

厚生科学研究費補助金
(特定疾患対策研究事業)

特発性間質性肺炎の細胞分子病態に基づく
疾病の病態に応じた治療法の開発研究

平成 11 年度研究報告書

平成 12 年 3 月

主任研究者 工藤翔二

**厚生科学研究費補助金
(特定疾患対策研究事業)**

**特発性間質性肺炎の細胞分子病態に基づく
疾病の病態に応じた治療法の開発研究**

平成 11 年度研究報告書

厚生科学研究費補助金
(特定疾患対策研究事業)
特発性間質性肺炎の細胞分子病態に基づく疾病の病態に応じた治療法の開発研究
平成 11 年度研究報告書

目 次

班員名簿

総括研究報告

総括研究報告－平成 11 年度研究－	1
	主任研究者 工藤 翔二

分担研究報告

Interleukin (IL)-10 による肺線維症の制御～ IL-10 の多彩な作用～	9
	林 清二 他
抗サイトカイン遺伝子発現による実験的肺線維化の抑制	13
	林 清二 他
プレオマイシン肺線維症に対する 14 員環マクロライドの抑制効果と作用機序の検討	18
	李 英姫 他
高濃度酸素曝露によるブタのびまん性肺胞傷害モデルにおける matrix metalloproteinase の役割についての検討	22
	具嶋 泰弘 他
ウサギ胎生期肺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	26
	福田 悠
特発性間質性肺炎に対するコルヒチンの臨床評価	30
	三木 誠 他
特発性間質性肺炎に対する N-アセチルシステイン (NAC) 吸入療法 －オープン臨床試験の成績－	35
	石井 芳樹 他
間質性肺炎における Cyclosporin A の治療効果の検討	39
	大谷 義夫 他
特発性間質性肺炎急性増悪に対する Cyclosporin A, 副腎皮質ステロイド併用療法の試み	43
	澤田めぐみ 他
研究成果の刊行に関する一覧表	47

厚生科学研究費補助金
(特定疾患対策研究事業)
重点研究事業研究者 住所録

厚生科学研究費補助金(特定疾患対策研究事業)
重点研究事業研究者 住所録 [平成11年度]

氏 名	所 属	肩 書	住 所	備 考
工 藤 翔 二	日本医科大学第四内科	教 授	〒 113-8603 東京都文京区千駄木 1-1-5 Tel.03-3822-2131 Fax.03-3823-0822	
貫 和 敏 博	東北大学加齢医学研究所 呼吸器腫瘍研究分野	教 授	〒 980-0872 宮城県仙台市青葉区星陵町 4-1 Tel.022-717-8539 Fax.022-717-8549	
杉 山 幸比古	自治医科大学呼吸器内科	教 授	〒 329-0431 栃木県河内郡南河内町薬師寺 3311-1 Tel.0285-44-2111 Fax.0285-44-3586	
吉 澤 靖 之	東京医科歯科大学 呼吸器内科	教 授	〒 113-0034 東京都文京区湯島 1-5-45 Tel.03-5803-5950 Fax.03-5803-0167	
菅 守 隆	熊本大学医学部第一内科	助 教授	〒 860-8556 熊本県熊本市本荘 1-1-1 Tel.096-373-5147 Fax.096-371-0582	
福 田 悠	日本医科大学 第一病理学	助 教授	〒 113-8603 東京都文京区千駄木 1-1-5 Tel.03-3822-2131 Fax.03-5685-3067	
林 清 二	大阪大学大学院医学系研究科 分子病態内科学	講 師	〒 565-0825 大阪府吹田市山田丘 2-2 Tel.06-6879-3833 Fax.06-6879-3839	
吾 妻 安良太	日本医科大学第四内科	講 師	〒 113-8603 東京都文京区千駄木 1-1-5 Tel.03-3822-2131 Fax.03-5685-3075	
石 井 芳 樹	獨協医科大学 呼吸器・アレルギー内科	講 師	〒 321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880 Tel.0282-87-2151 Fax.0282-86-5080	

総括研究報告

—平成11年度研究—

総括研究報告

主任研究者 工藤 翔二
日本医科大学 第四内科 教授

【研究課題名】

特発性間質性肺炎の細胞分子病態に基づく疾病の病態に応じた治療法の開発研究

【主任研究者】

工藤翔二 日本医科大学 第四内科 教授

研究要旨

特発性間質性肺炎の治療法の開発を目的とし、実験的・臨床的治療研究およびその基礎となる病態研究を行った。実験的治療としては、抗線維化物質の遺伝子導入により線維化の制御を試みた。病態研究としては MMP の発生、線維化病態における役割を検討した。臨床的研究として、既存の薬剤の間質性肺炎に対する効果を、客観的に評価した。

分担研究者＝貫和敏博（東北大学）、杉山幸比古（自治医科大学）、吉澤靖之（東京医科歯科大学）、吾妻安良太（日本医科大学）、福田 悠（日本医科大学）、林 清二（大阪大学）、菅 守隆（熊本大学）、石井芳樹（獨協医科大学）

A. 研究目的

本研究は、難治性かつ予後不良な疾患である特発性間質性肺炎（IIP）の、細胞分子病態に基づく疾病の病態に応じた新たな治療法の開発・確立を目的として、重点的に実験的研究と臨床的研究の両者を行い、その結果を総合するものである。厚生省特定疾患調査研究重点研究事業として前年度に得られた研究成果を基に、以下の課題を設定し、最終年度につなげることを目標とした。病因・病態をさぐる実験的・基礎的研究として、実験的肺線維症を用い① IL-10 や② decorin 遺伝子導入による線維化抑制効果の検討を行う。また③ 14 員環マクロライドの抗線維化作用を比較し、その機序を探る。④ 高濃度酸素投与によるびまん性肺胞傷害（DAD）モデルを作製し、MMP の役割について解析する。⑤ 肺の発生における MMP の発現・関与について検討し、肺胞上皮の再生のメカニズムをさぐる。臨床的研究としては、IIP やその他の間質性肺炎を対象とし、⑥ コルヒチンの治療効果、⑦ NAC 吸入療法の治療効果、⑧ サイクロスポリン A の治療効果について検討を進める。

B. 研究方法

実験的研究課題に関しては細胞分子生物学的方法によって、また臨床研究課題に関しては臨床疫学的方法によって遂行した。

C & D. 結果と考察

① IL-10 の間質性肺炎抑制作用

Interleukin (IL)-10 の *in vivo* 遺伝子導入によりプレオマイシン（BLM）肺傷害モデルの肺の炎症と線維化が抑制することが可能であった。*in vitro* において transforming growth factor-beta によって誘導される線維芽細胞（WI-38）の type I collagen mRNA の転写を IL-10 は抑制した。しかし、platelet derived growth factor による WI-38 に対する増殖促進作用を阻止し得なかった。BLM 刺激によって誘導されるヒト単球系細胞株 THP-1 の細胞内活性酸素の発生は IL-10 によって抑制された。IL-10 は肺の炎症と線維化の両者に抑制的に働く重要な因子であることが、*in vivo* 及び *in vitro* で示された。

