

図8 Quantitative analysis of HGF transgene expression in the lungs of mice after intraperitoneal administration of Ad-HGF. The time course of the HGF transgene expression was examined by ELISA at day 0, 3, and 7 (n=4 in each group). The expression level reached a peak (231.3 ng/g tissue) at day 3 and was maintained same level until day 7.

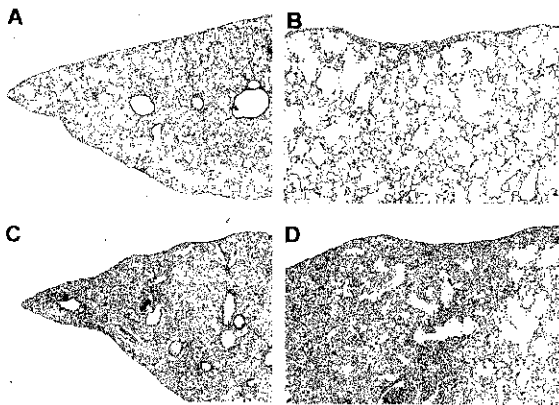


図9 Intraperitoneal injection of Ad-HGF ameliorated bleomycin-induced pneumonitis. Microscopic findings (Elastica-Masson staining) of the mice lung 3 weeks after administration of the vectors were shown. A & B: BLM with Ad-HGF ( $6 \times 10^8$  pfu) treated, C & D: BLM with Ad-Null ( $6 \times 10^8$  pfu) treated. Shown in the left column (A & C) is in low magnification ( $\times 6.25$ ), and right (B & D) in high magnification ( $\times 20$ ). Ad-HGF apparently improved the area of fibrotic change.

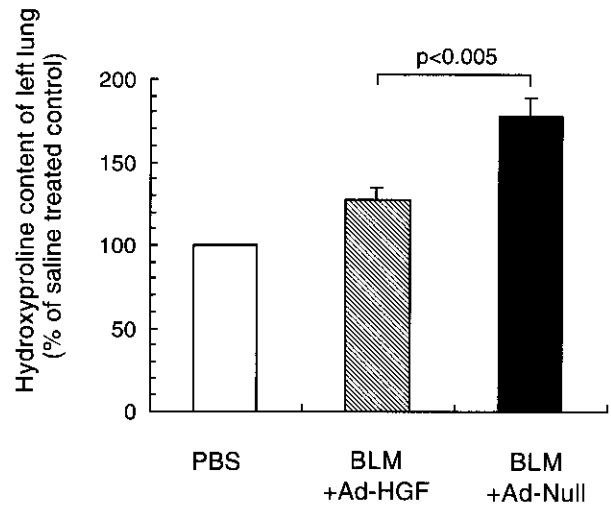


図10 Analysis of lung collagen content quantitated by hydroxyproline assay. Whole collagen content of the left lung was evaluated by determining hydroxyproline content of left lung at day 28, and the values were shown as % of saline treated control. Intraperitoneal administration of Ad-HGF significantly reduced the lung hydroxyproline content in BLM-injured mice (▨) ( $128 \pm 5\%$ , n=5), comparing to Ad-Null (■) ( $177 \pm 9\%$ , p<0.005) (n=5 in each group).

#### HGFの線維化抑制機序の解明

Ad-HGF投与群では、プレオマイシン単独群 ( $35 \pm 4\%$ ) に比べ、プレオマイシン投与7日後のアポトーシスをおこした肺胞上皮細胞数が有意に減少した ( $13 \pm 1\%$ ) (図11)。また、プレオマイシン投与7日後の肺内 TGF- $\beta$  mRNA 発現量も Ad-Null に比較して有意に減弱した (図12)。

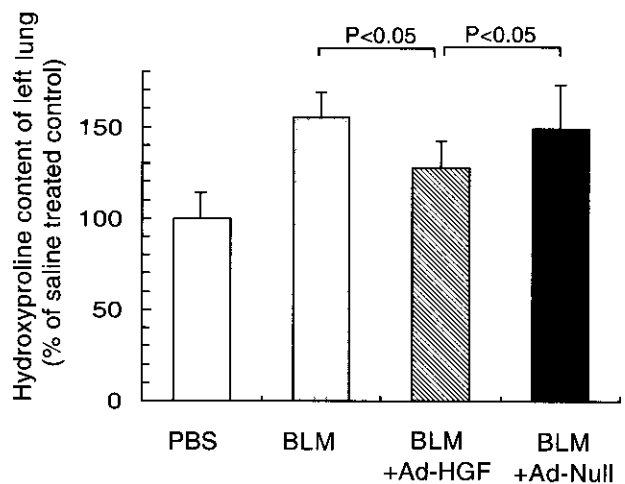


図11 Intravenous administration of Ad-HGF ameliorated bleomycin-induced pneumonitis. Hydroxyproline contents of left lung at day 28 were shown as % of saline treated control. Intravenous administration of Ad-HGF significantly reduced the lung hydroxyproline content in BLM-injured mice (▨) comparing to Ad-Null (■) ( $127.6 \pm 14.9\%$  vs.  $149.4 \pm 24.0\%$ , p<0.05).

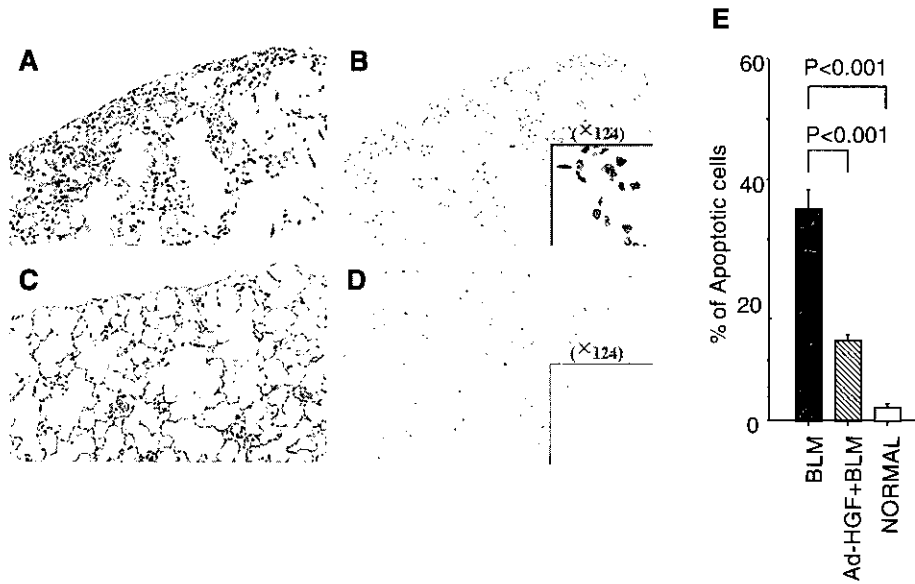


図 12 Ad-HGF rescued apoptotic alveolar epithelial cells from bleomycin-induced injury.

TUNEL staining (B, D) demonstrated apoptotic cells in alveolar epithelial cells at day 7 after administration of BLM only (A, B) and BLM with HGF therapy (C, D). Treatment with Ad-HGF prevented the apoptosis in the alveolar epithelial cells (D) from BLM injury. Left panels are H & E stainings. (Original magnification: A, B, C, D,  $\times 100$ .)

On the right side (E), the results of percentage of apoptotic cells in the lung were plotted. The number of apoptotic cells was reduced by administration of Ad-HGF.

