

はじめに

線維化病変部に集積する線維芽細胞あるいは筋線維芽細胞の由来を探り、そのメカニズムと病態における役割を解明することは、治療を考えるうえで極めて重要である。

循環血液中に存在する CD34 陽性 progenitor cell に由来する dendritic cells (DC) の亜群の 1 つに、組織傷害部位に集積して組織修復に働く細胞があり、組織の線維化に関与している可能性が考えられている¹⁾。この細胞は、抗原提示能を持つと同時に collagen や fibronectin を産生し組織修復を行うと考えられる^{2,3)}。今回、線維芽細胞様樹状細胞 (fibroblast-like DC; FDC) の末梢血からの分離法を確立し、その性状を検討した。

方 法

健康成人末梢血より PBMC を分離して Fibronectin でコートしたプレートに播き、20% FCS 入り RPMI 培地で培養した。2-3 日後非付着細胞を除去、さらに 2-4 週培養した。EDTA で細胞をはがし、CD14, CD19, CD2 ビーズでマクロファージ、B 細胞、T 細胞を除去し目的の細胞を分離した。FACS にて表面抗原の解析、免疫染色に

よる解析を行い細胞の性状を検討した。同一個体から PBMC および PBMC を IL-4+GM-CSF で培養したのち LPS で成熟させた mature monocyte-derived DC を分離し性状の相違を検討した。

結 果

培養 2-3 日目よりコロニー形成が始まり、5-7 日目には線維芽細胞様の形態を示す細胞が増殖してきた。14-28 日目にはほとんどが線維芽細胞様の形態の細胞となった

(図 1)。この細胞を EDTA にて剥離して検鏡すると細胞周囲に樹状突起を持ち樹状細胞様の形態を示した(図 2)。同一個体から得た monocyte-derived DC を図 3 に示した。DC は PBMC を plate に蒔いたのち浮遊した細胞から分離しており、付着して増殖する FDC とは全く異なるものであった。

本細胞の phenotype を FACS および免疫組織染色にて解析した。本細胞は CD34 (+), CD45RO (+) より末梢血に由来する細胞であること、type I collagen (+), prolyl-4-hydroxylase (+), α -smooth muscle actin (+) から線維芽細胞としての性状を有すること、さらに HLA-DR (+) より抗原提示細胞である可能性が示された(図 4)。FDC と monocyte-derived DC の表面抗原発現を比較した(表 1)。

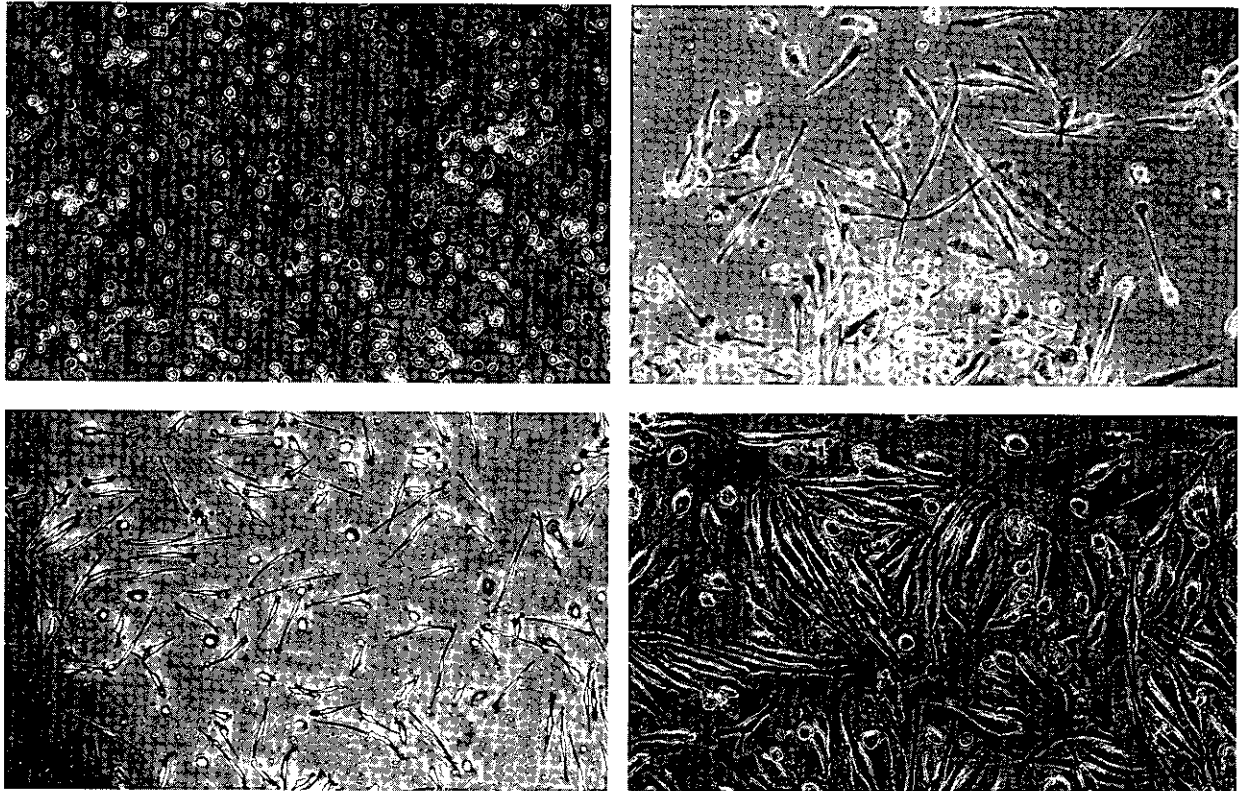


図 1 線維芽細胞様樹状細胞の末梢血単核球からの分離。 A: Day 2, B: Day 7, C: Day 14, D: Day 28



図2 非附着状態の線維芽細胞様樹状細胞の形態

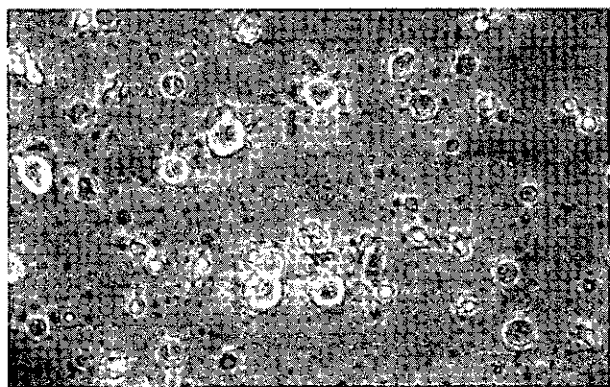


図3 monocyte-derived DC の形態

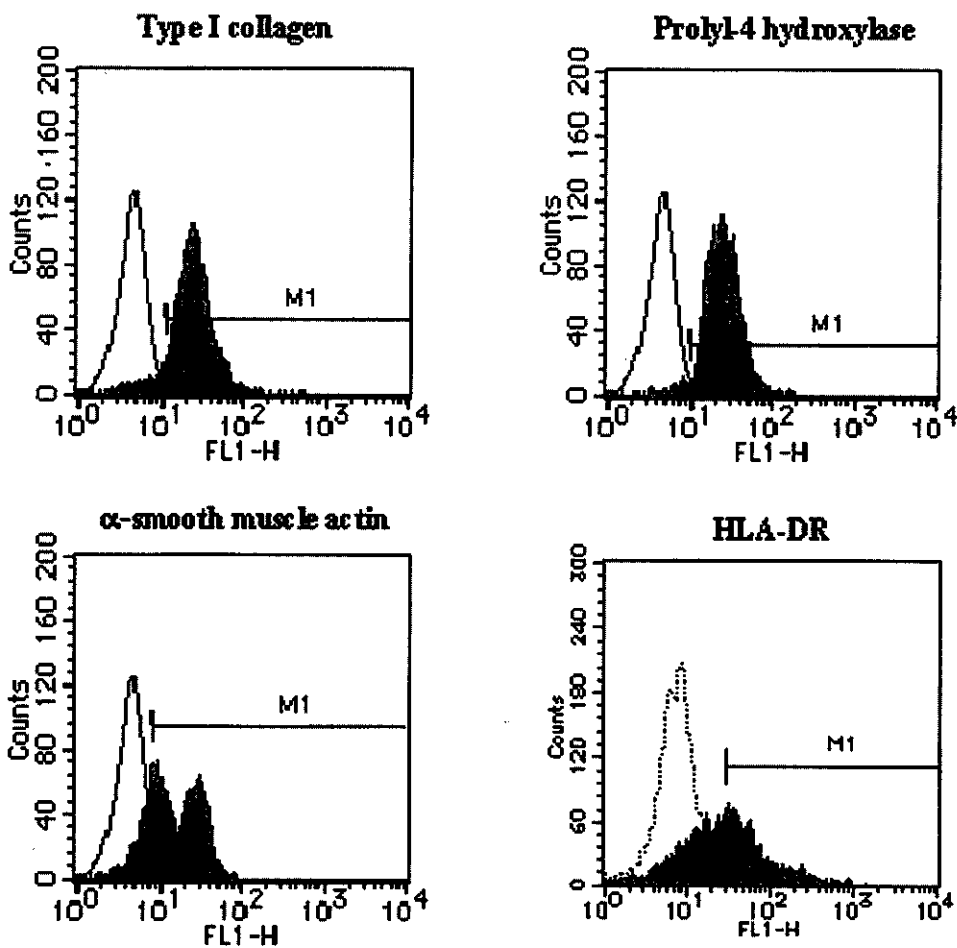


図4 線維芽細胞様樹状細胞のフローサイトメトリーによる解析

表1 FACS による表面抗原発現の比較

	monocyte	FDC	DC
CD1a	-	-	-
CD11c	++	+++	+++
CD14	+++	-	-
CD34	++	+	-
CD45RO	+	+	+
CD68	++	+	-
CD83	-	-	++
CD86	+	+	+++

monocyte-derived DCにおいて陽性であったCD83はFDCでは陰性で、CD86の発現も弱かった。

RT-PCRによってtype I collagen, fibronectin, prolyl-4-hydroxylase の mRNA 発現を同一個体から得たPBMC, FDCおよび対照としてヒトfibroblast (HFL-1)を用いて比較したところ、いずれのmRNAもPBMCではほとんど発現が認められなかったが、FDCではfibroblastと同様に発現が認められた(図5)。

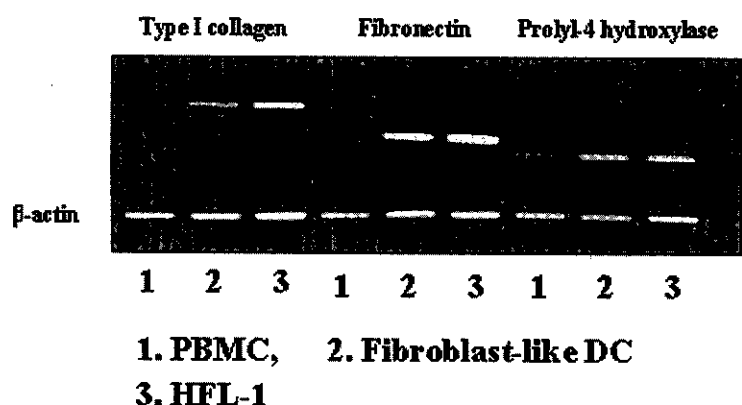


図5 RT-PCRによる type I collagen, fibronectin, prolyl-4-hydroxylase の mRNA 発現の解析. 同一個体から得た PBMC, FDC および対照としてヒト fibroblast (HFL-1) を用いて比較した.

