

還元性二糖類 trehalose^{16,17)} を含む細胞外液型イオン組成の臓器保存液である。

肺機能評価：切断した左房および左室から滴下する保存肺静脈流出血と、deoxygenator lung 肺静脈流出血が血液ガス分析用に採取された。血液ガス分析は再灌流直前と開始後 10 分毎に終了時まで行われた。これらのデータを用いて肺シャント率 (Q_s/Q_t) が以下の式を用いて計算された。 $Q_s/Q_t (\%) = (C_c - C_a) / (C_c - C_v) \times 100$; ここで C_c , C_a , C_v は、それぞれ肺毛細血管、肺動脈、肺静脈内の血液の酸素含有量である。最高気道内圧 (PIP) と平均肺動脈圧 (PAP) は連続的に観測され、10 分毎に記録された。再灌流終了直後に左肺の下 1/3 が採取され、組織湿重量が測定された。さらに 55°C, 72 時間の乾燥の後、組織乾燥重量が測定され、肺湿乾重量比 (W/D ratio) が算出された。実験系の安定性を評価するため deoxygenator lung 左肺の W/D ratio も同様にして算出された。

肺組織中 cAMP レベル：前述の如く、フラッシュ直後に右肺上葉と中葉を、再灌流直前に右肺下葉を、それぞれ肺組織中の cAMP 測定用に採取した。組織は液体窒素で直ちに凍結され、測定まで -80°C で保存された。検体は氷冷した 6% トリクロロ酢酸 (TCA) 2 ml を用いてホモジナイズされた。遠心分離後、エーテルを用いて上清から TCA が除去され、検体がイムノアッセイに供された (サイクリック AMP キット, ヤマサ, 千葉, 日本)。タンパク量は Lowry らの方法¹⁸⁾ に従って定量された。

統計学的検討：本文および図表中の全ての数値は Mean ± Standard Deviation (SD) で表記された。有意差の検定は Analysis of Variance, Scheffe's multiple comparison test を用いて行われ、危険率 $p < 0.05$ をもって有意とした。

動物の取り扱い：全ての動物は National Society for Medical Research による "Principles of Laboratory Animal Care" と National Academy of Science による "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH Publication No.86-23, Revised 1985" に従って、人道的に扱われた。

結 果

灌流血液と deoxygenator lung についてのデータ：回路を満たした血液の採取時のヘモグロビン値は 3 群間に差を認めなかった。また、再灌流前および再灌流中の deoxygenator lung 肺静脈流出血の血液ガス分析のデータも 3 群間に差を認めなかった。さらに再灌流終了時の deoxygenator lung の W/D ratio は Fresh 群 : 5.17 ± 0.16 , Control 群 : 5.03 ± 0.25 , Db-cAMP 群 : 5.22 ± 0.3

2 と傷害を認めず、実験系の安定性が確認された。

遂行可能実験数：Fresh 群および Db-cAMP 群では全ての再灌流を 60 分間行うことが可能であった。Control 群では 5 つの実験を 60 分間遂行し得たが、1 つの実験は著しい肺水腫のため再灌流開始後 20 分で中止された。

肺シャント率：Db-cAMP 群の肺シャント率は非常に低く、Fresh 群のそれと同等以下であった。一方、Control 群の肺シャント率は、実験を通じて Db-cAMP 群、Fresh 群のそれに比べ有意 ($p < 0.01$) に高値であった。(図 2)

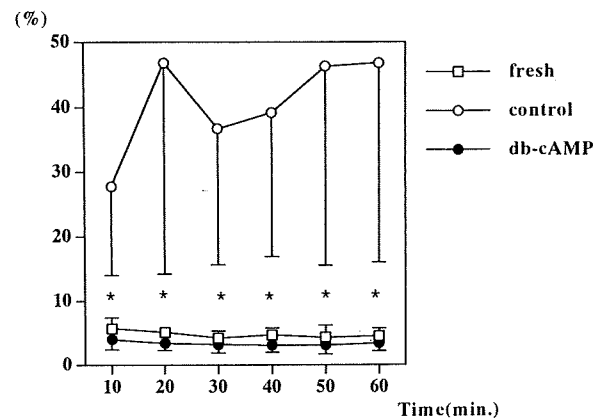


図 2 肺シャント率

* $p < 0.01$: Db-cAMP, Fresh versus Control.

最高気道内圧 (PIP) : Db-cAMP 群の PIP は実験を通じて低値で、Fresh 群のそれと同等であった。Control 群の PIP は、Db-cAMP 群、Fresh 群に比べ有意に高値であった (10 分および 20 分 : $p < 0.01$, 30 分から 60 分 : $p < 0.05$) (図 3)。

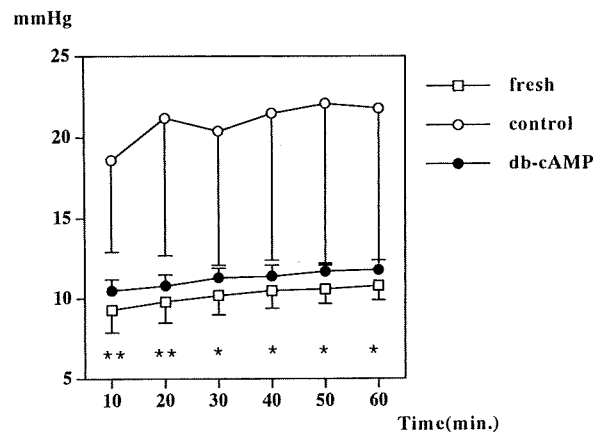


図 3 最高気道内圧

** $p < 0.01$: Db-cAMP, Fresh versus Control.

* $p < 0.05$: Db-cAMP, Fresh versus Control.

平均肺動脈圧 (PAP) : 再灌流開始後 10 分の PAP

は Control 群 : 14.0 ± 2.2 mmHg, Db-cAMP 群 : 10.8 ± 1.7 mmHg であり, 両群間に有意差を認めたが ($p < 0.05$), その後, 実験終了時まで PAP は Control 群において高い傾向にあったが, 3 群間に有意差を認めなかった.

W/D ratio : 再灌流終了時の W/D ratio は Fresh 群 : 5.45 ± 0.23 , Control 群 : 14.20 ± 3.43 , Db-cAMP 群 : 5.99 ± 1.50 であり, Db-cAMP 群, Fresh 群で Control 群に比べ有意に低値であった ($p < 0.01$).

肺組織中 cAMP レベル : Control 群における肺組織中の cAMP はフラッシュ直後 : 15.0 ± 6.8 pmol/mg · protein, 再灌流直前 : 12.3 ± 4.4 pmol/mg · protein であり, 保存の前後で有意な変化を示さなかった.

考案・結論

本実験で, われわれは細胞内 cAMP レベルを上昇させる db-cAMP の肺冷保存・虚血再灌流傷害に対する有効性を検討した. db-cAMP は細胞膜透過性の cAMP analogue であり, 細胞内に入った後に deacylation を受け cAMP に変化する^{6,7)}. また, db-cAMP およびその代謝産物である N6-monobutyl cAMP は, cAMP phosphodiesterase を抑制することによっても細胞内の cAMP レベルを上昇させる¹⁹⁾. cAMP が細胞内の second messenger として血管内皮保護作用をもたらすため, db-cAMP は, endotoxin⁸⁾, lipid hydroperoxide⁹⁾, oxidant gas¹⁰⁾, 空気塞栓¹¹⁾, 肺の温虚血再灌流傷害^{12,13)}, 心臓¹⁴⁾ や肝臓¹⁵⁾ の冷保存において有効性が報告されている. しかし肺の冷保存・虚血再灌流傷害に対する db-cAMP の効果については, これまで詳細な検討がなされていない.

今回のわれわれの検討において, db-cAMP を添加された灌流液を用いてフラッシュした肺は, 15 時間冷保存後の再灌流時において fresh 肺と同等の優れた肺機能を示した. また肺の色調や換気の均一性などを肉眼的に観察した所見では, Db-cAMP 群では Control 群と比較し再灌流開始後 5 分以内の極めて早期に既に良好な肺機能を示した. これらのことから, 肺の冷保存・虚血再灌流における db-cAMP の保護効果の少なくとも一部は, 肺保存中に起こる血管内皮傷害の抑制によるものと考えられる.

cAMP は血管透過性の抑制^{8-13,20)}, 血管平滑筋の弛緩^{9,13)}, 好中球の血管壁への付着を抑制¹⁴⁾ の 3 つの作用により血管内皮保護効果をもたらすとされる. しかし本実験系では血管透過性や平滑筋細胞の収縮の程度を直接測定することはできず, db-cAMP による血管内皮保護効果の詳細な機序は今後の検討が必要である.

血管内皮細胞²⁰⁾ や平滑筋細胞¹⁴⁾ が虚血にさらされると

adenylate cyclase 活性の低下²⁰⁾ や, phosphodiesterase 活性の亢進¹⁴⁾ により細胞内の cAMP レベルが低下することが知られている. 一方, 本実験では Control 群において冷保存の前後で肺組織中の cAMP 量は低下傾向にあるものの有意な変化を示さなかった (Db-cAMP 群では免疫アッセイの交差反応性の問題から, 肺組織中の cAMP の定量は行えなかった). 肺組織はさまざまな細胞から構成されており, 組織中の cAMP レベルが血管内皮細胞や平滑筋細胞中の cAMP 量を反映しない可能性は否定できない. しかし冷虚血状態では代謝の低下から cAMP レベルが変化しないことも考えられる. いずれにせよ db-cAMP が細胞内の cAMP レベルを上昇させることは広く認められた事実であり, 今回のモデルでも肺血管内皮細胞や平滑筋細胞内の cAMP レベルを上昇させることにより db-cAMP が保護作用をもたらしたと思われる.

結論として, 細胞内のセカンドメッセンジャーである cAMP レベルを上昇させる db-cAMP は冷保存・虚血再灌流に伴う肺傷害を軽減した. この db-cAMP の保護効果を詳細に解明するためには今後更なる検討を要する.

本論文の要旨は J Thorac Cardiovasc Surg, 114: 635-42, 1997 に報告した.

