

学 位 論 文 題 名

サルコイドーシス肺の炎症細胞における GM-CSF mRNA の発現

学位論文内容の要旨

1. 目的

肺サルコイドーシス（サ症）は主に単球／マクロファージ系の細胞から成る類上皮細胞肉芽腫の形成を特徴とする疾患である。この系統の細胞が肺に集積する機序として、肺胞隔壁に浸潤するTリンパ球ならびに肺胞マクロファージから放出される種々のサイトカインが重要と考えられている。本研究ではコロニー刺激因子（CSF）が単球／マクロファージ系細胞に対して分化や増殖を誘導するなどの作用を持つことに注目し、CSFがサ症における肉芽腫形成に関与するとの仮説を立てた。これを検証するため、サ症患者から気管支肺胞洗浄（BAL）で得た細胞によるCSFのmRNA発現を検討し、健康人および農夫肺症患者との比較を試みた。

2. 対象と方法

対象はサ症患者20名、農夫肺症患者5名、正常対照者5名とした。サ症患者については胸部X線所見、肺外病変の有無、臨床経過、血清アンギオテンシン変換酵素（ACE）値など臨床データを収集した。臨床経過はBALの前1年間の胸部X線所見または理学所見の変化に基づいて増悪・不変・軽快の3段階に分けた。

BALは常法によって行い、集めた細胞からRNAを抽出した。BAL細胞から得られるRNAの量は少ないので、mRNAの検出には逆転写－ポリメラーゼチェーンリアクション（RT-PCR）法を用いた。即ち、total RNA 1  $\mu$ gから逆転写酵素によってcDNAを合成し、次に目的のmRNAの一部の塩基配列に対応するオリゴヌクレオチドをプライマーとしたポリメラーゼチェーンリアクション（PCR）により目的のcDNAを増幅した。PCRは1サイクルを94℃ 1分、55℃ 2分、72℃ 1.5分とし30サイクル行った。

RT-PCRの最終産物の一部をアガロースゲルで電気泳動し、ナイロン膜にブロットした。これに<sup>32</sup>PでラベルしたそれぞれのcDNAプローブでハイブリダイゼーションを行い、洗浄後にオートラジオグラフィーを行った。用いたDNAプローブは米国Genetics Institute Inc. から供与を受けた。

3. 結果

1) BAL サ症患者ではリンパ球比率が平均35.3%と増加しており、リンパ球性肺炎を示していた。リンパ球のCD4+/CD8+比は平均4.0で、ヘルパーT細胞優位であった。農夫肺患者はいずれも抗原から隔離された時期にBALを行ったが、リンパ球比率（平均64.8%）、CD4+/CD8+比（平均9.8）ともサ症例より高値であった。

2) CSF mRNA の検出

A. M-CSF RT-PCR産物のサザンブロットの結果、すべての被験者が目的の塩基配列に一致したサイズ(245bp)のバンドを示し、mRNAが発現されていることがわかった。バンドの濃さには幅があったが、疾患、BAL所見などによる特定の傾向は認めなかった。

B. GM-CSF サ症患者20名中15名がmRNA発現を示すバンド(268bp)を呈した。陽性コントロールとして、健康人の末梢血単核球を0.1%のphytohemagglutininと5ng/mlのphorbol myristate acetateで24時間刺激してからRNAを抽出し、これのRT-PCR産物を10倍に希釈したものを用いたが、このシグナルに比べても患者のシグナルは明らかに弱く、患者RNA中のGM-CSF mRNAは比較的少ないことが推察された。農夫肺患者、健康人では発現は見られなかった。

C. IL-3 陽性コントロール（GM-CSFの場合と同じ、但し希釈はせずに用いた）では予測されたサイズのバンドを呈したが、BAL細胞のRNAでは一例もバンドが認められなかった。

### 3) BAL細胞がGM-CSF mRNAを発現していたサ症症例の臨床的検討

BAL細胞でのGM-CSF発現の臨床的意義を明らかにするため、サ症患者でGM-CSF(+)の群と(-)の群を比較検討した。GM-CSF(-)群の5人はいずれも肺外病変がなく、臨床経過上、1年前と比較して改善していたが、(+)群では15人のうち11人に肺外病変があり、14人は臨床経過上不変または増悪と判断された。これらの臨床像の差異は統計学的に有意であった。(p=0.016及び0.0008、Fisherの直接確率法)。

さらに、サ症の活動性を評価する指標として従来用いられてきた血清ACE値およびBAL所見について検討した。血清ACE値は、GM-CSF(+)群が(-)群より有意に高値であった(21.4±2.1 vs. 12.5±2.0、p<0.05)。BAL所見を比較すると、(+)群は(-)群に比して有意にリンパ球比率およびリンパ球のCD4+/CD8+比が高かった(リンパ球比率 44.3±6.2% vs. 8.2±2.7%、CD4+/CD8+比 5.0±0.6 vs. 1.5±0.4、いずれもp<0.01)。