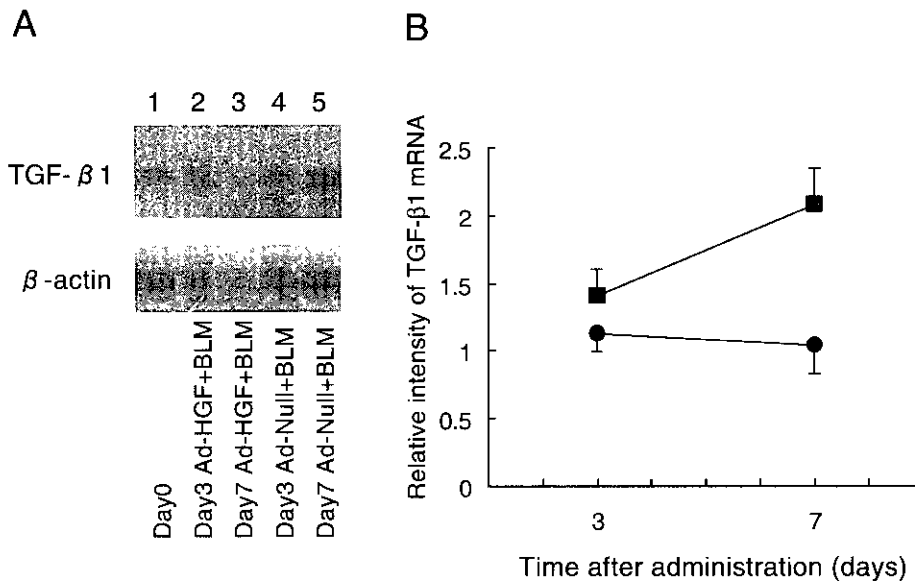


図 13 Ad-HGF decreased TGF- $\beta$  1 mRNA expression in the mice lung after bleomycin-induced injury.

A: Northern blot analysis of TGF- $\beta$  1 mRNA expression (upper panels) and  $\beta$ -actin (lower panels) as control in the right lung of mice. Total RNAs ( $20\mu\text{g}$ ) was derived from no-treated mouse (lane 1), mice treated with BLM and Ad-HGF (day3: lane 2, day7: lane 3) and mice treated with BLM and Ad-Null (day3: lane 4, day7: lane 5).

B: Quantification of the TGF- $\beta$  1 mRNA expression by Northern analysis. Relative amounts of TGF- $\beta$  1 mRNA were evaluated by densitometric correction to that of  $\beta$ -actin mRNA at each time points. Ad-HGF (●) inhibited the increase of TGF- $\beta$  1 mRNA at day 7 after BLM administration (■) (n=3).

HGF 発現プラスミドベクターによる肺特異的発現

pUC-SR  $\alpha$ -HGF (5 $\mu$ g) に MAA を結合させて静注し、肺の毛細血管にトラップさせ、肺特異的に発現させたところ、naked pUC-SR  $\alpha$ -HGF と比較し約 10 倍量である 174pg/ml の蛋白量が day3 で確認された(図 14)。発現量は d2 にピークを示し、以後漸減した(図 15)。

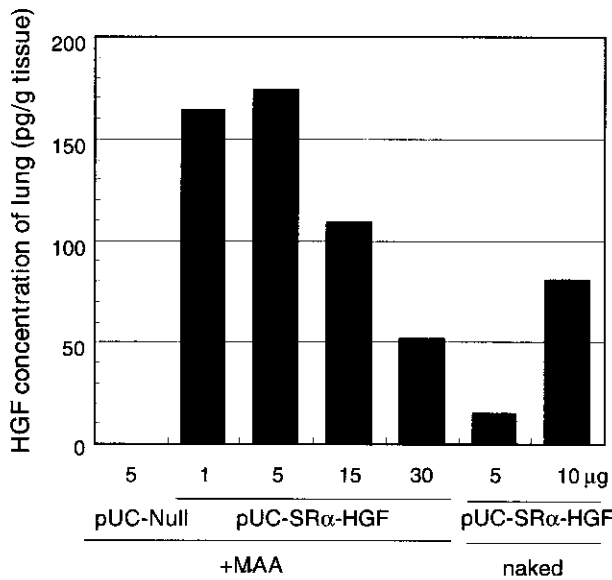


図 14 Expression of HGF after Intravenous injection of plasmid vectors with or without macroaggregated albumin (MAA). Intravenous administration of pUC-SR  $\alpha$ -HGF (5 $\mu$ g) conjugated with MAA induced the expression of HGF (174 pg/g tissue) in the lung eleven times as much as naked pUC-SR $\alpha$ -HGF (5 $\mu$ g) (15 pg/g tissue).

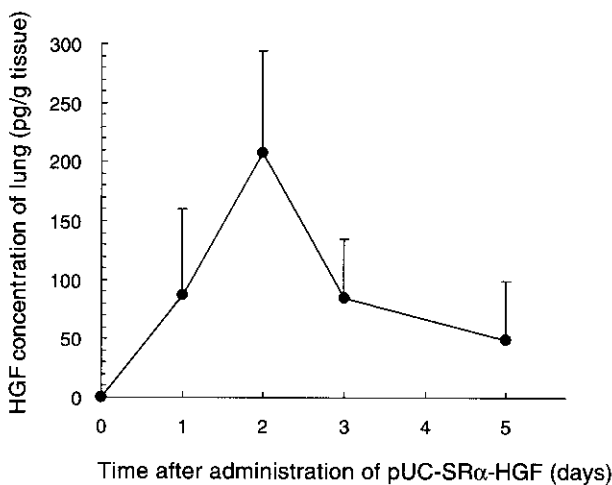


図 15 Time Course of HGF Expression after Intravenous Administration of pUC-SR  $\alpha$ -HGF Conjugated MAA. The expression level reached a peak (148.1  $\pm$  63.1 pg/g tissue) 2 days after injection, and slightly decreased thereafter.

考察・結論

HGF は薬剤性肝障害や腎障害を軽減し、臓器障害抑制作用を持つことが示されており、多臓器再生因子であると理解されている<sup>13)</sup>。我々はこれまで HGF が肺においても臓器障害抑制作用を明らかにした<sup>9)</sup>。HGF 蛋白の知見をふまえ、本研究では将来の臨床応用を目的に、HGF 発現アデノウイルスベクターを肺線維症治療に応用した。その結果、HGF タンパクと同様に肺線維化抑制が認められ、遺伝子治療の臨床応用への可能性が示唆された。

アデノウイルスベクターは各種ベクターの中でもとりわけ高容量の蛋白の発現が可能であり、実験的にも臨床的にも広く用いられている<sup>14)</sup>。今回、直接経気道的にベクターを投与し、肺での高容量発現を確認できたものの、アデノウイルスベクターの短所である炎症の活性化をきたしてしまい、病態を改善できず、本経路は非実用的であると判断した。しかし、経腹腔的投与や経血管的投与することによりこの短所も改善でき、間質性肺炎の治療に関して、臨床応用への可能性が強く示唆された。

TGF- $\beta$  mRNA の発現は、細胞外マトリックスである fibronectin, procollagen の mRNA の発現に先立ち、プレオマイシン投与開始 1 週間後に対照比約 5 倍のピークが認められ、同モデルに対し抗 TGF- $\beta$  抗体を投与すると線維化が抑制されること<sup>15)</sup>、さらに実際に TGF- $\beta$  を動物肺に遺伝子導入すると線維化が誘導されること<sup>16)</sup>などから、線維化形成に中心的な役割をなすと考えられている。Ad-HGF の経腹腔的投与や経血管的投与により肺での TGF- $\beta$  の発現を低下させることで、線維化を抑制する機序が本研究で解明された。また、BLM によって障害を受けた肺胞上皮はアポトーシスをおこして脱落し、その後傷害部に炎症性的変化が引き起こされ、様々なサイトカイン (TGF- $\beta$ , PDGF, TNF- $\alpha$ , IL-6 など) が活性化され線維化が進行していくものと考えられる<sup>1)</sup>。HGF の作用機序としては、以前示した *in vitro* のデータのとおり<sup>17)</sup>、*in vivo* でも障害を受けた肺胞上皮のアポトーシスを抑制し、また肺胞上皮の脱落時に II 型肺胞上皮に成長因子として作用して速やかに組織修復を行い、引き続き線維化に至る変化を抑制することが証明された。