② 抗サイトカイン遺伝子治療：

新しい遺伝子導入法として、発現蛋白を血中で高濃度に維持できる筋肉内遺伝子注入電気穿孔法を用いた。まずこの方法によって human (h) IL-10 遺伝子をマウスに導入した。hIL-10 は導入翌日から少なくとも 1 週間以上に渡って 50pg/ml 前後の濃度を維持し、これは HVJ-liposome 腹腔内投与にて得た血中濃度の数十倍に相当する濃度であった。次に、human decorin 遺伝子を導入し、肺線維症モデルマウスにおいて抗線維化効果を検討した。decorin は線維化を促進させる TGF- β に対して拮抗する因子である。C57BL/6 マウスにプレオマイシンを day0 より 24mg/kg を 5 日間連続皮下に投与した後、day9 に decorin 遺伝子導入を行った。day28 に肺湿重量と HyP 定量によって線維化の評価を行った。プレオマイシン導入による線維化が decorin 遺伝子導入によって軽減傾向を示した。

③ 14 員環マクロライドの抗線維化作用の比較検討

ICR マウスにおいて、プレオマイシン投与 28 日後の肺線維化は、エリスロマイシン同様、ロキシシロマイシンやクラリスロマイシンにより抑制された。また気管支肺胞

洗浄液中の細胞により示される好中球の気腔内浸潤は、プレオマイシン投与後 24 時間と 216 時間（144 時間から 264 時間）の二峰性増加を示し、14 員環マクロライドは、両方の好中球数の増加をともに抑制した。好中球浸潤に関与すると考えられる接着分子 CD62E, CD62P, VCAM-1 の肺組織中の mRNA 発現を RT-PCR により比較すると、マクロライドはプレオマイシン投与 144 時間後の CD62E, CD62P の発現は抑制せず、VCAM-1 発現を有意に抑制していた。以上より、14 員環マクロライドの抗線維化作用のメカニズムの一つとして、VCAM-1 の発現低下により、特に二回目の好中球浸潤を減少させ、肺傷害・線維化を抑制すると考えられた。臨床的には、マクロライドの間質性肺炎急性増悪、急性肺傷害に対する予防的投与への応用の可能性が示唆された。

④高濃度酸素誘発 DAD における MMP の役割

ブタに高濃度酸素を曝露(24-120 時間)することにより、治療実験モデルとなりうる DAD/AIP モデルを作製した。さらにこのモデルにおいて MMP の活性測定と組織中の局在をゼラチンザイモグラフィ法および免疫組織染色法を用い検討した。気管支肺胞洗浄液中の MMP-2, -9 活性は 72 時間以上の曝露群で増加していた。MMP-9 は好中球、肺胞マクロファージに局在をみた。MMP-9 は肺傷害の重症度および BAL 中の好中球数と強く相関しており、DAD においては好中球から産生される MMP-9 が病変形成に重要であることが示唆された。

⑤胎生肺における MMP/TIMP の役割

胎生期肺の発生過程において、基底膜成分を構成する細胞外基質を基質とする MMP である MMP-2 と、その活性化に関与する MT1-MMP が特に胎生後期の肺胞上皮に陽性であり、MMP-2 の活性化も同時に顕著に亢進していた。このことから、肺胞形成過程で重要な基底膜の菲薄化に MMP-2 の活性化が関与していると考えられた。間質性肺炎の肺胞の障害後の変化においても、肺胞形成過程を繰り返しているものと考えられる。すなわち、MMP-2 とその活性化は肺胞上皮細胞の再生に有利に作用するものと考えられる。

⑥コルヒチンによる治療効果

in vitro で抗線維化作用を有するコルヒチン(1.0mg/day 経口)を間質性肺炎慢性型の治療に用い、効果を検討した。東北大学医学部倫理委員会に承認されたプロトコールに従い、間質性肺炎患者 8 例(男性 6 名、女性 2 名、50 ~ 73 歳、平均 64.0 歳)を臨床試験に登録し、治療前、治療 3 ヶ月後及び 6 ヶ月後の画像所見、生化学(LDH, KL-6, CRP など)及び生理学検査所見(PaO₂, %VC, %DLco など)を比較して、効果及び副作用を総合的に検討した。8

例中 1 例に軽度の肝機能障害が見られ、投与を中止した。急性増悪を起こした 1 例を除き、6 例全ての KL-6 値は改善し、肺胞・間質レベルでの傷害が軽減している可能性が示唆された。経過観察の継続が必要ではあるが、副作用の少ない治療法として長期間投与が可能であり、今後の治療効果が期待された。

⑦ N-アセチルシステイン (NAC) 単独吸入療法の有用性

間質性肺炎増悪症例に対する NAC 吸入療法の有用性を臨床的に検討した。対象は 99 年 1 月から 11 月までに入院した未治療の間質性肺炎増悪症例 9 例(全例男性、平均年齢 72 歳)で、病型は特発性間質性肺炎(IIP)の慢性型・定型例が 6 例、その他の間質性肺炎が 3 例であった。方法は NAC 吸入療法研究会のプロトコールに準じ NAC (352.4mgx2/日)を超音波ネブライザーで吸入し、吸入前および 1, 3, 6, 9 カ月後(平均観察期間:5 カ月)に臨床症状(呼吸困難度, 咳, 痰の重症度), 血液ガス, 肺機能, 胸部 X 線所見, 炎症パラメーター(KL-6, SIL 2R, LDH, CRP)について比較し効果を判定した。その結果、IIP 1 例を含む 9 例中 3 例(33.3%)において自覚症状, 血液ガス, 画像, 炎症パラメーター等が改善し、今後間質性肺炎症例に対し試みる価値のある治療法と考えられた。

