

# Characteristics of Fibroblasts as a Target Cell and an Effector Cell in Japanese Patients with Sarcoidosis

|       |   |
|-------|---|
| メタデータ | 言語: jpn<br>出版者: 浜松医科大学<br>公開日: 2014-10-30<br>キーワード (Ja):<br>キーワード (En):<br>作成者: 田村, 亨治<br>メールアドレス:<br>所属: |
| URL   | <a href="http://hdl.handle.net/10271/1023">http://hdl.handle.net/10271/1023</a>                           |

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 | 医博第 170号  | 学位授与年月日 | 平成 6年 3月25日 |
| 氏名    | 田村 亨治   |         |             |
| 論文題目  | Characteristics of Fibroblasts as a Target Cell and an Effector Cell in Japanese Patients with Sarcoidosis<br>(日本人サルコイドーシス患者の線維芽細胞の標的細胞、効果細胞としての特徴) |         |             |

医学博士 田村 享治

論文題目

Characteristics of Fibroblasts as a Target Cell and an Effector Cell in Japanese Patients with Sarcoidosis

(日本人サルコイドーシス患者の線維芽細胞の標的細胞、効果細胞としての特徴)

論文の内容の要旨

(目的) 従来 target cell と考えられていた線維芽細胞は、サイトカインなどを産生して effector cell としても機能することが知られてきた。サルコイドーシス (以下サ症) においては肉芽腫周囲に線維芽細胞が集族しており、線維芽細胞と、肉芽腫を構成する単球、マクロファージ、Tリンパ球が相互に作用を及ぼしあっていることが推測される。またサ症の一部症例にみられる肺線維症の成因に、線維芽細胞自体の機能異常が関与する可能性がある。これらの観点から、サ症における線維芽細胞の病態形成への関与を調べるために、サ症由来の肺線維芽細胞の増殖能とサイトカイン産生能を検討した。

(対照) サ症患者7名 (男2名、女5名、 $37.1 \pm 13.5$ 歳)、特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 患者4名 (男3名、女1名、 $58.7 \pm 14.8$ 歳) と対照5名 (男4名、女1名、 $58.8 \pm 6.5$ 歳)。サ症の診断は病理学的あるいは臨床的に行った。IPFの診断は臨床的及び病理組織学的に行った。対照は、肺癌のために外科的切除を行った症例の肉眼的に正常部分を用いた。

(方法) 1) 線維芽細胞の培養: サ症患者は経気管支肺生検により、IPF患者、対照患者は開胸生検により肺組織を得た。検体を細切後、10% fetal bovine serum を含む Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) を標準培養液として培養して、線維芽細胞を得た。以下の検討には3-10 population doubling level の細胞を用いた。2) 細胞増殖能: 標準培養液中で confluent になった線維芽細胞を、血清無添加 DMEM で48時間培養し、細胞周期を整えた後、標準培養液に換えた (Day 0)。その24時間後 (Day 1)、48時間後 (Day 2)、96時間後 (Day 4)、トリパンブルー染色して生細胞数を算定した。また、Day 0において interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 1 ng/ml、interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 1,000 U/ml を添加して、同様に細胞数を算定した。3) 線維芽細胞のサイトカイン産生能: 標準培養液を無血清培養液に換えて、IL-1 $\beta$  (1 ng/ml)、IFN- $\gamma$  (1,000 U/ml) を添加した。24時間培養後、上清中の interleukin-6 (IL-6)、interleukin-8 (IL-8)、granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) にて測定した。

(結果) 1) 細胞増殖能: サ症由来の線維芽細胞は、対照患者由来の線維芽細胞に比し有意に増殖能が高かった ( $9.1 \pm 2.8$ 倍 VS  $4.8 \pm 1.7$ 倍、 $p < 0.05$ 、Day 4の細胞数の増加率を Day 0と比較)。IL-1 $\beta$  添加により、サ症、IPFのいずれも増殖能は抑制される傾向があったが、有意ではなかった。IFN- $\gamma$  添加によりサ症、IPFのいずれも対照に比し有意に増殖能が抑制された。2) サイトカイン産生能: サ症由来の線維芽細胞は IL-1 $\beta$  刺激により対照に比し有意に IL-6 産生能が高かった ( $36911 \pm 23412$  pg/ml vs  $10660 \pm 4996$  pg/ml、 $p < 0.05$ )。IL-8、GM-CSF もサ症で高い傾向があったが、有意ではなかった。サ症では、IL-1 $\beta$  存在時に IFN- $\gamma$  により IL-6 産生能が抑制されない傾向があったが、IPF、対照においては抑制された。

