

学 位 論 文 題 名

Expression of RANTES by bronchoalveolar lavage cells  
in nonsmoking patients with interstitial lung diseases

(非喫煙間質性肺疾患患者の気管支肺胞洗浄細胞における RANTES の発現)

学位論文内容の要旨

1980年代後半より多数のサイトカインの精製と遺伝子のクローニングが進み、新しいファミリーとして一群のサイトカインが見出された。これらのサイトカインはケモカインと称され、低分子量で構造上の類似性を持ち、特定の炎症細胞に対する強い走化作用や活性化作用を有するのが特徴である。サルコイドーシス、膠原病肺、特発性間質性肺炎などの間質性肺疾患の原因は不明だが、最初に肺局所への炎症細胞の集積が起こり、炎症が成立した後、線維化の過程へ進展していくと考えられる。サルコイドーシスは CD4 陽性細胞の肺局所への集積が特徴とされるが、なぜ特定の炎症細胞が集積するのか、その機序は解明されていない。そこで我々は、この機序にケモカインが、中でも当初 CD4 陽性細胞に特徴的な走化作用が報告された RANTES が関連しているのではないかと推定し、非喫煙間質性肺疾患患者における RANTES の発現を、mRNA と蛋白量について検討した。

RANTES mRNA の測定には、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の総細胞と、末梢血から分離した単核細胞から総 RNA を抽出して検体とした。測定には、RANTES mRNA の内部標準として作成した人工的 RNA を用いた競合的 reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いた。この方法では、既知量の検体と十段階希釈した内部標準を同一チューブに入れて RT-PCR を行う。用いた内部標準は両端の配列が RANTES mRNA と同じで長さが短く作られている。逆転写の段階からその内部標準と検体を同一チューブ内で反応させ、PCR 時は RANTES mRNA と同じプライマーを用いて競合的に増幅させる。これによって、検体と内部標準の間の、PCR 時の増幅効率の差を極力少なくでき、より簡便で再現性のある mRNA の半定量が可能になると考えられる。得られた検体と内部標準の PCR 産物は、2%アガロースゲル上で電気泳動すると、その長さの違いから、エチジウムブロマイドで染色後、容易に2本のバンドとして識別できる。検体中の RANTES と同一輝度に見える内部標準の希釈乗数に10を加えた数を、その検体の RANTES の発現量とした。RANTES の蛋白量は、BALF と血清を検体として、ELISA 法で測定した。

対象は、サルコイドーシス患者20名(男性4名、女性16名)、膠原病肺患者10名(女性10名:慢性関節リウマチ3名、SLE3名、全身性硬化症1名、多発性筋炎1名、

シェーグレン症候群2名)、特発性間質性肺炎患者10名(男性3名、女性7名)と、対照群として健常人8名(男性4名、女性4名)であり、全例非喫煙者である。

BALF 所見では健常人に比較して、サルコイドーシス患者群では総細胞数、リンパ球比率、CD4 陽性細胞比率・絶対数、CD4/8 比が増加し、膠原病肺患者群では、総細胞数、リンパ球比率、好中球比率、CD4 陽性細胞絶対数、CD8 陽性細胞絶対数が増加していた。特発性間質性肺炎患者群では好酸球比率、好中球比率、CD4 陽性細胞絶対数、CD8 陽性細胞絶対数が増加していた。

BALF 総細胞中の RANTES mRNA の発現は、対照群に比較して患者3群で有意に増加していた。しかし、末梢血単核細胞では4群間で有意な差は認められなかった。RANTES mRNA と BALF 所見の相関は、サルコイドーシス患者群でリンパ球比率・リンパ球絶対数、CD4 陽性細胞絶対数と有意な正の相関が認められ、膠原病肺患者ではリンパ球比率と有意な正の相関を認めた。RANTES 蛋白量は、BALF 中で、健常人に比較して患者3群で有意に増加していたが、血清中では4群間で有意な差は認められなかった。

本研究で明らかになったことは、サルコイドーシス、膠原病肺、特発性間質性肺炎の患者群で、対照に比較して BALF 細胞の RANTES mRNA の発現と BALF の RANTES 蛋白量が増加していたことである。末梢血や血清で有意な差は認められず、BALF 細胞の RANTES mRNA の発現と BALF の RANTES 蛋白量の増加は、肺局所での発現亢進を示唆すると考える。サルコイドーシス患者群と膠原病肺患者群においては、BALF 所見のリンパ球増加と RANTES mRNA の発現は有意な正の相関を示しており、これまで報告のある MCP-1 と共に、RANTES がサルコイドーシスや膠原病肺でリンパ球の集積に関与している可能性が示された。また RANTES は、最近 *in vitro* で MIP-1 $\alpha$ 、MCP-1 や PF-4 より T 細胞の活性化に重要な役割を果たすという報告がなされた。RANTES は、*in vivo* でも炎症細胞の集積に関与すると共に、炎症局所での炎症細胞の活性化にも関与している可能性がある。今回の検討では、RANTES mRNA はサルコイドーシス患者では、BALF 所見の CD4 陽性細胞と有意な正の相関を示した。しかし、RANTES はのちに CD8 陽性細胞に対する走化作用が報告された。実際、今回の検討では、サルコイドーシス患者群で CD4 陽性細胞と CD8 陽性細胞の絶対数が増加しており、RANTES は、サルコイドーシスにおいて両サブセットの集積に関与しているかもしれない。

