

論文の内容の要旨

論文題目 肺線維芽細胞の遊走におけるシステイニル・ロイコトリエンの効果

指導教員 長瀬隆英 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成15年4月入学

医学博士課程

内科学専攻

氏名 加藤順

<研究の背景及び目的>

肺の線維化は様々な慢性炎症性肺疾患で生じる。気管支喘息においては気道リモデリングと呼ばれる特有の構造変化の一部として気道上皮下の線維化が生じる。肺の線維芽細胞はこの過程において重要な役割を果たす。組織傷害部位への線維芽細胞の遊走は、正常な組織修復のために重要なステップであるが、遊走が増加し、組織に線維芽細胞が過剰に集積すると線維化につながると考えられる。

システイニル・ロイコトリエン(CysLTs)は喘息の病態生理において重要な役割を担う脂質メディエーターである。喘息モデルマウスにシステイニル・ロイコトリエンレセプターtype1(CysLT1)の拮抗薬を作用させると気道リモデリングが改善することが示されている。CysLTsは気道れん縮誘発、気道杯細胞の増加、白血球浸潤惹起作用を持つことが知られており、これらを通じて喘息の気道リモデリングに関わっていると考えられる。それに加えて、CysLTsは直接に肺間葉系細胞に作用して気道リモデリングの過程に関わっていることを示唆する研究がある。しかし、肺線維芽細胞の遊走とCysLTsとの関係はいままで良く知られていない。そこで、本研究ではCysLTsの線維芽細胞の遊走への効果につ

いて調べた。

<研究対象と方法>

1. 各種試薬

ロイコトリエン C_4 (LTC_4), D_4 (LTD_4), E_4 (LTE_4)、ウサギポリクローナル CysLT1 抗体、ウサギ IgG アイソタイプコントロール抗体、FITC 付加ヤギ抗ラビット IgG 抗体、DAKO IntraStain kit、ヒトファイブロネクチン (HFn)、百日咳毒素をそれぞれ購入した。Pranlukast は小野薬品より無償供与された。

2. 正常ヒト肺線維芽細胞 (normal human lung fibroblast, NHLF)、正常気管支平滑筋細胞の培養

NHLF は Biowhittaker Inc. より購入した。NHLF は Ham's F12 細胞培養液に 10% ウシ血清と 50U/ml ペニシリンGナトリウム、 $50\mu\text{g/ml}$ 硫酸ストレプトマイシン、 $1\mu\text{g/ml}$ アンホテリシンBを加えた溶液にて培養した。全ての実験で、3-4 継代した細胞を用いた。confluent となった NHLF は 0.05%トリプシンと 0.53mM EDTA を用いてディッシュより剥離し血清を加えない F12 培養液に再浮遊させた。正常気管支平滑筋細胞は平滑筋細胞増殖培地 (Cambrex Co) を用いて培養した。

3. CysLT1 の発現；フローサイトメトリーによる評価

Thivierge らの方法 (M. Thivierge 2001, J immunol) に則って NHLF における CysLT1 の発現をフローサイトメトリーで評価した。

4. CysLT1 の発現；免疫染色による評価

免疫染色キット EnVision+ System-HRP (DakoCytomation, CA) を使用して NHLF と正常気道平滑筋細胞の CysLT1 の発現を免疫染色で評価した。

5. NHLF の遊走

NHLF の遊走実験は Boyden blindwell chamber technique (J exp med 1962) に従い、Nucleopore 社の 48-well chamber を用いて行った。directional migration (chemotaxis) の評価では、遊走因子は chamber の下部 well に添加し、細胞 (1.0×10^6 個/ml 無血清 F12) は上部 well に添加した。Non-directional migration (chemokinesis) の評価では上下の well に同濃度の遊走因子を添加し

た。上下の well の間に 0.1 % gelatin で被覆した migration assay membrane (8 μ m 孔) を挟み、6 時間静置した。その後 membrane を chamber より取り外し、membrane 上面に付着している細胞を除去し、メタノール固定した後、Diffquik で染色した。染色した membrane をガラススライドにマウントし、光学顕微鏡 400 倍 5 視野に観察された細胞を合計して遊走細胞とした。実験は triplicate で少なくとも 3 回以上行った。

6. NHLF によるコラーゲングル・コントラクションに対する CysLTs の効果

既報に従い、type I コラーゲンをラットの尾部腱組織より抽出し、コラーゲン溶液、蒸留水、4 倍濃縮 F12 細胞培養液、NHLF をコラーゲン濃度 0.75mg, 細胞濃度 3×10^5 cells/ml, F12 1x 濃度、pH 7.4 となるように調整し、24 穴プレートに 0.5ml ずつ注入した。37°C、95% O_2 , 5% CO_2 下で incubate するとゲル化が完了するので、プレートからゲルを取り外して 5ml の培養液を入れた 60mm プレートに移した。37°C、95% O_2 , 5% CO_2 のインキュベータ内に静置し、画像解析装置を用いて経時的にゲル面積を測定し記録した。