参考文献

- 1) Cooper J. D.: Current status of lung transplantation. Transplant Proc. 23:2107-2114, 1991.
- 2) Bando T., S. Kosaka, C. J. Liu, T. Hirai, T. Hirata, H. Yokomise, K. Yagi, K. Inui, S. Hitomi, H. Wada.: Effects of newly developed solutions containing trehalose on twenty-hour canine lung preservation. J Thorac Cardiovasc Surg. 108:92-98, 1994.
- 3) Liu C. J., T. Bando, T. Hirai, T. Hirata, K. Yagi, H. Yokomise, K. Inui, S. Hitomi, H. Wada.: Improved 20-hour canine lung preservation with a new solution - ET-Kyoto solution. Eur J Cardiothorac Surg. 9:548-552, 1995.
- 4) Wada H., T. Fukuse, T. Nakamura, C. J. Liu, T. Bando, S. Kosaka, T. Ariyasu, S. Hitomi.: ET-Kyoto solution for 48-hour canine lung preservation. Ann Thorac Surg. 61:963-968, 1996.
- 5) Fukuse T., T. Hirata, M. Ueda, S. Hitomi, H. Wada.: Effects of EC, UW, and new ET-Kyoto solutions in an ex vivo rat lung preservation model. Transplantation. 62:1212-7, 1996.
- 6) Falbriad J. G., T. Posternak, E. W. Sutherland.: Preparation of derivatives of adenosine 3',5'-

- phosphate. *Biochim Biophys Acta.* 148:99-105, 1967.
- 7) Kaukel E., H. Hilz.: Permeation of dibutyl cAMP into hela cells and its conversion to monobutyl cAMP. *Biochem Biophys Res Commun.* 46:1011-1018, 1972.
- 8) Chang S., A. Sakai, N. F. Voelkel.: Dibutyl cAMP blocks endotoxin-induced lung injury in rats. *Am Rev Respir Dis.* 140:1814-1817, 1989.
- 9) Farrukh I. S., G. H. Gurtner, J. R. Michael.: Pharmacological modification of pulmonary vascular injury: possible role of cAMP. *J Appl Physiol.* 62:47-54, 1987.
- 10) Kennedy T. P., J. R. Michael, J. R. Hoidal, D. Hasty, A. M. Sciuto, C. Hopkins, R. Lazar, G. K. Bysani, E. Tolley, G. H. Gurtner.: Dibutyl cAMP, aminophylline, and β -adrenergic agonists protect against pulmonary edema caused by phosgene. *J Appl Physiol.* 67:2542-2552, 1989.
- 11) Kobayashi H., T. Kobayashi, M. Fukushima. : Effects of dibutyl cAMP on pulmonary air embolism-induced lung injury in awake sheep. *J Appl Physiol.* 63:2201-2207, 1987.
- 12) Seibert A. F., W. J. Thompson, A. Taylor, W. H. Wilborn, J. Barnard, J. Haynes.: Reversal of increased microvascular permeability associated with ischemia-reperfusion: role of cAMP. *J Appl Physiol.* 72:389-395, 1992.
- 13) Adkins W. K., J. W. Barnard, S. May, A. F. Seibert, J. Haynes, A. E. Taylor.: Compounds that increase cAMP prevent ischemia-reperfusion pulmonary capillary injury. *J Appl Physiol.* 72:492-497, 1992.
- 14) Pinsky D., M. Oz, H. Liao, S. Morris, J. Brett, R. Sciacca, M. Karakurum, M. Van Lookeren Campagne, J. Platt, R. Nowygrod.: Restoration of the cAMP second messenger pathway enhances cardiac preservation for transplantation in a heterotopic rat model. *J Clin Invest.* 92:2994-3002, 1993.
- 15) Ness K. V., D. Podkameni, M. Schwartz, P. Boros, C. Miller.: Dibutyl cAMP reduces nonparenchymal cell damage during cold preservation of rat livers. *J Surg Res.* 58:728-731, 1995.
- 16) Crowe J. H., L. M. Crowe, D. Chapman.: Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: The role of trehalose. *Science.* 223:701-703, 1984.
- 17) Wiemken A.: Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie van Leeuwenhoek.* 58:209-217, 1990.
- 18) Lowry O., N. Rosebrough, A. Farr, R. Randall.: Protein measurement with the Folin reagent. *J Biol Chem.* 193:265-275, 1951.
- 19) Hsie A.W., K. Kawashima, J. P. O'Neill, C. H. Schröder.: Possible role of adenosine cyclic 3',5'-monophosphate phosphodiesterase in the morphological transformation of Chinese hamster ovary cells mediated by N6, O2'-dibutyl adenosine cyclic 3',5'-monophosphate. *J Biol Chem.* 250:984-989, 1975.
- 20) S. Ogawa, S. Koga, K. Kuwabara, J. Brett, B. Morrow, S. A. Morris, J. P. Bilezikian, S. C. Silverstein, D. Stern.: Hypoxia-induced increased permeability of endothelial monolayers occurs through lowering of cellular cAMP levels. *Am J Physiol.* 262:C546-554, 1992.

ウイルス性肺炎モデルにおけるパーオキシナイトライトによる 急性肺傷害と遺伝子損傷メカニズム

赤池 孝章* 宮本 洋一 澤 智裕 前田 浩

ウイルス性肺炎モデルを用いて、パーオキシナイトライトによる蛋白（チロシン）のニトロ化反応を介した組織損傷機構と遺伝子変異促進作用について解析した。その結果、マウスインフルエンザウイルス肺炎モデルの肺組織中に、ニトロチロシンが検出され、そのレベルはNO合成酵素（NOS）阻害剤やパーオキシナイトライト消去剤の投与により有意に抑制された。また、NOS阻害剤、パーオキシナイトライト消去剤により肺の病理組織学的変化が軽減し、マウスの生存率も改善していた。さらに、誘導型NOS遺伝子欠損マウスのウイルス肺炎モデルにおいては、ウイルスの遺伝子変異率が有意に低いことがわかった。このことは、パーオキシナイトライトが、ニトロ化反応を介して、細胞・組織障害作用を発揮するだけでなく、内因性変異原性物質として作用することを示唆している。今後、パーオキシナイトライトを標的にした各種難治性疾患の治療法の開発が期待される。

Pathogenesis of Virus-induced Pneumonia Mediated through Peroxynitrite Formation: Lung Injury via Extensive Tissue Nitration and Acceleration of Viral Mutation

Takaaki Akaike, Yoichi Miyamoto, Tomihiro Sawa and Hiroshi Maeda

Department of Microbiology, Kumamoto University School of Medicine

Our previous study indicates that peroxynitrite (ONOO^-) a coupling product of nitric oxide (NO) and superoxide is a major pathogenic principle in influenza virus-induced pneumonia in mice. Based on the potent chemical reactivity and diverse biological actions of ONOO^- , involvement of ONOO^- in various disease pathogenesis has been also suggested recently. Here we found that ONOO^- is involved in the lung injury possibly through extensive tissue nitration, particularly nitration of tyrosine residues of various proteins. It is of most interest that treatment of influenza virus-infected animals with ebselen, which shows a potent ONOO^- scavenging action, led to significant amelioration of the lethality of the infection as well as improvement of pathological change of the lung. More important, tyrosine nitration in the lung was greatly attenuated by the ebselen treatment; the reduced level of nitrotyrosine in the lung was verified by an immunohistochemical analysis with use of anti-nitrotyrosine antibody, and by quantitative measurement of nitrotyrosine by using HPLC coupled with electrochemical analysis as well. Therefore, quantification of the nitrotyrosine in the tissues may be useful for estimation of the lung tissue damage induced by oxidative stress. Meanwhile, another important aspect of ONOO^- is its potent mutagenic activity. In this context, the effect of ONOO^- on the viral RNA genome was further investigated. Specifically, the rate of mutation of the green fluorescence protein-constructed Sendai virus (GFP/SeV) with or without peroxynitrite treatment was examined as quantifying the incidence of loss of fluorescence by GFP expressed in the virus-infected cell *in vitro*. Moreover, the mutation of GFP/SeV was also tested *in vivo* in iNOS ($-/-$) mice infected with GFP/SeV. The results obtained *in vitro* and *in vivo* studies showed that the mutation rate of GFP genome in GFP/SeV was apparently accelerated by NO or its reactive oxidized derivative ONOO^- . It is thus suggested that oxidative stress mediated by ONOO^- may cause enhanced mutation frequency of the virus, which will confer the virus genetic diversity and molecular evolution.

はじめに

我々はこれまでの研究により、マウスインフルエンザウイルス肺炎モデルにおいて宿主の炎症反応に伴って過剰に産生されるスーパーオキシド (O_2^-) と一酸化窒素 (NO) のカップリング産物であるパーオキシナイトライト ($ONOO^-$) が肺組織損傷の主要なメディエーターとして機能していることを報告してきた¹⁻⁸⁾。パーオキシナイトライトは、化学的反応性に富み、生体内において細胞障害、アポトーシスの誘導、変異原性の発現など多彩な病態生理活性を発現することが報告されている。

そこで今回は、インフルエンザウイルスによるマウスの劇症肺炎モデルにおけるパーオキシナイトライトによる生体内ニトロ化反応とアポトーシスの誘導を介した肺組織傷害メカニズムについて検討した。あわせて、センダイウイルスによる *in vivo* の感染系 (マウスのウイルス性肺炎モデル) におけるパーオキシナイトライトによるウイルスゲノムの変異促進作用について解析した。

対象および方法

1. インフルエンザウイルス肺炎モデルにおけるパーオキシナイトライトによる肺組織傷害メカニズムの解析
インフルエンザウイルス肺炎モデルにおける炎症局所のニトロ化反応を定量的に評価するため、HPLC-電気化学 (EC) 検出法を用いて、肺内のニトロチロシン生成量を測定した。あわせて、以前本モデルに治療効果を示した NOS 阻害剤やパーオキシナイトライト消去剤のニトロチロシン生成、および、肺組織のアポトーシス誘導に与える効果についても検討した。

2. パーオキシナイトライトによるウイルス遺伝子変異促進作用の解析

パーオキシナイトライトの *in vivo* におけるウイルス遺伝子変異を検証するため、iNOS ノックアウトマウス (C57BL/6-iNOS (-/-)) および C57BL/6-iNOS (+/+) マウスを用いて、green fluorescent protein (GFP) を組み込んだセンダイウイルス (GFP/SeV) 感染系を作製し、それぞれのマウス肺内で増殖したウイルスの GFP 遺伝子変異率を比較検討した。すなわち、ウイルス感染肺よりウイルスを CV-1 細胞を用いたブランク形成法により分離し、ウイルスゲノム中の GFP 遺伝子の変異を GFP/SeV 感染細胞に発現される GFP の蛍光の消失により判定した。

熊本大学医学部微生物学教室

* びまん性肺疾患分科会 研究協力者

結果および考察

1. パーオキシナイトライトによる肺傷害メカニズム

肺組織内の蛋白を抽出し、酸加水分解後、HPLC-EC 検出法によりニトロチロシン生成を同定した。その結果、インフルエンザウイルス感染後、7日後の肺組織の蛋白中に、ニトロチロシンのピークが認められた (図1)。さらにこれを、定量化して、ウイルス感染マウスの肺洗浄液および正常のサンプルと比較したところ、ウイルス感染のサンプル中にのみ有意なニトロチロシン生成が認められた (表1)。さらに、このニトロチロシン生成は、パーオキシナイトライトに対し強い消去活性をもっているエブセレンを投与することにより、強く抑制されることがわかった。