考 察

PBMCを培養することから形態学的に fibroblast 様の細胞を得た. この細胞は, 非付着時は細胞表面に樹状突起を有し樹状細胞様形態を示した. しかし, monocyte-derived DCが浮遊細胞であり, 分化に特殊なサイトカインが必要なものに対して, 本細胞は付着細胞であり, FCSのみで特別な因子を添加することなく増殖したことから通常の DCとは異なる細胞と考えられた. 今回, 抗原提示能の検討を行っていないが HLA-DR 陽性であり本細胞が抗原提示細胞である可能性を示唆している. 本細胞は, CD14 (-), CD34 (+), CD45RO (+) であることから PBMCのなかに存在する単球とは異なる progenitor cell に由来する細胞と考えられる. PBMCには, 認めない collagen type I や FN, prolyl-4-hydroxylase の mRNA や蛋白の発現を認めており形態学的のみならず機能的にも fibroblast 様に分化したのと考えられた. また, 本細胞は α -SMA (+) であり, myofibroblast の性格も持っている可能性が示された.

これまで本細胞と類似の性質を持つ細胞についていくつかの報告があるが同一のものであるか明らかでない^{1,4)}. Bucala らは, 本細胞と類似の細胞を fibrocyte と呼

び, 末梢血に存在する progenitor cell が wound 病巣に集積し fibroblast-like に分化し, extracellular matrix を産生し wound repair に働くと共に, 抗原提示細胞としても機能することを報告している^{1,2,3)}. このような細胞が肺の線維化においても重要な役割を演じている可能性は十分に考えられるため, 今後, 間質性肺炎肺組織の免疫組織学的解析を行い本細胞の生体内における動態を知ると共に, マウスブレオマイシン肺臓炎モデルにおける本細胞の動態解析を行い本細胞の肺線維化における役割を明らかにしたい. この結果, 線維化病巣に集積しうる末梢血由来細胞が同定されれば, 本細胞に HGF など線維化抑制因子を gene targeting することによってより有効性の高い肺線維化の治療が可能となることも期待される.

参考文献

- 1) Bucala R, Spiegel LA, Chesney J, Hogan M, Cerami A. Circulating fibrocytes define a new leukocyte subpopulation that mediates tissue repair. *Mol Med.* 1994;1:71-81.
- 2) Chesney J, Bacher M, Bender A, Bucala R. The peripheral blood fibrocyte is a potent antigen-presenting cell capable of priming naive T cells in situ. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94 (12) :6307-12.
- 3) Chesney J, Metz C, Stavitsky AB, Bacher M, Bucala R. Regulated production of type I collagen and inflammatory cytokines by peripheral blood fibrocytes. *J Immunol.* 1998;160:419-25.
- 4) Labat ML, Bringuier AF, Arys-Philippart C, Arys A, Wellens F. Monocytic origin of fibrosis. In vitro transformation of HLA-DR monocytes into neo-fibroblasts: inhibitory effect of all-trans retinoic acid on this process. *Biomed Pharmacother* 1994;48:103-111.

各種肺細胞におけるマトリックスメタロプロテアーゼの 発現に関する研究

宮川比佐子 弥永 和宏 岡本 竜哉 長 勇
菅 守隆* 安藤 正幸

特発性間質性肺炎における不可逆的なりモデリングの病態において細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) の産生と分解の不均衡が考えられる。マトリックスメタロプロテアーゼ (Matrix Metalloproteinase: MMP) は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である。特に MMP-2 及び MMP-9 は基底膜の主たる構成成分である IV 型コラーゲンを基質とし、基底膜傷害における重要な役割が想定される。以前、我々は間質性肺炎における MMP-2 及び MMP-9 の役割を明らかにするため、種々の間質性肺炎患者の BALF 及び組織中の MMP の発現を検討した。今回は単球系、II 型上皮、気管支上皮の 3 種類の細胞株を用いた *in vitro* の検討を行った。単球系細胞株では MMP-9 が TNF- α 、IL-1 β により、MMP-2 が TGF- β により誘導された。II 型上皮細胞株では MMP-2 が TGF- β により誘導されたが、MMP-9 は各種サイトカインにおいてもほとんど誘導されなかった。気管支上皮細胞株では TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β によって MMP-9 が誘導された。単球系、II 型上皮、気管支上皮のいずれの細胞株においても TNF- α 、IL-1 β 、TGF- β によって誘導された MMP-2 あるいは MMP-9 が IFN γ や Dexamethasone によって抑制された。また気管支上皮細胞株において ECM を変化させることにより MMP の発現が変化することを認めた。本研究の結果、細胞種やサイトカイン、増殖性サイトカイン、ECM 等が MMP の発現に影響を及ぼすことが分かった。

Regulation of MMP-2 and MMP-9 Expression by Cytokines and Extracellular Matrix Substrates in Lung Cells

Hisako Miyakawa, Kazuhiro Iyonaga, Tatsuya Okamoto, Isamu Cho
Moritaka Suga, and Masayuki Ando

First Department of Internal Medicine Kumamoto University School of Medicine, Kumamoto, Japan

We recently reported that matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9, produced mainly by macrophages and epithelial cells, contribute to lung injury resulting in the structural remodeling. The present study was conducted in order to know more about expression of these MMPs by macrophages and epithelial cells. We studied regulation of MMP-2 and MMP-9 expression by cytokines, growth factors, dexamethasone (Dx) and extracellular matrix (ECM) substrates in THP-1, A549, and BET-1A cell lines, representing monocytes/macrophages, alveolar type II cells, and bronchial epithelial cells, respectively, using gelatin zymography. MMP-9 production was increased by TNF- α , IL-1 β , and LPS in THP-1 and BET-1A cells but not in A549 cells. MMP-2 production was not influenced by these stimuli in any of the cell lines. In contrast, TGF- β upregulated MMP-2 production in THP-1 and A549 cells and MMP-9 production in BET-1A cells. IFN γ or Dx suppressed TNF- α , IL-1 β , and TGF- β -induced MMPs production in these cells. Furthermore, BET-1A cells cultured on type I collagen or fibronectin displayed greater constitutive, TNF- α -, IL-1 β -, or TGF- β 1-stimulated MMPs production than BET-1A cells cultured on type IV collagen. Our results suggest that cell type, proinflammatory cytokines, growth factor TGF- β , and cell-ECM interactions, all affect expression of MMP-2 and MMP-9 and help to clarify the role of these MMPs under inflammatory lung conditions.

はじめに

特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) は原因不明の進行性の間質性肺疾患であり, 不可逆的な肺のリモデリングを誘導する細胞外マトリックス (extracellular matrix: ECM) の産生や沈着, 分解はこの疾患の進行過程に関与していると考えられている^{1,2)}. マトリックスメタロプロテアーゼ (Matrix Metalloproteinase: MMP) は ECM 分解酵素の一つであり, ECM の分解は生理的な組織構築や病的組織の組織破壊の際に認められる^{3,4)}. 特に MMP-2 及び MMP-9 は基底膜の主要構成成分である IV 型コラーゲンを分解する^{5,6)}.

我々は以前 IPF 及び nonspecific interstitial pneumonia (NSIP), bronchiolitis obliterans organization pneumonia (BOOP) の 3 種類の間質性肺炎における MMP-2, MMP-9 の発現パターンを検討したところ, MMP-2 及び MMP-9 の主な産生部位は活性型マクロファージと上皮細胞であった⁷⁾. 興味深いことに, IPF では MMP-9 の発現が, NSIP と BOOP では MMP-2 の発現が優位であり, 異なる MMP の発現がそれぞれの間質性肺炎の病理学的特徴に関係している可能性が示唆された. また, 間質性肺疾患の病因として炎症性サイトカインや成長因子等の種々のメディエーターの関与が報告されている⁸⁾. 特に TGF- β は線維芽細胞を刺激し, ECM の成分であるコラーゲンやフィブロネクチンの合成を誘導し, 肺の線維化に関与することが考えられている^{9,10)}.

本研究では各種肺細胞を取り巻くメディエーターや ECM の変化が MMP を介して間質性肺疾患における組織リモデリングに関与すると仮定し, 単球系, II 型上皮, 気管支上皮の 3 種類の細胞株である THP-1, A549, BET-1A における MMP-2 及び MMP-9 の発現を検討した. また各種サイトカインや TGF- β , LPS 等の刺激に対する MMP の発現の変化, ECM の相違による MMP の発現の変化を検討した.

対象と方法

単球系, II 型上皮, 気管支上皮の 3 種類の細胞株である THP-1, A549, BET-1A を用い, 基底膜傷害に重要な役割を果たす MMP-2 及び MMP-9 について炎症性サイトカインや TGF- β , LPS 等の刺激に対する各々の細胞株の上清中の発現をザイモグラムを用いて評価した. 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られる. その濃度を NIH-Image にて定量化し, MMP 活性とした. また単球系, II 型上皮, 気管支上皮の細胞株における TNF- α , IL-1 β , TGF- β によって誘導された MMP-2 及び MMP-9 の発現の IFN γ や Dexamethasone (Dx) による変化を同様にザイモグラムを用い評価した. また IV 型コラーゲン及び I 型コラーゲン, フィブロネクチンという 3 種類の ECM を用いることにより BET-1A における MMP の発現の相違を同様にザイモグラムを用い検討した.

結 果

THP-1 及び A549, BET-1A における MMP-2 及び MMP-9 の発現について炎症性サイトカインや TGF- β , LPS 等の刺激に対する上清中の発現をザイモグラムを用いて評価した. すべての細胞種で proMMP-2 と proMMP-9 に対応する分子量が 72kDa と 92kDa の部位にバンドを認めた. THP-1 では TNF- α 及び LPS, IL-1 β の刺激にて濃度依存的に proMMP-9 の発現の増加を認めた (Fig.1A). TNF- α 10-1000 U/ml あるいは LPS 1-10 μ g/ml, IL-1 β 10-100 ng/ml の投与で proMMP-9 の発現は約 5 倍増加した (Fig.1B). TGF- β は proMMP-9 の産生にはほとんど影響を及ぼさず, proMMP-2 の発現を増加させた (Fig.1A, C). TGF- β 100 ng/ml の投与で proMMP-2 の発現は約 5 倍に増加した. また Dx は proMMP-2 及び proMMP-9 の発現を抑制した.

