

表1. 対象の特徴

	Ex-smoker		Current smoker	
	Emphysema (-)	Emphysema (+)	Emphysema (-)	Emphysema (+)
Number of subjects	9	12	16	28
Age, yr	66 ± 3	59 ± 3	56 ± 3	57 ± 2
pack-years of smoking	34 ± 8	42 ± 4	45 ± 4	47 ± 4
VC, % pred	124 ± 4	108 ± 3*	110 ± 3*	110 ± 2*
FEV <sub>1</sub> , % pred	129 ± 5	57 ± 5*#	107 ± 5*	90 ± 3*#
FEV <sub>1</sub> /FVC, %	79 ± 2	68 ± 3*#	80 ± 2	70 ± 2*#
D <sub>LCO</sub> /V <sub>A</sub> , % pred	96 ± 6	74 ± 4*#	90 ± 2	73 ± 4*#

\*: p < 0.05 compared to ex-smokers without emphysema  
#: p < 0.05 compared to current smokers without emphysema

(mean ± SE)

表2. 肺胞洗浄 (BAL) 液の特徴

	Ex-smoker		Current smoker	
	Emphysema (-)	Emphysema (+)	Emphysema (-)	Emphysema (+)
Recovery rate, %	51.6 ± 4.8	35.1 ± 4.4*	46.3 ± 4.0	34.5 ± 3.6*#
Albumin, mg/ℓ	51.1 ± 8.0	50.3 ± 7.9	34.9 ± 2.9	47.0 ± 6.9
Total cells, × 10 <sup>-4</sup> /ℓ BAL fluid	9.1 ± 2.2	12.3 ± 2.8	26.7 ± 5.5	30.5 ± 6.5
Viability, %	87.6 ± 1.6	83.5 ± 3.2	92.1 ± 1.5	85.3 ± 2.1
Macrophages, × 10 <sup>4</sup> /ℓ BAL fluid	7.7 ± 1.7	9.5 ± 2.2	23.1 ± 5.6	27.9 ± 6.7
Neutrophils, × 10 <sup>4</sup> /ℓ BAL fluid	0.05 ± 0.01	0.15 ± 0.07	0.90 ± 0.52	0.59 ± 0.23

\*: p < 0.05 compared to ex-smokers without emphysema  
#: p < 0.05 compared to current smokers without emphysema

(mean ± SE)

BAL 液中の HNL 濃度は、気腫病変を有する 2 群で喫煙・禁煙に拘らず、気腫病変のない喫煙者に比べて有意に高かった (44.0 ± 8.0 SE and 47.8 ± 13.1 vs. 12.6 ± 1.6 ng/ml BAL fluid) (図1)。HNL 濃度が高いサンプルについて Western blot を施行したところ、24、45、68 kDa の分子量のバンドが検出されこれらはそれぞれ HNL の monomer、dimer、trimer と一致した (図省略)。さらに、130 kDa の band も検出され、これは、HNL-

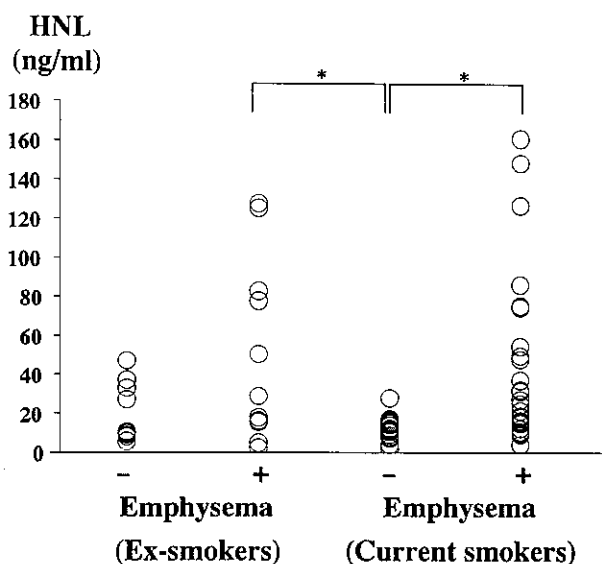


図1. BAL 液中 human neutrophil lipocalin (HNL) 濃度と喫煙、気腫病変との関係

MMP-9 複合体の分子量に合致した。BAL 液中 MMP-9 濃度は、気腫病変のある 32 名の被験者のうち 22 名 (喫煙者 14 名、禁煙者 8 名) の検体で測定感度以上であったのに対し、気腫病変のない被験者では 22 名中わずか 4 名 (喫煙者 2 名、禁煙者 2 名) のみであった。喫煙者、禁煙者それぞれの中で BAL 液中 MMP-9 濃度は、気腫病変を有する群では気腫病変のない群に比べて有意に高値を示した (median 0.79 ng/ml; range 0.39-26.0 vs. median 0.39 ng/ml; range 0.39-1.91, p < 0.01, and median 1.08 ng/ml; range 0.39-6.89 vs. median 0.39 ng/ml; range 0.39-1.66, p < 0.05) (図2)。一方、肺

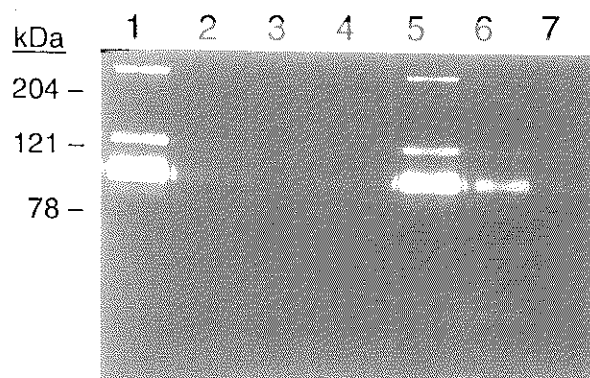


図2. Gelatin zymography (line1: 好中球溶解液, line2-4: 肺気腫病変のない被験者の BAL 液, Line5-7: 肺気腫病変のある被験者の BAL 液) 説明は本文参照

胞マクロファージ培養上清中のMMP-9濃度は気腫病変のある10名、気腫病変のない5名の間で差はなかった(4.8 ± 1.2 SE vs. 8.8 ± 1.6ng/ml, NS)。BAL液を検体として用いたgelatin zymographyを図3に示す。気腫

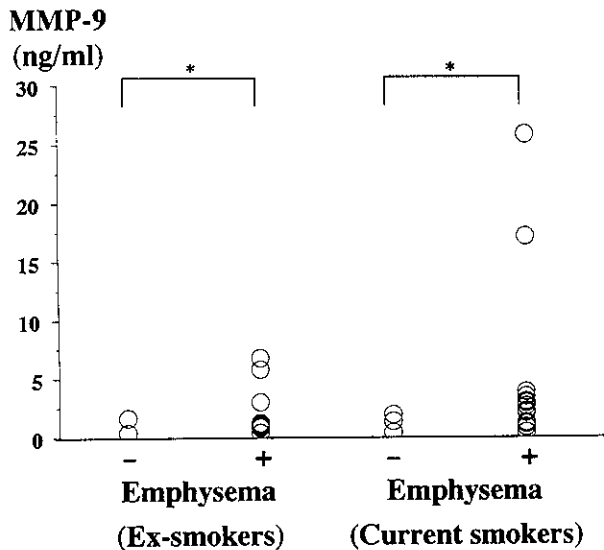


図3. BAL液中MMP-9濃度と喫煙、気腫病変との関係

病変のない喫煙者 (Lane 2-4) ではわずかに92 kDaのMMP-9活性が検出されるのみであるが、気腫病変のある喫煙者 (Lane 5-7) のうち2名ではさらに130 kDにも活性が検出される。これは、HNLとの複合体と推定され、MMP-9が好中球由来であることを示唆する。一方、肺胞マクロファージ培養液を用いたgelatin zymographyでは、92 kDaのバンドしか検出されず、気腫病変の有無で差がなかった。BAL液中MMP-8濃度については気腫病変のある25名ではその内23名が測定感度以上であったのに対し、気腫病変のない14名では8名のみであった。BAL液中MMP-8濃度も、気腫病変を有する2群では気腫病変のない喫煙者群に比べて有意に高値を示した (median 1.07ng/ml; range 0.06-16.67 and median 0.38; range 0.08-15.0 vs. median 0.06ng/ml; range 0.06-2.33, 共にP<0.01) (図省略)。

### 考案・結論

我々の一連の研究の特徴は、その対象として臨床的に明らかな肺気腫患者ではなく、肺CT検査によって早期あるいは軽度の気腫病変を有する被検者を選んでいることにある。そのためもあって、肺気腫ありと診断された被験者であってもBAL液中好中球数は増加していない。しかも、喫煙歴が同様でありながら気腫病変のない群を対照とすることによって、喫煙自体による影響と喫煙者の

中で肺気腫を発症する機序とを分離評価することが可能である。今回の研究では、最近、好中球2次顆粒より同定された25 kDaの糖蛋白であるHNLに着目した<sup>7)</sup>。この蛋白は好中球が活性化された際に分泌されると推定されているが、その機能はまだ明らかではない。今回の結果は、BAL液中好中球数や現在の喫煙状況とは全く無関係に気腫病変のある群ではない群に比べてBAL液中HNL濃度が著明に高いことを示した。一方、MMPsはその活性中心にZn<sup>2+</sup>を有し、酵素活性にCa<sup>2+</sup>を必要とする中性プロテアーゼ群の総称で、生体の細胞外マトリックスを分解することから、近年、肺気腫の成因に関わる酵素としても関心を集めている<sup>8)9)</sup>。しかし、多くの場合、その分泌担当細胞としては肺胞マクロファージを想定している研究が多く、本研究のように好中球由来のMMPsに着目したものはほとんどない。今回我々は、好中球由来のMMP-8が早期肺気腫患者のBAL液中で高いことを示したばかりではなく、MMP-9についても同様の傾向があり、しかもMMP-9/HNL複合体の存在により少なくとも一部は好中球由来であることを証明した。これらの結果はすべて、早期肺気腫病変形成における好中球の関与を示唆するものである。同様の対象群で、我々はすでにBAL液中NE- $\alpha$ 1-PI complexが高値であること、IL-8・LTB4などの好中球遊走・活性化因子も増加していることを報告している<sup>2)1)</sup>。また、喫煙によりエラスチン分解産物であるEDPはBAL液中で増加し、好中球エラスターゼ活性やNE- $\alpha$ 1-PI complex値とも相関する。これらの結果は、BAL液中好中球数の明らかな増加はなくとも、初期肺気腫病変形成には好中球の肺内集積あるいは活性化が重要であることを示唆しているものと考えられる。