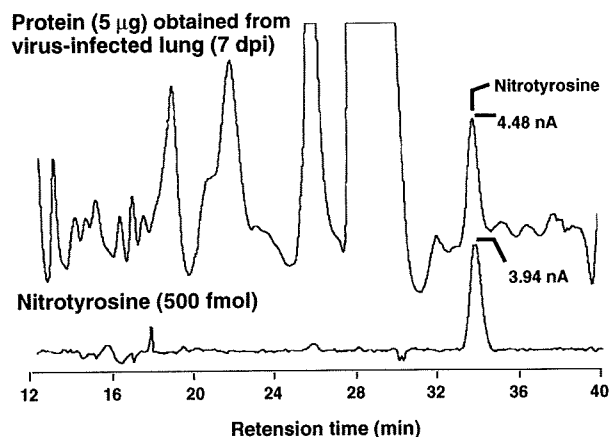


図1 インフルエンザ肺炎モデルにおけるニトロチロシン生成のHPLC-EC検出法による同定

表1 ウイルス感染肺内のニトロチロシン生成量

(mol/100 mol tyrosine)	
Virus infection (7 dpi)	
lung	0.029
BALF	0.188
Normal lung tissue	<0.003

またあわせて、ウイルス感染肺におけるアポトーシスの誘導を tunnel 法により *in situ* で検出し、アポトーシスの発現に対するエブセレンの作用について検討したところ、アポトーシスの誘導が、エブセレン投与により強く抑制されていた。同時に、炎症細胞の浸潤に伴った既存肺胞構築の変化などの病理組織学的変化は、エブセレン投与により著明に改善しており、マウスの生存率も有意に改善していた。

以上の知見は、インフルエンザウイルスによる劇症肺炎モデルの肺組織損傷に、パーオキシナイトライトが深く関わっていること、さらに、組織中のニトロチロシン

レベルが細胞・組織障害の良い指標となることを示唆している。

2. ウイルス遺伝子変異

昨年までの研究成果として GFP/SeV をパーオキシナイトライトにより処理することにより、GFP/SeV の遺伝子の変異率が経時的に上昇することがわかったが、今回さらに、この様なウイルス遺伝子の変異が、*in vivo* の感染系で起こるかどうかが検討した。この為、GFP/SeV を C57BL/6 (B6) マウスおよび B6 iNOS ノックアウトマウスに感染させ、感染後 4, 6, 7 日目の肺組織中のウイルスを分離し、GFP の変異率を測定した。その結果、ウイルスの肺内増殖は両群で有意な差がなかったが、ウイルスの変異率は、iNOS を発現する B6 wild マウスに有意に高いことがわかった (図 2)。また、電子スピン共鳴法により、マウス肺内における NO 生成を直接解析したところ、B6 wild マウスでは過剰な NO 生成が認められたが、iNOS ノックアウトマウスでは NO の生成はほとんど確認できなかった (図 3)。

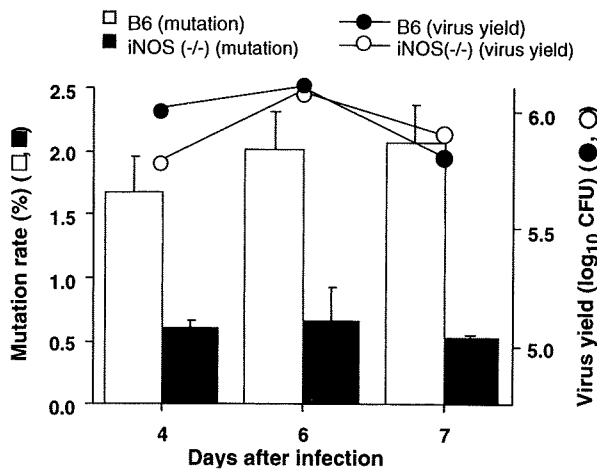


図 2 GFP/SeV 肺炎モデル (B6 および iNOS ノックアウトマウス) における GFP/SeV の肺内増殖と GFP 遺伝子変異率。

以上の結果より、ウイルス感染において NO や活性酸素、さらにはパーオキシナイトライトの生成を介し、宿主よりウイルスに加えられる酸化ストレスが、ウイルスの遺伝子変異を促進させ、さらにはウイルスの分子進化をもたらすことが示唆された。この様な変異は、酸化ストレスに対する病原体の生存戦略であると解釈することも可能であり、一方で感染・炎症における酸化ストレスは、生体の遺伝子に対しても同様に変異原性を発揮することも予想される。今後さらに、宿主と病原体の両側面から酸化ストレスによる遺伝子変異メカニズム解明が望まれる。

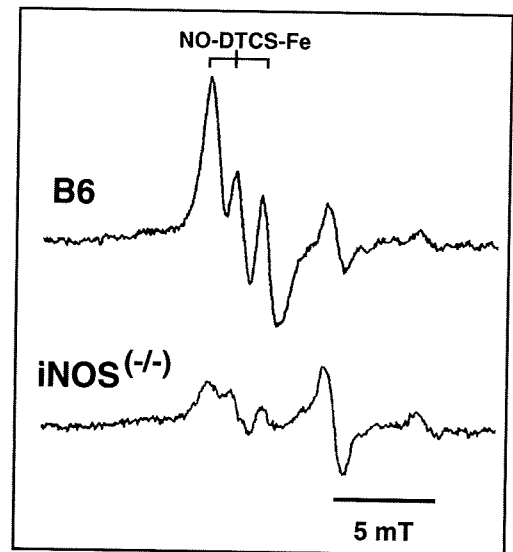


図 3 GFP/SeV 感染 B6 マウスおよび B6 iNOS ノックアウトの肺内 (感染後 7 日目) における NO 生成の電子スピン共鳴法による同定。DTCS-Fe を NO 捕捉剤として用いた。

謝 辞

本研究の一部は、熊本大学医学部・第一内科学、岡本竜哉博士、菅 守隆助教授、安藤正幸教授、および東京大学医科学研究所、ウイルス感染研究部、加藤 篤博士、永井 美之教授との共同研究により行った。

参考文献

- 1) Akaike T, Noguchi Y, Ijiri S *et al.* : Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: Involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:2448-2453, 1996
- 2) Akaike T, Suga M, Maeda H: Free radicals in viral pathogenesis: Molecular mechanisms involving superoxide and NO. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 217:64-73, 1998
- 3) 赤池孝章: ウイルス感染病態と NO. *ウイルス* 47, 165-176, 1997
- 4) Maeda H, Akaike T, Wu J *et al.* : Bradykinin and nitric oxide in infectious disease and cancer. *Immunopharmacology* 33:222-230, 1996
- 5) Sato K, Suga M, Akaike T *et al.* : Therapeutic effect of erythromycin on influenza virus-induced lung injury in mice. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 157:853-857, 1998
- 6) Maeda H, Akaike T: Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry (Moscow)* 63:854-865, 1998

7) Akaike T, Maeda H: Nitric oxide in influenza pathogenesis. Fang, FC (ed): Nitric Oxide and Infection, Plenum Publishing Co., New York, in press, 1999

8) 赤池孝章: 肺における活性酸素とスカベンジャー. 工藤翔二, 土屋了介, 金沢 実, 大田 健 (編) : Annual Review 呼吸器 1998. 中外医学社, 東京, pp 34-46, 1998

間質性肺炎の病態におけるマトリックスメタロプロテアーゼと そのインヒビターの役割

福田 悠

間質性肺炎は、肺胞間質を主たる炎症の場し、線維化は肺胞腔内に形成される。その過程は、肺胞上皮・基底膜の傷害、間質細胞の肺胞腔内侵入、腔内での細胞外基質の産生・沈着であり、matrix metalloproteinase (MMP) とそのインヒビター (TIMP) の関与が示唆される。予後不良な特発性間質性肺炎 (IPF) と、予後良好な特発性器質化肺炎 (BOOP) を対比して検討した。BOOP では、ポリープ状の腔内線維化で、肺胞上皮の傷害が軽度で再生が良好であり、線維化巣に線維芽細胞、毛細血管の侵入があり、MMP が優位であった。IPF では、壁在型の腔内線維化で、肺胞上皮の剥離傾向が強く、線維化巣には筋線維芽細胞がみられ、毛細血管の侵入はなく、TIMP が優位であった。間質性肺炎における MMP/TIMP の重要性が明らかにされたが、さらに、発現機序の解明により、不可逆的に進行する IPF の病態が明らかになることが期待される。

Role of matrix metalloproteinases (MMP) and tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in pathophysiology of interstitial pneumonia

Yuh Fukuda

Department of Pathology, Nippon Medical School

In interstitial lung diseases, deposition of extracellular matrix (ECM) in alveoli and degradation of ECM lead to pulmonary structural remodeling. The changes in ECM and the localization of matrix metalloproteinases (MMPs) and a tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP) in the lung tissues of patients with bronchiolitis obliterans organizing pneumonia (BOOP) and idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) were investigated. Immunohistochemical analysis for the detection of fibronectin, collagen-I, -III, -IV, α smooth muscle actin, MMP-1 (interstitial collagenase), MMP-2 (gelatinaseA), MMP-9 (gelatinase B) and TIMP-2, and *in situ* hybridization for the detection of MMP-9 mRNA were performed. The gelatinolytic activities of the homogenates were also determined using gelatin zymography. Fibronectin and collagen-I, -III and -IV were detected in the intraalveolar fibrosis in addition to the interstitium of these diseases. MMP-1, MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 were detected in the regenerated epithelial cells covering intraalveolar fibrosis. Myofibroblasts in intraalveolar fibrosis in BOOP showed predominant reaction for MMPs, and they ultrastructurally appeared to be phagocytosing collagen fibrils, and those of IPF showed predominant reaction for TIMP-2. New vascularization in intraalveolar fibrosis was exclusively observed in cases of BOOP, and the endothelial cells were positive for MMP-2. Gelatin zymography revealed that the active/latent forms of MMP-2 ratio in BOOP is significantly larger than that in the control lungs. Predominant MMPs in BOOP may constitute the mechanism of reversibility of fibrotic changes in this disease. TIMP-2 in myofibroblasts in IPF may contribute to the stable ECM deposition and the irreversible pulmonary structural remodeling.¹⁰⁾

はじめに

間質性肺炎は、肺胞間質を炎症の場とし、種々の程度の線維化をきたす疾患群である。病理形態学的に、特発性であり、かつ線維化が重要な間質性肺炎は、1) 通常型 (UIP)、2) 急性型・びまん性肺胞傷害 (AIP・DAD)、3) 器質化肺炎型 (BOOP)、4) 非特異型 (NSIP) に分類可能である。これら間質性肺炎の線維化は、以前は間質の線維化と理解されてきたが、最近の研究から線維化の形成部位はおもに肺胞腔内であることが明らかにされている。¹⁻⁵⁾

肺胞腔内線維化の形成過程は、以下の様と考えられている。⁵⁾ 1) 肺胞の炎症、傷害にともない肺胞上皮細胞壊死、肺胞上皮基底膜の断裂がおこる。2) 基底膜の断裂部位から肺胞間質細胞が肺胞腔内に侵入・増生し、細胞外基質を産生する。3) 局所に残存した上皮細胞は肺胞腔内線維化を被覆する。ただし、初期には、気道由来の上皮細胞が、後期には肺胞上皮が再生の主体となる。4) 肺胞腔内線維化に埋没した上皮基底膜は消失し、線維化、改築が完成する。