### 4. 考察

M-CSF mRNAがヒトのBAL細胞で発現されていることは既に報告されており、本研究では肉芽腫性肺炎患者で検討したが健常人と特に差は見いだせなかった。

ヒト肺におけるGM-CSF mRNA発現は従来知られていなかったが、本研究では高感度なRT-PCR法を用いて、サ症患者のBAL細胞における発現を検出できた。この方法でも健常者では発現を認めなかった点は従来の報告を裏付けていた。

GM-CSF mRNAがサ症患者のBAL細胞のみで発現されており、臨床的重症度とある程度の相関が得られたことは、サ症の病変形成機序の一部にGM-CSFが関与している可能性を示唆する。また、GM-CSF mRNAを発現しているサ症患者は血清ACE値やBAL液中のリンパ球比率、リンパ球のCD4+/CD8+比など従来用いられてきたサ症の活動性の指標もより高値であったこともこの可能性を支持している。

GM-CSFは単球/マクロファージ系細胞に対して増殖、分化、抗原提示、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>産生、サイトカイン分泌などを亢進させることが知られており、これらの作用を通してサ症の病変形成に関与する可能性がある。サ症患者の肺泡マクロファージは活性酸素、IL-1の産生や抗原提示能が亢進しているなど、GM-CSFの関与をうかがわせる知見も既に報告されている。

サ症と病理学的に類似した肺病変を形成する農夫肺症患者のBAL細胞ではGM-CSFの発現が認められなかった。サ症で活動性の指標とされているBAL液中のリンパ球比率、リンパ球のCD4+/CD8+比は今回対象とした患者ではむしろ農夫肺症でより高値であった。従ってサ症患者でのGM-CSF発現は単にリンパ球ないしCD4+Tリンパ球の数増加を反映しているのではなく、サ症における胞隔炎のひとつの特徴と考えられる。

GM-CSFを含めたサイトカインの疾患への関与については未知の点が多いが、生体内でのサイトカイン産生動態の研究によってサ症の病態の解明や合理的な治療法の選択に結び付くことが期待される。

### 5. まとめ

BAL細胞中のGM-CSF mRNA検出をRT-PCR法にて試みた。サ症患者20名中15名で発現を認めたが、農夫肺症患者および健常人では認めなかった。発現を認めたサ症患者はそうでないサ症患者に比べてより活動性の病変を有していた。これらの結果から、GM-CSFはサルコイド病変の形成または維持に重要な役割を果たしていると考えられた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 上 義 和

副 査 教 授 葛 巻 暹

副 査 教 授 大河原 章

目的：サルコイドーシス肺に、単球／マクロファージ系細胞が集積する機序をみること。

対象：サルコイドーシス（以下サ症）患者20名，農夫肺症患者5名，健常人5名。

方法：被験者の肺胞洗浄液（以下 BALF）中細胞から逆転写ポリメラーゼチェーンリアクションにより mRNA を増幅，最終産物の一部をアガロースゲルで電気泳動ナイロン膜にプロットした。それぞれの cDNA プローブでハイブリダイゼーションし，オートラジオグラフィを行った。

結果：サ症患者では BALF 中リンパ球比率が平均35.3%と増加しており，CD 4／CD 8 は平均4であった。農夫肺症ではリンパ球比率64.8%，CD 4／CD 8より高値であった。

サ症20名中15名が mRNA 発現を示すバンド（268bp）を呈したが，農夫肺症，健常人では発現はみられなかった。サ症のうち発現群は肺外病変があり，経過上不変または増悪と判断された。また，血清 ACE がより高く，CD 4／CD 8がより高いのが発現群であった。

以上の結果は，GM-CSF はサ症の肺病変の形成または維持に重要な働きをしていることを示している。

口頭発表に際し，葛巻教授から発現細胞の種類，Growth factor の測定，receptor 異常の有無につき，大河原教授から皮膚サルコイドーシスとの対比につき，長嶋教授から M-CSF，G-CSF の検討，他の肺疾患における検討につき，また皆川教授から細胞培養などの応用，IL-1 活性との相関につき質問があったが，申請者はほぼ妥当に答えた。

また，個別に葛巻，大河原，両教授から試問を受け，合格との御返事をいただいている。

以上，本研究はサルコイドーシスの肺肉芽腫形成に GM-CSF mRNA 発現が役割をもっていることを明らかにしたもので，博士に相当するものと認めた。