プラスミドベクターは他のベクターに比べて発現効率が劣るため、実験的にも呼吸器疾患に対して使われる頻度は少なかった。しかし、今回、免疫原性の少ない安全な遺伝子治療法として、plasmid DNA を用いて、アデノウイルスベクターとの比較・検討を行った。欠点である発現効率の改善を目的とし、Orson らの方法<sup>9)</sup>に従い臨床で肺血流スキャンに用いられている MAA を結合させて投与した。その結果、プラスミドベクターを肺毛細管にトラップさせて選択的に肺内に取り込ませることが可能であり、ターゲット器官である肺に効果的な HGF 発現法

が確立できた。今後は、本法の臨床応用も考慮して、肺臓炎モデルでその効果を確認する予定でいる。

以上より、本研究は、HGFによる遺伝子治療のベクター開発、実効的投与経路を確立、その有効性を実証し、臨床応用への可能性を示唆した。

#### 参考文献

- 1) 三木 誠, 貫和敏博: 間質性肺炎の治療戦略と将来展望. Annual Review 呼吸器 2000; 256-265.
- 2) 内山美寧, 八重柏政宏, 阿部達也, 富永泰之, 中村晃, 清水川稔, 佐藤研, 貫和敏博: 家族集積性を認める線維化肺の現状: アンケート調査の結果. 厚生省特定疾患びまん性肺疾患調査研究班平成9年度研究報告書 1998; 7-10.
- 3) British Thoracic Society. Standards of Care Committee: The diagnosis, assessment and treatment of diffuse parenchymal lung disease in adults. Thorax 1999; 54: S1-S30.
- 4) American thoracic society and European respiratory society: Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. Am J Respir Crit Care Med 2000; 161: 646-664.
- 5) Sakai T, K Satoh, K Matsushima, S Shindo, S Abe, T Abe, M Motomiya, T Kawamoto, Y Kawabata, T Nakamura and T Nukiwa: Hepatocyte growth factor in bronchoalveolar lavage fluids and cells in patients with inflammatory chest diseases of the lower respiratory tract: detection by RIA and in situ hybridization. Am J Respir Cell Mol Biol 1997; 16: 388-397.
- 6) Shindoh S, K Satoh, T Sakai, T Abe, M Yaekashiwa and T Nukiwa: [Expression of hepatocyte growth factor by activated eosinophiles in inflammatory lung tissue]. Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi 1999; 37: 25-30.
- 7) Kikuchi T, T Abe, M Yaekashiwa, Y Tominaga, H Mitsuhashi, K Satoh, T Nakamura and T Nukiwa: Secretory leukoprotease inhibitor augments hepatocyte growth factor production in human lung fibroblasts. Am J Respir Cell Mol Biol 2000; 23: 364-370.
- 8) Tahara M, K Matsumoto, T Nukiwa and T Nakamura: Hepatocyte growth factor leads to recovery from alcohol-induced fatty liver in rats. J Clin Invest 1999; 103: 313-320.
- 9) Yaekashiwa M, S Nakayama, K Ohnuma, T Sakai, T Abe, K Satoh, K Matsumoto, T Nakamura, T Takahashi and T Nukiwa: Simultaneous or delayed administration of hepatocyte growth factor equally represses the fibrotic changes in murine lung injury induced by bleomycin. A morphologic study. Am J Respir Crit Care Med 1997; 156: 1937-1944.
- 10) McGrory, WJ, Bautista, DS and Graham FL: A simple technique for the rescue of early region I mutations into infectious human adenovirus type 5. Virology 1988; 163: 614-617.
- 11) Orson FM, BM Kinsey, PJ Hua, BS Bhogal, CL Densmore and MA Barry: Genetic immunization with lung-targeting macroaggregated polyethyleneimine-albumin conjugates elicits combined systemic and mucosal immune responses. J Immunol 2000; 164: 6313-6321.
- 12) Woessner JF Jr. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this amino acid. Arch Biochem Biophys 1961; 93: 440-447.
- 13) Matsumoto K and Nakamura T: Hepatocyte growth factor (HGF) as a tissue organizer for organogenesis and regeneration. Biochem Biophys Res Commun 1997; 239: 639-644.
- 14) Crystal RG: Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success. Science 1995; 270: 404-410.
- 15) Giri SN, Hyde DM Hollinge MA. Effect of antibody to transforming growth factor  $\beta$  on bleomycin induced accumulation of lung collagen in mice. Thorax 1993; 48: 959-966.
- 16) Sime PJ, Z Xing, FL Graham, KG Csaky and J Gauldie: Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor- $\beta$ 1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. J Clin Invest 1997; 100: 768-776.
- 17) 中村晃, 八重柏政宏, 三木誠, 森ゆり子, 阿部達也, 貫和敏博: HGF (肝細胞増殖因子) の特発性間質性肺炎に対する治療応用に関する研究. 厚生省特定疾患びまん性肺疾患調査研究班平成10年度研究報告書 1999; 9-12.

# ブレオマイシン肺線維症に対するマウスインターフェロン- $\beta$ の効果に関する研究

吾妻安良太<sup>1\*</sup> 邊見 智<sup>2</sup> 宮内 泰<sup>2</sup> 伊澤 明子<sup>2</sup>  
曾根 三郎<sup>2</sup> 工藤 翔二<sup>1\*</sup>

ブレオマイシン (BLM) 肺線維症モデルを用いて、肺線維化に対するマウスインターフェロン- $\beta$  (MuIFN- $\beta$ ) の効果について検討した。8 週齢雄 ICR マウスに BLM (100mg/kg) を単回尾静脈内投与し、MuIFN- $\beta$  を 4 週間隔日尾静脈内投与した。BLM 投与 4 週後に肺を摘出したのち、病理学的検討および肺組織中コラーゲン量、プロリルヒドロキシラーゼ量の測定を行った。MuIFN- $\beta$  は、肺組織中可溶性コラーゲン量およびプロリルヒドロキシラーゼ量を有意に低下させ、病理学的にも線維化を抑制する傾向を示した。また、8 週齢雄性 C57BL/6 マウスに BLM (10mg/kg/day) を週 2 回、5 週間腹腔内投与した後、MuIFN- $\beta$  を連日 14 日間腹腔内投与し、生存率について検討したところ、MuIFN- $\beta$  は、生存率を改善する傾向を示した。これらの結果から、MuIFN- $\beta$  は、プロリルヒドロキシラーゼ活性を抑制することにより、肺線維化を抑制する可能性が示唆された。臨床的には、特発性肺線維症へのヒト IFN- $\beta$  の適応の可能性が示唆される。

## Effects of murine interferon- $\beta$ on experimental bleomycin-induced lung injury and fibrosis in mice.

Arata Azuma<sup>1</sup>, Satoshi Henmi<sup>2</sup>, Yasushi Miyauchi<sup>2</sup>, Akiko Izawa<sup>2</sup>,  
Saburo Sone<sup>2</sup>, Shoji Kudoh<sup>1</sup>