一方、肺胞腔内線維化には、以下の3型があることが知られている。¹⁾ 1) ポリープ型：肺胞の一部のみをしめるポリープ状の線維化、2) 壁在型：肺胞の一部のみをしめ、肺胞壁に癒合する線維化、3) 閉塞型：肺胞腔を埋めつくす線維化である。UIPである特発性肺線維症 (IPF) では、壁在型、閉塞型が主体であり、肺胞壁は癒合し、高度に改築 (remodeling) した蜂巢肺を形成する。また、予後の良い間質性肺炎であるBOOPでは、ポリープ型が主体で肺胞壁を癒合せないため、肺胞構造は改築されず治癒することが知られている。^{1, 4, 5)}

Matrix metalloproteinases (MMPs)、およびそのインヒビターである tissue inhibitor of MP (TIMP) は、細胞外基質の代謝・改築、細胞の移動に重要な働きをすることが知られており、間質性肺炎でもその関与が示唆されている。⁶⁻¹⁰⁾ ここでは、間質性肺炎のなかで、肺胞構造が改築されずに治癒する予後の良いBOOPと、不可逆的な改築・線維化を示すIPFを対比して、細胞外基質の変化、肺胞腔内線維化を構成する各種細胞でのMMPおよびTIMPの分布、発現について検討した結果を示す。¹⁰⁾

対象と方法

対象はBOOP、IPFで、BOOPは、開胸肺生検材料を用いた。IPFは、開胸肺生検・肺癌合併IPFの切除材料を用いた。コントロールとして、肺癌切除材料の正常部

肺を用いた。光顕的検索は、ホルマリン固定、パラフィン包埋切片のヘマトキシリンエオジン染色、エラスチカマッソン染色、アルシアン青PAS染色にて観察した。光顕的酵素抗体法は、抗フィブロネクチン抗体、抗I、III、IV型コラーゲン抗体、抗 α 平滑筋アクチン抗体、抗MMP-1、MMP-2、MMP-9抗体、抗TIMP-2抗体を用い、ABC法にて染色、観察した。In situ hybridizationは、パラホルム固定凍結標本で、MMP-9のRNA probe (東京大学医科学研究所、清木先生よりDNA probeの供与をうけた。) により行った。約200塩基対のantisenseおよびsense mRNA probe (コントロール) をジゴキシゲニンにてラベルし反応させた。その後免疫組織学的に発色させ観察した。電顕的検索は、グルタル・オスミウム固定、エポン包埋材料で超薄切片をタンニン酸二重染色にて観察した。電顕的酵素抗体法は、IPF症例のパラホルム固定凍結材料を用いた。抗TIMP-2抗体によりpre-embedding法で行った。

ゲラチンゼイモグラフィは、未固定凍結材料のSDSホモジェネートを用いた。2 mg/mlのゲラチンを含んだゲルに泳動後、反応させ、クマシーブルーで染色した。それぞれのバンドについて、NIHイメージソフトを用い、解析した。

結 果

1) コントロール :

コントロール肺では、MMP-1、MMP-2、MMP-9、TIMP-2がマクロファージに、またわずかにII型肺胞上皮細胞に陽性であった。MMP-9は、その他に好中球に強陽性であった。

2) BOOP :

BOOPでは、アルシアン青陽性の早期の線維化病巣が散在性に認められた。ポリープ型が主体の肺胞腔内線維化であった。BOOPでは、肺胞上皮細胞の再生が盛んで、多くの腔内線維化巣は、II型肺胞上皮細胞に被われていた。また、これらの線維化巣に混在して、Masson染色で青く染まり、再生肺胞上皮に被われた小型で球状のいわゆるcollagen globuleの形成が認められた。^{5, 10)}

BOOPの腔内線維化巣では、フィブロネクチン、I型、III型コラーゲンの沈着を認めたが、その分布は疎であった。腔内線維化巣には血管の新生像が観察された。 α 平滑筋アクチンは、平滑筋に陽性である他に、BOOPでは肺胞腔内線維化巣の間質細胞の一部に陽性であったが、多くの陰性細胞が混在していた。再生上皮細胞、筋線維芽細胞にMMP-1 (図1A)、MMP-2、MMP-9が陽性であり、侵入血管にはMMP-2が陽性であった。TIMP-2 (図1B) は、筋線維芽細胞に弱陽性から陰性であった。

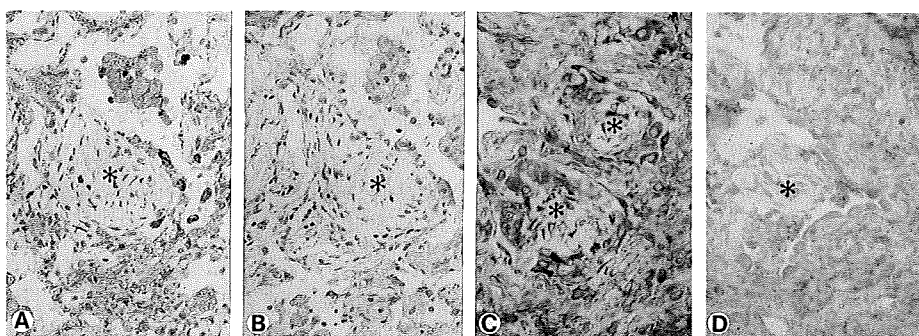


図1 BOOP

A: ポリブ型の早期腔内線維化巣 (*) の筋線維芽細胞, 再生上皮細胞は, 間質コラゲナーゼ (MMP-1) に陽性である. B: インヒビター (TIMP-2) は, 筋線維芽細胞に陰性から弱陽性であり, 膠原線維沈着を減少させることが示唆される. (A, B: 連切標本, 免疫組織化学) C: Anti-sense probe による *in situ* hybridization で, MMP-9 が腔内線維化巣 (*) の筋線維芽細胞, 再生上皮細胞に発現している. D: Sense probe による *in situ* hybridization で, 反応はみられない. *: 腔内線維化巣 (文献 10 より引用)

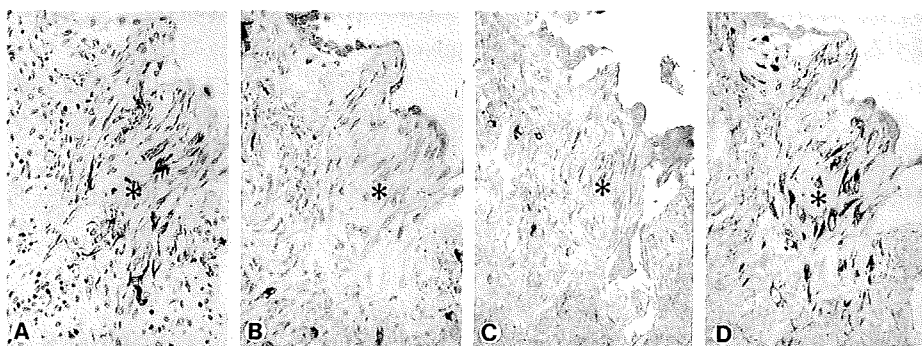


図2 IPF の免疫組織化学

A: 壁在型の早期腔内線維化巣 (*) には, α 平滑筋アクチン陽性の筋線維芽細胞をみる. 腔内線維化巣 (*) の筋線維芽細胞は, MMP-1 (B), MMP-2 (C) が陰性である. D: TIMP-2 は, 筋線維芽細胞に強陽性であり, 細胞外基質沈着を助長することが示唆される. (A, B, C, D: 連切標本) (文献 10 より引用)

In situ hybridization では, 肺腔内線維化巣の筋線維芽細胞とそれを被う再生肺胞上皮細胞で, 周囲の他の細胞に比べ MMP-9 mRNA のより強い発現が観察された (図 1 C, D).

電顕的には, BOOP の肺腔内線維化巣の間質細胞は, アクチン細線維が少なく粗面小胞体が良く発達した線維芽細胞で, 細胞質内に膠原線維の貪食像が観察された.

3) IPF :

IPF では, 終末的な蜂巢肺は下葉の胸膜下に著明であるが, 早期の活動性の線維化巣は, 散在性に蜂巢肺の周囲の正常肺領域に認められるのみであった. IV型コラーゲン染色を行い観察すると, これらの早期線維化巣はほぼすべて肺腔内に形成されていることが確認された. また, 早期肺腔内線維化巣は壁在型, 閉塞型が主体で, 肺胞壁は癒合していた. IPF ではフィブロネクチン, I 型, III型コラーゲンの密な沈着が認められた. 腔内の血管新生は認められなかった. IPF では肺腔内線維化巣の多くの間質細胞が α 平滑筋アクチン陽性の筋線維芽細胞

であった (図 2 A). この筋線維芽細胞には MMP-1 (図 2 B), MMP-2 (図 2 C), MMP-9 はそれぞれ陰性から弱陽性で, TIMP-2 (図 2 D) が強陽性であった. *In situ* hybridization では, 肺腔内線維化巣の間質細胞での MMP-9 の発現は, その周囲の他の細胞と同程度であった.

電顕的に IPF ではアクチン細線維の多い筋線維芽細胞の典型像を示し, 膠原線維の貪食像は認められなかった. また, 免疫電顕による観察では, IPF の肺腔内線維化巣の筋線維芽細胞の粗面小胞体, 核膜腔に TIMP-2 の強い反応がみられ, 同細胞が TIMP-2 を産生していることが確認された.