⑧サイクロスポリン A (CYA) による IIP の治療効果

特発性間質性肺炎(IIP)や一部の膠原病肺では、副腎ステロイド, CPA, AZP などの免疫抑制剤の効果は不十分である。1993 年以降、IIP, 膠原病肺症例で CYA を投与した症例のうち、急性悪化例(IIP6 例, RA2 例, DM10 例), 慢性進行型活動性例(IIP17 例, RA4 例, DM1 例, PSS3 例, SjS1 例)について retrospective に検討した。CYA は 100 ~ 200mg/日で開始し、血中トラフ値 100 ~ 150ng/ml で維持した。PSL, CPA, AZP などで反応しない膠原病急速進行性間質性肺炎例の一部で CYA 投与により救命できた。膠原病急速進行性間質性肺炎の生存群は、死亡群に比べ CYA 投与時 PaO₂/FiO₂ が高値を示し、病初期からの CYA 併用の必要性が示唆された。慢性進行型活動性例でも、CYA 単独治療で、IIP では 8 例中 4 例で、膠原病肺では 2 例中 2 例で有効例を認め、高齢者や糖尿病、骨粗しょう症などの合併患者に対して検討すべき治療と思われた。

また、IIP の急性増悪の治療には経験的に副腎皮質ステロイドが用いられているが、その成績は極めて不良である。これに対し、CYA を併用すると良好な治療反応を得たため、その治療成績を関連病院における CYA 非使用症例と比較検討した。CYA 非使用群 6 例では、ステロイドによる改善が当初 4 例で認められたが、その後のステロイドの減量に伴い再増悪を来し、最終的には全例が治

療開始 15 カ月以内で死亡した。CYA 使用群 7 例も非使用群と同様、半数以上の症例でステロイドに反応し改善が認められたが、CYA 投与開始後にはさらに自他覚所見の改善を示した。また CYA 非使用群で認められたステロイド減量に伴う再増悪は認められず、4 例が現在まで最長 52 カ月に渡り生存中である。以上より両群の生存期間を比較すると CYA 使用群で有意に長期の生存が得られたことが明らかになった。

E. 結論と展望

IIP の治療法の開発という観点から、病因・病態をさぐ

り将来の治療に結びつける基礎的研究、および現時点でも臨床応用の可能性のある薬剤の効果の客観的評価を行う臨床的研究の両者を通じ、全般に進展が望めた。いまだ画期的な治療法に到達するのはきわめて困難な状況であるが、病因・病態が少しずつ明らかになるにつれ、これまで行き詰まっていた IIP の治療に新しい可能性が見えつつある。この成果を次年度につなげるとともに、欧米において進められている肺移植医療の実施可能性を検討すると共に、インターフェロン、ピルフェニドン等の臨床治験を我が国においても速やかに実施する予定である。さらに「再生医学」を含めた次世代医療の可能性を重要研究課題とし、予後の改善策を模索したい。

分 担 研 究 報 告

Interleukin (IL)-10 による肺線維症の制御～ IL-10 の多彩な作用～

林 清二* 新井 徹 松岡 洋人 森下 裕

Interleukin (IL)-10 の *in vivo* 遺伝子導入によりブレオマイシン (BLM) 肺傷害モデルの肺の炎症と線維化が抑制されること, *in vitro* においても肺線維芽細胞株 WI-38 を用いた検討で transforming growth factor- β によって誘導される type I collagen mRNA 転写を IL-10 が抑制することを報告してきた。さらに今回は WI-38 の増殖とマクロファージの機能に対する作用を検討した。IL-10 は WI-38 の増殖に影響を与えず, platelet derived growth factor による増殖促進に対しても作用しなかった。BLM 刺激によって誘導される肺胞マクロファージからの tumor necrosis factor (TNF)- α の産生, ヒト単球系細胞株 THP-1 の細胞内活性酸素の発生は IL-10 によって抑制された。したがって, IL-10 は肺の炎症, 線維化の両者に抑制的に働く重要な因子と考えられた。

Interleukin (IL)-10 suppresses pulmonary fibrosis: analysis of anti-fibrotic effects of IL-10

Seiji Hayashi, Toru Arai, Hiroto Matsuoka, Hiroshi Morishita

Department of Molecular Medicine, Osaka University Medical School

We have reported that introduction of the interleukin (IL)-10 gene into mice inhibited bleomycin (BLM)-induced pulmonary inflammation and fibrosis and that IL-10 significantly reduced transforming growth factor- β -stimulated type I collagen mRNA expression of a human lung fibroblast cell line, WI-38. In this report we examined the effects of IL-10 on proliferation of WI-38 and the functions of macrophages. IL-10 did not affect the proliferation of WI-38 induced by platelet-derived growth factor. The BLM-induced production of tumor necrosis factor (TNF)- α from murine alveolar macrophages and intracellular superoxide of a human monocyte cell line (THP-1) was both suppressed by IL-10. Hence IL-10 was shown to be an important factor suppressing both inflammation and fibrosis of the lung.

はじめに

Interleukin (IL)-10 は、従来から抗炎症性サイトカインとして *in vitro*, *in vivo* において種々の炎症反応を抑制することが報告されてきた。しかし、肺の線維化との関連についての検討は十分とは言えないのが現状である。そこで、まず我々は、Hemagglutinating Virus of Japan (HVJ)-liposome 法を用いた IL-10 の *in vivo* 遺伝子導入によりブレオマイシン (BLM) 肺傷害モデルにおける肺の炎症および線維化を抑制できることを示した。IL-10 導入マウスにおいては、BLM 投与後 7 日目の tumor necrosis factor (TNF)- α の発現は有意に抑制されており、炎症、線維化の両者に関わると考えられる TNF- α の制御が重要な作用機序の一つと考えられた。さらに、IL-10 が *in vitro* においても、transforming growth factor (TGF)- β によって誘導される線維芽細胞の type I collagen mRNA の転写を抑制することを明らかにした。したがって、IL-10 は直接的に線維化を抑制する可能性があると考えられたり。

今回我々は、その線維化抑制の機序となる分子病態をさらに解明するため、線維芽細胞の増殖に対する作用、肺胞マクロファージからの TNF- α 、活性酸素産生に対する *in vitro* での作用を検討した。

対象と方法

1) 細胞培養

肺線維芽細胞株、WI-38 (RIKEN GENE BANK, Saitama, Japan) を 10% fetal bovine serum (FBS), 100U/ml penicillin G, 10 μ g/ml streptomycin を加えた Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) を用い、5% CO₂, 95% air の incubator 内で培養した。

ヒト単球系の細胞株である THP-1 (ATCC, Virginia, USA) を 10% FBS, 2-mercaptethanol (2-ME) (Sigma, St. Louis, USA) 加 RPMI で継代し、実験には 2-ME を含まない 10% FBS 加 RPMI で洗浄、2-ME (-) の条件で使用した。

2) 肺線維芽細胞の cell proliferation assay

96 穴 dish に 2.25×10^4 cells/well で細胞を加え、24 時間後、confluence に到達する前に、0.4% FBS 加 DMEM に入れ替えて 24 時間培養した。その後 human PDGF-BB (R&D, Minneapolis, USA), human IL-10 (Pharmingen, California, USA) 存在下にて、さらに 24 時間培養した。