1. Forth Department of Internal Medicine, Nippon Medical School

2. Pharmaceutical Research Laboratories, Toray Industries, Inc.

We evaluated the effects of murine recombinant interferon- $\beta$  (MuIFN- $\beta$ ) on experimental bleomycin-induced lung injury and related pulmonary fibrosis in mice. First, bleomycin (BLM) at the final dose of 100mg/kg was intravenously injected to 8-week-old ICR male mice, followed by the intravenous administration of MuIFN- $\beta$  every other day for 4 weeks. The animals were sacrificed after 28 days from BLM-injection and the lungs were appropriately processed. The lungs of the control group and MuIFN- $\beta$  administered groups were compared histologically, and soluble collagen and prolylhydroxylase contents were also examined. MuIFN- $\beta$  reduced the number of histological events and significantly decreased lung collagen and prolylhydroxylase (PH) contents. Secondly, BLM at the dose of 10mg/kg was intrapeneatolly injected to 8-week-old C57BL/6 male mice twice a week for 5 weeks followed by the subcutaneous administration of MuIFN- $\beta$  for 14 consecutive days. Mean survival time of the MuIFN- $\beta$ -treated groups was longer than that of the control groups. These results suggest that MuIFN- $\beta$  inhibits lung fibrosis by suppressing the PH activity. Furthermore, our results suggest that human IFN- $\beta$  may also suppress the progress of idiopathic pulmonary fibrosis in human.

## はじめに

インターフェロン (IFN) は、ウイルス感染やその他の生物学的誘発物質によって産生され、抗ウイルス作用、抗腫瘍作用、免疫修飾作用を持つサイトカインである。そして、IFN は、遺伝子やタンパク質の構造などの違いにより I 型 IFN (IFN  $\alpha$  および  $\beta$ ) と II 型 IFN (IFN- $\gamma$ ) の 2 種類に大きく分類される。

近年、IFN の薬理作用として、抗線維化作用を示唆する報告が多数見受けられる。まず、*in vitro* において、IFN は、線維芽細胞増殖抑制、線維芽細胞によるコラーゲン産生抑制、コラーゲナーゼ産生増強を示すことが報告されている<sup>1,2)</sup>。これらの作用は、各種臓器へのコラーゲン沈着を低下させる可能性がある。また、臓器線維化動物モデルにおいても、IFN は線維化を減ずる、あるいは線維化を防ぐ作用があることが報告されている<sup>3,4)</sup>。

このような背景のもと、Ziesche らは、特発性肺線維症の患者に対する IFN- $\gamma$ 1b と低用量プレドニゾロンの長期治療に関する予備試験を行ったところ、12ヶ月間の IFN- $\gamma$ 1b とプレドニゾロンの併用治療によって、プレドニゾロン単独療法には反応しなかった患者の症状 (総肺気量、動脈血酸素分圧) が大きく改善されたという<sup>5)</sup>。このことは、IFN が臓器の肺線維化に対して有効であることを示唆している。実際、海外にて、特発性肺線維症に対する IFN- $\gamma$ 1b の臨床試験が進行中である。

このように、臨床的にも IFN の抗線維化作用を利用して、肺線維症の治療を行う試みが行われているが、IFN のうち、IFN- $\beta$  は、*in vitro* において、コラーゲン産生抑制については IFN- $\gamma$  と同程度であるが、線維芽細胞増殖抑制、コラーゲナーゼ産生増強の点で IFN- $\gamma$  よりも優れているため、IFN- $\gamma$  よりも強力な抗線維化作用を期待することができる。この IFN- $\beta$  の強力な抗線維化作用を期待して、現在、米国にて、特発性肺線維症に対する IFN- $\beta$  1a の臨床試験も進行中である。

しかし、線維化動物モデルにおいて、IFN- $\beta$  の薬理効果を検討した報告は、放射線障害肺臓炎モデルで、IFN- $\beta$  が肺線維化を抑制したという報告<sup>6)</sup>があるだけで、その抑制メカニズムをはじめ、詳細な IFN- $\beta$  の抗線維化作用について動物レベルで明らかにした報告はない。

本試験では、肺線維症の代表的なモデル動物の一つであるブレオマイシン (BLM) 誘発性マウス肺線維症モデルを用いて、肺線維化に対する組み換え型マウスインターフェロン- $\beta$  (MuIFN- $\beta$ ) の効果について試験を行っ

た。

## 対象と方法

- 1) 肺線維化評価モデル作製投与スケジュール：8週齢雄性 ICR マウスに BLM (100mg/kg) を単回尾静脈内投与し<sup>7)</sup>、次いで MuIFN- $\beta$  を 4 週間隔日尾静脈内投与した。BLM 投与 4 週後にエーテル麻酔下にて、脱血 sacrifice し、肺を採取した。左肺は、組織標本作製に供し、アザン染色を行い、アシクロフトスコアに準拠し、MuIFN- $\beta$  非投与群と投与群との間で、比較検討を行った。また、右肺を用いて、肺組織中コラーゲン量およびプロリルヒドロキシラーゼ量の測定を行った。
- 2) 生存率評価モデル作製投与スケジュール：8週齢雄性 C57BL/6 マウスに BLM (10mg/kg/day) を週 2 回、5 週間腹腔内投与し、その時点から MuIFN- $\beta$  を連日 14 日間腹腔内投与し、試験期間中の生存率について検討した。また、MuIFN- $\beta$  投与終了日翌日に、エーテル麻酔下にて、脱血 sacrifice し、肺を採取した。左肺は、組織標本作製に供し、アザン染色を行い、アシクロフトスコアに準拠し、MuIFN- $\beta$  非投与群と投与群との間で比較検討を行った。
- 3) 結果は、すべて平均値±標準偏差で表した。

## 結 果

- 1) BLM 肺線維症評価モデルにおける病理組織学的結果：MuIFN- $\beta$  非投与群に比し、MuIFN- $\beta$  投与群では、軽度の肺胞壁の肥厚や間質・肺胞腔内への炎症性細胞の浸潤を認めたものの、肺胞構造は比較的保たれていた。また、MuIFN- 非投与群 (control) の線維化スコアが、 $3.0 \pm 1.9$  であったのに対し、MuIFN- $\beta$  ( $10^6$ U/head) 投与群では  $1.3 \pm 1.3$  であり、低値を示したが、有意な差は認められなかった (Figure1)。
- 2) 肺組織中コラーゲン量およびプロリルヒドロキシラーゼ量測定結果：MuIFN- $\beta$  非投与群 (control) に対し、MuIFN- $\beta$  投与群では、肺組織中可溶性コラーゲン量およびプロリルヒドロキシラーゼ量はともに有意に低値を示した (Figure2)。
- 3) 生存率評価モデルにおける生存率：BLM 投与期間中、どの群においても死亡例はみられなかった。しかし、BLM 投与中止後、MuIFN- $\beta$  非投与群では 6 例中 2 例死亡が観察されたのに対し、MuIFN- $\beta$  投与群では、死亡例はみられなかった (Figure3)。