A549 では TNF- α 及び LPS, IL-1 β の刺激にほとんど影響を受けなかった (Fig.2A-C). しかし, TGF- β は proMMP-2 の発現を濃度依存的に増加させた (Fig.2A). TGF- β 10-100 ng/ml の投与で proMMP-2 の発現が約 5 倍に増加した (Fig.2C). また Dx は proMMP-2 及び proMMP-9 の発現を抑制した.

BET-1A では, TNF- α 及び LPS, IL-1 β , TGF- β の刺激に対して濃度依存的に proMMP-9 の発現が増加した (Fig.3A, B). TNF- α 10-1000 U/ml あるいは IL-1 β 1-100 ng/ml, TGF- β 1-100 ng/ml の投与で proMMP-9 の発現は 3-4 倍に増加した. Dx は proMMP-2 及び proMMP-9 の発現を抑制した. TNF- α 及び LPS, IL-1 β の刺激は proMMP-2 の発現にはほとんど影響を及ぼさなかったが, TGF- β は proMMP-9 の発現を僅かながら増加させた.

TNF- α あるいは IL-1 β , TGF- β に誘導された MMP-9 及び MMP-2 の発現の IFN γ あるいは Dx による変化を評価した. THP-1 では IFN γ あるいは Dx が TNF- α あるいは IL-1 β によって誘導された proMMP-9 の発現を, また TNF- α あるいは IL-1 β , TGF- β によって誘導された proMMP-2 の発現を抑制した (Fig.4). A549 では IFN γ あ

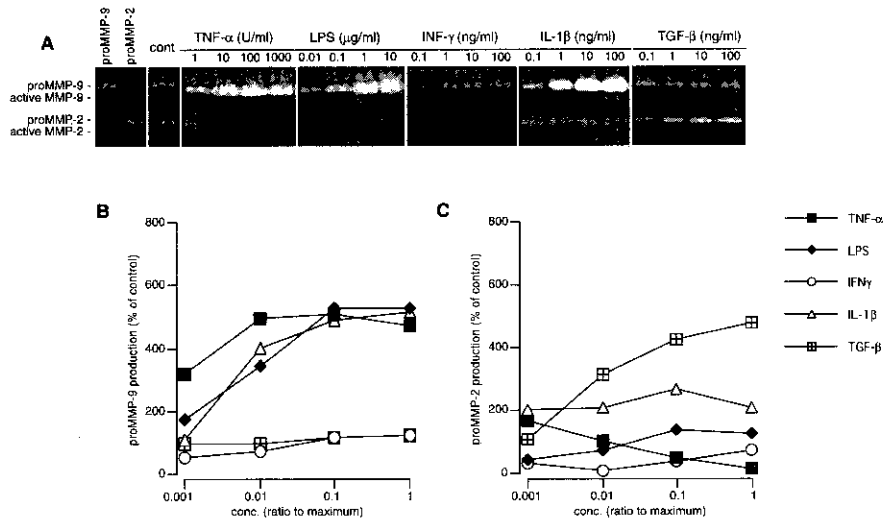


Fig.1 THP-1 細胞におけるサイトカインによる MMP の誘導

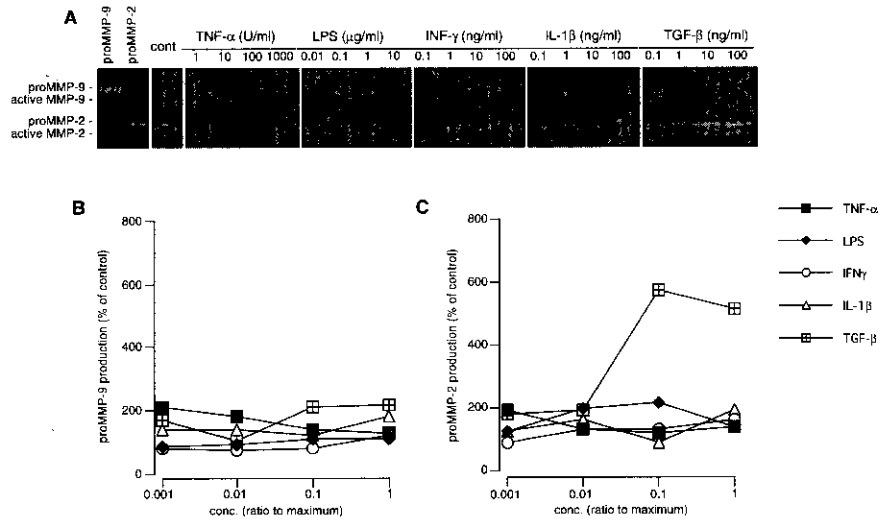


Fig.2 A549 細胞におけるサイトカインによる MMP の誘導

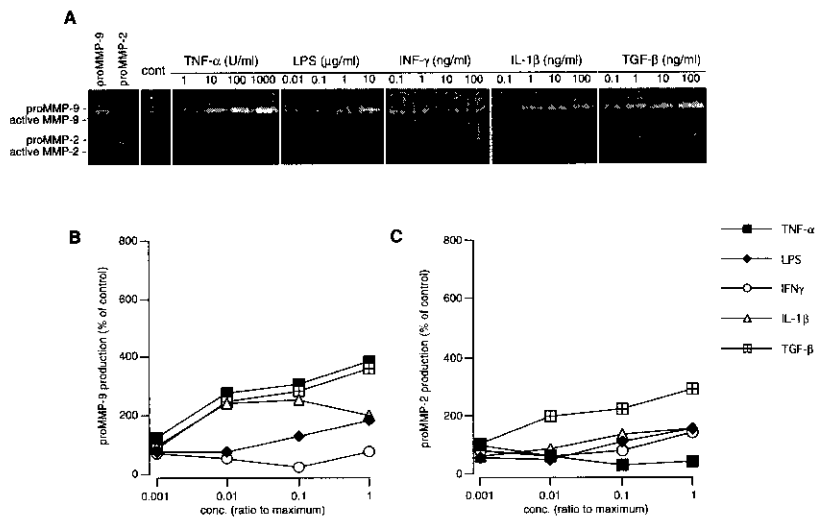


Fig.3 BET-1A 細胞におけるサイトカインによる MMP の誘導

るいは Dx が TNF- α によって誘導された proMMP-9 の発現及び TGF- β によって誘導された proMMP-2 の発現を抑制した. BET-1A では IFN γ あるいは Dx が TNF- α あるいは IL-1 β , TGF- β によって誘導された proMMP-2 及び proMMP-9 の発現を抑制した.

次に IV 型コラーゲン及び I 型コラーゲン, フィブロネクチンの 3 種類の ECM を用いることにより MMP-2 及び MMP-9 の発現の相違を同様にザイモグラムを用い検討した. THP-1 及び A549 においては明らかな変化は認めな

かった (図示せず). IV 型コラーゲンと比較すると, I 型コラーゲンあるいはフィブロネクチンを用いた場合 BET-1A は僅かに非刺激下の proMMP-9 の発現を増強した (Fig.5). TNF- α あるいは IL-1 β , TGF- β は proMMP-9 の発現を増加し, 更にこれらにより増加した proMMP-9 の発現は IV 型コラーゲンより I 型コラーゲンあるいはフィブロネクチンを用いた場合増強された. ECM の相違は IL-1 β あるいは TGF- β により増加した proMMP-2 の発現に僅かに影響を及ぼした (Fig.6A, C).

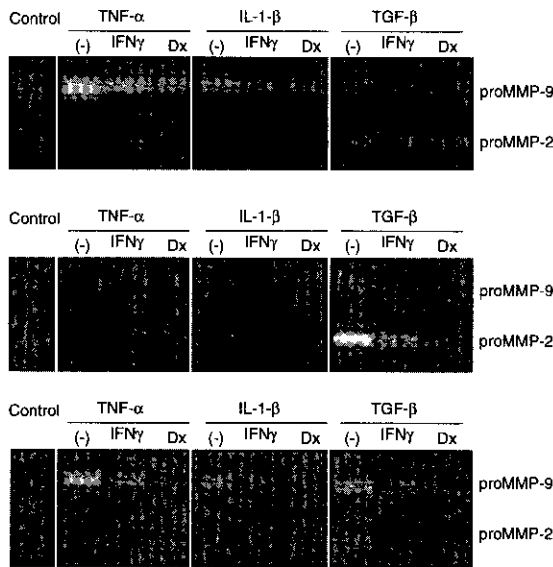


Fig.4 各種細胞における TNF- α , IL-1 β , TGF- β 1 に誘導された MMP に対する IFN γ や Dx の効果

考察・結論

MMP による ECM の分解は生理的な組織構築や病的組織の組織破壊の際に認められる^{3,4)}. MMP-2 の発現は線維芽細胞や上皮細胞において, MMP-9 の発現は単球やマクロファージ系の細胞において認められる¹¹⁾. MMP-2 は微量かつ持続的に発現しているが, MMP-9 は非刺激下にはほとんど産生されないのに対し, 炎症性サイトカインの産生が亢進すると著明な誘導が惹起される. またマクロファージと同様に細気管支や肺胞上皮細胞は肺傷害や肺線維化のような病的条件下で MMP-2 や MMP-9 を発現することにより ECM の調節機構としての役割を果たしている^{4,12,13)}. 本研究は単球系, II 型上皮, 気管支上皮の 3 種類の細胞株である THP-1, A549, BET-1A を用い, *in vitro* での炎症性サイトカイン, 増殖性サイトカイン, ECM による MMP-2 及び MMP-9 の発現を検討した.

