

Enhanced migration of fibroblasts derived from lungs with fibrotic lesions

メタデータ	言語: jpn 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2014-11-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 菅沼, 秀基 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1509

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博論第 232号	学位授与年月日	平成 8年 3月 8日
氏 名	菅 沼 秀 基		
論文題目	Enhanced migration of fibroblasts derived from lungs with fibrotic lesions (線維化肺由来の線維芽細胞における遊走能の亢進)		

博士(医学) 菅 沼 秀 基

論文題目

Enhanced migration of fibroblasts derived from lungs with fibrotic lesions

(線維化肺由来の線維芽細胞における遊走能の亢進)

論文の内容の要旨

目的：特発性肺線維症（IPF）の病理組織像では、線維芽細胞と細胞外マトリックスの増加がみられ、線維化形成の早期には肺胞内への線維芽細胞の遊走が生じると推測されている。IPF 由来の線維芽細胞の増殖能の亢進については幾つかの報告がなされているが、遊走能に関する研究は少なく疾患肺由来の線維芽細胞を用いた遊走能についての報告はこれまでにない。そこで、線維化肺由来のと線維芽細胞を培養し、その遊走能を検討した。

対象：IPF 患者11例と対照 8 例、膠原病に合併した間質性肺炎（IP-CVD）7 例、サルコイドーシス患者13例の肺組織由来の線維芽細胞について遊走能の検討をおこなった。肺組織は開胸肺生検または経気管支肺生検にて採取した。対照の線維芽細胞は肺腫瘍切除術の際に採取した正常肺から培養した。

方法：肺組織は1 mm³大以下に細切し、10% Fetal bovine serum を含む Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) にて初代培養、継代培養をおこない、3 から11 population doubling level の線維芽細胞を得た。遊走能の測定には、Neuro-Probe 社製、96-well chemotaxis chamber を用いた。フィルターは孔径 8 μ m で、あらかじめ30 μ g/ml のコラーゲン溶液で処理した。上室には、 2.5×10^5 個/ml に調整した線維芽細胞を入れ、下室には DMEM、または走化因子として platelet derived growth factor (PDGF) 30 ng/ml を添加した DMEM を入れた。37°C、5 %CO₂ 下に6時間静置した後、フィルターの下面に付着した細胞を100倍視野にて算定し遊走能とした。

結果：IPF：IP-CVD、サルコイドーシス患者および対照由来の線維芽細胞の DMEM に対する遊走能（平均（標準偏差））は、689（491）、517（238）、229（99）、183（86）個/1視野で IPF において有意な遊走能の亢進がみられた。また、PDGF を含む DMEM に対する遊走能は、それぞれ、1928（600）、1687（478）、862（358）、829（222）個/1視野で IPF と IP-CVD 患者由来の線維芽細胞の遊走能が亢進していた。また、線維化の強い肺組織に由来する線維芽細胞は、軽度の線維化病変由来の細胞と比べ遊走能が高く、線維芽細胞の遊走能と増殖能に相関関係はなかった。

結語：線維化肺由来の線維芽細胞の遊走能の亢進は、肺の線維化に重要であると考えられる。今回の検討では、線維化肺に由来する線維芽細胞は、強い遊走能を有していた。生体内においても線維芽細胞の遊走能が亢進しているならば、遊走能の亢進が線維化肺形成に関与している可能性がある。

論文審査の結果の要旨

難治性肺疾患の一つ特発性肺線維症（idiopathic pulmonary fibrosis ; IPF）における肺組織の線維化の機序については、線維芽細胞の増殖能亢進の観点から追求されているが、遊走能の変化については明らかでない。申請者は IPF の早期において肺線維芽細胞と細胞外マトリックスが増加することに着目し、肺胞領域へ線維芽細胞が遊走するか否かを明らかにするため、IPF 患者の肺組織線維芽細胞の in vitro 遊走能を各種肺疾患と比較して検討した。

申請者の口頭発表、および論文について審査委員会で評価された点はつぎのとおりである。

1. 本研究の目的を説明するために用いられた材料、および方法はほぼ適切であると評価された。すなわち、IPF (11例)、膠原病に合併した間質性肺炎 (7例)、サルコイドーシス (13例)、正常肺 (8例) から肺組織を生検採取し、線維芽細胞を準備し継代培養をおこなって純化した。遊走能は96穴 chemotaxis chamber を用い血清無添加培養液で測定した。その際、chemoattractant として platelet derived growth factor (PDGF) を添加した。これらの方法は精度や再現性において問題はないと判断された。

2. PDGF 無添加の条件下では IPF の線維芽細胞の遊走能は対照、およびその他の肺疾患と比較して有意に亢進していた。また、PDGF 添加の条件下では、いずれの疾患群においても遊走能は無添加の値と比べ約3倍以上亢進していたが、各群間で比べると IPF が最も高値を示し、他の疾患群と比べ有意に亢進していた。申請者はこれらの所見より線維芽細胞の遊走能の亢進が IPF の線維化肺形成に密接に関係する可能性を主張した。これに対し審査委員会では IPF における線維芽細胞の肺泡領域への遊走を促すシグナル伝達経路の細胞学的、ならびに分子レベルの変化の詳細はまだ明らかでないが、IPF 肺の線維化の機序を線維芽細胞の遊走能亢進の観点から追求する端緒を見出したものとして高い評価が与えられた。

3. さらに申請者は、肺線維化の進展に対して線維芽細胞の増殖能や IL-1 β 、IFN- γ などの組織サイトカインよりも遊走能の亢進が密接に関係することを明らかにした。これらの所見は IPF の肺線維化の機序を解明するうえで示唆に富む成果であると評価された。

審査の過程において、申請者に対し口頭で次のような質疑が行われた。

1. 遊走能の測定法の条件設定をどのようにして決定したか
2. 肺線維化にともない線維芽細胞や chemoattractant が気管支洗浄液中に出現するか
3. 線維芽細胞に PDGF リセプターを検出したか、また、肺線維化が進展する過程でリセプター発現に変化がみられるか
4. 線維芽細胞の遊走能を肺由来のものと肺以外の各種組織について比較検討したか
5. 遊走能に対するサイトカイン (IL-1 β や IFN- γ など) の添加実験の意味について
6. IPF の線維芽細胞の遊走能を年齢別に検討したか
7. 線維芽細胞の細胞骨格 (ミオシン、アクチン) の変化を電顕的に検出できるか

以上の質問に対し申請者はほぼ適切な解答をおこない、残された問題については現在検討中であることが確認されたので、本論文は博士 (医学) の授与に相応しい内容をそなえているものと全員一致で判定した。

論文審査担当者 主査 教授 山下 昭

副査 教授 筒井 祥博 副査 教授 吉見 輝也

副査 助教授 小出 幸夫 副査 講師 鈴木 一也