Carmichael ら²⁾の方法に準じて MTT (Sigma, St. Louis, USA) を用いて cell proliferation を測定した。Human

platelet derived growth factor (PDGF) または human IL-10 刺激 24 時間後、MTT を 50 μ g/well 加えて 6 時間培養した。上清 150 μ l を除去後 DMSO (Wako, Osaka, Japan) 150 μ l を加えて formazan crystal を溶解し、分光光度計にて 490nm の吸光度を測定した。

3) BLM 肺傷害モデルの作製

7 週令オス C57/BL6 マウスに 29G インシュリン注射用シリンジ (テルモ, Tokyo, Japan) を用いて塩酸ブレオマイシン (日本化薬, Tokyo, Japan) 100mg/kg または phosphate buffered saline (PBS) を 125 μ l の容量で尾静脈に注入した。気管支肺胞洗浄 (BAL; bronchoalveolar lavage) は PBS 1ml で 4 回行った。

4) 肺胞マクロファージの回収と培養

BLM を静注後 2 時間、8 時間後に BAL を行った。その回収液を 4 ~ 5 匹分集め、1000g, 5 分の遠心、上清吸引後 10% RPMI にて再浮遊、細胞数のカウントを行って、 1×10^6 /ml に細胞濃度を調整した。この細胞浮遊液を 96 穴プレートに 50 μ l/穴で加え、さらに human IL-10 を含む 10% RPMI を 50 μ l/穴で加えて最終濃度 0 ~ 20ng/ml で共存させた。24 時間培養後、上清を回収、-20°C で保存した。

5) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

培養上清中の mouse TNF- α は mouse TNF- α ELISA Kit (R&D, Minneapolis, USA) を用いて測定した。

6) FACS を用いた intracellular peroxides の測定

Bass ら³⁾の方法に準じて細胞内 peroxides の測定を行った。ヒト単球細胞株 THP-1 を、6 穴プレートに 5×10^5 /ml \times 3ml/穴で加え、最終濃度 10 μ g/ml の BLM または PBS 追加後 24 時間培養した。発色基質である 2',7'-dichlorofluoresin diacetate (DCFH-DA) (Sigma, St. Louis, USA), 5 μ M を含む 10% FBS 加 RPMI に交換して 15 分培養した後、最終濃度 100ng/ml の Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) (Sigma, St. Louis, USA) にて 45 分間刺激した。PMA 刺激により発生した細胞内 peroxides の量を peroxides と反応した発色基質による FL1 の蛍光強度として、FACSort (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) を用いて定性的に測定した。Peroxides 産生の IL-10 による制御を検討する際には、BLM 刺激時、PMA 刺激時ともに 20ng/ml の human IL-10 を添加した。

7) 統計

すべての数値は mean ± SEM で示した。統計学的解析には、対応の無い Student's *t*-test を用い危険率 5% 以下を有意差ありとした。

結果

1) 肺線維芽細胞株 WI-38 に対する効果 (Fig.1)

PDGF は 5 及び 20ng/ml の濃度で WI-38 の増殖を有意に促進した (Fig.1A) が、IL-10 はその増殖に有意な影響を与えなかった (Fig.1B)。さらに PDGF (20ng/ml) によって誘導される増殖促進に対して、抑制的にも促進的にも働かなかった (Fig.1C)。

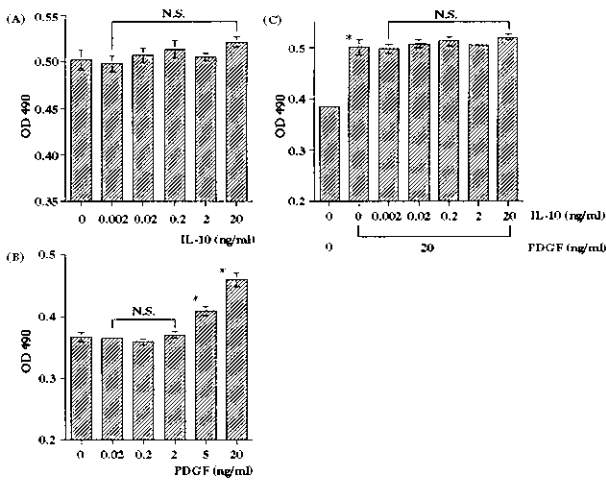


Fig.1 Effects of IL-10 on lung fibroblast proliferation. The human lung fibroblast cell line WI-38 was cultured in the presence of IL-10 and/or PDGF, and proliferation of the cells was assessed by MTT assay. Proliferation was not affected by IL-10 at concentrations of 2pg/ml to 20ng/ml (A). PDGF significantly augmented cell proliferation (*; $p < 0.01$) at concentrations of 5 and 20ng/ml (B). IL-10 at concentrations of 2pg/ml to 20ng/ml had no effect on proliferation induced by PDGF (20ng/ml) (C). Values are presented as means ± SEM (n=4). N.S.: Not significant.

2) *In vivo* BLM 刺激後マウス肺胞マクロファージにおける TNF- α 産生誘導と IL-10 による誘導抑制効果 (Fig.2)

BLM 静注マウス、コントロールマウスともに 2 時間後、8 時間後の BAL 液中の細胞は 95% 以上マクロファージであった。BLM 静注マウスの肺胞マクロファージは、コントロールマウスの肺胞マクロファージと比較し、2 時間後、8 時間後ともに有意に mouse TNF- α の産生が亢進していた。また、いずれの時間においても IL-10 により有意に TNF- α の産生は抑制された。

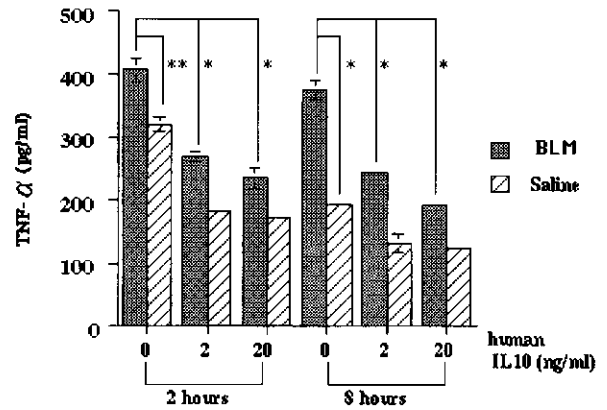


Fig.2 TNF- α production by murine alveolar macrophages (AMs) from mice 2 or 8 hours after *in vivo* exposure of BLM or saline as control. TNF- α of culture supernatant of the AMs was measured by ELISA. The release of TNF- α from AMs of BLM-treated mice was significantly high as compared with control mice after both 2 hours and 8 hours. The BLM-induced production of TNF- α was significantly inhibited by IL-10. Values are presented as means ± SEM. *: $p < 0.01$, **: $p < 0.05$