1. 日本医科大学第四内科

2. 東レ(株)研究所

\* びまん性肺疾患研究班 主任研究者

\*\* " 分担研究者

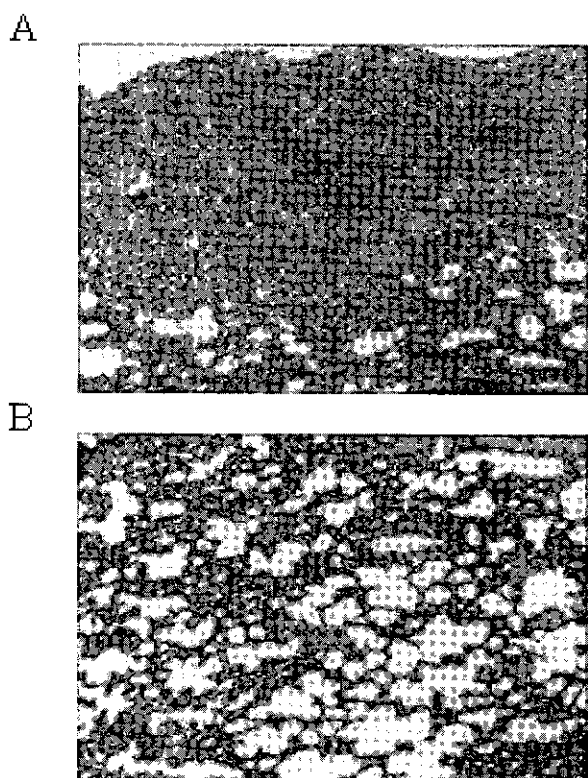


Figure 1 Histological findings of mouse lung tissue 28 days after BLM-injection (Azan stain). A) BLM alone B) BLM+MuIFN-β (10<sup>4</sup>U/head)

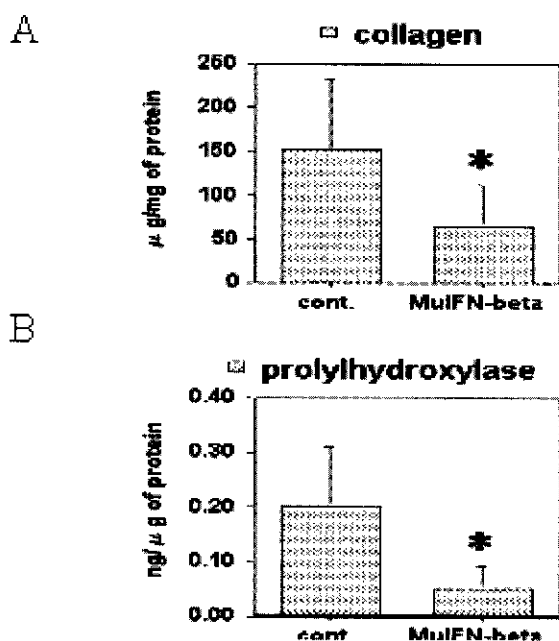


Figure 2 Comparison of lung collagen contents and prolyhydroxylase contents 28 days after BLM-injection. A) soluble collagen contents. Accumulation of lung collagen was measured as salt- and acid-soluble collagens. (\*p<0.05 vs. cont.). B) Prolyhydroxylase contents. (\*p<0.05 vs. cont.).

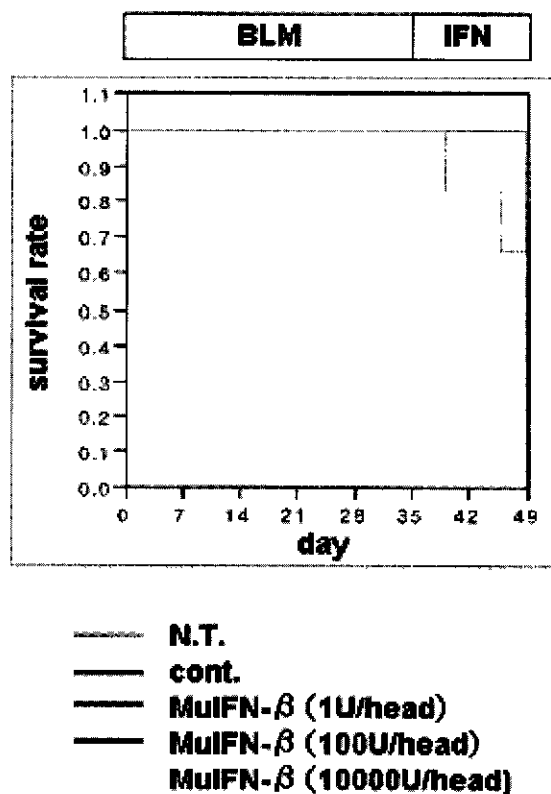


Figure 3 Comparison of survival rate between cont. group and MuIFN-β groups.

4) 生存率評価モデルにおける病理組織学的結果：MuIFN-β非投与群と同様に、MuIFN-β投与群においても、間質・肺胞腔内への著明な炎症性細胞の浸潤を認めた。また、MuIFN-β非投与群(control)の線維化スコアが、 $4.3 \pm 1.7$ であったのに対し、MuIFN-β (10<sup>4</sup>U/head)投与群では $3.8 \pm 0.8$ であり、低値を示したが、有意な差は認められなかった。しかし、MuIFN-β非投与群に比し、MuIFN-β投与群では、巣状の強い膠原線維の増生がみられない傾向にあった。(Figure4).

### 考 察

本研究は、肺線維症の代表的なモデル動物の一つであるBLM肺線維症モデルを使用して、MuIFN-βが、BLMによる肺の線維化を抑制する可能性を示した初めての報告である。

IFN-βは、抗腫瘍作用、抗ウイルス作用、免疫調節作用など多彩な薬理作用を持つことが知られている。このような多彩な薬理作用のうち、*in vitro*の系において、IFN-βは、コラーゲン産生抑制作用、コラーゲナーゼ産生増強作用、線維芽細胞増殖抑制作用を有することが報告されており<sup>14)</sup>、線維症治療薬としてのポテンシャルを持つ可能性がうかがえるが、動物レベルでIFN-βの抗線維化作用について検討した報告は少ない。

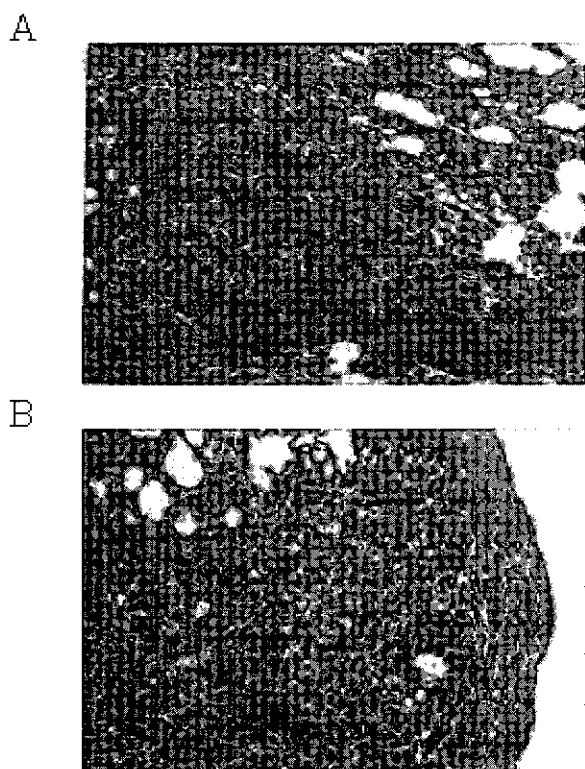


Figure 4 Histological findings of mouse lung tissue 14 days after administration of MuIFN- $\beta$  (Azan stain). A) BLM alone B) BLM+MuIFN- $\beta$  ( $10^4$ U/head)

本研究結果から、IFN- $\beta$ は、コラーゲン産生律速酵素であるプロリルヒドロキシラーゼ活性を抑制することによって、コラーゲン産生を抑制する可能性が示唆された。プロリルヒドロキシラーゼはコラーゲン合成過程におけるプロコラーゲンのプロリンを水酸化する酵素であり、安定したコラーゲンの3重らせん構造の形成に寄与する。IFN- $\beta$ が、プロリルヒドロキシラーゼ活性を抑制し、コラーゲン合成を阻害する可能性を示唆する結果は初めての報告であり、IFN- $\beta$ の抗線維化作用を説明するメカニズムの一つとして考えられる。

