

# 東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	Effects of CX3CL1 inhibition on murine bleomycin induced interstitial pneumonia
別タイトル	ブレオマイシン誘導間質性肺炎モデルマウスにおけるCX3CL1阻害による影響の解析
作成者（著者）	山田, 壯一
公開者	東邦大学
発行日	2021.03.17
掲載情報	東邦大学大学院医学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨.
資料種別	学位論文
内容記述	主査：岸一馬 / タイトル：Effects of CX3CL1 inhibition on murine bleomycin induced interstitial pneumonia / 著者：Soichi Yamada, Shion Miyoshi, Junko Nishio, Satoshi Mizutani, Zento Yamada, Natsuko Kusunoki, Hiroshi Sato, Yoshikazu Kuboi, Kana Hoshino Negishi, Naoto Ishii, Toshio Imai, Tetsuo Mikami, Hiroyasu Nakano, Shinichi Kawai, Toshihiro Nanki / 掲載誌：European Journal of Inflammation / 巻号・発行年等：18, 2020
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲第976号
学位記番号	甲第666号
学位授与年月日	2021.03.17
学位授与機関	東邦大学
DOI	10.1177/2058739220959903
その他資源識別子	<a href="https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/2058739220959903">https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/2058739220959903</a>
メタデータのURL	<a href="https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD78808313">https://mylibrary.toho u.ac.jp/webopac/TD78808313</a>

# 博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

山田壯一より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 666 号

学位申請者 : やま だ そう いち  
山 田 壯 一

学位論文 : Effects of CX3CL1 inhibition on murine bleomycin-induced interstitial pneumonia

(ブレオマイシン誘導間質性肺炎モデルマウスにおける CX3CL1 阻害による影響の解析)

著 者 : Soichi Yamada, Shion Miyoshi, Junko Nishio, Satoshi Mizutani, Zento Yamada, Natsuko Kusunoki, Hiroshi Sato, Yoshikazu Kuboi, Kana Hoshino-Negishi, Naoto Ishii, Toshio Imai, Tetsuo Mikami, Hiroyasu Nakano, Shinichi Kawai, Toshihiro Nanki

公表誌 : European Journal of Inflammation  
DOI: 10.1177/2058739220959903

論文内容の要旨 :

間質性肺炎 (IP) は肺組織の炎症と線維化をきたす疾患であり、進行すると肺の正常構造が破壊され、肺容積の減少、ガス交換の障害をもたらす。関節リウマチ (RA) を含むリウマチ性疾患に関連する IP は進行性で予後が悪く、確立された治療はないことから新規の治療法の開発が望まれている。

ケモカインの一つであるフラクタルカイン (CX3CL1) とその受容体である CX3CR1 が RA の滑膜組織に強く発現し、抗 CX3CL1 抗体によりマウスの RA 様関節炎が改善することが示されている。現在、抗 CX3CL1 抗体は関節リウマチ患者を対象に臨床試験が行われており、第 I/IIa 相試験の結果、忍容性が良好であり、臨床的有効性が示唆された。一方、多発性筋炎/皮膚筋炎にみられる IP では CX3CL1 が発現しており、CX3CL1 の血清レベルが筋炎や IP の疾患活動性と関連していることが報告されており、全身性強皮症の間質性肺炎においても CX3CL1 発現の増加が示されている。これらの結果から、抗 CX3CL1 抗体が RA の関節炎だけでなく IP にも有効であることが期待され、マウスモデルを用いて CX3CL1 阻害による IP に対する影響を解析した。

ブレオマイシン (BLM) により誘発されるマウス IP は、古くから IP の病態解明に広く用いられている。今回、まず BLM による

IP モデルマウス (BLM-IP) の作成を行った。C57BL/6J マウスに BLM を気管内投与し、14、21 日目に肺組織を HE 染色したところ、細胞浸潤と肺線維化が認められた。21 日目には炎症の重症度がわずかに低下していたため、IP のモデルとして 14 日目のマウスを用いて評価することとした。

BLM-IP における CX3CL1 および CX3CR1 の発現を免疫染色にて検討した。CX3CL1 は、正常マウスでは 2 型肺泡細胞に発現していたが、BLM-IP では肺間質に浸潤した単核球細胞や 2 型肺泡細胞に CX3CL1 が多く発現していた。また、CX3CR1 は正常マウスでは肺泡マクロファージにのみ見られたが、BLM-IP では、間質の浸潤細胞、肺泡マクロファージにも CX3CR1 が発現していた。これらの結果から BLM-IP において CX3CL1 と CX3CR1 間の相互作用が病態に関与していることが示唆された。

次に、抗 CX3CL1 抗体投与による効果を検討するために、BLM-IP モデルマウスを 2 群に分けて抗 CX3CL1 抗体またはコントロール抗体 (500 $\mu$ g $\times$ 3 回/週) を投与した。BLM 投与 14 日後の肺組織の HE 染色を用い、炎症細胞浸潤の程度をアシクロフトスコアにて比較検討したが、有意な差は認められなかった。また、シリウスレッド染色により肺線維化も評価したが、同様に有意差は認められなかった。