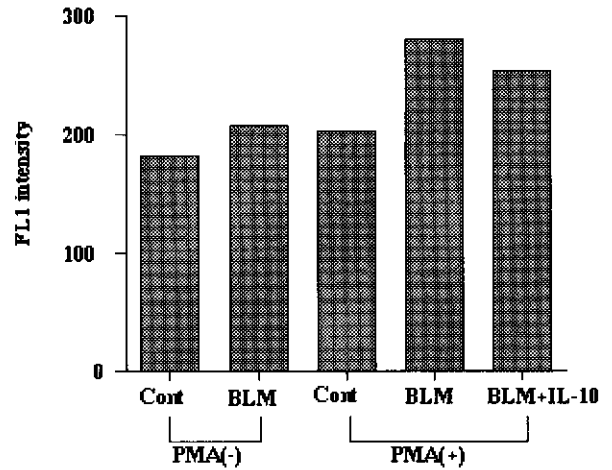


Fig.3 Intracellular peroxides induced by BLM stimulation

3) プレオマイシン刺激による THP-1 細胞内 peroxide 増加と IL-10 によるその制御 (Fig.3)

PMA 未刺激下では BLM 10 μ g/ml 前処置にても著明な蛍光強度の増強を認めなかった。しかし、BLM 前処置後に PMA 刺激を行った場合、40% 程度の蛍光強度の増強が検出された。さらに、BLM 前処置時、PMA 刺激時に IL-10 (20ng/ml) を共存させた場合には、蛍光強度の低下傾向を認めた。

考案

IL-10 の肺線維化に対する効果については、現在のところ、コンセンサスを得るには至っていない。Huaux ら⁴⁾は、IL-10 knockout mouse (KO) に対し経気道的にシリカを投与すると、24 時間後の炎症所見は正常マウスに比べ

て増強するが、30日後の線維化は軽減するため、IL-10は線維化に促進的に働く可能性があると報告している。この結果は、HVJ-liposome法を用いたIL-10の遺伝子導入によりBLM肺傷害における肺の炎症と線維化の抑制が可能であり、IL-10は線維化抑制作用を有するとする我々の主張とは矛盾するものである。しかし、この相違はモデルの違いでも説明可能であり、IL-10 KOを用いたBLM肺傷害モデルでの検討を待たなければならない。しかし、今回を含めて我々が提示した*in vitro*でのIL-10の作用はいずれも、肺線維症において中心的な役割を果たす肺胞マクロファージと線維芽細胞の機能を制御し、IL-10の*in vivo*での肺の炎症、線維化抑制効果を肯定するものであり、特発性肺線維症への応用を念頭に今後もIL-10の作用について検討を進めていく予定である。

参考文献

- 1) Arai T, Abe K, Matsuoka H, Yoshida M, Mori M, Goya S, Kida H, Kaneda Y, Hayashi S. Introduction of the interleukin-10 gene into mice inhibited bleomycin-induced lung injury *in vivo*. *Am J Physiol* 278: L914-L922, 2000.
- 2) Carmichael J, Degraff EG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res* 47: 936-942, 1987.
- 3) Bass DA, Parce JW, Dechatelet LR, Szejda P, Seeds MC, Thomas M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J Immunol* 130: 1910-1917, 1983.
- 4) Huaux F, Louahed J, Hudspeth B, Meredith C, Delos M, Renauld JC, Lison D. Role of interleukin-10 in the lung response to silica in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18: 51-59, 1998.

抗サイトカイン遺伝子発現による実験的肺線維化の抑制

林 清二* 森 雅秀 新井 徹

実験的肺線維症動物モデルにおける遺伝子治療の試みがこれまでいくつかなされてきた。遺伝子導入は蛋白発現は持続的かつ安定的な蛋白発現を可能にする点で有利とされる。今回我々は、新しい遺伝子導入法である、発現蛋白を血中で高濃度に維持できる筋肉内遺伝子注入電気穿孔法を用い、線維化を促進させる TGF- β に対して拮抗する因子である decorin を発現させ、肺線維化を抑制することを試みた。まず、この方法によって ELISA 系が確立している human IL-10 遺伝子をマウスに導入した。hIL-10 は導入翌日から血清中にて検出可能となり、少なくとも 1 週間以上に渡って 50pg/ml 前後の濃度を維持したが、これは以前我々が hemagglutinating virus of Japan (HVI)-liposome 腹腔内投与にて得た血中濃度の数十倍であった。次に、human decorin 遺伝子を導入し、ブレオマイシン肺線維症モデルマウスにおける抗線維化効果を検討した。decorin は TGF- β に拮抗することが既に知られている。C57BL/6 マウスにブレオマイシン 24mg/kg x5 日間連続皮下投与を行った後、9 日目に decorin 遺伝子導入を行った。28 日目に肺湿重量と hydroxyproline 定量によって線維化の評価を行った。ブレオマイシン導入による線維化が decorin 遺伝子導入によって軽減傾向を認めた。

Regulation of pulmonary fibrosis by gene transfer of anti-cytokine molecules

Seiji Hayashi, Masahide Mori, Toru Arai

Department of Molecular Medicine, Osaka University Medical School

Previously several investigators attempted to regulate pulmonary fibrosis with gene therapy *in vivo*. Protein expression by gene therapy with coding genes has advantages over administration of the recombinant protein that continuous and stable expression is enabled. In this investigation, we have attempted a new method of gene therapy with systemic delivery, namely *in vivo* gene transfer into muscle by electroporation.

In order to assess the efficiency of this method, we first introduced human IL-10 gene into mice. Human IL-10 in the serum was detected one day after the gene transfer, and 30 to 70pg/ml of human IL-10 was detected from day 3 through day 7. The gene expression was higher compared to our conventional method, the hemagglutinating virus of Japan (HVI)-liposome method. Next we introduced human decorin gene, that was thought to regulate transforming growth factor- β (TGF- β) activity, to assess the antifibrotic effect on the mice of bleomycin-induced lung fibrosis model. C57BL/6 mice were injected subcutaneously with bleomycin (24mg/kg/day) from days 0 to 5, and 100 μ g of plasmid cDNA of decorin gene was injected into muscle with electric pulses on day 9. On day 28, introduction of human decorin gene by this method tended to reduce the increase in the wet lung weight and hydroxyproline content of the lungs induced by bleomycin.

In vivo gene transfer into muscle by electroporation is a new and effective method for gene expression. The present investigation suggested that the decorin gene expression may be effective for amelioration of pulmonary fibrosis.