### 参考文献

- 1) Senior RM, Shapiro SD. Chronic obstructive pulmonary disease: epidemiology, pathophysiology, and pathogenesis. In: Fishman, ed. Pulmonary disease and disorders: The McGraw-Hill Companies: 659-681, 1997.
- 2) Yoshioka A, Betsuyaku T, Nishimura M, Miyamoto K, Kondo T, Kawakami Y. Excessive neutrophil elastase in bronchoalveolar lavage fluid in subclinical emphysema. Am J Respir Crit Care Med, 152: 2127-2132, 1995.
- 3) Betsuyaku T, Nishimura M, Yoshioka A, Takeyabu K, Miyamoto K, Kawakami Y. Elastin-derived peptides and neutrophil elastase in

- bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Respir Crit Care Med*, 154 : 720-724, 1996.
- 4) 西村正治, 谷野美智枝, 別役智子, 竹藪公洋, 宮本顕二, 川上義和. 早期肺気腫病変形成における好中球遊走因子の関与. 厚生省特定疾患「呼吸不全」調査研究班平成9年度研究報告書, pp59-62, 1998.
  - 5) Xu S, Petersson CGB, Carlson M, Venge P. The development of an assay for human neutrophil lipocalin (HNL) -to be used as a specific marker of neutrophil activity in vivo and vitro. *J Immunol Methods*, 171 : 245 -252, 1994.
  - 6) Hibbs MS, Hastay KA, Seyer JM, Kang AH, Mainardi CL. Biochemical and immunological characterization of the secreted form of human neutrophil gelatinase. *J Biol Chem*, 260 : 2493 -2500, 1985.
  - 7) Borregaard N, Cowland JB. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood*, 89 : 3503-3521, 1997.
  - 8) Tetley TD. Matrix metalloproteinases : a role in emphysema. *Thorax*, 52 : 495, 1997.
  - 9) Hautamaki RD, Kobayashi DK, Senior RM, Shapiro SD. Requirement of macrophage elastase for cigarette smoke-induced emphysema in mice. *Science*, 277 : 2002-2004, 1997.

# HO-1 遺伝子多型性と肺気腫発症の関連性の解析

沖永 壯治 山田 紀広 山谷 睦雄\*\*\* 関沢 清久  
佐々木英忠

## はじめに

喫煙は肺気腫の主要な危険因子とされているが、しかし喫煙者が肺気腫に罹患するのはそのなかの10~15%である<sup>1)</sup>。喫煙者が肺気腫に罹患する背景には喫煙以外の要因、環境因子や遺伝因子が関与していると考えられている。喫煙による肺気腫発症の機序のひとつに喫煙がもたらす活性酸素の関与があり、従って喫煙者で肺気腫に罹患する者は遺伝的に活性酸素を不活化する作用が弱いという可能性が考えられる。

ヘムオキシゲナーゼ (HO-1) は、本来ヘム分解反応を触媒する酵素であるが、ラットHO-1が熱ショック蛋白であることが発見されて以来<sup>2)</sup>、HO-1の様々な役割が見出されてきた。なかでもHO-1は強力な抗酸化作用を有し<sup>3)</sup>、呼吸器の恒常性維持に重要な働きを演じていることがわかってきた<sup>4) 5)</sup>。

HO-1 遺伝子はラットでは熱ショックにより転写レベルの誘導を受けるが、マウス<sup>6)</sup> やヒト<sup>7)</sup> では誘導されない。ヒトHO-1 遺伝子の5' 上流域には熱ショック蛋白の遺伝子に必要なヒートショックエレメント (HSE) は確かに存在し、なおかつそれ自体は十分に機能するものであることがわかっている<sup>8)</sup>。これはヒトHO-1 遺伝子にはHSEを抑制する何らかの作用があり、そのひとつはHSEのすぐ下流にあるGTの反復配列であることがわかっている<sup>9)</sup>。さらにこのGT反復配列は個体によって長さが異なるという多型性があることが判明した<sup>9)</sup> (Fig.1)。HO-1 遺伝子のシスエレメントは細胞がストレスを受けた際にHO-1 遺伝子を発現させるために重要であり、GT反復配列の長短が発現量の大小に影響することが考えられる。

そこで、喫煙による肺気腫発症のし易さとHO-1 遺伝子の酸化ストレス時の発現し難さ、即ちGT反復配列の長短が関係しているという仮説をたて、これを検証した。

東北大学医学部附属病院老人科

\* 「呼吸不全」調査研究班 研究協力者

\*\* 横断的基礎研究グループ構成員

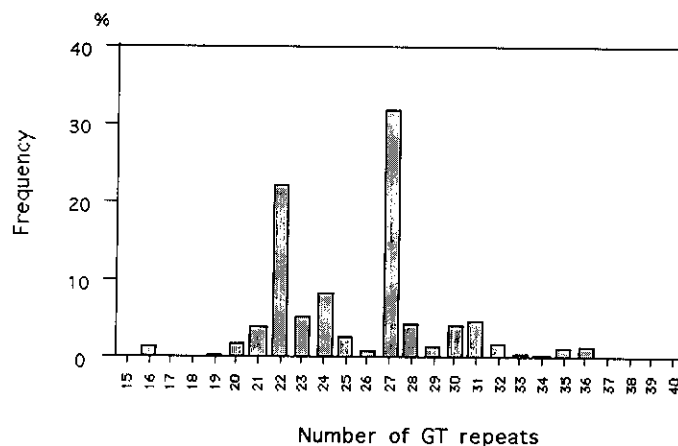


Fig.1 Frequency of the polymorphism for a (GT)<sub>n</sub> repeat in the human HO-1 gene (Kimpara et al. 1997)

## 対象と方法

対象は年齢50歳以上の喫煙歴のある男性で、第1群 (肺気腫群)、第2群 (非肺気腫群) にわける。肺気腫の診断は原則的に、慢性閉塞性肺疾患、気管支喘息の診断と治療指針 (日本胸部疾患学会1995年) に従い、理学的所見、呼吸機能所見、胸部画像所見などを参考にした。喫煙者はブリックマン指数で400以上とした。以上の2群から血液を採取しDNA抽出した。これを鋳型としてPCRを行った。2種のプライマーはHO-1 遺伝子5' 上流域のGT反復配列領域をはさむ位置とした。その際プライマーの一方を蛍光色素でラベルし、PCR産物のシーケンスを行いGT反復配列の長さを測定した。さらに、GT反復配列多型性間におけるHO-1 遺伝子発現の相違をトランスフェクションを用いた一過性の遺伝子発現で調べた。レポーター遺伝子としてルシフェラーゼ遺伝子を用い、GT反復配列数20、29、38の3群間で比較を行なった。

## 結果

PCR産物のシーケンスの結果、各々の個体において

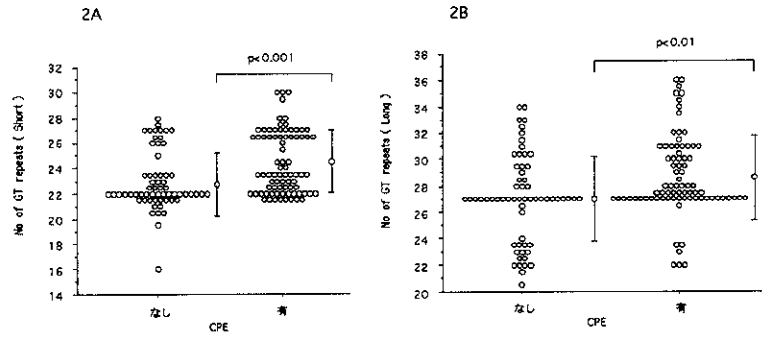


Fig.2 Comparison of number of GT repeats in the human HO-1 gene between with and without CPE. (2A : short, 2B : long) (mean ± SEM)

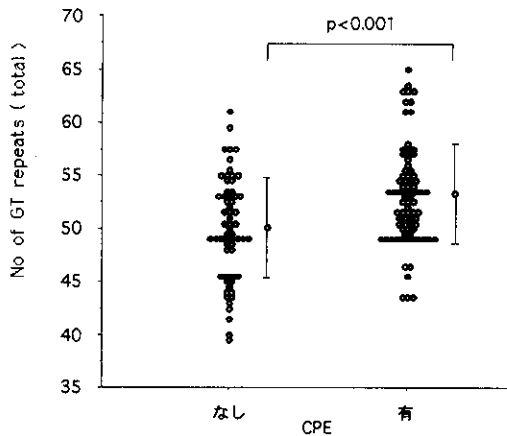


Fig.2C Comparison of number of GT repeats in the human HO-1 gene between with and without CPE. (2A : short, 2B : long) (mean ± SEM)

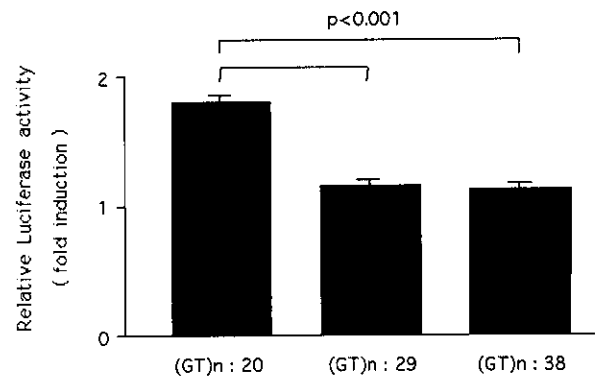


Fig.3. Effects of GT repeats on HO-1 gene expression in Hep3B cells by  $H_2O_2$  (500  $\mu$ M, 3 hours) treatment. (mean ± SEM, n = 10)

長さの異なる2つのピークが検出された。短鎖、長鎖および合計について2群間で比較を行ったところ、GT反復配列数はいずれも肺気腫群で有意に長いという結果が得られた (Fig.2 A, B, C)。

Fig.3にルシフェラーゼアッセイの結果を示した。過酸化水素 (500 $\mu$ M、3時間) 刺激後のルシフェラーゼ活性は、GT反復配列数29、38に比べ20のもので有意に高いという結果が得られた。