今回, THP-1 及び BET-1A においては炎症性サイトカインである TNF- α や IL-1 β , LPS による刺激において proMMP-9 の発現が濃度依存的に誘導されるが,

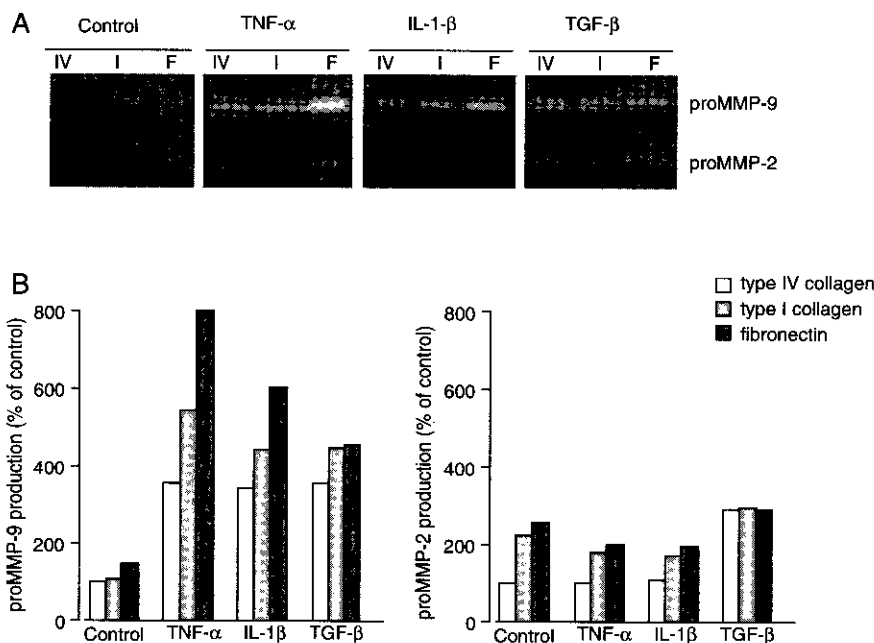


Fig.5 BET-1A 細胞における MMP の発現に対する ECM の効果

proMMP-2 の発現の誘導を全く認めなかった。これらの結果により炎症等に伴い炎症性サイトカインが亢進するとマクロファージや上皮細胞における MMP-9 の発現を誘導し、基底膜の破壊に関与していることが示唆された。また今回 A549 では各種刺激においてほとんど誘導されなかったが、TGF- β は THP-1 や A549 において proMMP-2 の発現を誘導した。MMP-2 は非刺激下においても微量かつ持続的に発現しており、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単球系や II 型上皮細胞において誘導され、修復あるいは構造改変に関与しているものと考えられた^{11,14}。BET-1A では炎症性サイトカインのみならず TGF- β により proMMP-9 の発現の増強が認められた。炎症性サイトカインによる MMP-9 の発現の増強は炎症等の際の基底膜の破壊に重要である。また TGF- β は肺線維化において重要な因子であり、線維化病変において気管支上皮細胞が MMP-9 を発現することにより直接 ECM 改変を調節することが推測された。

IFN γ は細胞種の相違により種々の効果を有する。IFN γ はヒトメラノーマ細胞において MMP-2 と MMP-9 の発現を増加させ、中皮細胞ではこれらの発現に影響を及ぼさない^{15,16}。更に IFN γ が MMP の発現を抑制するという多くの報告がある¹⁷。本研究においては IFN γ が THP-1, A549, BET-1A のいずれにおいても MMP-2 及び MMP-9 の発現に影響を及ぼさないものの、TNF- α , IL-1 β , TGF- β で誘導した MMP の発現を抑制した。同様に Dx は非刺激下及び刺激下のいずれの場合も MMP の発現を抑制した。IFN γ や Dx が炎症に伴う ECM 傷害を抑制する可能性が示唆された。

次に我々は BET-1A における MMP の発現に対する ECM の影響を検討した。肺傷害によって引き起こされた基底膜の破壊は気管支上皮細胞に影響を及ぼす^{12,18}。正常基底膜の主たる構成成分である IV 型コラーゲンにおいて各種刺激における MMP-2 及び MMP-9 の発現は弱く、病的状態で認められる I 型コラーゲンやフィブロネクチンではこれらの発現が増強した。更に IV 型コラーゲンに比べ I 型コラーゲンやフィブロネクチンでは TNF- α や IL-1 β , TGF- β で誘導された MMP-2 や MMP-9 の発現が増強した。炎症性サイトカインや増殖性サイトカインの存在下、非存在下いずれにおいても ECM が MMP の発現に影響を及ぼすことが推測された。

細胞種や各種刺激、細胞-細胞外マトリックス相互作用が MMP の発現に影響を及ぼし、肺のリモデリングに関与していることが示唆された。また上皮細胞を介した ECM turnover において正常基底膜の主たる構成成分である IV 型コラーゲンは I 型コラーゲンやフィブロネクチンに比べて支持的機能を持っていることが推測された。

参考文献

- 1) Carrington CB, Gaensler EA, Coutu RE, FitzGerald MX, and Gupta RG. Natural history and treated course of usual and desquamative interstitial pneumonia. *N Engl J Med.* 298: 801-809 (1978).
- 2) Cherniack RM, Crystal RG, and Kalica AR. Current concepts in idiopathic pulmonary fibrosis: a road map for the future. *Am Rev Respir Dis.* 143: 680-683 (1991).
- 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: 687-698 (1998).
- 5) Murphy G, McAlpine CG, Poll CT, and Reynolds JJ. Purification and characterization of a bone metalloproteinase that degrades gelatin and type IV and V collagen. *Biochim Biophys Acta.* 831: 49-58 (1985).
- 6) O'Connor CM and FitzGerald MX. Matrix metalloproteinases and lung disease. *Thorax.* 49: 602-609 (1994).
- 7) Suga M, Iyonaga K, Okamoto T, Gushima Y, Miyakawa H, Akaike T, and Ando M. Characteristic elevation of matrix metalloproteinase activity in idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med.* 162: 1949-1956 (2000).
- 8) Zhang Y, Lee TC, Guillemin B, Yu MC, and Rom WN. Enhanced IL-1 β and tumor necrosis factor- α release and messenger RNA expression in macrophages from idiopathic pulmonary fibrosis or after asbestos exposure. *J Immunol.* 150: 4188-4196 (1993).
- 9) Ignatz RA, and Massague J. Transforming growth factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem.* 261: 4337-4345 (1986).
- 10) Khalil N, O'Connor RN, Unruh HW, Warren PW, Flanders KC, Kemp A, Berezney OH, and Greenberg AH. Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor- β in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 5: 155-162 (1991).
- 11) Murphy G and Docherty AJP. The matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Am J Respir Cell*

- Mol Biol. 7: 120-125 (1992).
- 12) Yao PM, Delclaux C, D'Ortho MP, Maitre B, Harf A, and Lafuma C. Cell-matrix interactions modulate 92-kDa gelatinase expression by human bronchial epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 18: 813-822 (1998).
 - 13) Pardo A, Ridge K, Uhal B, Sznajder JJ, and Selman M. Lung alveolar epithelial cells synthesize interstitial collagenase and gelatinases A and B *in vitro*. *Int J Biochem Cell Biol.* 29: 901-910 (1997).
 - 14) Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, and Quaranta V. Induction of cell migration by matrix metalloproteinase-2 cleavage of laminin-5. *Science.* 277: 225-228 (1997).
 - 15) Hujanen ES, Vaisanen A, Zheng A, Tryggvason K, and Turpeenniemi-Hujanen T. Modulation of Mr 72000 and Mr 92000 type-IV collagenase (gelatinase A and B) gene expression by interferons alpha and gamma in human melanoma. *Int J Cancer.* 58: 582-586 (1994).
 - 16) Marshall BC, Santana A, Xu QP, Peterson MJ, Campbell EJ, Hoidal JR, and Welgus HG. Metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases in mesothelial cells. *J Clin Invest.* 91: 1792-1799 (1993).
 - 17) Saren P, Welgus HG, and Kovanen PT. TNF- α and IL-1 β selectively induce expression of 92-kDa gelatinase by human macrophages. *J Immunol.* 157: 4159-4165 (1996).
 - 18) Yao PM, Maitre B, Delacourt C, Buhler JM, Harf A, and Lafuma C. Divergent regulation of 92-kDa gelatinase and TIMP-1 by HBECs in response to IL-1 β and TNF- α . *Am J Physiol.* 273 (*Lung Cell Mol Physiol.* 17) : L866-874 (1997).

特発性肺線維症の肺胞上皮細胞過形成病変における TGF- β II 型受容体の genomic instability の検討

林 清二* 森 雅秀 木田 博 森下 裕
合屋 将 松岡 洋人

transforming growth factor (TGF)- β は特発性肺線維症の病態形成において重要な役割を果たしているが、*in vitro* においても肺胞上皮細胞の増殖を抑制する。一方、特発性肺線維症の組織学的特徴の一つである肺胞上皮細胞の過形成病変に対しては、これまでほとんど解析されていない。肺胞上皮細胞の過形成が TGF- β の制御から逸脱したためではないかと仮定し、その機序の一つとして既に報告のある TGF- β II 型受容体 (T β R II) の exon3 に存在する microsatellite 部位における欠失の検出を試みた。

特発性肺線維症患者の組織標本上から microdissection 法によって細胞を抽出し、得られた DNA を鋳型として nested PCR 法を用いて増幅し検出した。その結果、IPF 11 症例の肺胞上皮過形成病変 121 個所の中で 5 症例 9 個所において変異を認めた。また壁の肥厚した肺動脈においても一部で変異が確認された。T β R II に対する免疫組織染色では T β R II 遺伝子の欠失が確認された肺胞上皮の部位で染色性の低下を確認した。肺胞上皮細胞過形成の一部の病変については、TGF- β による上皮細胞の増殖抑制作用から逸脱することによる過形成である可能性が示唆された。

Microsatellite instability in the transforming growth factor- β type II receptor gene in alveolar lining epithelial cells of idiopathic pulmonary fibrosis

Seiji Hayashi, Masahide Mori, Hiroshi Kida, Hiroshi Morishita,
Sho Goya, Hiroto Matsuoka

Department of Molecular Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine

It has been reported that transforming growth factor (TGF)- β , which plays an integral role in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), suppresses proliferation of alveolar epithelial cells *in vitro*. Although hyperplastic lesions of alveolar lining epithelial cells (ALECs) are characteristic pathologic features of IPF, the mechanism of their involvement in the pathogenesis has not been extensively studied yet. On the assumption that the hyperplastic ALECs have escaped from the growth inhibitory effects of TGF- β , we searched for mutations in the microsatellite of the TGF- β receptor type II (T β R II) gene. To detect a deletion in the polyadenine tract in exon 3 of the T β R II gene, cells were isolated by microdissection from lung sections of IPF patients, and DNA was extracted from these cells and amplified by high fidelity PCR.

A total of 121 sites of hyperplastic ALECs from 11 IPF patients were analyzed, and a one-base-pair deletion was detected in 9 sites from 5 patients. The mutation was also detected in smooth muscle-like cells of the thickened pulmonary artery. In some tissue areas where the deletion was detected, low T β R II expression was confirmed by immunohistochemical staining. These data suggest that microsatellite instability in the T β R II gene occurred in some lesions of hyperplastic ALECs in IPF, although at a low incidence, and this genetic disorder might play a partial role in the pathologic changes of IPF.