また、IFN- $\beta$ は、生存率評価モデルの生存率を改善する傾向を示した。観察期間が14日間と比較的短期であったため、長期にわたる検討が必要であるが、IFN- $\beta$ は抗線維化作用のほかにも延命効果をもたらす可能性を示唆する結果であると考えられる。

一方、IFN- $\beta$  (IFN- $\beta$  1a)は、海外において脱髄性自己免疫疾患である多発性硬化症 (Multiple Sclerosis; MS) の治療薬として使用されている。どのような作用機作で、MSの進展を抑制するのかは明らかとなっていないが、脳脊髄液中の interleukin-10 (IL-10) レベルの上昇が IFN- $\beta$  1a の進展抑制メカニズムの一つとして考えられている<sup>10)</sup>。

IL-10は抗炎症サイトカインの一つとして知られているので、IFN- $\beta$ の肺線維化抑制メカニズムにも IL-10レベ

ルの上昇が関与している可能性が考えられる。実際、海外では、特発性肺線維症に対する IL-10 の臨床試験が開始されるらしい。

また、IFN- $\beta$ は、単球/マクロファージあるいは樹状細胞の interleukin-12 (IL-12) 産生を抑制することによって、MSの進展を抑制するという報告<sup>11)</sup>もあり、IFN- $\beta$ が各種サイトカイン産生に影響を及ぼすことによる間接的な作用によって、抗炎症作用、強いては抗線維化作用を発揮している可能性が考えられる。

本研究結果は、IFN- $\beta$ が肺線維症に対して有効である可能性を示唆するものであるが、その線維化抑制メカニズムについては、直接的なコラーゲン産生抑制作用の他に、各種サイトカイン産生を修飾することによって、間接的に Th1/Th2 バランス、MMP/TIMP バランスなどを改善し、線維化抑制をもたらす可能性も考えられるため、今後さらに検討する必要があると考えている。

以上より、本研究結果は、BLM肺線維症モデルにおいて、IFN- $\beta$ の抗線維化作用を動物レベルで実証したと同時に、ヒト肺線維症に対する IFN- $\beta$ の有効性を示唆する結果であると考えられる。今回の結果をそのままヒトの肺線維症に当てはめることはもちろんできないが、肺線維症に対する新しい治療薬の一つとして今後さらに検討を行っていく予定である。

## 結 論

MuIFN- $\beta$ は、BLM肺線維症モデルにおいて、肺線維化を抑制する可能性が示唆された。

## 参考文献

- 1) Duncan MR and Berman B. :  $\gamma$  interferon is the lymphokine and  $\beta$  interferon the monokine responsible for inhibition of fibroblast collagen production and late but not early fibroblast proliferation. J Exp Med. 162: 516-27, 1985.
- 2) Duncan MR and Berman B. : Persistence of a reduced-collagen-producing phenotype in cultured scleroderma fibroblasts after short-term exposure to interferons. J Clin Invest. 79: 1318-24, 1987.
- 3) Popic W and Inglot AD : Combined action of interferons and transforming growth factor beta on the proliferation of human fibroblasts. Arch Immunol Therap Exp. 39: 19-26, 1991.
- 4) Duncan MR and Berman B : Differential regulation of glycosaminoglycan, fibronectin, and collagenase production in cultured human dermal fibroblasts by interferon-alpha, -beta, and -gamma. Arch Dermatol Res



- 281: 11-8, 1989.
- 5) Granstein RD, *et al*: Gamma-interferon inhibits collagen synthesis *in vivo* in the mouse. J Clin Invest 79: 1254-1258, 1987.
  - 6) Moreno MG and Muriel P : Remission of fiber fibrosis by interferon- $\alpha$  . Biochem Pharmacol 50: 515-20, 1995.
  - 7) Ziesche R, *et al* : A preliminary study of long-term treatment with interferon gamma-1b and low-dose prednisolone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. N Engl J Med. 341: 1264-9, 1999.
  - 8) McDonald S, *et al* : Pulmonary changes induced by combined mouse  $\beta$ -interferon (rMuIFN- $\beta$ ) and irradiation in normal mice - toxic versus protective effects. Radiotherapy and Oncology. 26: 212-8, 1993.
  - 9) Azuma A, *et al* : Role of E-selectin in bleomycin induced lung fibrosis in mice. Thorax 55: 147-52, 2000.
  - 10) Rudick RA, *et al* : Interferon beta induces interleukin-10 expression: relevance to multiple sclerosis. Ann Neurol 40: 618-27, 1996.
  - 11) Karp CL *et al* : Interferon  $\beta$  in multiple sclerosis : is IL-12 suppression the key? Immunol Today. 21: 24-8, 2000.

# 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 松岡 洋人

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為されてきた。遺伝子導入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- $\beta$  に対して拮抗する因子である可溶性 TGF- $\beta$  II 型受容体-IgG (Fc) 融合蛋白を発現させ、肺線維化を抑制することを試みた。C57BL/6 マウスに bleomycin 1.5mg/kg を気管内に投与した後、5 日目に筋肉内遺伝子注入電気穿孔法を用いて可溶性 TGF- $\beta$  II 型受容体-IgG (Fc) 融合遺伝子を前脛骨筋に導入した。12 日目 (遺伝子導入後 7 日目) の筋肉に対し免疫組織染色を、肺組織に対し免疫組織染色と Western Blotting を行った。21 日目 (遺伝子導入後 16 日目) の Hydroxyproline 定量によって線維化の評価を行った。筋肉での蛋白発現と肺への蛋白の集積を確認し、この遺伝子導入法が有効であると考えられた。しかしながら、Hydroxyproline 量には差がなく、現在の系では可溶性 TGF- $\beta$  II 型受容体-IgG (Fc) 融合遺伝子導入による bleomycin 線維化の抑制効果は十分でなかった。今後は発現レベルが病変の抑制に十分であるかどうかの検討が必要であると考えられる。

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

Seiji Hayashi, Masahide Mori, Hiroto Matsuoka

*Department of Molecular Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine*

Several investigators have attempted to regulate pulmonary fibrosis with gene therapy *in vivo*. To accomplish continuous and stable protein expression, *in vivo* introduction with a coding gene has advantages over administration of a recombinant protein.

We introduced soluble human transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) type II receptor-IgG (Fc) (T $\beta$ RII-Fc) gene and assessed the extent of the protein expression and antifibrotic effect on bleomycin-induced lung fibrosis model mice. On day 0, bleomycin (1.5 mg/kg) was instilled through the trachea into the lungs of C57BL/6 mice under anesthesia, and 100  $\mu$ g of plasmid cDNA of the T $\beta$ RII-Fc gene was injected into muscle with electric pulses on day 5.

On day 12, expression of T $\beta$ RII-Fc protein was detected not only on the muscles by immunohistochemical (IHC) analysis, but in the lungs by IHC and Western Blotting.

The T $\beta$ RII-Fc gene introduction did not reduce the hydroxyproline content of the lung on day 21 compared to control of lacZ gene.

*In vivo* gene transfer into muscles by electroporation is a new, effective and cheap method for gene expression. We might need further investigation for the quantitative analysis of the protein expression.