はじめに

特発性肺線維症では、各種の cytokine や growth factor が重要な役割を果たしていることが明らかになっている^{1,2)}。なかでも transforming growth factor- β (TGF- β) は肺の線維化を促進させる因子として重要であることが指摘されている^{3,4,5)}。

一方、これまで実験的肺線維化動物モデルにおける治療の試みがいくつかなされてきた。遺伝子導入による蛋白発現は、精製蛋白そのものを投与する場合に比べ、その投与方法が比較的容易であること、持続的安定的な蛋白発現を得られる可能性があること、発現細胞の選択が可能であることなどの利点があるが、逆に発現レベルの厳密なコントロールは困難である。また、びまん性肺疾患を対象とした場合には、経気道の投与では末梢までの到達がかなり困難になることや繰り返し投与する際の vector に対する抗原性の獲得が問題となってくる可能性がある。

以上を踏まえ、今回我々は TGF- β を制御し、高レベルの蛋白発現を得られる遺伝子導入法と組み合わせて、肺線維症モデルにおいて有効な治療法を開発する方針とした。TGF- β と拮抗することが報告されている細胞外 matrix の一つである decorin の遺伝子を筋肉内注入電気穿孔法を用いて、ブレオ肺線維症マウスモデルに応用した。

方 法

(1) 筋肉内注入電気穿孔法による生体内発現

今回用いた筋肉内注入電気穿孔法は宮崎らによって一昨年に報告された方法で、従来の naked DNA の筋注法より格段に高発現が得られるとされている⁶⁾。

目的の遺伝子を組み込んだ plasmid cDNA を生理食塩水で希釈して $1.5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ とした。Pentobarbital 1mg の腹腔内投与にてマウスを麻酔後、左右の前脛骨筋に 29G 針を用いて plasmid cDNA を $50 \mu\text{g}$ ($33 \mu\text{l}$) ずつ筋注した。その直後に筋注部分を挟むように 5mm 幅の双極針を穿刺して、 $100\text{V}125 \mu\text{F}$ の放電を 1 秒毎に 8 回行った (Gene Pulser, BIO-RAD)。予備実験として、以前我々が報告した pCAGGS-humanIL-10 を上記方法によって投与し、経時的に採血を行った (day0, 1, 3, 7, 14, 各群 n=2)。採血は右心室から行い、 4°C にて一晚放置後血清分離して -20°C で保存した。血清 IL-10 は ELISA kit (EH-IL10, ENDOGEN) を用いて測定した。

(2) Decorin 遺伝子の構築と遺伝子発現の確認

human decorin 遺伝子を chicken β -actin promoter 支配

下の発現ベクターである pCAGGS expression vector⁷⁾ に組み込んだ pCA-decorin を作製した (Fig.1)。蛋白発現の確認のため、ヒト肺胞上皮細胞株 A549 細胞にネオマイシン耐性遺伝子と共に導入し、G418 含有 medium で培養して選択した。この培養上清を回収し、SDS-PAGE, Western Blotting を行い、rabbit 抗 human decorin 抗体 (GibcoBRL) を用いて検出した。また対照として lacZ 遺伝子も同様に pCAGGS expression vector に組み込んだ。

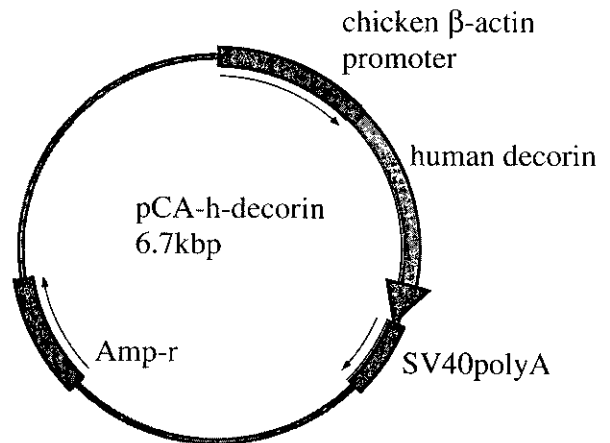


Fig.1

(3) ブレオマイシン肺線維症マウスモデルに対する遺伝子治療

ブレオマイシンによる肺線維症マウスモデルを以下のように作製した。8週令雄 C57BL/6 マウス 12 匹に対し、ブレオマイシン (日本化薬) を $24\text{mg}/\text{kg}$ ずつ 5 日連続 (day0-4) で腹部皮下に投与した。さらに、その後 (day9) に上記の筋肉内注入電気穿孔法によって pCA-decorin を 6 匹に各 $100 \mu\text{g}$ 投与した。対象群として、pCA-lacZ を 6 匹に各 $100 \mu\text{g}$ 投与した。28 日目に両肺を摘出し、肺湿重量を測定した。

(4) Hydroxyproline の定量

Woessner らの方法に準じて行った⁸⁾。すなわち、マウス全肺を 6N HCl 2ml とともにアンプル管に封入し、 105°C 、18 時間加熱した検体を飽和 LiOH にて中和、蒸留水にて 10 倍希釈した後、発色基質を加えて 60°C 、10 分反応させた。冷却後、分光光度計にて 562nm の吸光度を測定し、hydroxyproline 標準液との比較で定量を行った。

結 果

(1) 筋肉内注入電気穿孔法による human IL-10 の生体内発現

はじめに筋肉内注入電気穿孔法による蛋白発現の程度を再確認する目的で、以前我々が報告した hemagglutinating virus of Japan (HVJ)-liposome 腹腔内投与

法との比較を pCAGGS-hIL-10 を用いて行った。HVJ-liposome 腹腔内投与法では、血清中での human IL-10 の発現は最大 2 ないし 3pg/ml であったが、筋肉内注入電気穿孔法では最大 71pg/ml の高発現と 1 週間以上の持続を確認した (Fig.2)。導入遺伝子の全身発現において、この方法は有効であると考えられた。

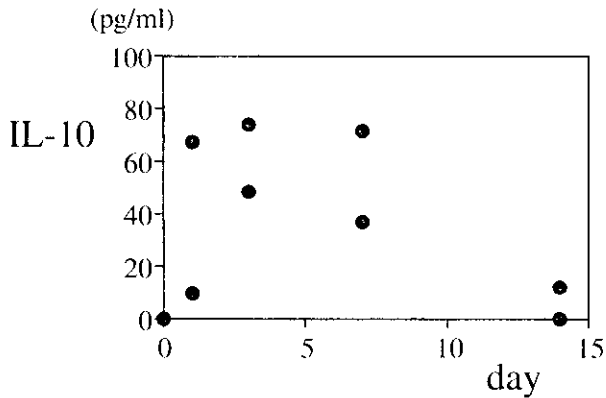


Fig.2

(2) decorin 遺伝子の発現の確認

ヒト肺胞上皮細胞株 A549 細胞へ pCA-decorin を導入し安定発現させた細胞株での培養上清において、Western Blotting 法によって decorin 蛋白の発現を確認した (Fig.3)。