はじめに

特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) をはじめとする肺の線維化病変において、肺胞上皮細胞の過形成病変は組織学的特徴の一つとされている^{1,2)}。この過形成は慢性炎症による上皮傷害に対する修復の過程で生じるとされているが、その病態は十分には解明されていない。肺胞上皮細胞についてはサイトカインの一種である transforming growth factor (TGF)- β がその増殖調節に関与することを示唆する報告があり³⁾、また IPF の組織においては肺胞上皮細胞などで TGF- β が発現していることが証明されている^{4,5)}。以前我々はラットに対し経気道的に TGF- β 1 遺伝子を導入し強制発現させると肺間質に明らかな線維化が起こり、TGF- β が IPF の病態形成の上で極めて重要な因子であることを報告した⁶⁾。

また最初に一部の消化器癌で報告された^{7,8)}、TGF- β の信号伝達に不可欠な II 型受容体 (T β RII) の変異は、組織の線維化である冠状動脈硬化病変や肝硬変でも報告された^{9,10)}。これは T β RII 遺伝子の exon3 に adenine が 10 塩基連続する microsatellite 部位 (以下 A10 と表記) での 1 塩基対ないしそれ以上の欠失によるものとされている。今回我々は、肺胞上皮細胞でも同様の変異が起こって TGF- β に不応性となり過形成病変が生じているのではないかと仮定して以下の検討を行った。

方 法

(1) 検体の作成

臨床的に特発性肺線維症を疑われ、胸腔鏡下肺生検 (VATS) によって組織学的に UIP と診断された IPF 11 例 (table 1) のパラフィン固定肺組織から厚さ 1 ないし 3 μ m の切片を作製した。また肺癌切除肺 3 例の正常部分を含む組織からも同様に切片を作製した。この標本を脱パラフィン化してヘマトキシリン染色を行った後に、電動マイクロマニピュレーター (Narishige 社) を用いた

microdissection 法により標本上の肺胞上皮過形成病変、気道上皮、線維化巣、肺動脈などから 1 箇所につき約 10 から 50 個程度の細胞を回収した¹¹⁾。コントロールとして肺癌症例で腫瘍細胞の浸潤を組織学的に認めない部位の気管支上皮、肺動脈からも同様に細胞を回収した。

(2) T β RII 遺伝子の primer の設定

T β RII 遺伝子の exon3 に adenine が 10 塩基連続する microsatellite 部位を挟む様に 2 組の primer を設定した。

primer 1 : 5'-CAGTTTGCCATGACCCCAAG;

primer 2 : 5'-CTTCTGAGAAGATGATGTTGTCAT;

primer 3 : 5'-CCCCTACCATGACTTTATTCTGGA;

primer3R:5'-Rhodamin-

CCCCTACCATGACTTTATTCTGGA;

primer 4 : 5'-CATTGCACTCATCAGAGCTACAGG

(3) T β RII 遺伝子の欠失の確認

これらの細胞を proteinase K 溶液 10 μ l (proteinase K 200 μ g/ml, Tris-HCl 20mM, EDTA 1mM, Tween20 0.5%) で 37 $^{\circ}$ C 24-48 時間反応させた後、98 $^{\circ}$ C で 8 分加熱処理し、この反応液を鋳型として high fidelity DNA polymerase (KOD polymerase, TOYOBO) と Rhodamin 標識プライマーを用いて nested PCR を行い、T β RII 遺伝子の exon3 を増幅した。条件設定は以下の通り。first PCR; Tris-HCl (pH 8.0) 0.12M, KCl 10mM, (NH₄)₂SO₄ 6mM, TritonX-100 1%, BSA 10 μ g/ml, MgCl₂ 2mM, dNTPs 0.2mM each, primer 1 0.3 μ M, primer 2 0.3 μ M, KOD polymerase 5U/ μ l 全量 15 μ l; 94 $^{\circ}$ C 10 分, 94 $^{\circ}$ C 1 分 61 $^{\circ}$ C 1 分 72 $^{\circ}$ C 20 秒 30 サイクル, 72 $^{\circ}$ C 5 分。second PCR; first PCR の反応液 1 μ l, primer 3R 0.5 μ M, primer 4 0.5 μ M, KOD polymerase 5U/ μ l 全量 15 μ l; 94 $^{\circ}$ C 10 分, 94 $^{\circ}$ C 1 分 61 $^{\circ}$ C 1 分 72 $^{\circ}$ C 20 秒 30 サイクル, 72 $^{\circ}$ C 5 分。PCR における陰性対照としては H₂O を用い、陽性対照として正常ヒト末梢血及びヒト大腸癌細胞株 HCT116 (ATCC Number: CCL-247) から抽出した genome DNA 180pg を鋳型とした (HCT116 株は T β RII 遺伝子の exon3 上の A10 部位で 1 塩基欠落して A9 となっている¹²⁾)。PCR の後、検体に Alu I 2U を加え 37 $^{\circ}$ C 3 時間以上反応させた。95 $^{\circ}$ C で 4 分加熱変性させてから、ポリアクリルアミド変性 (8M 尿素) ゲルを用いて 2500V30W で 2.5 時間電気泳動して分離した。FM-BIO II multi-view (Takara) を用い 605nm の吸光度を測定してバンドの濃度を定量化し、陽性対照のバンドを用いて 1 塩基分上下に生じるダミーのバンドを補正した上で、1 塩基対欠失バンド (A9 = 98bp) / 正常バンド (A10 = 99bp) \times 100 (%) を deletion rate として計算した。

(4) 免疫組織染色

一部の組織については T β RII に対する免疫組織染色を行った。T β RII の細胞内ドメイン C 末端 16 アミノ酸残基に対する抗体である抗 T β RII (C-16) 抗体 (Santa Cruz) 0.5 μ g/ml を用い、VECTASTAIN UNIVERSAL Quick キッ

Table1 Patients' backgrounds

Case	age/sex	BI	(pH/PaCO ₂ /PaO ₂)	(%VC/FEV1.0%)	complication
1.	67 M	800	7.43 / 37.9 / 81.5	73 / 91	DM
2.	68 M	500	7.40 / 41.4 / 97.3	113 / 75	LC
3.	51 M	3000	7.34 / 35.5 / 88.5	49 / 100	DM, HC
4.	59 M		no information		
5.	44 M	840	7.38 / 47.3 / 86.2	75 / 91	
6.	73 F	0	7.40 / 45.3 / 79.7	49 / 100	DM
7.	62 M	2280	7.39 / 42.6 / 95.2	55 / 100	HC
8.	55 F	500	7.40 / 38.6 / 96.1	98 / 79	
9.	70 M	(+)	7.43 / 47.6 / 78.0	90 / 74	LC
10.	79 M	1160	no information		LC
11.	58 F	0	7.40 / 71.6 / 74.7	60 / 86	

sex : M, male; F, female; smoking : BI, Brinkmann Index (smoking x years); complication : DM, diabetes mellitus; LC, lung cancer; HC, chronic hepatitis C.

大阪大学大学院医学系研究科分子病態内科学講座

* びまん性肺疾患研究班 分担研究者

ト (VECTOR laboratories) を使用し, DAB を基質として発色させた。

(5) TβRII 遺伝子の塩基配列の決定

さらに一部の検体については塩基配列を決定した。deletion rate の高い検体の first PCR の反応液を鋳型とし primer 3 と primer 4 を用いて second PCR (反応液量 50 μl) を行い, その反応液を低融点アガロースゲルを用いて泳動分離し断片を回収した。この PCR 産物約 50ng と primer 3 あるいは primer 4 を用いて Dye Terminator 法によって増幅し (ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit: PERKIN ELMER), 373A DNA Sequencing System (Applied Biosystems) を用いて電気泳動を行い塩基配列を決定した。

(6) 肺癌組織における TβRII 遺伝子変異の検出

生検もしくは手術によって得られた肺癌の検体から DNA を抽出し, 上記の方法で TβRII 遺伝子変異の検出を試みた。組織型は腺癌 53 例, 扁平上皮癌 15 例, 大細胞癌 10 例, 非小細胞癌 5 例, 小細胞癌 30 例の計 113 例である。

結 果

IPF 11 症例の肺胞上皮過形成病変 121 個所が解析可能で, その中で 5 症例 9 個所において deletion rate が 20 から 100% の明らかな変異を認めた (table 2), また壁の肥厚した肺動脈 (多くは組織学的には中膜の筋線維芽細胞と考えられる) においても一部で変異が確認された。その一方で, 組織学的に正常と思われる末梢気管支の気道上皮細胞や拡大した気腔の内面を広く覆う背の高い線毛上皮細胞, 線維芽細胞の増殖部分では変異は検出されなかった。代表的な例を fig.1 に示す。

TβRII に対する免疫組織染色では線維化部分の肺胞上皮細胞や間質で増殖した筋線維芽細胞は濃染される傾向にあったが, 肺胞上皮の TβRII 遺伝子の欠失が確認された組織の連続切片で同一部位の染色性の低下が一部確認された。(fig.2)

塩基配列を決定した断片では, 従来から報告されていた A10 での 1 塩基対の欠失を認めた (fig.3)。

対照疾患として肺癌 113 例に対し, 同様の検索を行ったが, いずれも上記の変異を認めなかった。

Table2 Deletion mutations in exon 3 of the TGF-β receptor type II in various cell types of IPF

cell type	positive / total
IPF	
alveolar lining epithelial cells	9 / 121 sites (5 / 11 cases)
pulmonary artery#	8 / 40 sites (3 / 10 cases)
fibroblasts	none / 18 sites
bronchial epithelial cells	none / 18 sites
non-invasive lesion of lung cancer	
bronchial epithelial cells	none / 10 sites (none / 3 cases)
pulmonary artery	none / 9 sites (none / 3 cases)

Samples in which the deletion rates were over 20% were defined as positive.

smooth muscle-like cells in the thickened pulmonary artery wall

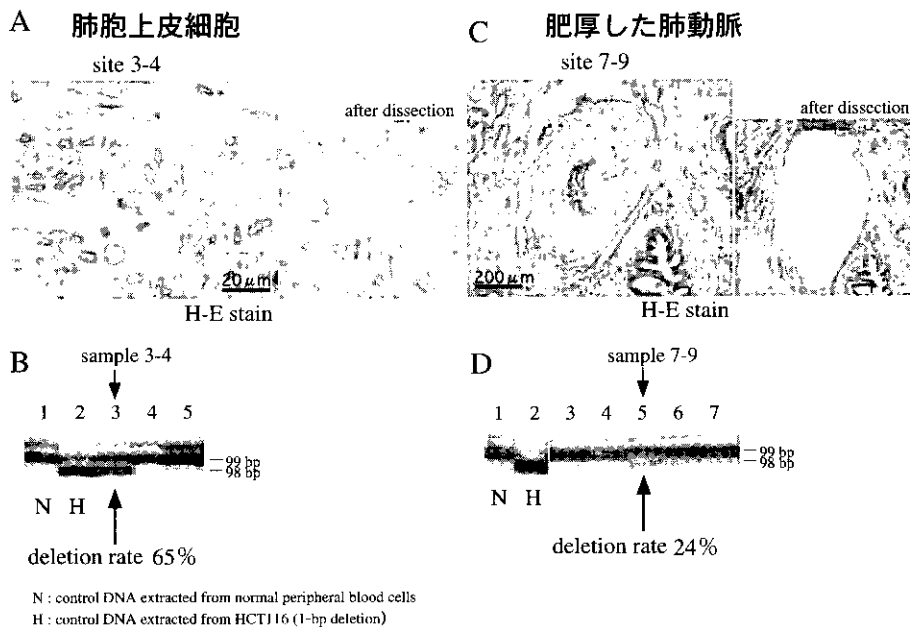


Fig.1

考案・結論

微小組織における特定の部分の遺伝子異常を検索するため今回は microdissection 法による細胞抽出を行い, さらに McCaffrey らの方法⁹⁾ を一部改変して行った。