(考案) サ症由来の線維芽細胞は増殖能、IL-6 産生能が高いことより、活性化された線維芽細胞が、target cell としてのみならず effector cell として作用して、サ症の病態形成に関与していることが示

唆された。線維芽細胞より分泌された IL-6 などのサイトカインは、さらに T リンパ球などに作用してサ症における免疫学的病態を増幅し、慢性化をひきおこすと考えられた。また、IPF よりもサ症において意義のあると認識されている IFN- $\gamma$  により、サ症の線維芽細胞の増殖が抑制されたことは、サ症で肺線維症に至る症例の少ないという現象の一部を説明しうる可能性があると考えられた。

### 論文審査の結果の要旨

申請者はサルコイドーシス（サ症）の症例の一部に肺線維症がしばしば見られることに注目し、サ症の病態形成に線維芽細胞の機能異常が関与するか否かを、サ症由来の肺線維芽細胞の増殖能とサイトカイン産生能の面から検討した。

審査委員会において、申請者の口頭発表と主論文内容に関し審査した結果、以下の点が評価された。

1. サ症患者、特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis ; IPF) 患者、対照者（肺癌患者）から手術時に得られた肺組織から線維芽細胞 (Fbl) を単離し、in vitro 系で培養を行うための至適条件を設定することに成功した。

2. Fbl の培養液中に interleukin-1  $\beta$  (IL-1  $\beta$ )、あるいは interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) を加え、Fbl の interleukin-6 (IL-6)、interleukin-8 (IL-8)、granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF) の産生能を ELISA 法で検索しているが、その方法は、特異性、精度、再現性などからみてほぼ適切であると判断された。

3. サ症 Fbl は、培養 4 日目で対照と比べ有意の増殖能を示したが、IL-1  $\beta$  の添加により抑制される傾向が見られ、さらに IFN- $\gamma$  の添加ではサ症と IPF いずれの Fbl もその増殖能が有意に抑制されることが明らかにされた。

4. サ症 Fbl は、IL-1  $\beta$  の添加により、IL-6 産生の有意の増加、および IL-8 と GM-CSF の増加傾向を示し、さらに IL-1  $\beta$  存在下での IL-6 産生は IFN- $\gamma$  添加によって抑制されないことなどが明らかにされた。それに対し、IPF や対照の Fbl は IFN- $\gamma$  添加によって IL-6 産生が抑制され、サ症 Fbl とは異なる反応を示すことが明らかにされた。

以上の所見に基づき、サ症の Fbl は増殖能や IL-6 産生が亢進しており、T 細胞など免疫系細胞に作用してサ症の病態形成の増殖や慢性化に強く関与する可能性があることを申請者は主張している。

審査委員会では、本研究がサ症の病態形成において、肺組織の Fbl が target cell としてだけでなく、effector cells としても関与する可能性を明らかにした点に関し高い評価が与えられ、今後の研究の発展が期待された。

審査の過程において、申請者に対し次のような質疑がおこなわれた。

1. 使用した Fbl の鑑別、および同定法
2. 対照サ症、および IPF 患者の Fbl のサイトカインに対する反応性の異なる理由
3. サ症の Fbl のサイトカイン反応性と産生能が病期で異なる可能性
4. smoker と non smoker のサ症 Fbl のサイトカイン反応性および産生能の異なる可能性
5. サ症の肺組織における免疫系細胞の浸潤と、IL-1  $\beta$  と IFN- $\gamma$  の産生細胞の同定法
6. サ症の予後と Fbl のサイトカイン反応性、および産生能との間に相関はみられないか

7. 肺組織内、および肺胞洗滌液中のサイトカイン濃度を測定したか
8. 肺組織内 Fbl の target cells としての意義

以上の質疑に対し、申請者はほぼ適切な解答をおこなったので、本論文が博士（医学）の学位授与に値する内容を備えているものと審査委員全員で判定した。

|         |    |    |    |    |    |     |    |    |
|---------|----|----|----|----|----|-----|----|----|
| 論文審査担当者 | 主査 | 教授 | 山下 | 昭  |    |     |    |    |
|         | 副査 | 教授 | 白澤 | 春之 | 副査 | 教授  | 吉田 | 孝人 |
|         | 副査 | 教授 | 吉見 | 輝也 | 副査 | 助教授 | 寺田 | 護  |