はじめに

特発性肺線維症の病態には、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<sup>1,2)</sup>。なかでも transforming growth factor (TGF)- $\beta$  は肺の線維化を促進させる因子として重要であるとされている<sup>3,5)</sup>。特発性肺線維症に対する確実に有効となる治療法は、いまだ確立されていない。遺伝子導入による蛋白発現は、精製蛋白を投与する場合に比べて、投与方法が比較的容易であること、安定で持続的な蛋白発現を得られる点で有利とされ、将来の臨床応用も含め今後も検討を重ねておくべきであると考えられる。

我々は筋肉内注入電気穿孔法によって、TGF- $\beta$  活性を制御する遺伝子を発現させ、実験的肺線維化動物モデルにおいて治療実験を行ってきた。昨年は TGF- $\beta$  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、プレオ肺線維症マウスモデルに応用し、線維化の軽減の可能性を指摘した。本年度は、同じく TGF- $\beta$  と拮抗する可溶性 TGF- $\beta$  II 型受容体-IgG (Fc) 融合蛋白の遺伝子を用いてさらに検討を加えた。二量体である TGF- $\beta$  との結合をより確実にするため、ヒト IgG の hinge の部分を融合させることによって、可溶性 TGF- $\beta$  II 型受容体を二量体化するとともに、半減期の延長を図った。本年度は全身的な蛋白発現方法としての筋肉内注入電気穿孔法の肺疾患における有効性を確認するとともに、肺線維症モデルにおける可溶性 TGF- $\beta$  II 型受容体-IgG (Fc) 融合遺伝子の治療効果の検討を目的とした。

## 方 法

### (1) 筋肉内注入電気穿孔法による生体内発現

われわれが用いている筋肉内注入電気穿孔法は宮崎らによって以前報告された方法で、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<sup>6)</sup>。

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、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、Gene Pulser (BIO-RAD) を用いて  $100\text{V}125 \mu\text{F}$  の放電を 1 秒毎に 8 回行った。

### (2) 遺伝子の構築

可溶性 TGF- $\beta$  II 型受容体-IgG (Fc) 融合遺伝子を chicken  $\beta$ -actin promoter 支配下の発現ベクターである

pCAGGS expression vector<sup>7)</sup> に組み込んだ pCA-soluble TGF- $\beta$  type II receptor-IgG (Fc) (pCA-T $\beta$ RII-Fc) を使用した (猪阪らにより作製, Fig.1)。また対照として pCAGGS expression vector に lacZ 遺伝子を組み込んだ pCA-lacZ を使用した。

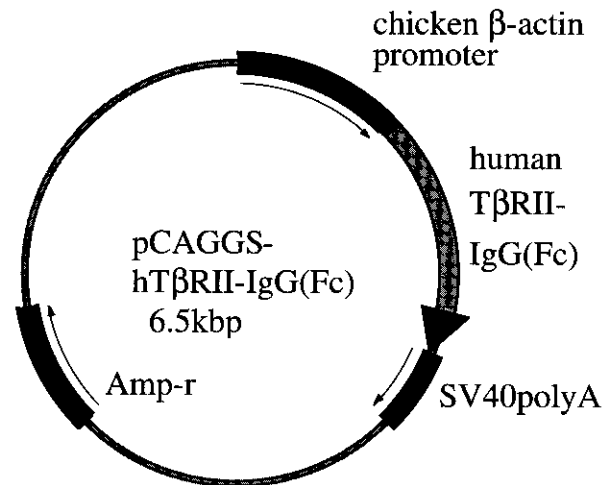


Fig.1

### (3) bleomycin 肺線維症マウスモデルに対する実験スケジュール

bleomycin による肺線維症マウスモデルを以下のように作製した。7-8 週令雄 C57BL/6 マウス に対し、bleomycin (日本化薬)  $1.5 \text{ mg}/\text{kg}$  体重を生理食塩水 ( $3 \text{ ml}/\text{kg}$  体重) に懸濁して気管内に投与した。さらに、5 日目に上記の筋肉内注入電気穿孔法によって pCA-T $\beta$ RII-Fc を各  $100 \mu\text{g}$  投与した。対照群として、pCA-lacZ を各  $100 \mu\text{g}$  投与した。

5 日目 (遺伝子未導入) に 2 匹、12 日目 (遺伝子導入 7 日目) に各群 2 匹ずつ両肺と前脛骨筋を摘出して抗 IgG (Fc) 抗体を用いて免疫組織染色を行った。さらに、各群 2 匹ずつ肺組織から蛋白を抽出して Western Blotting を行った。

21 日目に両肺を摘出し、各群 6 匹は hydroxyproline の定量を行った。

### (4) 組織固定と免疫組織染色

4% パラホルムアルデヒド-PBS にて組織固定後、Tissue-Tick に包埋して  $-20^\circ\text{C}$  に保存した。  $5 \mu\text{m}$  厚の切片を作成し、Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色を行った。また、ヒト IgG (Fc) に対する免疫組織染色は以下の通り行なった。組織切片を乾燥後、アセトンにて固定、さらに  $0.3\%$   $\text{H}_2\text{O}_2$  含有 methanol を用いて内因性 peroxidase ブロックを 30 分間行った。一次抗体としてヤギ抗ヒト IgG (Fc) 抗体 (Chemicon, Inc, CA) PBS 400 倍希釈を用い、 $37^\circ\text{C}$  3 時間反応させた後、二次抗体としてビオチン化ウサギ抗ヤギ IgG 抗体 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) PBS

400倍希釈を37℃ 30分間反応させた。さらに VECTASTAIN ABC Kit (Vector Laboratories) を用い、3, 3'-diaminobenzidine (Sigma, St. Louis, MO) を基質として発色させた。

(5) 肺組織からの蛋白抽出と Western Blotting

摘出した全肺を RIPA buffer 1ml (Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM, SDS 0.1%, sodium deoxycholate 0.1%, NP-40 1%, PMSF 2mM, NaF 10mM, aprotinin 10 $\mu$ g/ml, leupeptin 10 $\mu$ g/ml) 中にて細断し、遠沈したあと上清を-20℃にて保存した。この 10 $\mu$ l をとり、SDS-PAGE で泳動後、PVDF メンブランに転写した。一次抗体としてヤギ抗ヒト IgG (Fc) 抗体 (上記) PBS 2000 倍希釈を用い、37℃ 1時間反応させ、さらに二次抗体としてペルオキシダーゼ標識-ネコ抗ヤギ IgG (H+L) 抗体 PBS 2000 倍希釈で 37℃ 30分反応させた。その後、Western Blot Chemiluminescence Reagent (NEN Life Science) を用いて検出した。

(6) hydroxyproline の定量

Woessner らの方法に準じて行った<sup>8)</sup>。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℃、18 時間加熱した検体を蒸留水にて 10 倍希釈した後、飽和 LiOH にて中和、発色基質を加えて 60℃、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 T $\beta$ RII-Fc の生体内発現

遺伝子導入 7 日目の筋肉に免疫組織染色を行ったところ、pCA-T $\beta$ RII-Fc 導入群において発現が確認できた (Fig.2)。さらに、同日の肺組織の免疫組織染色でも、Bleo 投与群において発現が確認できた (Fig.2)。また、肺からの抽出蛋白を Westan Blotting にて解析したところ、T $\beta$ RII-Fc 蛋白の発現を検出した (Fig.3)。

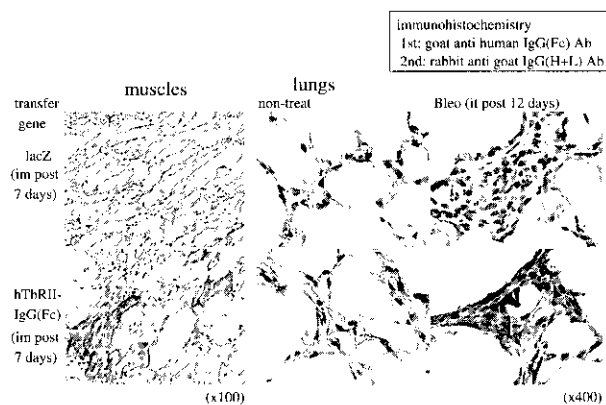


Fig.2

Western Blotting

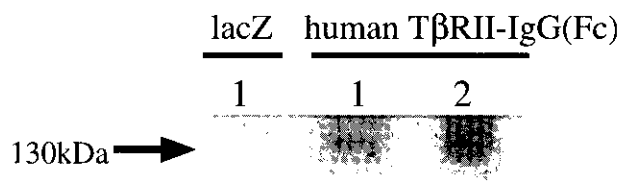


Fig.3

(2) 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

T $\beta$ RII-Fc 遺伝子の発現が、マウスモデルにおいてプレオマイシンの肺線維化を抑制するかどうかについて検討を行った。線維化の指標として hydroxyproline の定量を行った。治療群及び対照群 (各群 n=6) において、hydroxyproline の定量 ( $\mu$ g) は 212  $\pm$  16 と 207  $\pm$  14 (mean  $\pm$  SD, Fig.4) であり、有意差はなかった。