4) グラチンザイモグラフィ :

BOOP, IPF, コントロールのすべての症例で, 不活型 MMP-9, 不活型 MMP-2, 活性型 MMP-2 が検出された (図 3). 特に, BOOP において, 活性型 MMP-2/不活型 MMP-2 の割合が, コントロールに比べ, 優位に増加していた. (図 4)

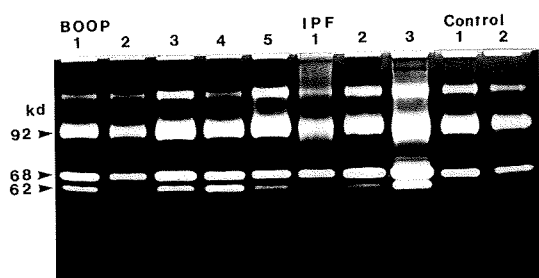


図3 ゲラチンゼイモグラフィー
BOOP, IPF, コントロールのすべての症例で, 不活型 MMP-9 (92kd), 不活型 MMP-2 (68kd), 活性型 MMP-2 (62kd) が検出される。(文献 10 より引用)

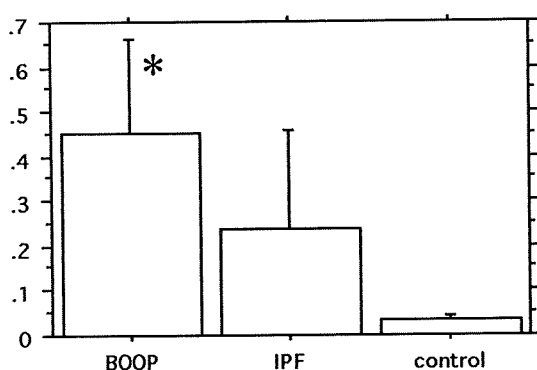


図4 ゲラチンゼイモグラフィーにおける活性型 MMP-2/不活型 MMP-2 の割合は, BOOP において, コントロールに比べ, 優位 (*) に増加している。(文献 10 より引用)

考察・結論

BOOP の肺胞腔内線維化は, 肺胞上皮細胞の傷害が軽く, 再生が良好なためポリープ型である。時間が経つとコラーゲンの球となり, 縮小消失する。電顕的に腔内線維化巣の筋線維芽細胞には, 膠原線維の貪食像が観察される。これは, 局所で産生・沈着した膠原線維を筋線維芽細胞が吸収する像と考えられ, この過程には, 間質コラーゲナーゼである MMP-1 が働いていると考えられる。上皮細胞の MMP-2, MMP-9, 内皮細胞の MMP-2 は, 再生・移動に関与していると考えられる⁹⁾。肺組織中では, MMP-2 の不活型に比べ, 活性型の割合が増加しており, 線維化の局所で MMP-2 が働いていることが示唆される。BOOP の線維化が可逆的である理由の一つに, MMPs の働きがあると考えられる。

また, IPF では新生された線維化が不可逆的であり, 終末像である蜂巢肺まで進行する。経過とともに, 蜂巢肺の領域が拡大し, 空気・血液関門である肺胞が徐々に減少する。IPF の壁在型・閉塞型腔内線維化巣は, 肺胞壁を癒合させるので, 本来の肺胞構造は失われることになる。IPF の肺胞腔内線維化巣の間質細胞は筋線維芽細胞としての性格が強くなり, MMPs に比し TIMPs の優位が

考えられる。^{7, 10)}

TIMP-2 は, 局所での筋線維芽細胞の増生を促すことが知られており¹¹⁾, また, TIMPs の優位なことから, 産生された細胞外基質の沈着を助長していることが示唆される。TIMPs が不可逆的な線維化形成に寄与している可能性が考えられる。また, TIMP-2 には, 塩基性線維芽細胞増殖因子を介して間接的に血管内皮細胞の増生・侵入を阻止することが知られており¹²⁾, これが IPF の肺胞腔内線維化巣に血管新生がない理由であろう。IPF の不可逆的な線維化形成に TIMPs の関与が考えられる。

文献

- 1) Basset F, Ferrans VJ, Soler P, Takemura, T, Fukuda Y, Crystal RG. Intraluminal fibrosis in interstitial lung disorders. *Am J Pathol* 122:443-61. 1986
- 2) Kuhn C, McDonald JA. The roles of the myofibroblast in idiopathic pulmonary fibrosis. Ultrastructural and immunohistochemical features of sites of active extracellular matrix synthesis. *Am J Pathol* 138:1257-65. 1991
- 3) Fukuda Y, Basset F, Ferrans VJ, Yamanaka N. Significance of early intra-alveolar fibrotic lesions and integrin expression in lung biopsy specimens from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Hum Pathol* 26:53-61. 1995
- 4) Epler GR, Colby TV, McLoud TC, Carrington CB, Gaensler EA. Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia. *New Eng J Med* 312:152-8. 1985
- 5) Fukuda Y. Immunohistochemical analysis of interstitial lung disease. Takishima eds. *Basic and Clinical Aspects of Pulmonary Fibrosis*. CRC Press. Boca Raton, 15-28. 1994
- 6) O'Connor CM, FitzGerald MX. Matrix metalloproteases and lung disease. *Thorax* 49:602-609, 1994
- 7) Pardo A, Ramirez R, Ramos C, Montano M, Stricklin G, Raghu G. Production of collagenase and tissue inhibitor of metalloproteinases by fibroblasts derived from normal and fibrotic human lungs. *Chest* 102:1085-1089, 1992
- 8) Hayashi T, Stetler-Stevenson WG, Fleming MV, Fishback N, Koss MN, Liotta LA, Ferrans VJ, and Travis WD. Immunohistochemical study of metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lungs of patients with diffuse alveolar damage and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 149:

- 1241-56. 1996
- 9) Buisson A-C, Zahm JM, Polette M, Pierrot D, Bellon G, Puchelle E, Birembaut P, Tournier JM. Gelatinase B is involved in the *in vitro* wound repair of human respiratory epithelium. J. Cell. Physiol. 166:413-426, 1996
- 10) Fukuda Y, Ishizaki M, Kudoh S, Kitaichi M, Yamanaka N. Localization of matrix metalloproteinases-1, -2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in interstitial lung diseases. Lab. Invest. 78:687-698, 1998
- 11) Corcoran ML, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 stimulates fibroblast proliferation via a cAMP-dependent mechanism. J. Biol. Chem. 270:13453-13459, 1995
- 12) Murphy AN, Unsworth EJ, Stetler-Stevenson WG. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 inhibits bFGF-induced human microvascular endothelial cell proliferation. J Cell Physiol 157:351-8. 1993

特発性間質性肺炎の線維化機構におけるプロテアーゼの役割

岡本 竜哉¹ 彌永 和宏¹ 菅 守隆^{1*} 具嶋 泰弘¹
一安 秀範¹ 一門 和哉¹ 赤池 孝章^{2***} 安藤 正幸¹

特発性間質性肺炎 (IIP) においては ECM の産生と分解の不均衡が想定される。マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) は IIP の線維化機構における肺胞構築の破壊と過剰な ECM の分解を担う主要因子と想定される。単球系細胞では MMP-2 は TGF- β , MMP-9 は TNF- α , IL-1 β により産生が誘導された。患者 BALF をザイモグラム法にて解析すると, MMP 活性は病勢に応じて亢進しており, また組織中の発現を免疫組織化学的に検討すると, これらはマクロファージ, 上皮, 間質細胞等に発現していた。肺障害初期の上皮・基底膜の断裂, 気腔内への炎症細胞や間質細胞の侵入, そして基本構築改変と過剰な ECM の沈着という一連の線維化機構のなかで, MMP は重要な役割を担っていると考えられた。

Involvement of matrix metalloproteinase-9 and -2 in idiopathic interstitial pneumonia

T. Okamoto¹, K. Iyonaga¹, M. Suga¹, Y. Gushima¹
H. Ichiyasu¹, K. Ichikado¹, T. Akaike², M. Ando¹

1. The First Department of Internal Medicine, Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto 860-0811, Japan
2. Department of Microbiology, Kumamoto University School of Medicine

Idiopathic interstitial pneumonia (IIP) is a disease of unknown etiology and poor prognosis that is characterized by alveolar inflammation and progressive proliferative and fibrotic changes in the lung. The imbalance between the deposition and degradation of extracellular matrix (ECM) lead to irreversible pulmonary structural remodeling seen in this disease. Matrix metalloproteinases (MMPs), a group of zinc neutral endopeptidases produced by a variety of cells have crucial roles in the homeostasis of the ECM. In this study, the expression of MMP-9 (gelatinase B) and MMP-2 (gelatinase A) in patients with various interstitial lung diseases including diffuse alveolar damage (DAD), usual interstitial pneumonia (UIP), nonspecific interstitial pneumonia (NSIP) and bronchiolitis obliterans organizing pneumonia (BOOP) was investigated. The activities of MMPs in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were determined by using gelatin zymography. Immunohistochemical analysis for the detection of MMPs was also performed. In the cases with active stage of UIP and DAD, increased expression of MMP-9 was detected. The levels of MMP-9 were correlated with the neutrophil contents of the BAL. Alveolar macrophages, neutrophils and the squamous metaplastic epithelial cells strongly expressed MMP-9. In contrast, MMP-2 was predominantly detected in the patients with BOOP and NSIP, and the levels of which significantly correlated with the BALF concentrations of TGF β . The epithelial cells and fibrotic interstitium strongly expressed the MMP-2 predominantly. *In vitro*, LPS, TNF α and IL-1 β induced the expression of MMP-9 in human monocytic cell line (THP-1). MMP-2 was constitutively expressed and significantly increased by the stimulation with TGF β , not with neither TNF α nor IL-1 β . These results indicate that MMP-9 and MMP-2 may have different function for the development of interstitial lung diseases, MMP-9 may contribute to the lung injury and MMP-2 may play an important role in tissue repair or remodeling seen in fibrotic lung diseases.

はじめに

特発性間質性肺炎 (IIP) は原因不明の傷害因子により、肺胞上皮および基底膜の損傷と創傷治癒機転が過剰に繰り返され、正常肺胞構造の改変 (リモデリング) が惹起されることが本態と考えられている。好中球の浸潤、Th1 サイトカインの産生と単球・マクロファージの活性化に伴う胞隔炎、そして Th2 サイトカインによる炎症の鎮静化と線維芽細胞による修復機転といった、様々な時相の炎症段階が、時間的、空間的に同時に存在し、このことが IIP における複雑なサイトカインネットワークを生む要因となる¹⁾。IIP では、肺の基本構築の改変とともに線維性コラーゲンの沈着が生じ、最終的に蜂窩肺の形成にいたる。この不可逆的な肺のリモデリングにおいては ECM の産生・沈着と分解との均衡の破綻が想定される。種々の炎症細胞や間質細胞により産生されるマトリッ

Table 1 対象とした間質性肺炎患者 BALF の細胞分画と MMP 活性

病型	n	BAL 細胞分画 (%)				MMP activity (AU)	
		AM	Lymphocyte	Neutrophil	Eosinophil	MMP-9	MMP-2
DAD	2	21.0 ± 5.0	16.3 ± 12.4	62.2 ± 17.2	2.2 ± 1.8	70.7 ± 29.0	48.2 ± 36.1
CVD-UIP	8	68.9 ± 9.3	24.6 ± 8.2	4.8 ± 1.6	1.7 ± 0.8	32.9 ± 9.6	4.0 ± 2.1
IIP-UIP (active)	6	66.9 ± 7.6	5.6 ± 2.0	21.4 ± 7.9	6.1 ± 3.2	60.3 ± 10.7	11.9 ± 3.4
IIP-UIP (stable)	12	82.0 ± 4.7	10.5 ± 2.7	3.7 ± 1.7	4.1 ± 2.2	6.7 ± 1.3	2.9 ± 1.0
BOOP	6	49.0 ± 9.7	42.2 ± 7.7	2.8 ± 1.1	2.6 ± 1.5	12.8 ± 2.9	15.5 ± 9.4
NSIP	4	70.2 ± 5.7	13.6 ± 5.8	11.8 ± 5.0	6.2 ± 2.5	6.2 ± 1.0	20.1 ± 10.7