### 考案・結論

従来、肺気腫の発症要因としてプロテアーゼ・抗プロテアーゼの不均衡が提唱されてきたが、最近これに加えオキシダント・抗オキシダントの不均衡が指摘されている。今回の研究では、抗酸化作用を有する酵素であるHO-1の発現が肺気腫患者で低下しているという仮説をたて、HO-1遺伝子GT反復配列多型性と肺気腫発症との関連に

ついて検討した。結果、HO-1遺伝子GT反復配列には多型性が存在し、肺気腫群で有意に長い傾向を認め、さらにGT反復配列数とHO-1発現量との間に負の相関関係を認めたことから肺気腫の発症要因としてHO-1遺伝子多型性の関与が示唆された。

HO-1遺伝子の発現機構は詳細に調べられており、誘導刺激 (Fig.4) によりその誘導経路が異なる<sup>10)</sup> (Fig.5)。実際に喫煙という酸化刺激がHO-1発現の際どの経路をとるかという事は今後の課題である。HO-1のいくつかの機能 (Fig.6) のうち抗酸化作用はその代謝産物 (Fig.7) のひとつのビリルビンの関与が有力である<sup>11)</sup>。強力なラジカルスカベンジャーであるビリルビンを介してHO-1は抗酸化作用を示すと考えられており、炎症を沈静化に向かわせることが報告されている<sup>4)</sup>。従って肺気腫に限らず、多くの炎症性肺疾患にもHO-1が関与していることが考えられる。

Hemin/Heme	Heat Shock
LPS	UV Light
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hyperoxia
Heavy Metals	Hypoxia
TPA	Hypertension
IL-1, IL-6	Inflammation
TNF- $\alpha$	
Arsenite	

Fig.4 Inducers for the transcriptional expression of HO-1 gene.

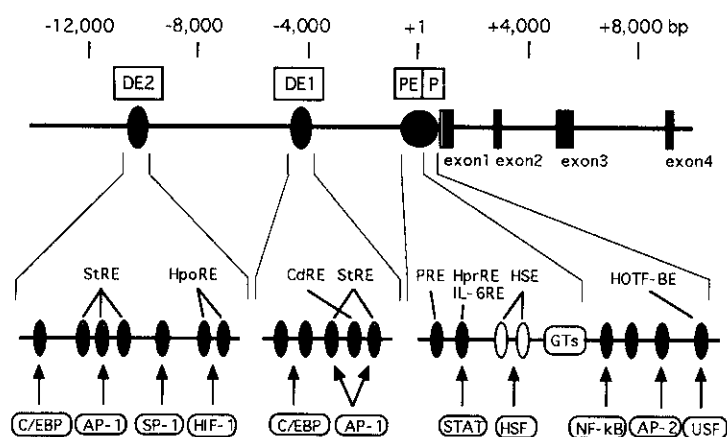


Fig.5 *Cis*-regulatory elements and *trans*-acting factors for human HO-1 gene.

### 参考文献

- 川根博司：喫煙と肺気腫。臨床医 1997：23：890 - 893.
- Shibahara S, Muller RM, Taguchi H：Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. J Biol Chem 1987；262：12889 - 12892.
- Vogt BA, Alam J, Croatt AJ, et al：Acquired resistance to acute oxidative stress：Possible role of heme oxygenase and ferritin. Lab Invest 1995；72：474 - 483.
- Willis D, Moore AR, Frederick R, et al：Heme oxygenase：A novel target for the modulation of the inflammatory response. Nat Med 1996；2：87 - 90.
- Otterbein L, Sylvester SL, Choi AMK：Hemoglobin provides protection against lethal endotoxemia in rats：The role of heme

- Heme and hemoprotein metabolism.
- Antioxidative stress protein.
- Carbon monoxide synthase.

Fig.6 Biological function of heme oxygenase

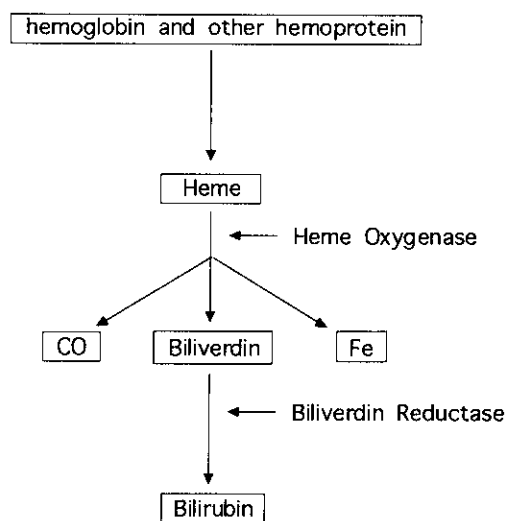


Fig.7 Pathway of heme breakdown.

- oxygenase-1. Am J Respir Cell Mol Biol 1995；13：595 - 601.
- Alam J, Cai J, Smith A：Isolation and characterization of the mouse heme oxygenase -1 gene. J Biol Chem 1994；269：1001 - 1009.
- Shibahara S, Sato M, Muller R, et al：Structural organization of the human heme oxygenase gene and the function of its promoter. Eur J Biochem 1989；179：557 - 563.
- Okinaga S, Takahashi K, Takeda K, et al：Regulation of human heme oxygenase-1 gene expression under thermal stress. Blood 1996；87：5074 - 5084.
- Kimpara T, Takeda A, Watanabe K, et al：Microsatellite polymorphism in the human heme oxygenase-1 gene promoter and its application in association studies with Alzheimer and Parkinson disease. Hum Genet 1997；100：145 - 147.

10. Choi AMK, Alam J : Heme oxygenase-1 : Function, regulation, and Implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996 : 15 : 9 – 19.
11. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, et al : Bilirubin is an Anti-oxidant of possible Physiological Importance. *Science* 1987 : 235 : 1043 – 1046.

# ウイルス感染による慢性肺気腫急性増悪の解明

山谷 陸雄\* 鈴木 朋子 賈 玉霞 中山 勝敏  
関沢 清久 佐々木英忠

## はじめに

気管支喘息や慢性気管支炎はウイルス感染が引き金になって急性増悪し、呼吸不全をきたすことが多い。ライノウイルス、インフルエンザウイルス、RSウイルスなどが同定され、二次性の細菌感染が更に症状を悪化させる<sup>1)</sup>。ウイルス感染は気道上皮の剥離脱落や気道壁の浮腫を介して気道内腔を狭窄すると言われている。また、炎症性サイトカイン、ヒスタミンやキニンが気道炎症や気管支平滑筋収縮を生じて気流障害を促すと考えられている。慢性肺気腫も感冒を機会に急性増悪すると知られているが、起因ウイルスの同定や病態の把握はこれまでなされていない。ライノウイルスは感冒の主体をなすと報告されている。これまでmajor groupライノウイルスがICAM-1を受容体を介して気道上皮に感染すると知られてきたが、minor groupライノウイルスの気道上皮細胞への感染受容体は調べられていない。本年度は1)慢性肺気腫の急性増悪をきたす起因ウイルスの同定と急性増悪の際の病態、および2)minor group2型ライノウイルスの感染受容体の確認および、感染気道上皮の炎症性サイトカイン、受容体発現につき研究を行った。また、3年間のまとめを考察で総括した。

## 対象と方法

① 当科通院中の慢性肺気腫患者20人を対象に気道感染症状に随伴した急性増悪時に咽頭ぬぐい液を採取した。Numazakiらの方法によって、咽頭ぬぐい液を感受性のある細胞に接種してウイルスを増殖し、免疫学的手法により同定した<sup>2)</sup>。患者の肺機能を検討するため、動脈血血液ガス分析とピークフロー値を測定した。ピークフロー値はピークフローメーター(Personal Best)で測定した。ウイルス感染による気道炎症を検討するため、呼気一酸化炭素濃度を測定した<sup>3)</sup>。呼気一酸化炭素(CO)濃度

はCO測定器(portable Bedfont EC analyzer)で測定した。急性増悪時の血中因子の変化を検討するため、血中IL-1、IL-4、IL-5、IL-6、および可溶性ICAM-1を測定した。

② 剖検気管上皮細胞を滅菌試験管に培養し、2型ライノウイルス10<sup>4</sup> TCID<sub>50</sub>/mlを60分間感染させた<sup>4)</sup>。1、3および5日後に培養液を回収し、新しい培養液と交換した。培養液の2型ライノウイルス量を線維芽細胞に対する細胞変性効果を用いて測定した。培養液のIL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 濃度をELISA法で測定した。2型ライノウイルスの感染受容体を確認するため、抗LDL受容体抗体(50  $\mu$ g/ml)を気管上皮細胞に前処置後2型ライノウイルスを感染させて、培養液ライノウイルス量、IL-1 $\beta$ およびIL-6量を比較した。2型ライノウイルス感染による気管上皮細胞のLDL受容体発現量変化を検討するため、気管上皮細胞のRNA抽出を時間経過で行った。

## 結果

① 慢性肺気腫20例中8例において気道感染症状に随伴した急性増悪を生じた。8例中2例でA型インフルエンザウイルスを同定した。また、2型アデノウイルスと単純ヘルペスウイルスをそれぞれ1例検出した(表1)。8例それぞれにおいて、急性増悪時に動脈血酸素分圧とピークフロー値が低下し、治療によって回復した(図1)。気道炎症を表す呼気一酸化炭素濃度も、急性増悪時に上昇し、治