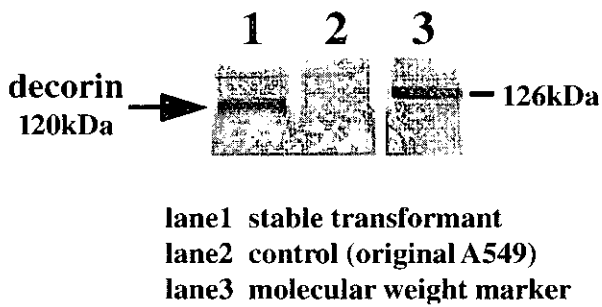


Fig.3

(3) プレオマイシン肺線維症マウスモデルに対する遺伝子治療

decorin 遺伝子の発現が、プレオマイシン肺線維症マウスモデルにおいて有効な治療方法となり得るかどうかについて検討を行った。線維化の指標として摘出肺の湿重量と hydroxyproline の定量を行った。治療群及び対照群 (各群 n=6) において、肺湿重量 (mg) は 170.3 ± 23.7 と 199.8 ± 24.6 (mean \pm SEM, $p=0.38$, Fig.4), hydroxyproline の定量 (μg) は 208.5 ± 15.4 と 259.0 ± 33.6 (mean \pm SEM, $P=0.21$, Fig.5) であった。

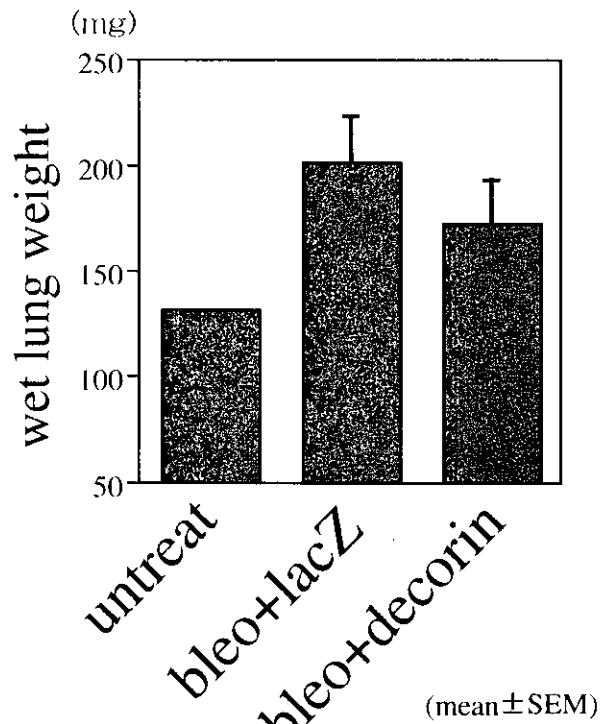


Fig.4

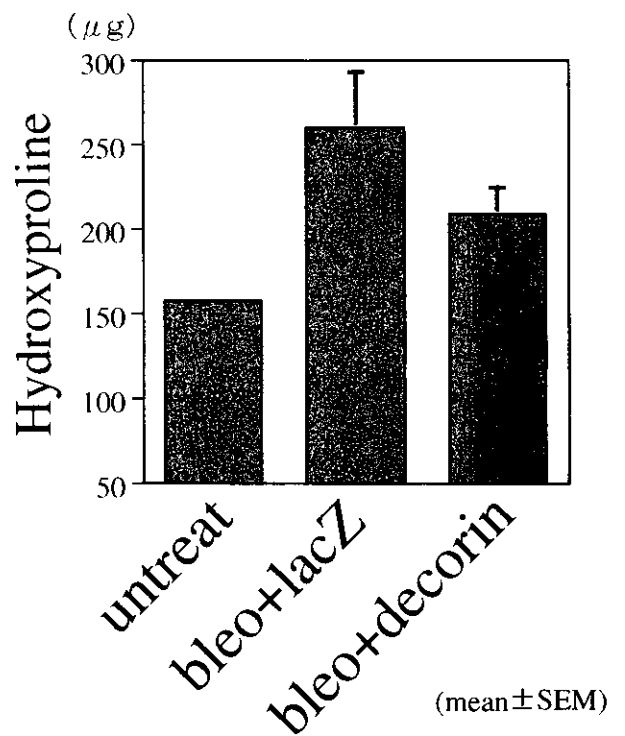


Fig.5

考案・結論

遺伝子導入によって疾患の治療を図る遺伝子治療については、様々な試みがなされている。肺線維症のようなびまん性の慢性疾患においては、炎症や線維化を抑制する因子の投与が持続的に安定に行えることがその利点と考えられる。これまで報告された実験的肺線維化動物モデルにおける遺伝子治療の報告はHVJ-liposome法を用いてPDGF soluble receptorを投与した我々の報告¹⁰⁾とadenovirus vectorを用いてSmad7を投与した報告がある¹¹⁾が、いずれも経気道的に投与している。将来の肺線維症に対する臨床応用まで視野に入れた場合、経気道的投与ではその到達が比較的中枢側に偏る可能性が高く、多くの症例で線維化の病変部位が中枢ではなくむしろ胸膜直下から始まる末梢を中心に分布していることを考慮すると、投与経路として全身的投与も検討する必要がある。今回、我々が選択した筋肉内注入電気穿孔法による全身発現は手技が比較的容易な上に持続的な高発現を得られることが2グループから報告されている^{6,12)}。また、我々もIL-10遺伝子を用いて従来法と比較したところ、それを支持する結果であった(Fig.2)。また、マウスモデルにおいては尾静脈からの投与と違い、筋肉組織で発現した蛋白が下大静脈を通過して直接肺へ到達する利点がある。

線維化を抑制する因子として、肺や他臓器において多くの種類が検討されているが、今回我々はdecorinを用いた。細胞外matrixの一つであるdecorinは当初*in vitro*でTGF- β と拮抗することが報告され¹³⁾、その後実験的腎炎モデルにおいてdecorinの精製蛋白¹⁴⁾あるいは遺伝子導入¹⁵⁾の有効性が報告された。また、実験的肺線維症モデルにおいても、ハムスターにプレオマイシンとdecorinの精製蛋白を同時に経気道的に投与することで線維化の抑制が図れたことが報告されている¹⁶⁾。この研究では両者の分布が一致すると予想されるため、プレオマイシンの経静脈的投与モデルにも同様の効果がえられるかどうかは確かではない。

現段階ではまだ予備実験の段階であるため有意差を得ることはできなかったが、さらに今後検討を重ねていく予定である。

参考文献

- 1) 林 清二：間質性肺炎発症とサイトカイン。日本内科学会雑誌 87: 163-8, 1998.
- 2) 菅 守隆, 岡本竜哉, 彌永和宏：肺のリモデリング-肺障害とリモデリングの分子生物学的機構-。呼吸 17: 254-66, 1998.
- 3) Khalil N, O'Connor RN, Unruh HW, Warren PW, Flanders KC, Kemp A, Berezney OH, Greenberg AH.

Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5: 155-62, 1992.

- 4) Broekelmann TJ, Limper AH, Colby TV, McDonald JA. Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 6642-6, 1991.
- 5) Yoshida M, Sakuma J, Hayashi S, Abe K, Saito I, Harada S, Sakatani M, Yamamoto S, Matsumoto N, Kaneda Y, Kishimoto T. A histologically distinctive interstitial pneumonia induced by overexpression of the interleukin 6, transforming growth factor beta 1, or platelet-derived growth factor B gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9570-4, 1995.
- 6) Aihara H, Miyazaki J. Gene transfer into muscle by electroporation *in vivo*. *Nat Biotechnol* 16: 867-70, 1998.
- 7) Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108: 193-200, 1991.
- 8) Woessner JF Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and Protein samples containing small proportions of this amino acid. *Arch Biochem Biophys* 93: 440-447, 1961.
- 9) Arai T, Abe K, Yoshida M, Mori M, Matsuoka M, Goya S, Kida H, Kaneda Y, Hayashi S. Introduction of the interleukin-10 gene into mice inhibited bleomycin-induced lung injury *in vivo*. *Am J Physiol* 278: L914-L922, 2000.
- 10) Yoshida M, Sakuma-Mochizuki J, Abe K, Arai T, Mori M, Goya S, Matsuoka H, Hayashi S, Kaneda Y, Kishimoto T. *In vivo* gene transfer of an extracellular domain of platelet-derived growth factor beta receptor by the HVJ-liposome method ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 265: 503-8, 1999.
- 11) Nakao A, Fujii M, Matsumura R, Kumano K, Saito Y, Miyazono K, Iwamoto I. Transient gene transfer and expression of Smad7 prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *J Clin Invest* 104: 5-11, 1999.
- 12) Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, Delaere P, Branellac D, Schwartz B, Scherman D. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 4262-7, 1999.
- 13) Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature* 346: 281-4, 1990.
- 14) Border WA, Noble NA, Yamamoto T, Harper JR, Yamaguchi Y, Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Natural

- inhibitor of transforming growth factor-beta protects against scarring in experimental kidney disease. *Nature* 360: 361-4, 1992.
- 15) Isaka Y, Brees DK, Ikegaya K, Kaneda Y, Imai E, Noble NA, Border WA. Gene therapy by skeletal muscle expression of decorin prevents fibrotic disease in rat kidney. *Nat Med* 2: 418-23, 1996.
- 16) Giri SN, Hyde DM, Braun RK, Gaarde W, Harper JR, Pierschbacher MD. Antifibrotic effect of decorin in a bleomycin hamster model of lung fibrosis. *Biochem Pharmacol* 54: 1205-16, 1997.

ブレオマイシン肺線維症に対する

14員環マクロライドの抑制効果と作用機序の検討

李 英姫¹ 松田久仁子¹ 青山 昭徳¹ 阿部 信二¹
新原 礼子¹ 榎木 達治¹ 宮本 晴子¹ 高橋 卓夫¹
臼杵 二郎¹ 高橋 智² 吾妻安良太^{1*} 工藤 翔二^{1**}

ICR マウスにおいて、ブレオマイシン投与 28 日後の肺線維化は、エリスロマイシン同様、ロキシシロマイシンやクラリスロマイシンにより抑制された。また気管支肺胞洗浄液中の細胞により示される好中球の気腔内浸潤は、ブレオマイシン投与後 24 時間と 216 時間（144 時間から 264 時間）の二峰性増加を示し、14 員環マクロライドは、両方の好中球数の増加をもとに抑制した。好中球浸潤に関与すると考えられる接着分子 CD62E, CD62P, VCAM-1 の肺組織中の mRNA 発現を RT-PCR により比較すると、マクロライドはブレオマイシン投与 144 時間後の CD62E, CD62P の発現は抑制せず、VCAM-1 発現を有意に抑制していた。以上より、14 員環マクロライドの抗線維化作用のメカニズムの一つとして、VCAM-1 の発現低下により、特に二回目の好中球浸潤を減少させ、肺傷害・線維化を抑制すると考えられた。臨床的には、マクロライドの間質性肺炎急性増悪、急性肺傷害に対する予防的投与への応用の可能性が示唆された。

Inhibitory effect of fourteen-member macrolides on experimental bleomycin-induced lung injury and fibrosis in mice

Yingji Li¹, Kuniko Matsuda¹, Akitoku Aoyama¹, Shinji Abe¹
Reiko Sinbara¹, Tatsuji Enomoto¹, Haruko Miyamoto¹, Takuo Takahashi¹
Jiro Usuki¹, Satoru Takahashi², Arata Azuma¹, Shoji Kudoh¹

1. Fourth Department of Internal Medicine, Nippon Medical School
2. Institute of Basic Medical Sciences, University of Tsukuba

Bleomycin (BLM)-induced lung fibrosis was inhibited by Erythromycin (EM) and other 14-member macrolides such as Roxithromycin (RXM) and Clarithromycin (CAM) on day 28 after BLM injection in ICR mice. The number of neutrophils in bronchoalveolar lavage (BAL) expressed two maximal peaks at 24 and 216 (from 144 to 264) hours respectively after BLM administration. 14-member macrolides inhibited both peaks of the neutrophil infiltration into the airway. Among mRNA expression of adhesion molecules (CD62E, CD62P, VCAM-1) which was thought having close relationship with neutrophil infiltration into the airway, 14-member macrolides significantly inhibited the expression of VCAM-1 mRNA while have little inhibition to the expression of CD62E and CD62P mRNA.

These results indicated that the 14-member macrolides obviously attenuated the expression of VCAM-1 mRNA during the early phase of BLM-induced lung injury, which can lead inhibition of neutrophil migration into the airway and subsequent lung injury and lung fibrosis. It might be one of the possible mechanisms of anti-inflammatory and anti-fibrotic effects of 14-member macrolides. This suggested the clinical applicability of preventive administration of 14-member macrolides for the acute exacerbation of interstitial pneumonia and acute lung injury.