クスメタロプロテアーゼ (MMP) は、ECM 蛋白を分解する蛋白分解酵素で、一般に、不活性型前駆体 (proMMP) として産生され、細胞外で活性化される²⁾。肺の修復・再構築において基底膜の破壊が重要であるが、その主成分である IV 型コラーゲンを分解するものとして、MMP-9 (ゼラチナーゼ B) と MMP-2 (ゼラチナーゼ A) が挙げられる。MMP は IIP の初期線維化過程における正常肺胞構築の破壊と、後期の過剰な ECM の分解を担う主要因子と想定され、IIP の病態発現に深く関与するものと考えられる。本研究では、IIP における肺線維化機序の一端を MMP の立場から検討、解析した。

対象と方法

当科にて気管支肺胞洗浄検査 (BAL) を行った間質性肺炎患者 (DAD 2 例, CVD-UIP 8 例, 活動性のある UIP 6 例, 安定した UIP 12 例, BOOP 6 例, NSIP 4 例), 計 38 例を対象とした (Table 1)。活動性のある UIP とは診断後 2 年以内に死亡した症例とした。

基底膜の破壊に重要な、MMP-9 と MMP-2 について、BALF 中の発現をゼラチンザイモグラム法により測定した。即ち、あらかじめゼラチンを包埋したアクリルアミドゲルにて非還元下で SDS-PAGE を行った後、バッファー中にて 48 時間インキュベートし、蛋白染色を行った。酵素活性があるとゲル中に含まれる基質ゼラチンが分解され、酵素の分子量に応じた部位に白く抜けたバンドが得

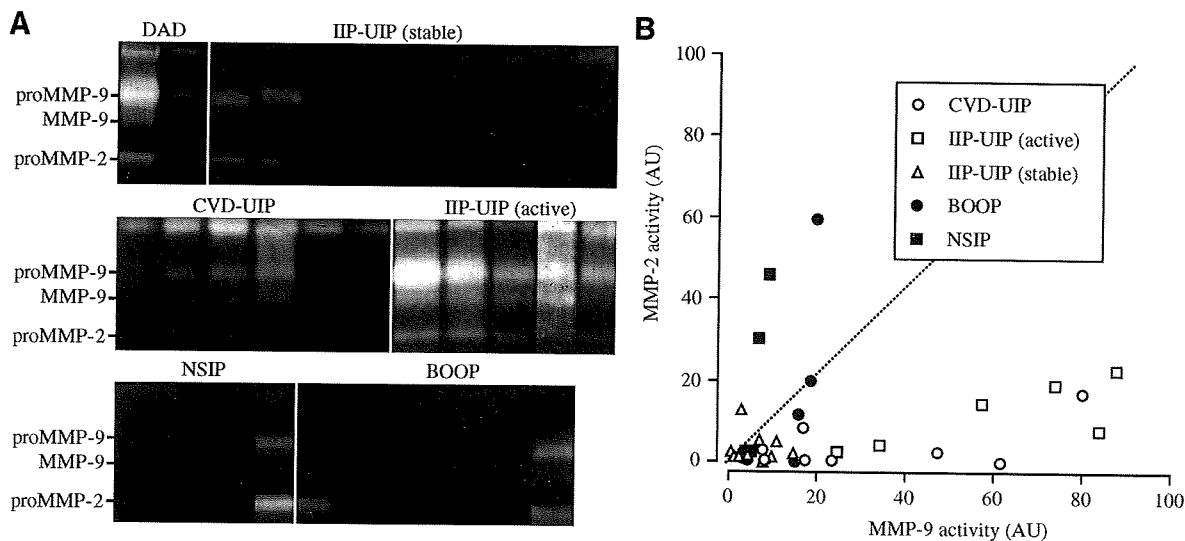


Fig.1 種々の間質性肺炎患者 BALF のゼラチンザイモグラフと、組織型による発現パターンの相違

- 1. 熊本大学医学部第一内科
- 2. 同 微生物学教室
- * びまん性肺疾患分科会 分科会員
- ** 同 研究協力者 (基礎班)

られる。その濃度を NIH-Image にて定量化し、MMP 活性とした。また一部の症例では抗ヒト MMP-2, -9 単抗体を用いて免疫組織染色を行い、肺組織内での発現の局在について解析した。また単球系細胞株である THP-1 を種々のサイトカインで刺激した際の MMP の誘導につ

いてもザイモグラム法により解析した。

結 果

BALF のザイモグラムの結果を Fig.1A に示す。MMP-9、-2 活性を両軸にとり、種々の病型別にプロットしたところ、膠原病肺、UIP の活動性のある症例においては MMP-9 の亢進が認められ、特に産生の亢進した症例ではその活性型もザイモグラム上認められた。しかしながら MMP-2 の産生はわずかであった。安定した UIP では両 MMP の活性はほとんど認められなかった。一方、NSIP、BOOP では MMP-9 よりも MMP-2 が優位となる傾向がみられた。(Fig.1B)。BAL 中の好中球比率

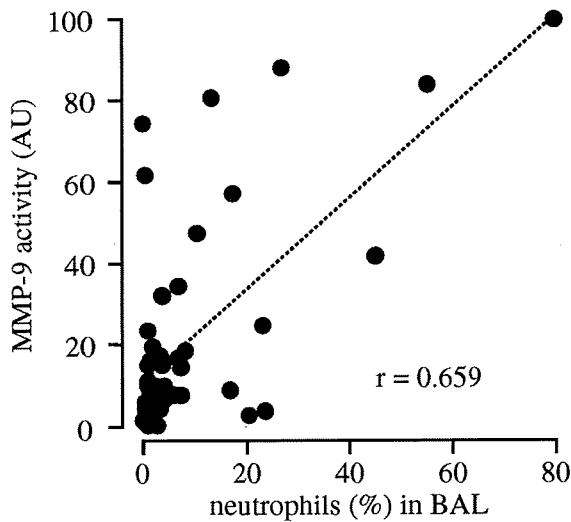


Fig.2 MMP-9 の活性とBAL中好中球比率の相関

と MMP-9 の間には有意な相関関係が認められ ($r=0.659$)、MMP-9 の産生細胞の一つに好中球が考えられた (Fig.2)。MMP の単抗体を用いた免疫組織染色の結果を Fig.3 に示す。UIP では肺胞マクロファージ、好中球に加え、特に扁平化生上皮に強い MMP-9 の発現を認めた。また線維化した間質および肺胞上皮に MMP-2 の発現を認めた。これに対して NSIP、BOOP では、強い MMP-2 の発現を肺胞上皮および肥厚した間質に認めるのに対して、MMP-9 の発現は弱い傾向にあった。MMP の活性と BAL 中のサイトカインの関係につき検討した結果 (Fig.4)、 $TGF\beta$ と MMP-2 の活性の間に有意な相関が認められた ($r=0.801$)。ヒト単球系樹立細胞

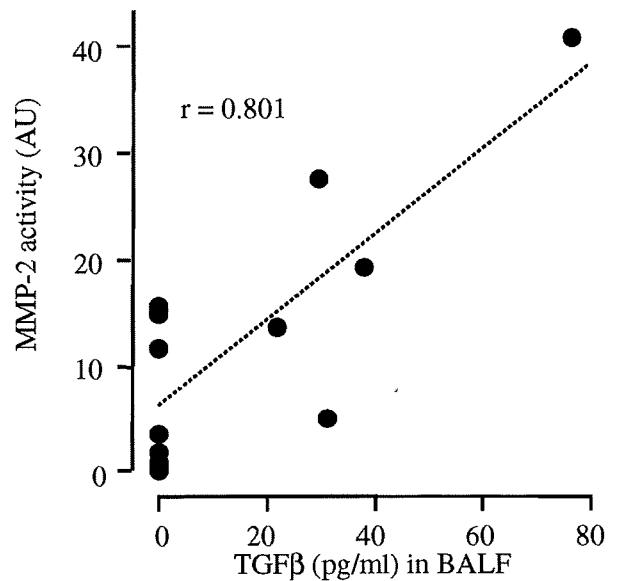


Fig.4 MMP-2 の活性とBAL中 $TGF\beta$ の相関

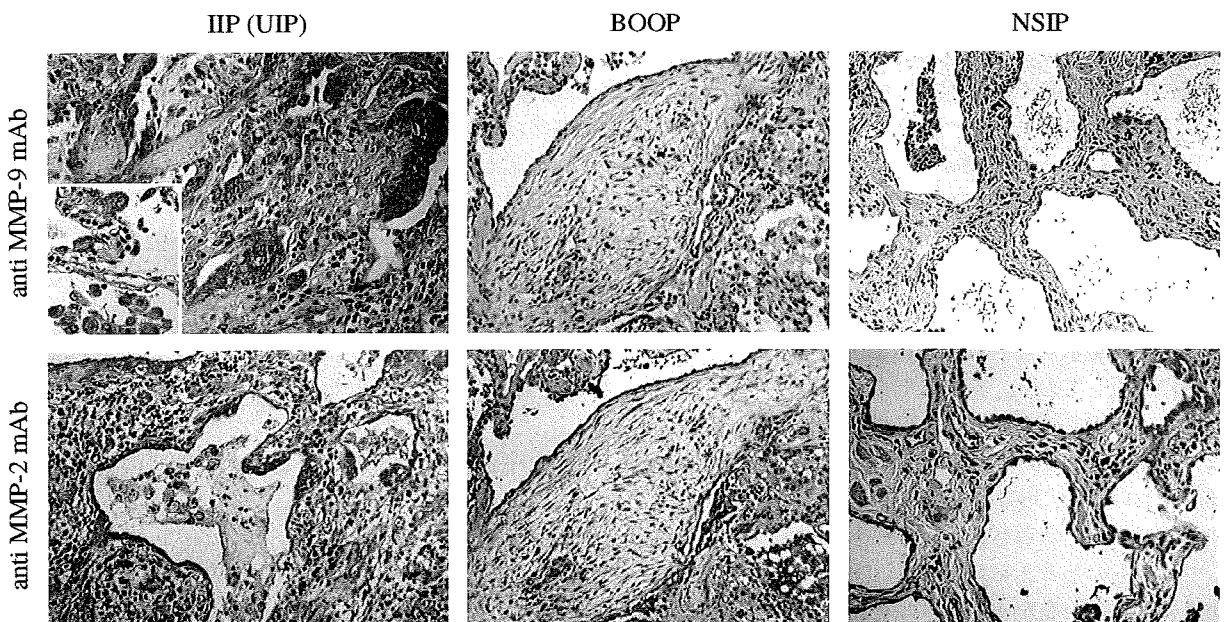


Fig.3 間質性肺炎組織の抗ヒト MMP-9、-2 モノクローナル抗体による免疫組織化学染色

株である THP-1 を種々のサイトカインで刺激した際の培養上清中の MMP の活性につき検討した結果、TNF α 、IL-1 β といった炎症性サイトカインにより MMP-9 が用量依存的に強く誘導された。MMP-2 は constitutive に発現しており、炎症性サイトカインの影響は受けず、TGF β によってのみ発現が増強された (Fig.5)。同様の傾向はヒト気道上皮系細胞株である BET-1A でも認められた。