表1 対象患者および同定ウイルス。

慢性肺気腫 症例数	感冒罹患数	症状増悪数	検出ウイルス	
20	8	8	Flu	2
			HSV	1
			Adeno	2

Flu,インフルエンザ; HSV,単純ヘルペスウイルス; Adeno,アデノウイルス。

東北大学医学部附属病院老人科

\*「呼吸不全」調査研究班 研究協力者



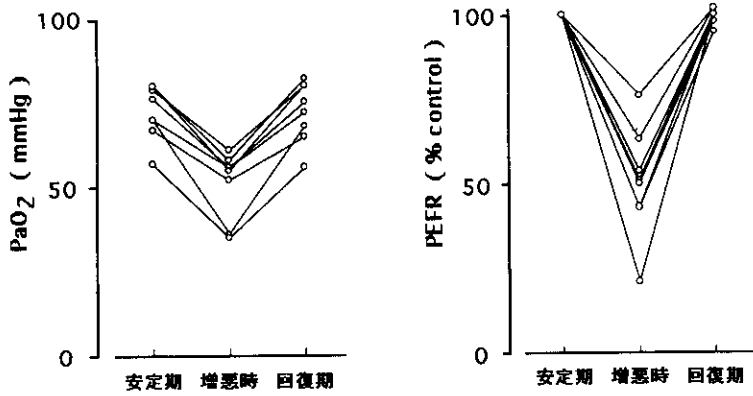


図1 慢性肺気腫患者の気道感染前後における動脈血酸素分圧 (PaO<sub>2</sub>) およびピークフロー値 (PEFR) の変化。

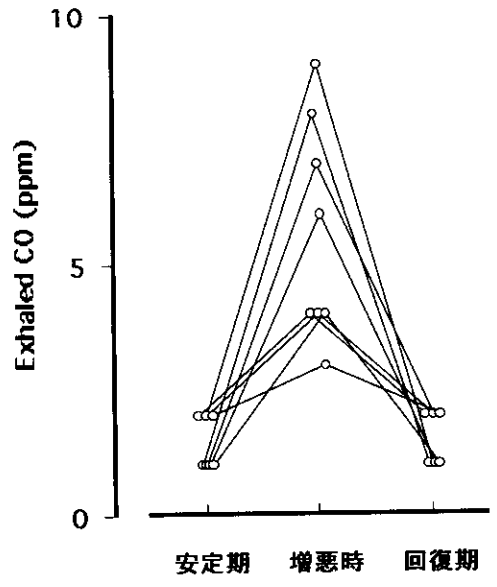


図2 慢性肺気腫患者の気道感染前後における呼気一酸化炭素濃度の変化。

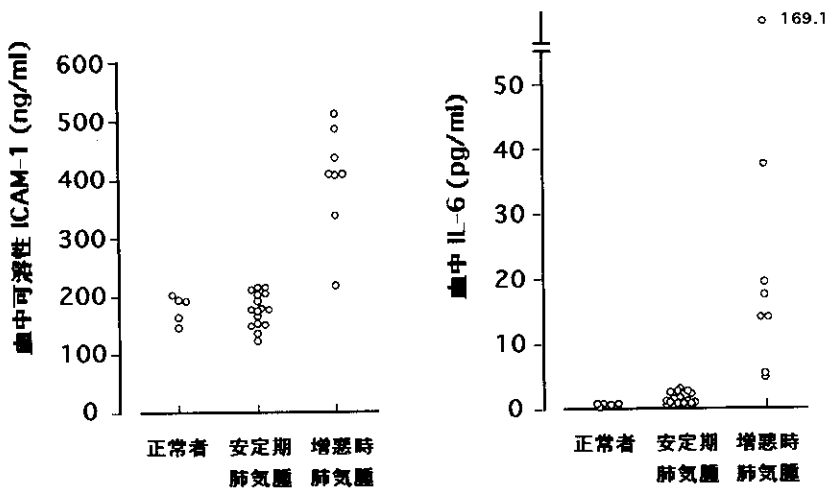


図3 正常者、安定期慢性肺気腫患者、急性増悪時慢性肺気腫患者の血中 ICAM-1 および IL-6 濃度。

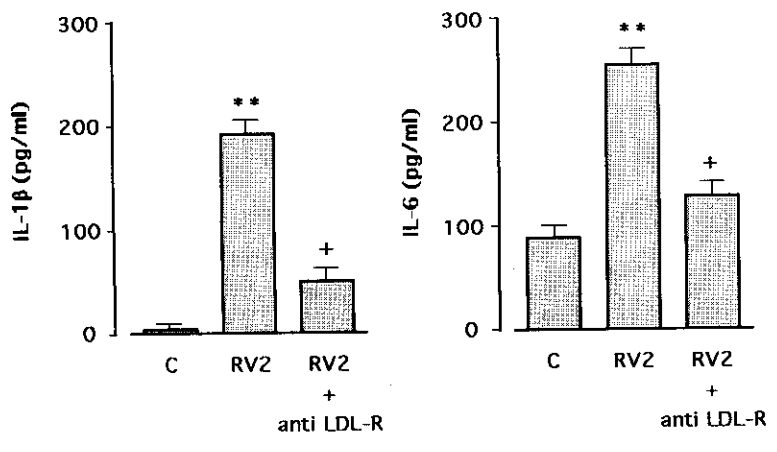


図4 2型ライノウイルス感染 (RV2) によるヒト気管上皮培養液IL-1 $\beta$ およびIL-6増加 (\* p < 0.05)。抗低比重リポ蛋白受容体抗体 (anti LDL-R) はサイトカイン合成を抑制した (+ p < 0.05)。C; コントロール。

療によって元の値に戻った (図2)。血中 IL-6 と可溶性 ICAM-1 は急性増悪の慢性肺気腫患者において有意に高い値を示した (図3)。血中 IL-1 $\beta$ 、IL-4、IL-5 は急性増悪で変化しなかった。

② 2型ライノウイルスは培養気管上皮細胞に感染した。培養液中の2型ライノウイルス量は時間経過とともに増加し、1、3、5日目にそれぞれ  $3.1 \pm 0.3$ 、 $4.2 \pm 0.2$ 、 $3.7 \pm 0.5 \log \text{TCID}_{50}/\text{ml}$  (平均  $\pm$  標準誤差、 $n = 7$ ) であった。抗 LDL 受容体抗体処理後、培養液ライノウイルス量は明らかに減少した ( $1.4 \pm 0.2 \log \text{TCID}_{50}/\text{ml}$ 、1日目) また、抗 LDL 抗体処理後に2型ライノウイルスを感染させた場合、培養液 IL-1 $\beta$ 、IL-6ともに減少した (図4)。培養気管上皮の LDL 受容体 mRNA 発現量は2型ライノウイルス感染後、時間経過とともに増加した (図5)。

考案・結論

本年度の研究で慢性肺気腫のウイルス感染時に低酸素血症とピークフロー値低下を生ずることが明らかになった (図6)。これは気管支喘息や慢性気管支炎の急性増悪に共通している<sup>4) 5)</sup>。IL-6 と可溶性 ICAM-1 の増加はウイルス感染に伴う気道上皮細胞の IL-6、ICAM-1 合成増加に一致している。気道上皮のみな

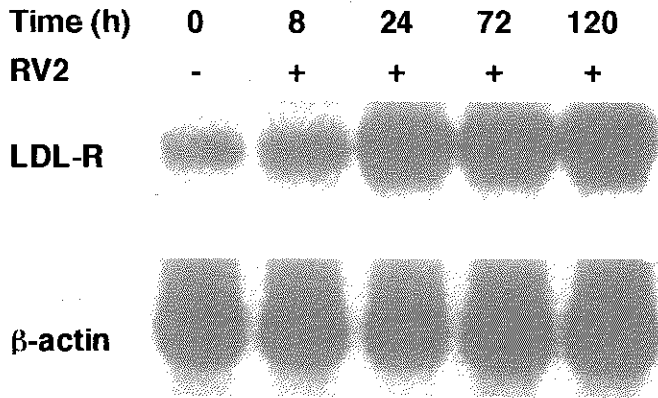


図5 2型ライノウイルス感染によるヒト気管培養上皮細胞の低比重リポ蛋白受容体 (LDL-R) mRNA 合成増加。

2型ライノウイルスはICAM-1合成も増加しており、ライノウイルスの血清型が100種以上あることより、受容体合成増加がライノウイルスの反復感染<sup>1)</sup>に関係している可能性がある。major groupもminor groupも同種の炎症性サイトカインと双方の受容体発現を活性化した。14型ライノウイルスもLDL受容体発現を亢進(未発表)した。共通の機序を介して気道浮腫、気道炎症を生じ、慢性肺気腫の急性増悪をもたらすと推測される(図6)。ウイルス感染予防はワクチンが最も有効であるが、ライノウイルスは100種以上の血清型があり、有効性が問題となる。ICAM-1およびLDL受容体の発現抑制および炎症性因子抑制を介した治療法も可能性を有すると考えられる(図6)。

参考文献

- 1) Johnston SL, Pattemore PK, Sanderson G, et al: Community study of role of viral infections of asthma in 9-11 year old children. BMJ 1995;310:1225-1228.
- 2) Numazaki Y, Oshima T, Ohmi A, et al: A microplate method for isolation of viruses from infants and children with acute respiratory infections. Microbiol Immunol 1987;31:1085-1095.
- 3) Yamaya M, Sekizawa K, Ishizuka S, et al: Increased carbon monoxide in exhaled air of subjects with upper respiratory tract infections. Am J Respir Crit Care Med 1998;158:311-314.
- 4) Terajima M, Yamaya M, Sekizawa K, et al: Rhinovirus infection of primary cultures of human tracheal epithelium: role of ICAM-1 and IL-1b. Am J Physiol 1997;273:L749-L759.
- 5) Gump DW, Phillips CA, Forsyth BR, et al: Role of infection in chronic bronchitis. Am Rev Respir Dis 1976;133, 465-474.

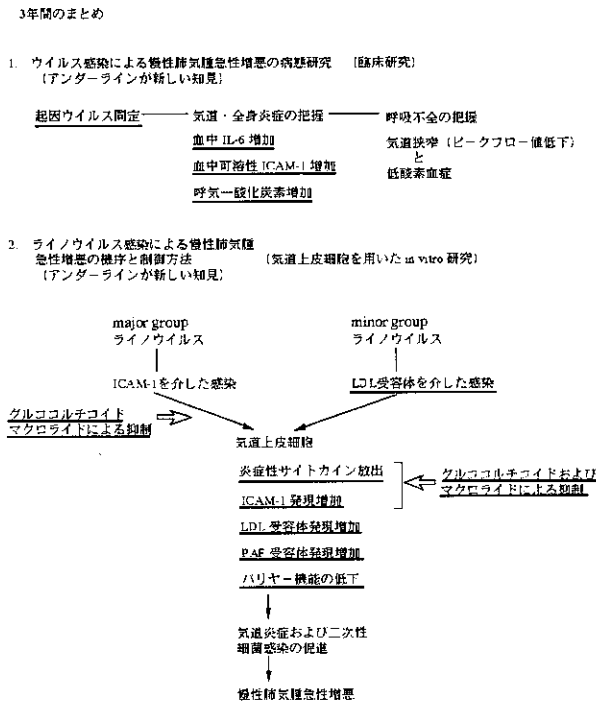


図6 3年間のまとめ図

らず、肺および一部分全身の炎症が関係している可能性がある。in vitro研究で2型ライノウイルスが気管上皮細胞の低比重リポ蛋白(LDL)受容体を介して感染することを明らかにした。上皮細胞はライノウイルス感染後炎症性サイトカイン合成とLDL受容体合成を増加した。