TGF-β はこれまでの様々な報告から, 肺線維症の病態形成において重要な役割を果たしているのは明らかであるが, その詳細な解析は十分とはいえない。

細胞表面の TGF-β 受容体には I 型と II 型の 2 種類があ

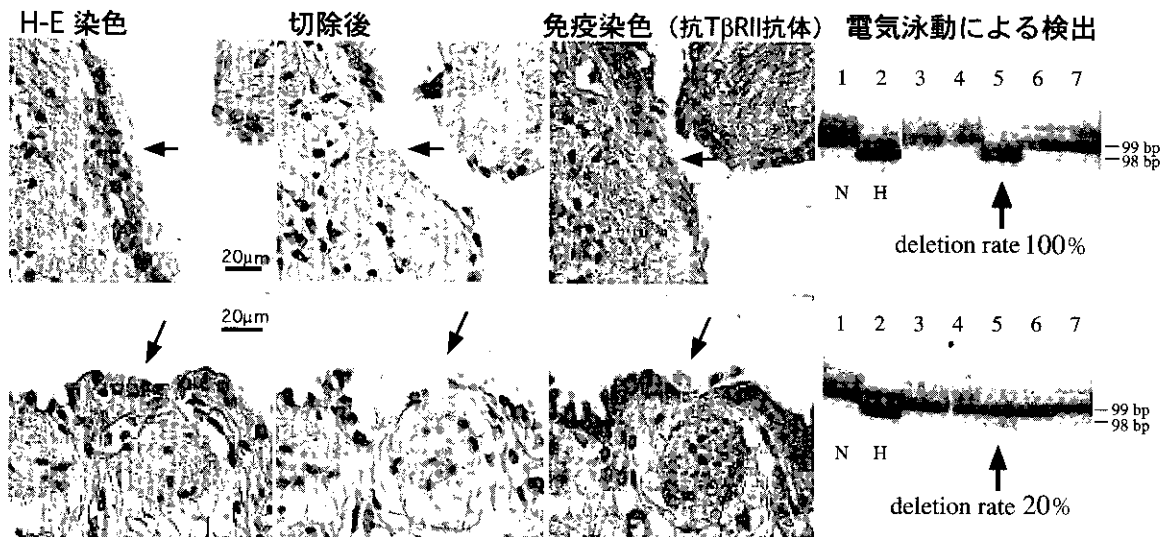
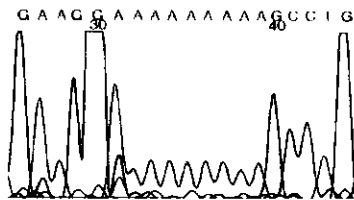


Fig.2

1塩基対欠失 (sample 5-7の分析)

GAAGGAAAAAAAAAAGCCTG



正常 (sample 5-6の分析, antisense)

CAGGCTTTTTTTTTCCTTC

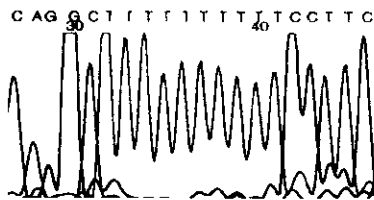


Fig.3

り、この2種類の受容体が TGF- β に結合し各々2分子ずつ4量体を形成することによって初めて細胞内に信号伝達が行われる^{13,14)}。今回部分的に観察された TGF- β II 型受容体の変異では膜貫通部以下の部分が欠落する不完全な蛋白が発現するため、この変異が同一細胞内で homogeneous に生じた場合には TGF- β による信号伝達が伝わらなくなり、その細胞においては TGF- β による調節から逸脱し増殖調節機構に異常をきたす可能性が考えられる¹⁵⁾。炎症後の修復の細胞増殖の過程でもともと不安定な microsatellite での変異が生じるのではないかと推測される。

従来、特発性肺線維症の組織で特徴的とされる肺胞上皮細胞の過形成病変の成因については、IPF 患者では何らかの刺激で惹起された炎症によって肺胞内腔が障害され、これを修復しようとして続発性に肺胞上皮細胞が増殖してくる結果として過形成病変が形成されていると考えられてきた。しかしながら、今回の検討によって一部の病変については、TGF- β による上皮細胞の増殖抑制作用から逸脱することによる過形成である可能性が示された。

肺の線維化に対する影響としては、肺上皮特異的に細胞内ドメインを欠失させた TGF- β II 型受容体の変異体を強発現させたトランスジェニックマウスにおいて肺臓の線維化が惹起されたという報告があり¹⁶⁾、今回確認されたような肺胞上皮細胞における TGF- β の不応性が、周囲の線維化を誘導する可能性も考えられる。

また、消化器癌を中心に TGF- β II 型受容体の変異が報告されているため、肺癌においても検討を加えた。我々の検討では陽性の所見は得られなかった。しかし、諸家の報告では腺癌細胞株で変異を認めたという報告もあり¹⁷⁾、一部の発癌の母地となる可能性は否定できない。

なお、この研究に際し、組織検体をご提供頂いた国立療養所近畿中央病院山本暁先生と国立療養所刀根山病院伊藤正巳先生に厚く深謝いたします。

また、大阪大学医学部附属病院、国立療養所近畿中央病院、国立療養所刀根山病院の各々の倫理委員会において本研究の実施の承認を得ている。

参考文献

- 1) Katzenstein, AL, and Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 1301-1315, 1998.
- 2) Travis WD, Matsui K, Moss J, and Ferrans VJ. Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia: prognosis significance of cellular and fibrosing patterns - survival comparison with usual interstitial pneumonia and desquamative interstitial pneumonia. *Am. J Surg Pathol* 24: 19-33, 2000.
- 3) Khalil N, O'Connor RN, Flanders KC, Shing W, and Whitman CI. Regulation of type II alveolar epithelial cell proliferation by TGF- β during bleomycin-induced lung injury in rats. *Am J Physiol* 267: L498-507, 1994.
- 4) Khalil N, O'Connor RN, Unruh HW, Warren PW, Flanders KC, Kemp A, Berezney OH, and Greenberg AH. Increased production and immuno-histochemical localization of transforming growth factor- β in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5: 155-162, 1991.
- 5) Broekelmann TJ, Limper AH, Colby TV, and McDonald JA. Transforming growth factor β 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6642-6646, 1991.
- 6) Yoshida M, Sakuma J, Hayashi S, Abe K, Saito I, Harada S, Sakatani M, Yamamoto S, Matsumoto N, Kaneda Y, and Kishimoto T. A histologically distinctive interstitial pneumonia induced by overexpression of the interleukin 6, transforming growth factor- β 1, or platelet-derived growth factor B gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 9570-9574, 1995.
- 7) Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, Brattain M, and Willson JKV. Inactivation of the type II TGF- β receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268: 1336-1338, 1995.
- 8) Vincent F, Hagiwara K, Ke Y, Stoner GD, Demetrick DJ, and Bennett WP. Mutation analysis of the transforming growth factor β type II receptor in sporadic human cancers of the pancreas, liver, and breast. *Biochem Biophys Res Commun* 223: 561-564, 1996.
- 9) McCaffrey TA, Du B, Consigli S, Szabo P, Bray PJ, Hartner L, Weksler BB, Sanborn TA, Bergman G, and Bush HL Jr. Genomic instability in the type II TGF- β 1 receptor gene in atherosclerotic and restenotic vascular cells. *J Clin Invest* 100: 2182-2188, 1997.
- 10) Furuta K, Misao S, Takahashi K, Tagaya T, Fukuzawa Y, Ishikawa T, Yoshioka K, Kakumu S. Gene mutation of transforming growth factor β 1 type II receptor in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 81: 851-853, 1999.
- 11) Sugio K, Kishimoto Y, Virmani AK, Hung JY, and Gazdar AF. K-ras mutations are a relatively late event in the pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Res* 54: 5811-5815, 1994.
- 12) Wang J, Sun L, Myeroff L, Wang X, Gentry LE, Yang J, Liang J, Zborowska E, Markowitz S, Willson JKL, and Brattain MG. Demonstration that mutation of the type II transforming growth factor β receptor inactivates its tumor suppressor activity in replication error-positive colon carcinoma cells. *J Biol Chem* 270: 22044-22049.
- 13) Wrana JL, Attisano L, Carcamo J, Zentella A, Doody J, Laiho M, Wang XF, and Massague J. TGF β signals through a heteromeric protein kinase receptor complex. *Cell* 1992; 71: 1003-1014, 1995.
- 14) Franzen P, ten Dijke P, Ichijo H, Yamashita H, Schultz P, Heldin CH, and Miyazono K. Cloning of a TGF β type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF β type II receptor. *Cell* 75: 681-692, 1993.
- 15) Vincent F, Nagashima M, Takenoshita S, Khan MA, Gemma A, Hagiwara K, and Bennett WP. Mutation analysis of the transforming growth factor-beta type II receptor in human cell lines resistant to growth inhibition by transforming growth factor- β . *oncogene* 15: 117-122, 1997.
- 16) Bottinger EP, Jakubczak JL, Roberts IS, Mumy M, Hemmati P, Bagnall K, Merlino G, and Wakefield LM. Expression of a dominant-negative mutant TGF- β type II receptor in transgenic mice reveals essential roles for TGF- β in regulation of growth and differentiation in the exocrine pancreas. *EMBO J* 16: 2621-2633, 1997.
- 17) Kim WS, Park C, Hong SK, Park BK, Kim HS, Park K. Microsatellite instability (MSI) in non-small cell lung cancer (NSCLC) is highly associated with transforming growth factor-beta type II receptor (TGF- β RII) frameshift mutation. *Anticancer Res* 20 (3A): 1499-502, 2000.