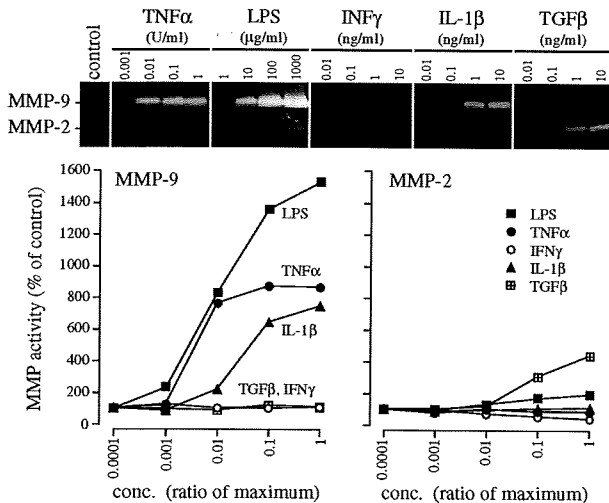


Fig.5 THP-1におけるサイトカインによる MMP の誘導

考 案

間質性肺炎患者の BALF、および組織中の MMP の発現を検討した。その結果、DAD や膠原病肺、そして UIP の活動期の症例では MMP-9 の著明な発現亢進がみられ、炎症細胞や扁平化上皮が産生細胞と考えられた。THP-1 においては非刺激時には認められず、炎症性サイトカインにより強い発現が誘導された。高濃度酸素暴露によるブタ肺傷害モデルにおける我々の検討では、HRCT 所見より求めた肺傷害スコアと BALF 中の MMP-9 発現には正の相関が認められており、MMP-9 は、間質性肺炎における肺傷害、特に上皮基底膜の損傷に関与するものと推測された。

一方、MMP-2 は BOOP や NSIP にて、肺胞上皮や線維化した間質に発現し、BALF 中でも TGF β 値と相関して高い活性を示した。THP-1 においては、MMP-2 は構成的に発現しており、炎症性サイトカインによる誘導を受けず、TGF β のみにより発現が増強された。生体内では、正常状態では間質の恒常性の維持に、そして線維化局所においては、増殖性サイトカインにより線維芽細胞や単球において誘導され、修復あるいは構造変化に関与しているものと考えられる。MMP-2 は UIP 患者の線維化巣にても強い発現が報告されており、線維化形成との関連性も注目されている³⁾。我々の UIP 症例における

検討でも同様に MMP-2 の発現を組織中に認めるものの、BALF 中では低値であった。このことは UIP においては MMP-2 は ECM と強く結合した状態で存在し、肺胞腔に放出されない可能性を示唆している。MMP-2 の線維化巣での役割について、福田らは UIP においては MMP よりも TIMP の発現が優位であるため、ECM は沈着の方向に傾くが、BOOP においては TIMP よりも MMP の発現が優位であるため、ポリープ様の線維化巣の消退に関与するものとした⁴⁾。また TGF β や PDGF といった増殖性サイトカインは ECM と結合した状態で肺の間質に存在しているため、間質における MMP-2 の生理活性の一つとして、かかる増殖性サイトカインの間質および肺胞腔内への遊離、ひいては線維化の促進に関与する可能性も示唆された。以上より、MMP-2 は肺傷害に関与するよりむしろ、肺の線維化およびリモデリングに関与するものと想定された。

一般に MMP は不活性型前駆体 (proMMP) として産生され、一部の例外をのぞき、細胞外で活性化される²⁾。活性化の機序として a) 蛋白分解酵素によるプロペプチドの切断による、分子量の減少を伴う活性化と、b) 活性酸素種 (O₂⁻, OH⁻, HOCl)⁵⁾ や反応性窒素酸化物 (NO₂, ONOO⁻)⁶⁾ によるプロペプチドの化学修飾による、分子量の減少を伴わない活性化が報告されている。本検討では、ザイモグラム上分子量の減少した活性型の MMP-2、-9 は確かに認められるものの量的に少なく、肺局所で、分子量の減少を伴わない MMP の活性化が起こっている可能性が想定され、今後さらなる検討を行う必要があると考えられた。

結 論

2 種類の IV 型コラゲナーゼ (MMP-9、-2) は異なる誘導機構を有しており、MMP-9 は、炎症性サイトカインの刺激により炎症細胞や化生上皮より産生され、肺傷害、特に上皮基底膜の傷害に関与し、その活性は間質性

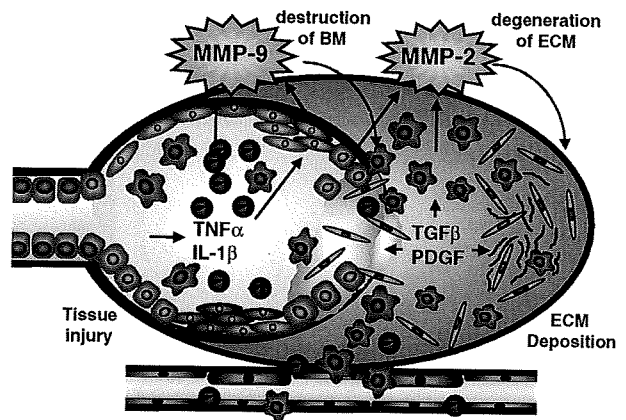


Fig.6 間質性肺炎の病態形成における MMP の役割

肺炎における肺傷害のマーカーとして有用である可能性が示唆された。一方MMP-2は、増殖性サイトカインの刺激により単球や間質細胞より産生され、正常間質のホメオスターシスや、傷害組織の修復とリモデリングに関与する可能性が示唆された (Fig.6).

参考文献

- 1) Martinet Y, Menard O, Vaillant P, Vignaud JM, and Martinet N. Cytokines in human lung fibrosis. *Arch Toxicol Suppl.* 18:127-139 (1996)
- 2) Grant GA, Goldberg GI, Wilhelm SM, He C, and Eisen AZ. Activation of extracellular matrix metalloproteases by proteases and organomercurials. *Matrix Suppl.* 1:217-23 (1992)
- 3) Hayashi T, Stetler-Stevenson WG, Fleming MV, Fishback N, Koss MN, Liotta LA, Ferrans VJ, and Travis WD. Immunohistochemical study of metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lungs of patients with diffuse alveolar damage and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* 149:1241-1256 (1996)
- 4) Fukuda Y, Ishizaki M, Kudoh S, Kitaichi M, and Yamanaka N. Localization of matrix metalloproteinases-1, -2, and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in interstitial lung diseases. *Lab Invest.* 78:687-98 (1998)
- 5) Van Wart HE, and Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:5578-82 (1990)
- 6) Okamoto T, Akaike T, Nagano T, Miyajima S, Suga M, Ando M, Ichimori K, and Maeda H. Activation of human neutrophil procollagenase by nitrogen dioxide and peroxynitrite: a novel mechanism for procollagenase activation involving nitric oxide. *Arch Biochem Biophys.* 342:261-274 (1997)

肺線維症における新生血管に関する研究

海老名雅仁 清水川 稔 猪岡 望 阿部 達也
貫和 敏博*

肺線維症における血管新生に関する研究は少なく、血管の増減関しても相反する報告が有る。我々は特発性肺線維症 7 例の胸腔鏡下肺生検標本において、血管増殖因子として知られる VEGF, bFGF, 及び IL-8 の産生増加を示した。また、肺組織内の様々な線維化の程度を Ashcroft Score にそって分類した上で、肺胞壁中における血管内皮細胞の面積比を血管密度として計量組織学的に測定し、線維化過程における血管の増減を解析した。その結果、血管密度は正常肺の肺胞壁で $12.3 \pm 6.5\%$ (mean \pm SD) で有るのに対し、score 1 で $21.8 \pm 7.1\%$ ($p < 0.01$), score 2 で $24.9 \pm 6.8\%$ ($p < 0.01$) と、早期の線維化過程において有意に増加しているものの、score 7 で $5.7 \pm 3.3\%$ ($p < 0.01$), score 8 で $3.1 \pm 1.9\%$ ($p < 0.01$) と線維化がすすむにつれ血管密度は正常よりも低くなることを示した。これらの結果から肺線維症の進展に血管新生が関与する可能性が推察される。

Angiogenesis in idiopathic interstitial pneumonia

Masahito Ebina, Minoru Shimizukawa, Nozomu Ino-oka, Tatsuya Abe
Toshihiro Nukiwa

Department of Respiratory Oncology and Molecular Medicine Division of Cancer Control Institute of Development, Aging, and Cancer.

Angiogenesis influences various kinds of diseases, including inflammatory diseases. Our previous study shows high serum levels of angiogenic factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) in IIP patients. Angiogenesis in IIP, however, has not been clearly proved yet, partly because of the difficulty in observing endothelial cells of alveolar capillaries, which is now easily detectable by immunohistochemistry (IHC) using antibody to CD34. We examined in this study the lung biopsied specimens of 7 IIP patients through video-assisted thoracoscopic surgery and 3 normal control lungs through surgical operation by detecting immunohistochemical expression of the angiogenic factors using antibodies against VEGF (A-20, Santa Cruz), bFGF (FGF-2, Santa Cruz), and IL-8 (provided by Dr. Strieter, Michigan Univ.), in addition to CD34 (Nichirei). The expression of these angiogenic growth factors was increased in the fibrotic lungs, diagnosed as UIP, of the all IIP patients examined. The alveolar capillaries were remarkably dilated and increased in number in the early stage of IIP, scored as 1 to 3 according to Ashcroft scales. The capillaries in the late stage of fibrosis (scores 6-8) were, on the contrary, reduced in the fibrotic loci. These images were statistically evaluated using computed image analysis system (CAS 200, Becton Dickinson). The vascular density, the percentage of the total area of endothelial cells in the alveolar wall, was calculated at the scored foci. In the normal lungs (score 0), the vascular density was $12.3 \pm 6.5\%$ (mean \pm SD). The densities of the early fibrotic foci were statistically increased to $21.8 \pm 7.1\%$ (score 1, $p < 0.01$), and $24.9 \pm 6.8\%$ (score 2, $p < 0.01$), while decreased in the late stages as $5.7 \pm 3.3\%$ (score 7, $p < 0.01$), and $3.1 \pm 1.9\%$ (score 8, $p < 0.01$). These results suggested the contribution of angiogenesis to the pathogenesis of IIP.