# 好中球エラスターゼによる細胞の形態変形と剥離： アクチン重合の関与

堀江 孝至\* 橋本 修 丸岡秀一郎 権 寧博  
松本 健

## はじめに

好中球エラスターゼ (NE) による気道傷害の発生機序は、主に細胞外マトリックスの分解による細胞傷害であると考えられてきた。以前、我々は、NEにはこのような作用に加えて、NE刺激により活性化された Rho pathway、myosin light chain kinase (MLCK) および extracellular signal-regulated kinase (Erk) が気道上皮細胞の形態変化を惹起し、気道上皮細胞の剥離を促すことを報告した<sup>1)</sup>。細胞形態の変化に関与する細胞の収縮反応と細胞骨格の構造維持は、細胞のアクチン収縮反応と actin fiber の重合を制御する myosin light chain (MLC) のリン酸化が関与し、Rho pathway と MLCK により制御されている<sup>2, 3)</sup>。そこで、本研究ではこの点に注目し、actin fiber を染色し、NE 刺激による細胞の形態の変化と剥離における細胞収縮および actin fiber 重合の関与に関して検討した。さらに、NE による気道炎症性疾患の治療法の基礎的検討を目的として、吸入ステロイドおよびエラスターゼ阻害薬の NE による気道上皮細胞の形態変化と剥離に対する効果を検討した。

## 材料・方法

1. 細胞気管上皮細胞株 NCI-H292、肺胞 II 型上皮細胞株 A549 は ATCC から入手した。

### 2. Reagent

NE (Sigma)、KT5926 (Sigma)、exoenzyme C3 from *C. botulinum* (List Biological Laboratories)、FITC 標識 phalloidin (Sigma)、 $\alpha$ -actinin (Sigma)、FITC 標識抗マウス IgG (Sigma)、becromethasone-dipropionate (BDP: Glaxo)、budosonide (BD: Astra)、dexamethasone (DEX: Sigma)、ONO5046 (小野薬

品工業)。

### 3. 細胞培養

Actin、 $\alpha$ -actinin 分布の観察は I 型コラーゲンコートした slide chamber に、吸入ステロイドとエラスターゼ阻害薬の効果はコラーゲンコートマイクロプレートに NCI-H292 は 10% FCS 加 RPMI 1640、A549 は 10% FCS 加 Eagle MEM で confluent の状態に培養し、無血清培地に置換し培養した。

4. アクチン線維、 $\alpha$  アクチニン分布の観察気道上皮細胞を C3 ( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) あるいは KT5926 ( $1 \mu\text{M}$ ) で 1 時間、前処理した後に NE ( $0.5 \text{ U}/\text{ml}$ ) で刺激した。その後、位相差顕微鏡で細胞の状態を観察し、gap 形成の開始時に actin fiber は FITC 標識 phalloidin で染色し、 $\alpha$ -actinin は抗  $\alpha$ -actinin 抗体で染色後に FITC 標識抗マウス IgG 抗体で染色し、confocal laser microscope で細胞を観察した。染色の対照細胞として actin fiber が良く染色される肺線維芽細胞を使用した。

5. 吸入ステロイドおよびエラスターゼ阻害薬の効果吸入ステロイドとして BDP ( $10^{-5}\text{M} \sim 10^{-7}\text{M}$ )、BD ( $10^{-5}\text{M} \sim 10^{-7}\text{M}$ )、エラスターゼ阻害薬として ONO5046 ( $1\text{mg}/\text{ml}$ ) で気道上皮細胞を 1 時間、前処理後に NE ( $0.5 \text{ U}/\text{ml}$ ) で刺激し、経時的に細胞を位相差顕微鏡で観察した。

## 成績

### 1. アクチン線維の分布

FITC-phalloidin 染色の対照として用いた肺線維芽細胞では actin fiber は細胞質を横断するようにフィラメント状に観察された。しかし、無刺激の肺胞 II 型上皮細胞では actin fiber は細胞質の周囲に弱く染色されるのみであった。NE 刺激では、細胞質周囲の actin fiber の染色性の増強が観察され、C3 あるいは KT5926 の前処理は NE による actin fiber の染色性の増強を抑制した (図 1)。気管支上皮細胞も同様の変化を示した。

日本大学医学部第一内科

\* 「呼吸不全」調査研究班 研究協力者

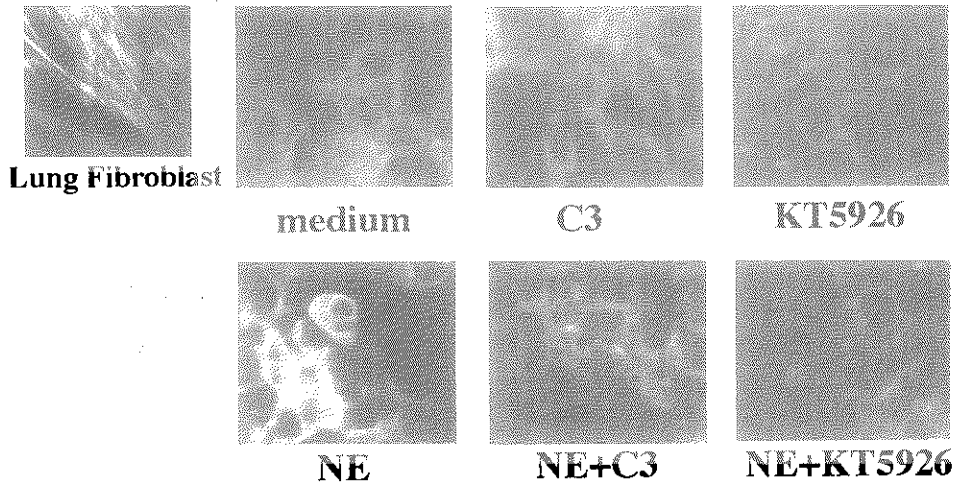


図1. The distribution of actin fibers in airway epithelial cells. Quiescent, serum-starved alveolar type II epithelial cell (A549) monolayer were preincubated with serum-free medium, C3 (5  $\mu$ g/ml) or KT 5926 (1  $\mu$ M) for 1 hour followed by the stimulation of NE (1.0 U/ml). Actin fibers were visualized using FITC-conjugated phalloidin when the beginning of development of gaps was seen (at 2 hours after stimulation of NE). Three identical experiments independently performed gave similar results. For the control, lung fibroblasts were stained with FITC-conjugated phalloidin (Figure 1, Lung fibroblast).

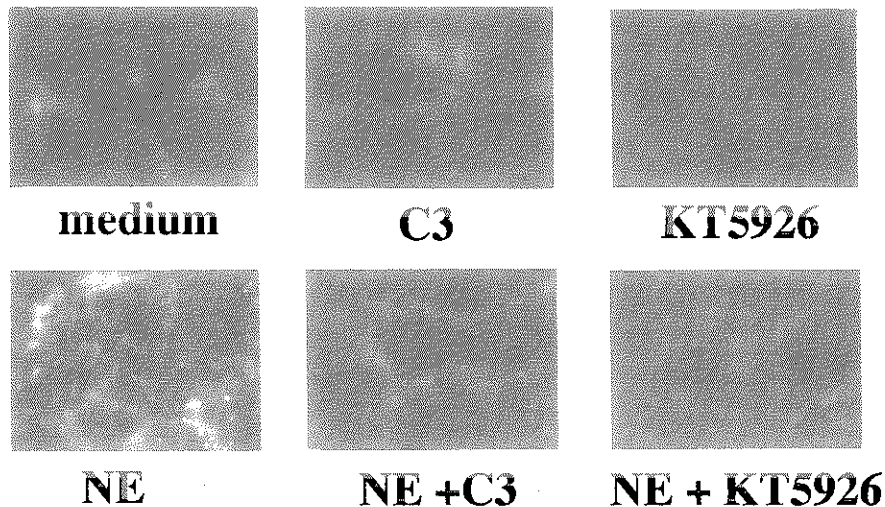


図2. The distribution of  $\alpha$ -actinin in airway epithelial cells. Quiescent, serum-starved alveolar type II epithelial cell (A549) monolayer were preincubated with serum-free medium, C3 (5  $\mu$ g/ml) or KT 5926 (1  $\mu$ M) for 1 hour followed by the stimulation of NE (1.0 U/ml).  $\alpha$ -actinin were visualized using anti- $\alpha$ -actinin antibody followed by FITC-conjugated anti-mouse IgG antibody when the beginning of development of gaps was seen (at 2 hours after stimulation of NE). Three identical experiments independently performed gave similar results.

## 2. $\alpha$ アクチニンの分布

無刺激の肺胞 II 型上皮細胞では、 $\alpha$ -actinin は弱く染色されるのみであったが、NE 刺激では  $\alpha$ -actinin の染色性が増強し、C3 あるいは KT5926 の前処理は NE 刺激

による  $\alpha$ -actinin の染色性の増強を抑制した (図 2)。気管支上皮細胞も同様の変化を示した。

## 3. 吸入ステロイドの効果

BDP、BD は NE による気管支上皮細胞の形態変化と

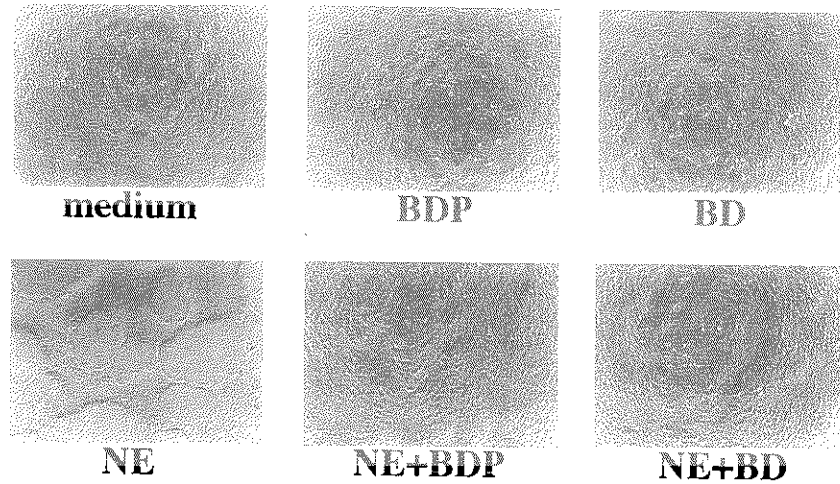


図3. Effect of inhaled corticosteroids, BDP and BD, on NE-induced the changes in overall morphology and the detachment of cell monolayer. Quiescent, serum-starved bronchial epithelial cells (NCI-H292) that had been preincubated with various concentrations of BDP or BD were stimulated with NE (0.5 U/ml), and then overall morphology of cell monolayer was examined under phase contrast microscopy.