気管支肺泡洗浄液 (BALF) を採取し、細胞数、および細胞種類をフローサイトメーターにて解析した。抗 CX3CL1 抗体投与群ではコントロール群と比較して、総細胞数と白血球数が有意差はないものの減少傾向にあった。CD19<sup>+</sup> B 細胞数も減少傾向であった。CD86<sup>+</sup> 細胞 (M1 様マクロファージ) 数は有意に減少していたが、CD206<sup>+</sup> 細胞 (M2 様マクロファージ) 数には変化が見られなかった。また T 細胞上の CD3 発現レベルが増加していた。

IP モデル動物において抗 CX3CL1 抗体による効果を検討した初めての研究である。抗 CX3CL1 抗体の投与では BLM-IP の炎症細胞浸潤抑制効果および線維化抑制効果は認められなかったが、BALF 中の M1 マクロファージを減少させた。BLM-IP の急性期に M1 マクロファージが BALF で増加することが知られており、抗 CX3CL1 抗体は CX3CL1-CX3CR1 シグナルを介しマクロファージの浸潤、さらに活性化を抑制する可能性が推測された。また、T 細胞受容体 (TCR) /CD3 複合体を介した刺激により TCR/CD3 が細胞内に取り込まれることが知られており、抗 CX3CL1 抗体による BALF 中 T 細胞の CD3 発現レベルの増加は、T 細胞の活性化も抗 CX3CL1 抗体により抑制されたことを反映している可能性がある。

このように、本研究では、マウス BLM-IP では CX3CL1-CX3CR1 が間質性肺炎の病態に関与していることが示唆された。抗 CX3CL1 抗体による CX3CL1-CX3CR1 シグナルの抑制により肺線維化の進行には影響を与えなかったが、BALF 中への M1 マクロファージの浸潤、T 細胞の活性化が抑制された。CX3CL1 阻害は IP において炎症細胞の浸潤、活性化の抑制に寄与することが示唆された。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 666 号	氏 名	山 田 壯 一
学位審査担当者	主 査	岸 一 馬
	副 査	亀 田 秀 人
	副 査	近 藤 元 就
	副 査	赤 坂 喜 清
	副 査	杉 山 篤

学位論文の審査結果の要旨 :

ケモカインの一つであるフラクタルカイン(CX3CL1)とその受容体であるCX3CR1は関節リウマチ(RA)の滑膜組織に強く発現し、抗CX3CL1抗体によりマウスのRA様関節炎が改善することが示されている。抗CX3CL1抗体は間質性肺炎(IP)にも有効であることが期待され、マウスモデルを用いてCX3CL1阻害によるIPへの影響を解析した。まずブレオマイシン(BLM)によるIPモデルマウス(BLM-IP)の作成を行った。C57BL/6JマウスにBLMを気管内投与したところ、細胞浸潤と肺線維化が認められた。次に、BLM-IPにおけるCX3CL1およびCX3CR1の発現を免疫染色にて検討した。CX3CL1は、正常マウスでは2型肺胞細胞に発現していたが、BLM-IPでは肺間質に浸潤した単核球細胞や2型肺胞細胞に多く発現していた。また、CX3CR1は正常マウスでは肺胞マクロファージにのみ見られたが、BLM-IPでは、間質の浸潤細胞、肺胞マクロファージにも発現していた。これらよりBLM-IPにおいてCX3CL1とCX3CR1間の相互作用が病態に関与していることが示唆された。次に、抗CX3CL1抗体の効果を検討するために、BLM-IPモデルマウスを2群に分けて抗CX3CL1抗体またはコントロール抗体を投与した。両群で、炎症細胞浸潤の程度および肺線維化に有意差は認められなかった。次に、気管支肺胞洗浄液(BALF)を採取し、細胞数、および細胞種類をフローサイトメーターにて解析した。抗CX3CL1抗体投与群ではコントロール群と比較して、総細胞数と白血球数が減少傾向にあった。CD86<sup>+</sup>細胞(M1様マクロファージ)数は有意に減少しており、T細胞上のCD3発現レベルが増加していた。本研究より、マウスBLM-IPではCX3CL1-CX3CR1が間質性肺炎の病態に関与していることが示唆された。抗CX3CL1抗体は肺線維化の進行には影響しなかったが、BALF中へのM1マクロファージの浸潤、T細胞の活性化が抑制された。CX3CL1阻害はIPにおいて炎症細胞の浸潤、活性化の抑制に寄与することが示唆された。

2020年10月27日に開催された学位審査会において、研究要旨を発表した後、活発な質疑応答が行われた。審査委員よりBLM-IPの発症機序、BLMによるIPと膠原病肺の違い、BALFの細胞数と組織での炎症細胞浸潤の差、BLM-IPにおけるステロイド投与の報告、コラーゲンの定量、線維化の評価方法などの質問が出された。申請者はそれら全ての質問に、適切に返答した。

以上より、BLM誘発性肺炎モデルマウスにおけるCX3CL1阻害による影響を解析した本研究の意義は高く、本論文は学位に値するとの結論に達し、学位審査会を終了した。