放射線肺臓炎における肺線維芽細胞増殖因子としての トロンビンの関与

菅根 三郎* 谷 憲治 西岡 安彦 黄 陸平

【目的】放射線肺臓炎における液性因子、特に血液凝固因子であるトロンビンの関与について検討した。
【研究方法】放射線肺臓炎モデルは6週齢ウイスター系ラット(約200g)にWardらの方法に準じて全肺に15Gyの単回照射を行うことで作成した。放射線照射後、2, 4, 8, 18週後に6mlの生理食塩水にて5回気管支肺胞洗浄を行いBALFを回収した。1200rpmにて遠心後、上清を-80℃に保存した。実験には、さらに透析にて10倍に濃縮したBALFを使用した。肺線維芽細胞の採取は、放射線照射後第4週のラット肺よりPhanらの方法に準じて行った。すなわち採取した肺をハサミにて細片後トリプシン処理することで肺組織から線維芽細胞株を作成した。3~10継代で実験に使用した。トロンビン活性の測定は、Boc-Val-Pro-Arg-MCA基質の分解で測定した。また線維芽細胞の増殖活性は、MTT法にて計測した。同時に、BALFにanti-thrombinIII(ATIII), argatrobanのトロンビンインヒビターを加えてそれぞれの活性の抑制効果を検討した。組織学的検討には、ヘマトキシリン・エオジン染色、アザン・マロリー染色を使用した。【研究結果】照射肺組織所見では照射4週目から間質への細胞浸潤、隔壁の肥厚がみられた。18週目には線維性変化をみとめた。BALF中のトロンビン活性は、非照射ラットのBALF中には検出できなかったが、放射線照射後2週で 23.9 ± 20.1 nmol/h, 4週で 428.9 ± 328.9 nmol/h, 8週で 71.9 ± 15.1 nmol/h, 18週で 56.7 ± 6.8 nmol/hであり、照射後4週目で最も高かった。同時に測定した、カテプシンH, カテプシンB, カテプシンGの活性は放射線照射および非照射ラットで有意差は認められなかった。BALF中の線維芽細胞増殖活性は、10%のBALFを添加した場合、非照射ラットからのBALFでも $40.4 \pm 4.7\%$ の増殖刺激活性が認められたが、照射4週後のBALFでは $79.9 \pm 10.1\%$ とさらに亢進が認められた。一方、18週後の照射ラットのBALFでは $126.6 \pm 19.5\%$ と4週後のBALFより高い線維芽細胞増殖活性が認められた。トロンビンインヒビター(ATIII, argatroban)を用いた阻害実験から、4週目のBALFの線維芽細胞増殖活性はトロンビンインヒビターにて抑制されるが、18週目の線維芽細胞増殖活性は阻害されなかった。【考察】ラット放射線肺臓炎モデルから、トロンビンは放射線肺線維症の発症早期に線維芽細胞増殖因子として重要な役割を果たしていることが推測された。

Thrombin Promotes Fibroblast Proliferation in Experimental Radiation Pneumonitis

Saburo Sone, Kenji Tani, Yasuhiko Nishioka, Luping Huang

Third Department of Internal Medicine, School of Medicine, Tokushima University, Tokushima 770-8503, Japan

To clarify the role of thrombin in the pathogenesis of radiation-induced pneumonitis, we measured the thrombin activity and fibroblast growth-inducing activity in bronchoalveolar lavage fluid obtained from irradiated rat lungs. Bronchoalveolar lavage fluid was collected at 1, 2, 4, 8 and 18 weeks after the irradiation. Thrombin activity was not detected in the bronchoalveolar lavage fluid from unirradiated rats, but the bronchoalveolar lavage fluid obtained from irradiated rat lung showed significantly increased thrombin activity, which reached maximum at 4 weeks after the treatment. Higher fibroblast growth-inducing activity was detected in the bronchoalveolar lavage fluid from irradiated rats at 4 and 18 weeks than from unirradiated rats. Pretreatment of bronchoalveolar lavage fluid from irradiated rats at 4 weeks with thrombin inhibitors, antithrombin III and argatroban, significantly inhibited the fibroblast growth-inducing activity as well as the thrombin activity. On the other hand, these thrombin inhibitors did not inhibit fibroblast growth-inducing activity in bronchoalveolar lavage fluid from irradiated rats at 18 weeks. Purified rat thrombin induced proliferation of fibroblasts from irradiated rats similar to those from unirradiated rats. These findings suggest that thrombin may play an important role as a fibroblast growth-inducing factor during early stages of radiation pneumonitis.

はじめに

胸郭の悪性腫瘍に対する放射線治療による肺障害-線維化は、臨床上しばしば遭遇する重要な問題であり、治療を制限し予後、QOLに大きな影響を与える。その頻度は放射線を30Gy以上肺へ照射を行った患者の5-15%に発症すると報告されている¹⁾。これらのことより、悪性腫瘍に対する放射線治療成績向上のためには放射線肺臓炎の病態解析および治療法の開発は重要な研究課題である。これまでに放射線照射肺においては、TNF- α 、IL-1、PDGFなどの種々の可溶性因子が産生され線維化に重要な役割を果たしていると推測されているがその詳細なメカニズムは十分解明されているとは言えない。一方、トロンビンは血液凝固に関与する重要なセリンプロテアーゼであるが、その他にも多くの生理機能を有することが知られている^{2,3)}。例えば内皮細胞の活性化^{4,6)}、炎症細胞の遊走活性^{7,9)}などが報告されているが、線維芽細胞に対しても増殖刺激能および遊走能があるとされる¹⁰⁾。我々も、これまでにプレオマイシン肺障害モデルにおいてトロンビンが線維芽細胞増殖因子として重要な役割を果たしていることを報告している¹¹⁾。

今回ラット放射線肺臓炎モデルを用いて肺線維化におけるトロンビンの関与について検討した。

対象と方法

放射線肺臓炎モデルは6週齢ウイスター系ラット(約200g)にWardらの方法に準じて全肺に15Gyの単回照射を行うことで作成した¹²⁾。動物実験は徳島大学動物実験施設使用マニュアルに従って行った。

放射線照射後、2, 4, 8, 18週後に6mlの生理食塩水にて5回気管支肺胞洗浄を行いBALFを回収した。1200rpmにて遠心後、上清を-80℃に保存した。実験には、さらに透析にて10倍に濃縮したBALFを使用した。

肺線維芽細胞の採取は、放射線照射後第4週のラット肺よりPhanらの方法に準じて行った¹³⁾。すなわち採取した肺をハサミにて細片後トリプシン処理することで肺組織から線維芽細胞株を作成した。3~10継代で実験に使用した。

トロンビン活性の測定は、Boc-Val-Pro-Arg-MCA基質の分解で測定した。また線維芽細胞の増殖活性は、MTT法にて計測した。同時に、BALFにanti-thrombinIII(ATIII)、argatrobanのトロンビンインヒビターを加えてそれぞれの活性の抑制効果を検討した。

組織学的検討には、ヘマトキシリン・エオジン染色、

アザン・マロリー染色を使用した。

結 果

照射肺組織所見では照射4週目から間質への細胞浸潤、隔壁の肥厚がみられた。18週目には線維性変化をみとめた。

BALF中のトロンビン活性は、非照射ラットのBALF中には検出できなかったが、放射線照射後2週で 23.9 ± 20.1 nmol/h、4週で 428.9 ± 328.9 nmol/h、8週で 71.9 ± 15.1 nmol/h、18週で 56.7 ± 6.8 nmol/hであり、照射後4週目で最も高かった(Figure 1)。同時に測定した、カテプシンH、カテプシンB、カテプシンGの活性は放射線照射および非照射ラットで有意差は認められなかった。

BALF中の線維芽細胞増殖活性は、10%のBALFを添加した場合、非照射ラットからのBALFでも $40.4 \pm 4.7\%$ の増殖刺激活性が認められたが、照射4週後のBALFでは $79.9 \pm 10.1\%$ とさらに亢進が認められた。一方、18週後の照射ラットのBALFでは $126.6 \pm 19.5\%$ と4週後のBALFより高い線維芽細胞増殖活性が認められた(Figure 2)。

トロンビンインヒビター(ATIII, argatroban)を用いた阻害実験から、4週目のBALFのトロンビン活性とともに線維芽細胞増殖活性はトロンビンインヒビターにて抑制されるが、18週目の線維芽細胞増殖活性は阻害されなかった(Figure 3A and B)。最後に、コントロールラットと放射線照射ラットのトロンビンによる増殖刺激活性を比較したが、有意差を認めなかった(Figure 4)。

考察・結論

トロンビンは、血液凝固系プロテアーゼの一つである。これまでに*in vitro*での線維芽細胞増殖活性ばかりでなく、実験的肺線維症モデルであるプレオマイシン肺線維症において重要な線維芽細胞増殖因子であることが報告されている¹¹⁾。さらに、強皮症患者のBALF中にもトロンビン活性が検出され肺線維症に関与していることが知られている¹⁴⁾。トロンビンは、種々の生理活性を持つプロテアーゼであり、線維芽細胞や平滑筋細胞に対して遊走活性を示すばかりでなく、PDGF、FGF、TGF- β 、IL-6などの線維芽細胞の増殖因子の産生も刺激することが知られている¹⁵⁾。

今回我々はラット放射線肺線維症モデルを用いてトロンビンの関与を検討した。今回用いたモデルでは、4週をピークに胞隔炎が起り、18週でコラーゲンの沈着を認めた。放射線照射後のBALF中の線維芽細胞増殖活性は、4週、18週ともに対照群より高い活性を認めた。トロンビン活性は4週が最も高かった。照射4週後のBALF

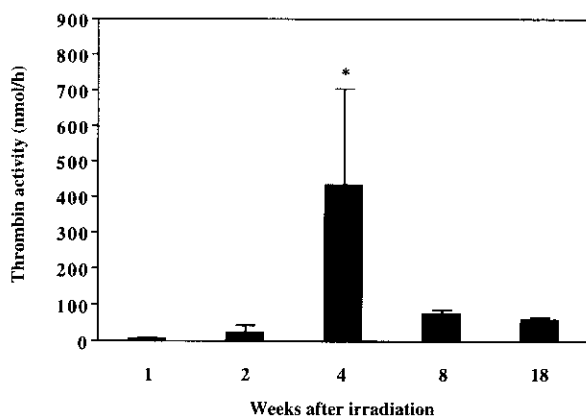


Figure 1 Thrombin activity in BALF from irradiated rats. The BAL was performed at 1, 2, 4, 8 and 18 weeks after the irradiation. Thrombin activity in BALF was expressed in nanomoles of substrate per hour. Values represent mean \pm SEM, with $n=5$ in each group. * significantly ($p<0.05$) different from the value of irradiated rats at 1, 2, 8 and 18 weeks.

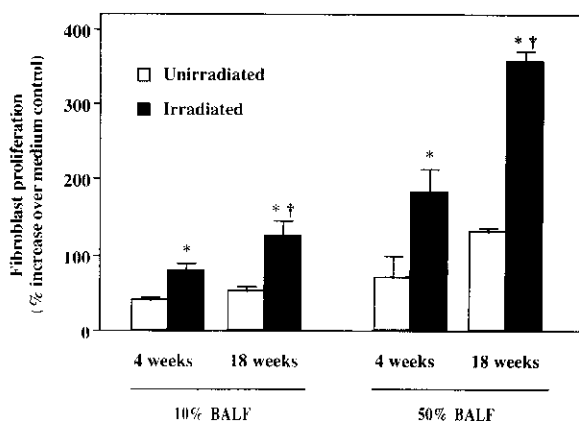


Figure 2 Effect of BALF from unirradiated and irradiated rats on fibroblast proliferation. The BALF obtained from unirradiated and irradiated rats at 4 and 18 weeks was concentrated 10-fold and then added to normal rat lung fibroblast cultures at final concentrations of 10% or 50%. Growth-inducing activity was expressed as the percent increase over the value of medium control cultures. Values represent mean of independent experiments using different samples ($n=3$). *significantly ($p<0.05$) different from the value of unirradiated rats. † significantly ($p<0.05$) different from the value of irradiated rats at 4 weeks.