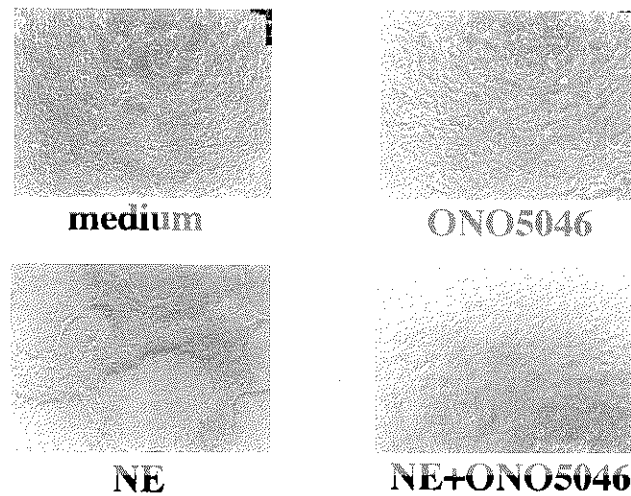


図4. Effect of elastase inhibitor, ONO5046 on NE-induced the changes in overall morphology and the detachment of cell monolayer. Quiescent, serum-starved bronchial epithelial cells (NCI-H292) that had been preincubated with ONO 5046 were stimulated with NE (0.5 U/ml), and then overall morphology of cell monolayer was examined under phase contrast microscopy.

剥離を濃度依存性に抑制した(図3)。さらに、BDP、BDで細胞を前処理した後に細胞を洗浄し、培養液中からBDP、BDを除いた条件下でNEで細胞を刺激した場合も、BDPおよびBDはNEによる気管支上皮細胞の形態変化と剥離を抑制した。

#### 4. エラスターゼ阻害薬の効果

ONO5046はNEによる気管上皮細胞の形態変化と剥離を抑制した(図4)。

#### 考察

本研究は、NE刺激により気道上皮細胞にactin fiberの染色性と $\alpha$ -actininの染色性の増強を明らかにし、これらの変化は細胞の形態変化と剥離と相関していた成績を示した。さらに、Rho活性阻害薬C3およびMLCK活性阻害薬KT5926はNE刺激によるactin fiberと $\alpha$ -actininの染色性の増強を抑制した。

NE刺激によるactin fiberの染色性の増強は、NE刺激によりRhoおよびMLCKが活性化され、アクチン系の細胞収縮反応とactin fiberの重合が惹起されたことを示唆した。また、NE刺激による $\alpha$ -actininの染色性の増強は、アクチン系の細胞収縮反応により細胞接着斑形成の増強が惹起されたことを示唆した。このように、NE刺激によりRhoおよびMLCKを介して細胞の収縮反応と接着性の増強を示唆する成績が得られたが、細胞はどのような機序で剥離するのであろうか。細胞形態と細胞接着性の維持はアクチン系の細胞収縮反応とこれに伴う細胞接着斑形成による接着性との均衡によって維持されており<sup>9)</sup>、細胞収縮反応が接着性を凌駕する時に細胞が剥離すると思われる。本研究が示した成績は、NEの細胞外マトリックス分解作用に加えて、NEによるアクチン系による細胞収縮が接着性を凌駕し、細胞が剥離したと考察される。今後、myosine light chain (MLC) のリン酸化を解析し、さらに詳細にMLCとactin fiberの関与を検討する予定である。

気管支喘息の治療薬として広く使用されているBDPおよびBDは、NE刺激による気管上皮細胞の形態変化と剥離を抑制した。BDPおよびBDで細胞を前処理した後に、BDPおよびBDを含む培養液を除去し細胞を洗浄し、その後NEで刺激した場合でもBDPとBDの抑制効果が見られた。この成績は、BDPおよびBDには抗エラスターゼ活性は有していないことを示した。BDPおよびBDが気管支上皮細胞にエラスターゼの作用を抑制する何らかの変化、即ち(1)NEの細胞表面上への結合阻害、(2)NEの細胞内への取込み阻害、(3)NEにより活性化されるMLCKあるいはRhoの上流の蛋白・酵素の活性化の阻害、などををもたらした可能性が推測される。エラスターゼは、エラスターゼ分子自体が、また、エラスターゼとエラスターゼインヒビターとの複合体が細胞表面上に結合する成績や細胞に取り込まれる成績が報告されている(6)。エラスターゼを標識し、BDPおよびBDのエラスターゼと細胞の相互作用に対する影響を解析することによって、BDPとBDのNE刺激による気管支上皮細胞の形態変化と

剥離の抑制機序の一端が明らかにされると思われる。

BDPおよびBDと同様にエラスターゼ阻害薬であるONO5046はNE刺激による気管支上皮細胞の形態変化と剥離を抑制した。このような吸入ステロイドとエラスターゼ阻害薬の効果は、NEによる気道炎症性疾患の早期治療の可能性を示唆した。

本研究は、NE刺激によりMLCKとRhoを介したアクチン系の細胞収縮反応とactin fiberの重合が惹起され、細胞の形態が変化し、NEの細胞外マトリックス分解作用がこれに加わり細胞が剥離したことを示唆した。さらに、吸入ステロイドとエラスターゼ阻害薬のNEによる気道炎症性疾患の早期治療の可能性を示唆した。

## 参考文献

1. 橋本 修、丸岡 秀一郎、権 寧博、松本 健、竹下 郁子、堀江孝至。1998. 好中球エラスターゼによる気道上皮細胞の形態変化・細胞剥離とその細胞内シグナルの解析。Ther. Res. 19:1176-1180.
2. Burridge, K., and M. Chrzanowska-Wodnicka. 1996. Focal adhesions, contractility, and signaling. Annu. Rev. Cell. Dev. Biol. 12:463-519.
3. Hall, A. 1994. Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. Annu. Rev. Cell. Biol. 10:31-54.
4. Narumiya, S. 1996. The small GTPase Rho: cellular functions and signal transduction. J. Biol. 120:215-228.
5. Chrzanowska-Wodnicka M, et al. 1996. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesion. J. Cell. Biol. 133:1403-1415.
6. Perlmutter DH, et al 1990. Endocytosis and degradation of  $\alpha$ 1-antitrypsin-protease complexes is mediated by the serpin-enzyme complex (SEC) receptor. J. Biol. Chem. 265:16713-16716.

# 慢性気道炎症における macrophage migration inhibitory factor (MIF) 関与の可能性

辻野 一三<sup>1)</sup> 西村 正治<sup>1)</sup> 牧田比呂仁<sup>1)</sup> 谷野 功典<sup>1)</sup>  
宮本 顕二<sup>2)</sup> 西平 順<sup>3)</sup> 川上 義和<sup>1)</sup> 西村 正治\*

## はじめに

マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) は1966年マクロファージの遊走を阻止するT細胞由来のサイトカインとして初めて報告されたが<sup>1) 2)</sup>、近年、MIFはT細胞以外の細胞でも産生され種々の炎症や免疫反応に関与すること、さらにグルココルチコイドの抗炎症作用に抑制的に働くというユニークな作用を持つ可能性も報告され、新しいタイプのサイトカインとして注目されている<sup>3) 4)</sup>。呼吸器科領域においては、エンドトキシン (LPS) 投与ラットの肺組織中でMIFの発現が亢進し<sup>5)</sup>、また急性呼吸促進症候群 (ARDS) 患者の気管支肺胞洗浄 (BAL) 液中のMIF濃度が上昇することが報告された<sup>6)</sup>。加えて我々は昨年までに、抗MIF抗体がLPS投与によるラット肺への好中球遊走を抑制し、さらにその作用の少なくとも一部は好中球遊走因子の抑制を介していることをあきらかにした<sup>7)</sup>。一方、ごく最近MIFがヒトの好酸球によっても産生され、かつ気管支喘息患者のBAL液中でMIF濃度が上昇していることがRossiらによって報告された<sup>8)</sup>。これらの結果をふまえて、今回我々は好酸球性気道炎症の代表的疾患である気管支喘息と好中球の関与がより重要と考えられる慢性閉塞性肺疾患 (COPD) の二疾患に着目し、MIFが両疾患における気道炎症に関与する可能性について検討した。

## 対象と方法

### [対象]

○気管支喘息：American thoracic society (ATS) のガイドラインに基づいて診断した25症例。年齢45 ± 4歳 (SE)。男/女：13/12名。13例は吸入ステ

ロイド剤を投与され、12例はステロイド以外の薬物によって治療されていた。

○COPD：症状、呼吸機能、胸部X線写真および胸部CTで診断した安定期にある51症例。年齢67 ± 2歳。男/女：47/4名。

○健常者：呼吸、循環器系のあきらかな既往歴のない17例。年齢31 ± 1歳。男/女：17/0名。

### [方法]

<実験1>血清MIF濃度の比較；上記3群の対象の血清MIF濃度をELISA法で測定し、3群間で比較した。

<実験2>誘発喀痰中MIF濃度の比較；14例の気管支喘息患者、16例のCOPD患者および7例の健常者の誘発喀痰中のMIF濃度を以下の方法で測定した。

○喀痰の誘発；salbutamol 200 μgを吸入し、10分後より3%の高張食塩水を5分間吸入。吸入後十分にうがいし、口腔内の水分を可及的に拭いとった後に喀出された痰をポリエチレン製の容器に採取。4℃で保存し、2時間以内に次の処理を行った。

○喀痰の処理；採取された喀痰の重量を測定し、同量の0.1% dithiothreitol (DTT) を加え37℃で30分間インキュベート。喀痰が十分に溶解したことを確認してから400g、4℃で10分間遠沈。上清を-80℃で保存し、後日MIFおよびeosinophil cationic protein (ECP)、好中球エラスターゼ (NE) 濃度をELISA法で測定した。ペレットは少量のPBSで再浮遊させた後、リジンコーティングしたスライドガラスに塗抹し、冷風で乾燥。メタノール固定した後、Diff Quickで染色した検体を検鏡し200個以上の非扁平上皮細胞をカウントし細胞分画を算出した。全細胞中扁平上皮細胞が50%を越えた場合は唾液混入の影響を考え、検討には加えなかった。

