と PBS+PBS 群では線維化関連遺伝子発現に有意差を認めなかった。

また、day21 に BAL を行い、BAL 中の肺胞 M ϕ のみ単離培養し、M2 関連遺伝子発現を確認した。*Arg1*、*Pdgfa*、*Il10* の発現レベルは、BLM+PBS 群より BLM+BMDM 群で有意に高かったが、PBS+BMDM と PBS+PBS 群では有意差を認めなかった。以上より、BLM+BMDM 群では M2 関連 M ϕ が増えた。

【考察】

本研究では、外的に BMDM を投与することで、肺線維症における M ϕ の役割について解析し、BLM 投与マウスでは BMDM 移植により線維化が増悪することを明らかにした。これまで、BLM 誘発肺線維症モデルでは、線維化促進 M ϕ と抗線維化 M ϕ 、両方の存在が報告されている。今回は BMDM 移植により、線維化促進 M ϕ が優勢になった可能性がある。BLM モデルでは線維化期、線維化改善期で M ϕ の機能がそれぞれ線維化促進、抑制性に変化するとの報告もあり、今回は線維化期に移植したため、移植 M ϕ が線維化形質に変化した可能性も考えられた。一方、PBS 群では炎症、線維化が悪化しなかったことから、線維化環境のない肺組織への BMDM 移植は線維化に寄与しないことが示唆された。

BLM+BMDM 群は BAL の肺胞 M ϕ だけでなく、他の炎症性細胞、リンパ球および好中球分画が上昇する傾向があった。M ϕ はいくつかの免疫細胞と相互作用する可能性があり、BMDM 移植は BLM に誘発される好中球およびリンパ球の炎症にも影響を与える可能性が示唆された。興味深いことに、PBS+BMDM 群では総細胞数 (TCC) と M ϕ の増加は観察されなかった。M ϕ 機能はさまざまな微小環境刺激によって変化すると考えられ、肺の炎症に対する BMDM 移植の効果は、移植された肺環境で変化する可能性があった。

また、本研究では BMDM が線維化を促進する機序についても明らかにした。BMDM 移植により、*Ccl2* や *Il13* といった炎症性ケモカイン、サイトカインの遺伝子発現が肺組織で増加した。CCL2 は、単球などによって産生される炎症誘発性ケモカインであり、IPF 患者の M ϕ 、上皮細胞および内皮細胞は *Ccl2* mRNA/蛋白質を強く発現し、CCL2 受容体を欠損したマウスは BLM 誘発性の肺線維症が減弱するとの既報もあり、*Ccl2* 遺伝子発現増加が線維化促進に関与したと示唆される。IL-13 は TGF- β 1 を活性化し、肺上皮細胞のアポトーシスを促進して線維症を誘発するため、*Il13* の高発現も線維化促進に寄与した可能性がある。

また、BAL から肺胞 M ϕ を単離し、線維化形質 (M2 関連遺伝子発現) について解析した。BLM+BMDM 群の肺胞 M ϕ は、BLM+PBS 群と比較し *Arg1*、*Pdgfa*、*Mmp12*、*Il10* 遺伝子発現が有意に増強し、線維化微小環境において BMDM 移植は肺胞 M ϕ の M2 分極を誘導したことが示唆された。上記高発現した分子は BLM 誘発性肺線維症の M ϕ で高度に発現され、肺線維症の病因に寄与するとする既報がある。さまざまな微小環境特異的サイトカインが M ϕ の可塑性を決定するため、肺胞 M ϕ に対する BMDM の効果は、肺移植の時期や環境によって変化する可能性が考えられた。

本研究の limitation として、次の 4 点が挙げられた。①BMDM は移植後に肺に存在し続けるか？②BMDM が M2 表現型に分極したか？③BMDM が組織常在 M ϕ を M2-M ϕ に分極化したか？④BMDM と上皮細胞などの肺実質細胞との相互作用と線維化の関係性はあるか？M ϕ と肺線維症の関連を明らかにするために、更なる研究が必要と考える。

【結語】

線維化期の BMDM の肺移植は、マウス肺の BLM 誘発性の炎症および線維症を悪化させる可能性がある。