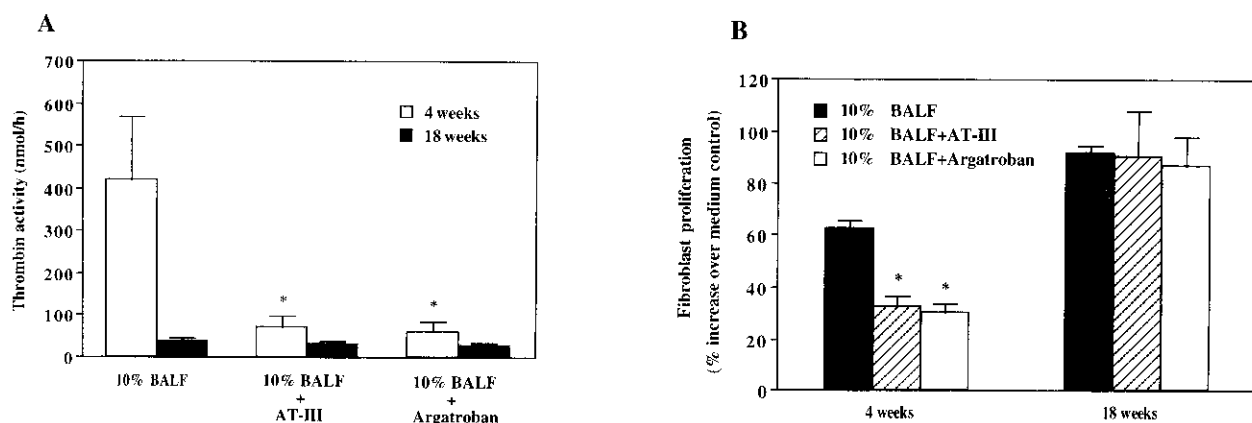


Figure 3 The effect of thrombin inhibitors on the BALF obtained from irradiated rats. (A) Thrombin activity in BALF from irradiated rats at 4 and 18 weeks after the pretreatment with AT-III or argatroban. The concentrated BALF was preincubated with an equal volume of DMEM, AT-III (80 U/ml) or argatroban (2mM) at 37°C for 20 h. Thrombin activity in BALF was expressed in nanomoles of substrate per hour. Values represent the mean of independent experiments using different samples ($n=3$). (B) In vitro effects of AT-III and argatroban on fibroblast growth-inducing activity in BALF. The concentrated BALF at 4 and 18 weeks after the irradiation was preincubated with an equal volume of DMEM, AT-III (80U/ml) or argatroban (2mM) at 37°C for 20 h. The solution was then added to fibroblast cultures containing 10% BALF. The growth-inducing activity was expressed as the percent increase over the value of medium control cultures. Values represent the mean of independent experiments using different samples ($n=3$). * significantly ($p < 0.05$) different from the value of untreated BALF.

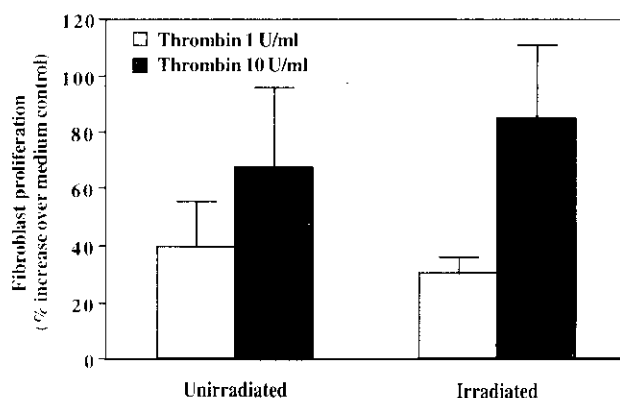


Figure 4 In vitro effect of rat thrombin on unirradiated and irradiated rat lung fibroblast proliferation. Highly purified rat thrombin (about 3,000 NIH U/mg) was added to fibroblast cultures at concentrations of 1 and 10 NIH U/ml. After culturing for 3 days, fibroblast growth-inducing activity was detected by MTT assay as described in Materials and Methods. The growth-inducing activity was expressed as the percent increase over the value of medium control cultures. Values represent the mean of independent experiments using different samples (n=3).

に種々のトロンビンインヒビター処理を行った実験から、4 週後の BALF 中に検出された線維芽細胞増殖活性の大部分は、トロンビンによることが示唆された。一方、18 週の BALF 中の線維芽細胞増殖活性は、トロンビンインヒビター処理においても低下せず、トロンビン以外の可溶性因子によることが推測された。

以上から、トロンビンはブレオマイシン肺線維症ばかりでなく、放射線肺臓炎においても線維化病態に重要な役割を果たしていることが推測された。

参考文献

- 1) E. Cameron and R. Crystal, Radiation-induced lung injury. In Crystal RG, West JB, Weibel ER, Barnes PJ, eds, *The Lung 2nd ed.* Lippincot-Raven Publishers, New York. 1997: 2647-2651.
- 2) K. G. Mann, M. E. Nesheim, W. R. Church, P. Haley, and S. Krishnaswamy, Surface-dependent reactions of the vitamin K-dependent enzyme complexes. *Blood* 1990; 1: 1-16.
- 3) E. W. Davie, K. Fujikawa, and W. Kisiel, The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry*. 1991; 29: 10363-10370.
- 4) E. A. Jaffe, J. Grulich, B. B. Weksler, G. Hampel, and K. Watanabe, Correlation between thrombin-induced prostacyclin production and inositol trisphosphate and cytosolic free calcium levels in cultured human endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 8557-8565.
- 5) R. Bar-Shavit, V. Sabbah, M. G. Lampugnani, P. C. Marchisio, J. W. Fenton, II, I. Vlodavsky, and E. Dejana, An arg-gly-asp sequence within thrombin promotes endothelial cell adhesion. *J. Cell Biol.* 1991; 112: 335-344.
- 6) R. Bar-Shavit, K. A. Hruska, A. J. Kahn, and G. D. Wilner, Hormone-like activity of human thrombin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1986; 485: 335-348.
- 7) R. Bar-Shavit, A. Kahn, J. W. Fenton, II, and G. D. Wilner, Chemotactic response of monocytes to thrombin. *J. Cell Biol.* 1983; 96: 282-285.
- 8) R. Bar-Shavit, A. Kahn, J. W. Fenton, II, and G. D. Wilner, Receptor-mediated chemotactic response of a macrophage cell line (J 774) to thrombin. *Lab Invest.* 1983; 49: 702-707.
- 9) R. Bizios, L. Lai, J. W. Fenton, II, and A. B. Malik, Thrombin-induced chemotaxis and aggregation of neutrophils. *J. Cell. Physiol.* 1986; 128: 485-490.
- 10) L. B. Chen, and J. M. Buchanan, Mitogenic activity of blood components. I. Thrombin and prothrombin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1975; 72: 131-135.
- 11) K. Tani, S. Yasuoka, F. Ogushi, K. Asada, K. Fujisawa, T. Ozaki, N. Sano, T. Ogura, Thrombin enhances lung fibroblast proliferation in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1991; 5: 34-40.
- 12) H. E. Ward, L. Kemsley, L. Davies, M. Holecek, and N. Berend, The pulmonary response to sublethal thoracic irradiation in the rat. *Radiat. Res.* 1993; 136: 15-21.
- 13) S. H. Phan, J. Varani, and D. Smith, Rat lung fibroblast collagen metabolism in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* 1985; 76: 241-247.
- 14) N. A. Hernandez-Rodriguez, A. D. Cambrey, N. K. Harrison, R. C. Chambers, A. J. Gray, A. M. Southcott, R. M. duBois, C. M. Black, and G. J.

Laurent, Role of thrombin in pulmonary fibrosis. *The Lancet*. 1995; 346: 1071-1073.

- 15) K. Tani, F. Ogushi, H. Takahashi, T. Kawano, T. Endo, and S. Sone, Thrombin stimulates platelet-derived growth factor release by alveolar macrophages in rats - significance in bleomycin-induced pulmonary fibroblast-. *J. Med. Invest.* 1997; 44: 59-65.

肺線維症発症要因としてのインスリン様受容体シグナル

玉置 正勝¹ 鈴木 陽一¹ 白澤 卓二^{1*} 青山 昭徳²
吾妻安良太²

肺線維症は加齢依存的に発症することが知られている。そこで線虫で長寿や酸化ストレス耐性を示すインスリン様受容体変異に着目した。マウスのインスリン受容体遺伝子にこの線虫で発見された遺伝子変異を導入した加齢遅延モデルマウスを作製した。このマウスを用いて高濃度酸素負荷を行った。その結果モデルマウスは野生型マウスとくらべ生存期間が延長する傾向が認められた。組織ではモデルマウスで硝子膜の形成が少なく MnSOD の発現が亢進しており、活性酸素の無毒化により酸化ストレス耐性を獲得したと考えられた。次にプレオマイシン誘発肺線維症実験を施行したが、野生型マウスの肺で認めた炎症細胞浸潤と肺線維化病変はモデルマウスでは軽減し、肺線維症に対する疾患感受性が低下していることが明らかになった。以上のことからインスリンシグナル伝達が肺線維症治療のターゲットになりうることを示唆された。

Insulin Receptor Signaltransduction and Lung Fibrosis

Masakatsu Tamaki¹, Yoichi Suzuki¹, Takuji Shirasawa¹, Shotoku Aoyama²,
Arata Azuma²

1. *Molecular Genetics, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology*
2. *Internal Medicine, Nihon Medical School*

We generated a mouse for insulin resistance by introducing a mutation found in longevity mutant *C. elegans*, *daf-2*. Using this mouse model we tested whether insulin resistance confers the insensitivity for the development of bleomycin-induced lung fibrosis. Lung fibrosis was moderately induced in wild type mice by intravenously injecting 100mg/kg bleomycin while fibrotic foci were hardly found in mutant mice. Immunohistochemical study indicated that MnSOD, antioxidant defence system for reactive oxygen species (ROS), is up-regulated after O₂ exposure, suggesting that ROS may play a role in the development of lung fibrosis. Our data suggest the possible preventative measure by antioxidant treatment for the development of lung fibrosis.