<実験3>MIF濃度と他のパラメータとの相関；気管支喘息・COPD群の血清および喀痰中MIF濃度と以下のパラメータの相関をみた。

1) 北海道大学第一内科

2) 同 医療技術短期大学部

3) 同 中央研究部

\* 「呼吸不全」調査研究班 分担研究者

○血液；白血球数、好酸球数、IgE-RIST、C-reactive protein (CRP)

○誘発喀痰；細胞分画、上清中ECP濃度、上清中好中球エラスターゼ (NE) 濃度

○呼気中一酸化窒素 (NO) 濃度；鼻腔内陰圧法により鼻腔内NOの影響を除き<sup>9)</sup>、また呼気流速を約6L/minに一定にしながら化学発光法で測定した (Sievers 280NOA)。

[統計] 結果は全て平均±標準誤差 (mean ± SE) で表した。各群間の比較はt検定を用い、相関はPearsonあるいはSpearmanの方法で検定した。p < 0.05を有意とした。

### 結果

1. 血清MIF濃度：気管支喘息群の濃度は7.1 ± 0.9ng/ml、COPD群は5.8 ± 0.4mg/ml、健常者は4.6 ± 0.7ng/mlで、3群間に有意差はなかった。ただし、喘息群の濃度は健常者よりも高い傾向があった (p = 0.06) (図1)。
2. 誘発喀痰中MIF濃度：気管支喘息群 (70.1 ± 13.3ng/ml) およびCOPD患者群 (90.1 ± 12.8ng/ml) の濃度は健常者 (20.6 ± 6.3ng/ml) より有意に高かった (気管支喘息群：p < 0.05 vs 健常者、COPD群：p < 0.01 vs 健常者) (図2)。
3. MIF以外のパラメータでは、末梢血好酸球数、血清IgE、誘発喀痰中好酸球比率、ECP濃度、NE濃度および呼気中NO濃度が気管支喘息群で有意に高値があるいは高い傾向があった。一方誘発喀痰中好中球比率とNE濃度はCOPD群で高値だった (図3, 4)。これらのパラメータと血清および誘発喀痰中MIF濃度との間には、気管支喘息群、COPD群いずれでも有意な相関はなかった (表1)。

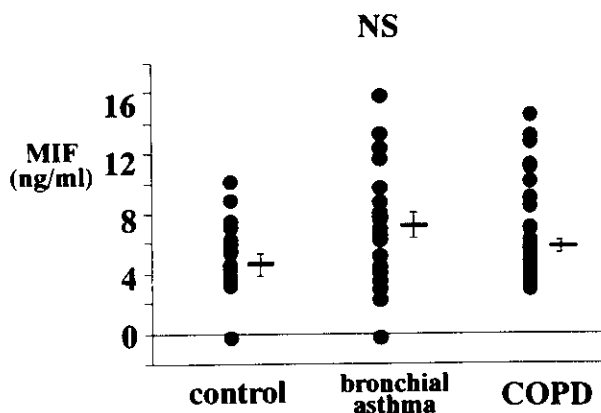


図1. 血清MIF濃度 — 3群間の比較 3群間に有意な差はみられなかった。

### 考案・結論

気管支喘息およびCOPD患者の血清MIF濃度は健常者と比較して差はなかったが、誘発喀痰中の濃度は両群ともに健常者より有意に高値だった。このことはMIFがすでに報告のある気管支喘息の病態に関わっている可能性を支持した。しかし、その関与は喘息に特異的なものではなくCOPDを含むヒトの慢性気道炎症性疾患に広く関与する可能性がある。MIFの持つユニークな作用として、ステロイドの抗炎症作用に対する抑制効果が報告されている<sup>4)</sup>。本研究では吸入ステロイド剤投与群と非投与群とに

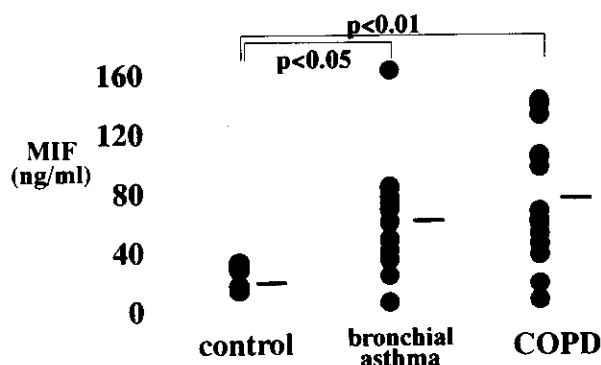


図2. 誘発喀痰中MIF濃度 — 3群間の比較 喘息およびCOPD群、いずれの濃度も健常者に比べ有意に上昇していた。

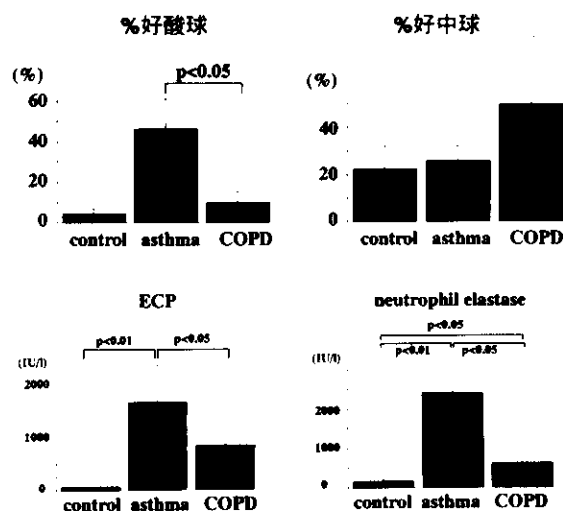


図3. MIF以外のパラメータ 誘発喀痰中の細胞分画では、好酸球比率は喘息群で高かった。好中球比率はCOPD群で高い傾向があったが、統計学的有意差はなかった。誘発喀痰中ECP濃度は喘息群で高く、好中球エラスターゼ (NE) 濃度は喘息群で他の2群より高く、COPD群も健常者群より高値だった。



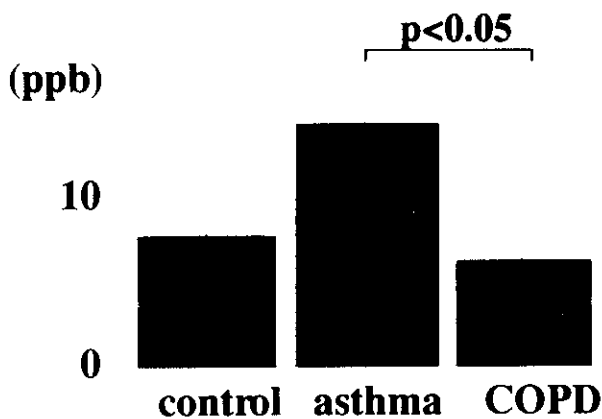


図4. 呼気中NO濃度 呼気中NO濃度は喘息群でCOPD群より有意に高かった。健常者との比較では統計学的有意差はなかった。

表1. 誘発喀痰中MIF濃度と他のパラメータとの相関

	気管支喘息	COPD
喀痰中細胞分画		
%好酸球	NS	NS
%好中球	NS	NS
喀痰中ECP濃度	NS	NS
喀痰中NE濃度	NS	NS
呼気中NO濃度	NS	NS

分けて検討してみたが、血清・誘発喀痰いずれでもMIF濃度に有意な差はなかった。また、今回の対象にはステロイド剤抵抗性症例は含まれておらず、今後はそれらのより重症な喘息症例におけるMIFの関与について検討が必要と考えられる。MIFとCOPDの関連についての報告は現在まで全くなされていない。COPDに随伴する気道炎症は、気管支喘息と比べマクロファージや好中球がより強く関与する点で性質が異なっている。我々は昨年までの研究で、ラットの急性肺障害モデルではMIFが肺泡マクロファージに発現し、かつ好中球の肺への遊走に関与する可能性を指摘してきた<sup>7)</sup>。この点から、MIFは喘息よりもむしろCOPDの病態に強く関与する可能性を推測したが、今回の結果はそれを支持するものではなかった。しかし、誘発喀痰中のMIF濃度は平均ではCOPD群の方が喘息群より高値だったこと、またNE濃度は気管支喘息群でも明らかに上昇していたことは、MIFがやはり好中球との関連で上昇している可能性を示唆し、今後症例数を増やしさらに検討を続ける予定である。近年気道炎症に対する新しい指標として呼気中NOのモニタリングが注

目されている<sup>20)</sup>。呼気中NO濃度は全く非侵襲的に測定が可能であり、その値の上昇は特に気管支喘息であきらかにみられることが知られている。今回の我々の測定結果も気管支喘息患者のみで濃度が上昇していたが、これは誘発喀痰中のMIF濃度が喘息・COPD両群で上昇していたのと対照的だった。MIFとNOの関係に関しては、マクロファージによる細胞内殺菌作用に対するMIFの増強効果が誘導型NO合成酵素(iNOS)を介していることが最近報告された<sup>11)</sup>。この報告はMIFと気管支喘息との関連を示唆したが、本研究では少なくともMIFと呼気中NOとのあきらかな関連は認めなかった。まとめとして、今回我々は誘発喀痰中MIF濃度は気管支喘息およびCOPD症例で上昇しており、初めてヒトの慢性気道炎症に関与している可能性を示した。しかしその由来やそれぞれの病態への関わりの詳細については今後の検討が必要である。

#### 参考文献

- 1) Bloom BR and Bennet B: Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. *Science* 1966; 153: 80-82.
- 2) David J: Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1966; 56: 72-77.
- 3) Bernhagen J, Calandra T, Bucala R et al: MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature* 1993; 365: 756-759.
- 4) Calandra T, Bernhagen J, Bucala R et al: MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 1995; 377: 68-71.
- 5) Bacher M, Meinhardt A, Lan HY et al: Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *Am J Pathol* 1997; 150: 235-246.
- 6) Donnelly SC, Haslett C, Reid PT et al: Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nature Med* 1997; 3: 320-323.
- 7) Makita H, Nishimura M, Miyamoto K, et al.: Effect of anti-macrophage migration inhibitory factor antibody on lipopolysaccharide-induced pulmonary neutrophil accumulation. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 573-579.