特発性間質性肺炎患者群では BALF 所見と RANTES mRNA の発現に相関は認められなかったが、好酸球比率と好中球比率が上昇していた。RANTES は好中球に対する作用は報告されておらず、特発性間質性肺炎では好酸球の集積に関与している可能性がある。しかし、RANTES のみで各々の疾患の肺局所での炎症細胞の構成が決定される訳ではない。さらに、種々のケモカインと BALF 所見の相関の検討や、*in vitro* での主要な走化因子の同定が必要である。今後、様々なケモカイン、サイトカインの知見が集積し、各疾患特有のサイトカインネットワークが明らかになり、間質性肺疾患の病態の解明が進むことが期待される。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 皆 川 知 紀  
副 査 教 授 松 田 英 彦  
副 査 教 授 川 上 義 和

学 位 論 文 題 名

## Expression of RANTES by bronchoalveolar lavage cells in nonsmoking patients with interstitial lung diseases

(非喫煙間質性肺疾患患者の気管支肺胞洗浄細胞における RANTES の発現)

1980年代後半より、ケモカインと称される、低分子量で構造上の類似性を持ち、特定の炎症細胞に対する強い走化作用や活性化作用を有する新しい一群のサイトカインが見出された。サルコイドーシス、膠原病肺、特発性間質性肺炎（以下 IIP）などの間質性肺疾患は、原因不明だが、最初に肺局所への炎症細胞の集積が起こり、炎症の成立後、線維化へ進展すると考えられる。そこで我々は、この機序にケモカインである RANTES が関連しているのではないかと推定し、非喫煙間質性肺疾患患者における RANTES の発現を、mRNA と蛋白量について検討した。

RANTES mRNA の測定は、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 細胞と、末梢血単核細胞から抽出した総 RNA を検体とし、RANTES mRNA の内部標準として作成した人工 RNA を用いた競合的 reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) 法で行なった。これにより、検体と内部標準の間の逆転写と PCR 増幅の効率差を極力少なくでき、より簡便で再現性のある mRNA の半定量が可能になる。RANTES 蛋白量は、BALF と血清を検体として、ELISA 法で測定した。

対象は、サルコイドーシス患者 20 名（男性 4 名、女性 16 名）、膠原病肺患者 10 名（女性 10 名：慢性関節リウマチ 3 名、SLE 3 名、全身性硬化症 1 名、多発性筋炎 1 名、シェーグレン症候群 2 名）、IIP 患者 10 名（男性 3 名、女性 7 名）と、健常人 8 名（男性 4 名、女性 4 名）であり、全例非喫煙者である。

BALF 所見では健常人に比較して、サルコイドーシス患者群で総細胞数、リンパ球比率、CD4 陽性細胞比率と細胞数、CD8 陽性細胞数、CD4/8 比が増加し、膠原病肺患者群で、総細胞数、リンパ球比率、好中球比率、CD4 陽性細胞数、CD8 陽性細胞数が増加していた。IIP 患者群では好酸球比率、好中球比率、CD4 陽性細胞数、CD8 陽性細胞数が増加していた。

BALF 総細胞の RANTES mRNA の発現は、健常人に比較して患者 3 群で有意に増加し、

末梢血単核細胞では4群間で有意差はなかった。また、サルコイドーシス、膠原病肺患者群で、RANTES mRNA はリンパ球比率、リンパ球数、CD4 陽性細胞数と有意な正の相関を認めた。RANTES 蛋白量は、BALF で、健常人に比較して患者3群で有意に増加していたが、血清中では4群間で有意差はなかった。BALF 細胞の RANTES mRNA の発現と BALF の RANTES 蛋白量の増加は、肺局所での RANTES の発現亢進を示唆すると考える。

サルコイドーシス患者群と膠原病肺患者群で、BALF 所見のリンパ球増加と RANTES mRNA の発現は有意な正相関を示した。よって RANTES が、サルコイドーシスや膠原病肺でリンパ球集積に関与している可能性が示された。今回の検討で RANTES mRNA は、サルコイドーシス患者と膠原病肺患者で、BALF 所見の CD4 陽性細胞数と有意な正相関を示した。しかし両群では CD4 陽性細胞数と CD8 陽性細胞数が増加しており、RANTES は、両疾患において両サブセットの集積に関与しているかもしれない。IIP 患者群では、BALF 所見と RANTES mRNA の発現に相関はなかったが、好酸球比率が上昇していた。同疾患では RANTES は好酸球の集積に関与している可能性がある。

しかし、RANTES のみで各疾患の肺局所における炎症細胞の構成は決定されない。今後、様々なケモカイン、サイトカインの知見が集積し、各疾患特有のサイトカインネットワークが明らかになり、間質性肺疾患の病態の解明が進むことが期待される。

審査に当り、副査松田教授より、1、間質性肺疾患の定義について、2、サルコイドーシスのステージ分類について、3、サルコイドーシスにおいて、ステージで BALF 所見に差はないのかについて、4、健常人群と疾患群で、性差、年齢に差が認められるがこれが結果に影響を及ぼす可能性について、5、RANTES mRNA の半定量化の意義について、6、免疫染色はどのような対象を用いておこなったのか、について質問があった。また、副査川上教授より、末梢血単核細胞の RANTES mRNA の発現や、血清中 RANTES 蛋白量で有意差がなく、肺局所でこれらに差があったことの意義について質問があった。さらに主査皆川教授より、1、対象を非喫煙者に限った理由について、2、細菌性肺炎など原因が明確な疾患での RANTES の発現について、3、サルコイドーシスは全身性疾患であるが、血清中 RANTES 蛋白量に差を認めなかったことはどのように説明できるか、4、RANTES と疾患の活動性、予後は関連があるのか、5、より疾患特異性の高いサイトカインも合わせて検討するとさらに有意義である、6、今後、ケモカイン受容体の動向についての検討も重要である、との質問、コメントがあった。申請者はこれらの質問に対して適切な回答をおこなった。

審査員一同は、本研究を、間質性肺疾患における RANTES 発現の意義を検討した研究として高く評価し、申請者を博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。