7. 統計学的解析

図中のデータは平均値 + 標準誤差で示した。多重比較を行ったデータについては Turkey-Kramer 多重比較検定を行った。P 値 0.05 未満を以て有意とした。

<結果>

1. NHLF における CysLT1 の発現

本研究にて使用したヒト肺線維芽細胞, NHLF において、フローサイトメトリー及び免疫染色にて CysLT1 の発現が認められた。免疫染色では気管支平滑筋細胞でも CysLT1 の発現が認められた。

2. NHLF の遊走における LTD_4 の効果、Boyden chamber を用いての検討

LTC_4 ・ LTD_4 ・ LTE_4 いずれも、単独では NHLF に対して chemotaxis も chemokinesis も惹起しなかった。

HF α は 1.25–20 μ g/ml の濃度において NHLF に対し濃度依存性に遊走を起こし

た。

HF α 1.25 μ g/ml と 2.5 μ g/ml の濃度において LTD $_4$ (10 $^{-7}$ M) は有意に NHLF の遊走を増強した。LTC $_4$ 、LTE $_4$ についてはパイロット研究において同様の傾向を認めたが、有意差を認めなかったため以後全て LTD $_4$ を用いて実験を行った。

LTD $_4$ による遊走増強効果は 10 $^{-9}$ M から 10 $^{-7}$ M の範囲で濃度依存性を認めた。

LTD $_4$ の遊走増強効果が chemokinesis に作用するのか chemotaxis に作用するのか調べるため HF α を上下の well に加えた場合と下の well のみに加えた場合にそれぞれ LTD $_4$ の効果を比較した。LTD $_4$ は双方で遊走増強効果を示した。

特異的 CysLT1 拮抗薬である Prunlukast を CysLT1 を加える前に作用させると、LTD $_4$ の効果はうち消された。このことより、LTD $_4$ は CysLT1 を介して遊走増強効果を呈していると考えられた。

CysLT1 に結合した LTD $_4$ は G 蛋白の G $_{i/o}$ を活性化することが知られているため、百日咳毒素 (50ng/ml, 8 時間) を作用させた NHLF において LTD $_4$ の効果を観察したところ、LTD $_4$ による遊走増強効果は百日咳毒素を作用させた群では見られなかった。LTD $_4$ の効果は百日咳毒素に感受性の G $_{i/o}$ 蛋白を介していると考えられた。

3. NHLF の collagen gel-contraction における LTD $_4$ の効果

NHLF を type 1 collagen 内に包埋して面積変化を観察すると、開始時と比較し 24 時間で 66.0 $\pm$ 4.9%、48 時間で 52.1 $\pm$ 2.7%、72 時間で 44.6 $\pm$ 3.9% に縮小した。これらは細胞を加えていないゲルの面積に比し有意な縮小であった。LTD $_4$ 10 $^{-7}$ M をゲル作成時に 20 分間作用させたところゲルの縮小には影響を及ぼさなかった。

< 考察 >

本研究において、LTD $_4$ が NHLF の HF α による遊走を増強することが示された。この効果は特異的 CysLT1 拮抗薬である Prunlukast により完全に阻害された。すなわち、CysLT1 を介した効果であると考えられる。

CysLT1 拮抗薬は慢性喘息患者の症状を改善することから、CysLT1 を介した作用が気管支喘息の病態生理に重要であると考えられている。Henderson らは CysLT1 拮抗薬がマウス喘息モデルの気道リモデリングを抑制することを明らかにした。この結果は、CysLTs が喘息の気道上皮下の線維化において重要な役割

を果たしていることを強く示唆している。

CysLT1 は肺では主に炎症細胞と気管支平滑筋に発現が認められていたが、肺線維芽細胞における発現はこれまで明らかでなかった。しかし最近、肺線維芽細胞の細胞株 HFL-1 において定常状態では CysLT1 は発現していないが、IL-13、TGF- β を作用させることにより発現し、CysLTs によりコラーゲン産生やケモカイン産生の増強が認められることが示された。そして本研究では、正常ヒト肺線維芽細胞において定常状態で CysLT1 が発現していることが示された。さらに LTD₄ は HFn による線維芽細胞の遊走を増強した。この結果は CysLTs はその炎症作用だけでなく、線維芽細胞への直接作用によっても気道リモデリングに関わっていることを示唆する。今回の実験結果においては LTD₄ の遊走増強効果は PTX 処置にて消失したため、G_{i/o} 蛋白を介していると考えられる。

結論として、本実験ではシステイニル・ロイコトリエンの一つ、LTD₄ がファイブロネクチンによる肺線維芽細胞の遊走を増強し、喘息における気道リモデリングに関与しうる可能性があることが示された。