- 8) Rossi AG, Haslett C, Hirani M, et al: Human circulating eosinophils secrete macrophage migration inhibitory factor (MIF). *J Clin Invest* 1998 ; 101 : 2869-2874.
- 9) Tsujino I, Miyamoto K, Nishimura M, et al : Measurement of exhaled nitric oxide concentration using continuous negative pressure. *Respirology* in print.
- 10) Kharitonov SA, Yates D, RA Robbins, et al. Increased nitric oxide in exhaled air of asthmatic patients. *Lancet* 1994 ; 343 : 133-35.
- 11) Juttner S, Bernhagen J, Metz CN, et al. : Migration inhibitory factor induces killing of *Leishmania major* by macrophages : Dependence on reactive nitrogen intermediates and endogenous TNF-alpha. *J Immunol* 1998 ; 161 : 2382-2390.

# Matrix metalloproteinase (MMP) 発現に対する レチノイン酸の制御

高橋 英気 相馬 早苗 高橋 和久 福地義之助\*

## 背景・目的

肺気腫は慢性呼吸不全の主要な原因疾患である。本疾患は近年増加傾向にあり、本格的な高齢化社会を迎えるにあたって医学的にも社会的にも重要となってくる。したがって、その病態生理を明らかにし、根本的な予防・治療対策をたてることが望まれる。肺気腫の成因として古くから protease-antiprotease 不均衡説が唱えられており、好中球エラスターゼ、カテプシンL, Sなどの蛋白分解酵素や $\alpha$ 1-アンチトリプシンなどの役割が強調されてきたが、最近ではマクロファージ、好中球、線維芽細胞で産生されるMMP (matrix metalloproteinase) やその阻害蛋白であるTIMP (tissue inhibitor of metalloproteinases) が注目されている。特にエラスターゼ活性を持つMMP-2 (Ohnishi et al. Lab Invest, 1998; 78:1077)、MMP-9 (Finlay GA et al. Am J Respir Crit Care Med 1997; 240)、MMP-12 (Hautamaki RD et al. Science 1997, 277:2002) は肺胞壁を構成する主要な細胞外基質であるエラスチンやコラーゲンなどを分解する酵素として重要な役割を担っている可能性がある。

レチノイン酸 (retinoic acid: RA) は従来から胎生期の肺胞形成を促進する重要な物質として知られている。最近、気道内エラスターゼ注入による実験的肺気腫モデルで、all-trans RAが肺胞の再構築を促進することが報告された。MMP-TIMPはprotease-antiprotease系としてだけでなく、間質性肺疾患におけるリモデリングで重要な役割を果たすことが推測されており (Fukuda Y et al. Lab Invest, 1998; 8:687)、肺胞再構築の際にも何らかの役割をになっていることが考えられる。

本研究の目的はRAのマクロファージにおけるMMP-2, MMP-9, MMP-12, TIMP-1, TIMP-2の発現調節に

及ぼす影響を調べ、肺気腫や間質性肺疾患の病態の修飾や治療への応用の可能性について検討することである。

## 方法

### 1 細胞培養

ヒト白血病細胞由来の細胞株U937 (ATCC)、THP-1 (ATCC)、ヒト肺線維芽細胞株Wi 38 VA13 (ATCC) 及びマウス腹腔マクロファージ細胞株P388D1は10%子牛血清加RPMI1640培地で培養し、ザイモグラフィー用検体はリン酸緩衝液で細胞を洗浄後、無血清RPMI1640培地で8時間培養後、上清を採取した。細胞はphorbol myristate acetate (PMA, Sigma), all-trans-retinoic acid (ATRA, Sigma), 9-cis-retinoic acid (9-cis-RA, Sigma), dexamethasone (Dex, Sigma) で刺激した。

### 2 ザイモグラフィー

ゼラチンザイモグラフィーは培養上清を、gelatin (1.2 mg/ml) 含有10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、aminophenylmercuric acid (1mM), ZnCl<sub>2</sub> (0.001 M) 加緩衝液中で37°C, 24時間反応させ、Coomassie Blueで染色した。エラスチンザイモグラフィーは培養上清を0.5 mM Tris/HCl, pH 7.5, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.005 % Brijで透析後、限外濾過により20-30倍に濃縮し、総蛋白量として20 mgの検体をk-elastin (1.2 mg/ml, Elastin Products) 含有10%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動 (4°C, 定電流 30-40 mA) を行った。ゲルを2.5% Triton X-100で洗浄後、0.05 M Tris/HCl pH 8.0, 0.01 M CaCl<sub>2</sub>, 0.001 M ZnCl<sub>2</sub>で48-72時間反応後Coomassie Blueで染色した。

### 3 ノーザンブロット

培養細胞からguanidine isothianate/phenol/chloroform法でtotal RNAを抽出し、total RNA 25 mgを1% agarose gelで電気泳動し、nylon membraneに移行させた後紫外線照射で固定した。MMP-2, MMP-9, MMP-12, TIMP-1, TIMP-2 cDNAプローブは、U937ま

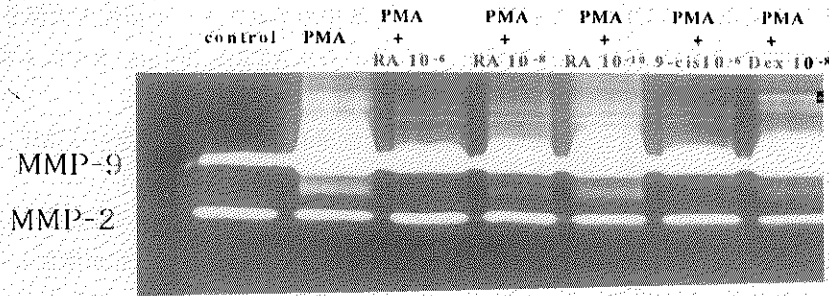


図1 Gelatin zymography of media conditioned by U937

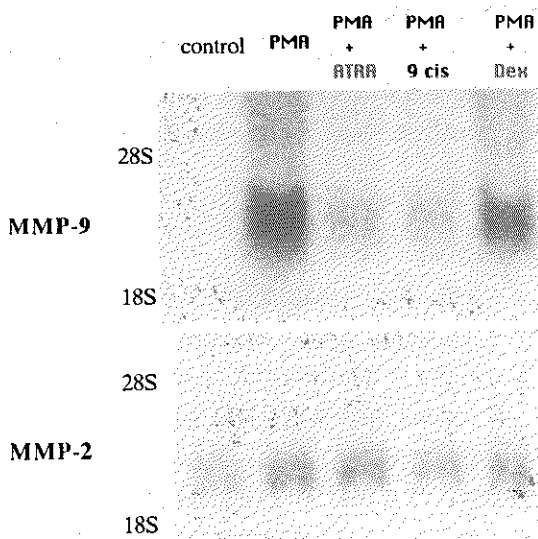


図2 Northern blot analysis (U937)

たは Wi-38 VA13 細胞株から得られた total RNA を 鋳型に逆転写酵素で cDNA を作成後、各遺伝子に特異的なオリゴ核酸プライマーを用いて PCR 法で partial cDNA を増幅し、TA クローニングベクターに subcloning した。partial cDNA を  $^{32}\text{P}$  d-CTP で標識後、ハイブリダイゼーション (42°C, 24 時間) を行い、 $2 \times \text{SSC}$  0.1% SDS 及び  $0.1 \times \text{SSC} / 0.1\%$  SDS (65°C) で洗浄後オートラジオグラフィーを行った。

## 結果

### 1. マクロファージ系細胞の MMP-2, MMP-9 発現に及ぼす RA の影響

U937, THP-1, P388D1 とも無刺激の状態では MMP-2, MMP-9 活性の発現がみられた。MMP-9 活性及び mRNA 発現は PMA 0.5 から 50 ng/ml の刺激で 24 - 48 時間後に量応答的に増加したが、MMP-2 活性には明かな影響を及ぼさなかった。U937, THP-1 においては ATRA, 9-cis-RA とともに  $10^{-6}\text{M}$  から  $10^{-10}\text{M}$  濃度で MMP-9 の

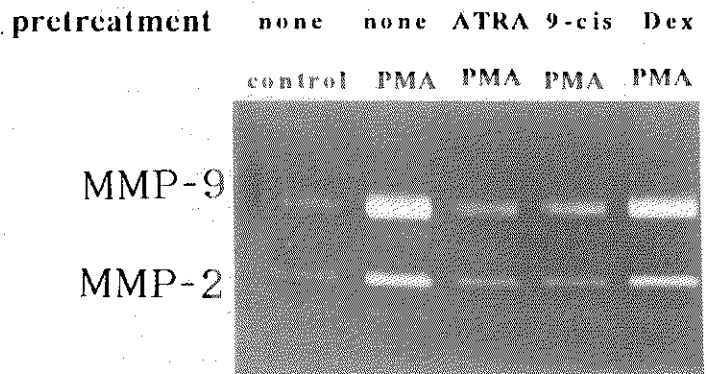


図3. Gelatin Zymography of media conditioned by U937

活性、mRNA 発現を抑制した (図 1, 2)。またこの抑制効果は細胞を ATRA, 9-Cis-RA で 24 時間から 48 時間前処置することでも同様にみられた (図 3)。Dex には MMP-9 発現抑制効果がみられなかった。

しかし P388D1 において ATRA は及び 9-cis-RA は MMP-9 の活性を増加させた (図 4)。

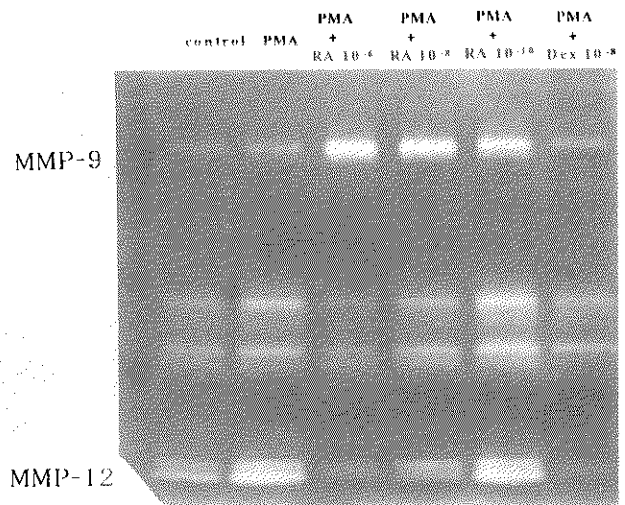


図4 Elastin Zymography of meditioned by P388D1