はじめに

血管新生の分子生物学的機序に関する研究はこの数年の間に著しい発展をみているが、単に基礎研究に留まらず、虚血性心疾患に対する血管新生促進、あるいは固形癌に対する腫瘍血管抑制など、新しい治療戦略として臨床応用にまで至っている。ところが呼吸器疾患、中でも肺線維症における血管系のリモデリングに関しては、長い間注目を受けて、新生血管に関する情報は少ないうえに、血管の増加と減少の相反する報告があり、あいまいなままに残されている。このような現状にあって、最新の血管新生機序に関する新しい知見に基づいた、肺線維症における新生血管の研究が求められており、さらに、治療が極めて困難な特発性間質性肺炎の治療にどう応用できるのかという臨床応用の可能性を探ることは急務である。

われわれは、ステロイド等による治療をうけていない特発性間質性肺炎 (idiopathic interstitial pneumonia ; IIP) 患者 7 例の胸腔鏡視下肺生検 (video-assisted thoracoscopic surgery ; VATS) によって得られた肺組織標本、および正常対照肺として早期肺癌患者 3 例の無病変肺手術摘出組織標本を用いて、肺組織内の血管増殖因子の増減、および肺胞毛細血管床の増減を、肺組織の線維化病巣の程度に即して検討を行った。血管増殖因子としては vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), および Interleukin-8 (IL-8) を、血管内皮細胞に関しては血管内皮細胞特異性が強い細胞膜糖鎖抗原である CD34, 代表的な血液凝固因子である第 8 因子関連抗原 (von Willebrand factor ; vWF), および炎症巣に形成される高内皮性細静脈 (high endothelial venule ; HEV) に発現する接着因子の ICAM-1 (Intercellular adhesion molecule-1) を、免疫組織染色にて発現細胞の同定とその分布の程度を評価した。線維化の進行に伴う血管新生の変化に関しては、IIP 肺組織内に分布する線維化の様々な領域を 9 段階の Ashcroft score にて分類した上で、CD34 陽性血管内皮細胞の面積比を画像解析装置を用い形態計量学的に求め、統計学的に比較検討した。

材料と方法

対象肺

東北大学加齢医学研究所附属病院にて胸腔鏡下肺生検を施行された、未治療の特発性間質性肺炎 (IIP) 7 例

東北大学加齢医学研究所 腫瘍制御部門
呼吸器腫瘍研究分野

* びまん性肺疾患分科会 分科会員

の 11 標本、および正常対照として早期肺癌患者 3 例の、腫瘍より十分離れた手術摘出正常肺組織標本 3 標本を、10%緩衝ホルマリンにて室温 48 時間固定後、パラフィン包埋し、厚さ 3 μ m の連続切片を薄切し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、エラスティカ・マッソン (EM) 染色および免疫組織染色を行った。これらの 7 例の IIP 症例は病理組織診断にて、いずれも通常型間質性肺炎 (usual interstitial pneumonia ; UIP) との診断を受け、また、対照肺においても癌、線維化あるいは炎症像を伴わない正常肺組織であることを確認している。

免疫組織染色

染色法は全て ABC (avidin-biotin complex) 法によった。使用抗体、希釈倍率、前処置等は別表 (表 1) にまとめた。抗 CD34 抗体の発色基質として Vector Red (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を、核染色にはメチルグリーンを使用した。それ以外の抗体には発色基質として DAB (3, 3'-diaminobenzidine), 核染色にヘマトキシリンを使用した。

表 1 実験で使った抗体の名前、希釈、染色前の諸処置、および入手先

Name	Dilution	Treatment	Sources
anti-VEGF	1/900	Microwave	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)
anti-bFGF	1/200	Hyaluronidase Autoclave	Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY)
anti-IL-8	1/1000		kindly provided by Dr. Strieter (Univ. Michigan)
anti-CD34	1/100		Nichirei Co. (Tokyo)
anti-vWF	1/2000	Microwave	DACO (Copenhagen, Denmark)
anti-ICAM-1	1/500	CSA System	DACO (Copenhagen, Denmark)

線維化程度の評価

および肺胞毛細血管内皮の形態計測学的評価

IIP および対照肺の HE および EM 組織標本を、光学顕微鏡下に 400 倍にて観察し、各標本毎に 5~15 視野の線維化の程度をアシクロフト・スコアに準じ、0~8 の 9 段階で評価した。その評価された視野における肺胞壁中の CD34 陽性血管内皮細胞の面積および肺胞壁の面積を、画像解析装置 : CAS 200 computed image analysis system (Becton Dickinson, Lomcoln Park, NJ) および解析ソフトウェア Quantitative Angiogenesis (version 1.0.03) を用いて計測した。肺胞壁の単位面積に占める血管内皮細胞の総面積の割合を血管密度 (Vessel density, %) として求め、各アシクロフト・スコア間の統計比較を unpaired *t*-test により行い、 $p < 0.05$ の場合を有意差ありとした。

結 果

IIP 症例はいずれも、肺胞壁の炎症細胞の浸潤、あるいは肺胞腔内のマクロファージの増殖が同一肺内に様々な程度に局在してみられ、多段階の線維化巣が混在する

UIP の特徴的な病理像を呈していた。VEGF は肺胞マクロファージを中心とする炎症細胞や再生肺胞上皮細胞などに、肺組織内全域に多くの産生がみられた (図 1 A)。bFGF はどちらかというと、線維化が進んでいる領域の線維芽細胞や太い静脈の血管内皮細胞に産生を認め、肺胞細胞には再生上皮も含めてほとんど陽性所見を認めなかった (図 1 B)。IL-8 の産生細胞は、VEGF の産生細胞群と類似しており、肺組織内全域の、マクロファージ、リンパ球、肺胞上皮細胞などに、いずれも正常肺に比し高い発現を認めた (図 1 C)。

抗 vWF 抗体や抗 ICAM-1 抗体で陽性所見を示す血管内皮細胞はいずれも毛細血管よりも太いレベルの静脈の内皮細胞であり、肺胞壁内の毛細血管内皮細胞はこれらの抗体では検出できなかった。これらの血管内皮細胞は抗 CD34 抗体ではよく示され、とくに肺胞毛細血管内皮細胞は均質に強い陽性所見がみられた。IIP 肺の肺胞毛細血管は、線維化がほとんど見られない、わずかに肥厚しているだけの肺胞壁のなかにあっても、正常肺組織中の肺胞毛細血管 (図 1 D) と比べ、著しく拡張しているのがみられた (図 1 E)。さらに肥厚した肺胞壁では、毛細血管が 2 重あるいは 3 重になって平行して走行しているのが観察された (図 1 F)。これらの血管の間には

肺胞細胞や elastic fiber もみられず、UIP の蜂巢化 (honeycombing) 像に伴う肺胞虚脱の像とは異なる。このように拡張し、あるいは増加した血管床は、線維化のスコアリングがすすむにつれて、相対的に減退していくことが認められた (図 1 G)。

IIP の 1 症例 (Case 7) において、30 箇所スポットにおける線維化の程度の score をもとめ、また肺胞血管内皮細胞の血管密度 (%) を算出した。その結果、線維化早期の過程 (スコア 1-3) で血管密度が高まり、線維化が進むにつれて血管密度は著明に減少することが確認された。次に正常肺 3 例の血管密度測定の結果をアシクロフト・スコア 0 とし、IIP 症例 7 例の 114 スポットの結果をそれぞれのスコア (1-8) とあわせてプールしたものを図 2 に示す。正常肺組織では $12.3 \pm 6.5\%$ (mean \pm SD) であったのに対し、IIP 標本では、線維化初期病変と考えられる score 1, 2, 3 の領域において、各々 $21.8 \pm 7.1\%$ ($p < 0.01$), $24.9 \pm 6.8\%$ ($p < 0.01$), $19.2 \pm 5.0\%$ ($p < 0.01$) と有意な上昇を認めた。また逆に線維化の進んだ score 6, 7, 8 の領域においては、各々 $8.0 \pm 2.4\%$ ($p < 0.05$), $5.7 \pm 3.3\%$ ($p < 0.01$), $3.1 \pm 1.9\%$ ($p < 0.01$)、と正常肺胞壁の毛細血管にくらべ著明な減少を認めた。

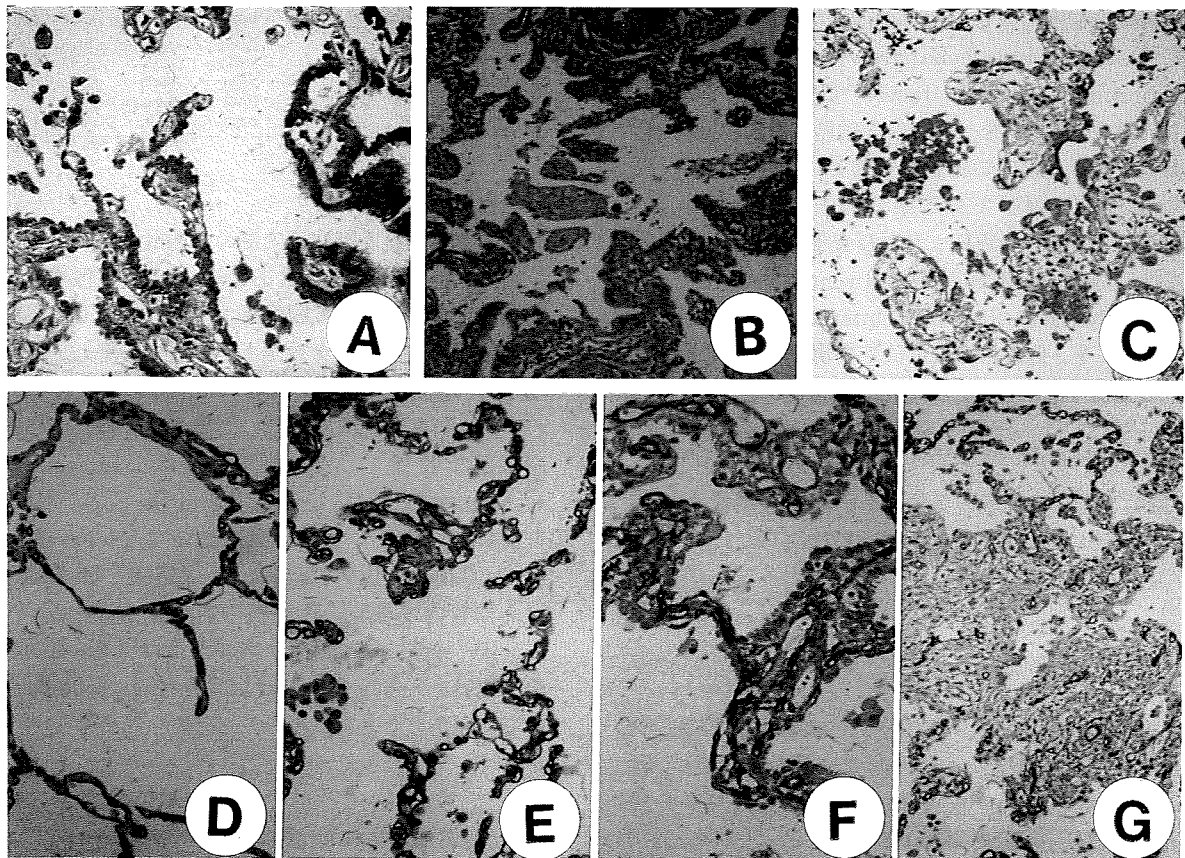


図 1 IIP 患者の肺組織切片の免疫組織染色標本。A ; VEGF, B ; bFGF, C ; IL-8, D-G ; CD34 に対する抗体で反応させたもの。D ; 正常肺, E ; スコア 1, F ; スコア 2, G はスコア 5。