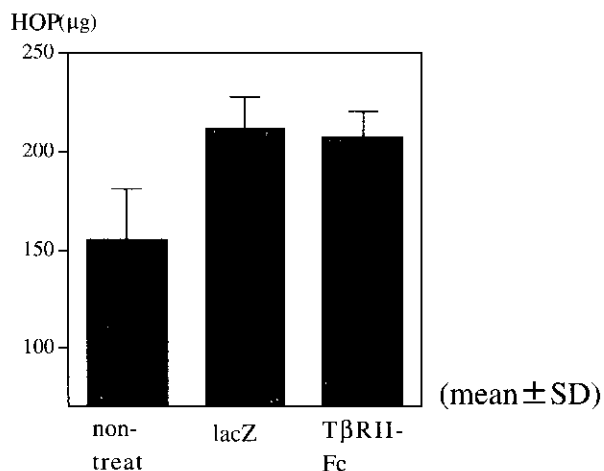


Fig.4

考案・結論

我々は以前より、肺の線維化を促進させる因子である TGF- $\beta$  や platelet derived growth factor (PDGF)-BB 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、肺線維症モデルにおいて有効な治療法の開発を試みてきている<sup>9-11)</sup>。

複数の同様の動物実験の報告が、精製蛋白や抗体を直接投与したものであり、いずれも現在のところ臨床応用には至っていない。また、我々は可溶性 PDGF 受容体遺伝子導入によるプレオマイシン肺傷害の抑制を報告しており、遺伝子治療の有用性を確認している<sup>9)</sup>。

最近報告された新しい遺伝子導入法である遺伝子筋注電気穿孔法は手技は比較的容易で高発現が期待できる<sup>6,12)</sup>。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、昨年我々も IL-10 遺伝子を導入し、その蛋白発現を確認した。今回の検討では、筋肉での蛋白発現であっても、一定量の肺局所への蛋白の集積が確認できた。

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、本年度の研究では T $\beta$ RII-IgG (Fc) を用いた。肺の線維化の鍵となる cytokine である TGF- $\beta$  は 2 量体で、まず II 型受容体 2 分子と結合し、さらに I 型受容体 2 分子と結合することによって、I 型受容体の細胞内から信号伝達が行われる。このため、II 型受容体の細胞外 domain 単独ではなく、IgG の hinge の部分と融合させた遺伝子を作製し発現させると、2 量体の形で分泌され、TGF- $\beta$  との結合がより強固になるとされている。腎炎モデルにおいて T $\beta$ RII-Fc の遺伝子導入<sup>13)</sup> の有効性が既に報告されており、また、実験的肺線維症モデルにおいても、ハムスターにブレオマイシン肺臓炎に対する T $\beta$ RII-IgG (Fc) 精製蛋白の経気道的投与で、線維化の抑制が図れたことが報告されている<sup>14)</sup>。現在の段階では、発現蛋白の肺への集積は確認できたが、線維化抑制因子としての可溶性 human TGF- $\beta$  II 型受容体遺伝子投与では十分な治療効果が得られなかった。今後は、病変の制御に必要な十分な蛋白発現が得られているかどうかについて定量的な検討を行う必要がある。

#### 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: 254-266, 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: 155-162, 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 USA* 88: 6642-6646, 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: 9570-9574, 1995.
- 6) Aihara H, Miyazaki J. Gene transfer into muscle by electroporation *in vivo*. *Nat Biotechnol* 16: 867-870, 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) 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: 503-508, 1999.
- 10) Arai T, Abe K, Matsuoka H, Yoshida M, Mori M, Goya S, Kida H, Nishino K, Osaki T, Tachibana I, Kaneda Y, Hayashi S. Introduction of the interleukin-10 gene into mice inhibited bleomycin-induced lung injury *in vivo*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 278: L914-922, 2000.
- 11) 厚生省特定疾患びまん性肺疾患分科会平成 11 年度研究報告書. 95-99, 2000.
- 12) MirLM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, Delaere P, Branell D, Schwartz B, Scherman D. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4262-4267, 1999.
- 13) Isaka Y, Akagi Y, Ando Y, Tsujie M, Sudo T, Ohno N, Border WA, Noble NA, Kaneda Y, Hori M, Imai E. Gene therapy by transforming growth factor-beta receptor-IgG Fc chimera suppressed extracellular matrix accumulation in experimental glomerulonephritis. *Kidney Int* 55: 465-475, 1999.
- 14) Wang O, Wang Y, Hyde DM, Gotwals PJ, Kotliansky VE, Ryan ST, Giri SN. Reduction of bleomycin induced lung fibrosis by transforming growth factor beta soluble receptor in hamsters. *Thorax* 54: 805-812, 1999.

# 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
Keicho N., J. Ohashi, G. Tamiya, K. Nakata, Y. Taguchi, A. Azuma, N. Ohishi, M. Emi, M. H. Park, H. Inoko, K. Tokunaga and S. Kudoh	Fine localization of a major disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis	Am. J. Hum. Genet.	66	501-507	2000
Keicho N., M. Emi, M. Kajita, I. Matsushita, K. Nakata, A. Azuma, N. Ohishi and S. Kudoh	Overestimated frequency of a possible emphysema-susceptibility allele when microsomal epoxide hydrolase is genotyped by the conventional polymerase chain reaction-based method	J. Hum. Genet.	46	96-98	2001
Kanai T., Fujii T., Yamashita T., Hyodo H., Miki A., Unno N., Kozuma S., Taketani Y., Keicho N., Tokunaga K.	Polymorphism of Human Leukocyte Antigen-E Gene in the Japanese Population with or without Recurrent Abortion	Am. J. Reprod Immunol Microbiol	45	168-173	2001
Komuro I, Keicho N, Iwamoto A, Akagawa KS.	Human alveolar macrophages and GM-CSF-induced monocyte-derived macrophages are resistant to H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> via their high basal- and inducible-levels of catalase activity	J Biol Chem			in press
Azuma A., Keicho N., Furukawa H., Yabe T., Kudoh S.	Prolonged Survival of a Bare Lymphocyte Syndrome Type I Patient with Diffuse Panbronchiolitis Treated with Erythromycin.	Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis			in press
慶長直人, 土屋朋子, 中田光	びまん性汎細気管支炎と分子遺伝学の接点	Ther Res	21	1900-1903	2000
中田光, 本田芳広, 田中直彦, M. Weiden, 慶長直人	AIDS に合併する結核	結核	75	547-556	2000
土屋朋子, 慶長直人, 中田光	びまん性汎細気管支炎の病態生理	内科	86	733-736	2000
内田寛治, 中田光, 慶長直人	GM-CSF 自己抗体と疾患	アレルギー科	10	392-397	2000
慶長直人, 土屋朋子, 中田光	びまん性汎細気管支炎と HLA	血液フロンティア	11	39-46	2001
中田光, 内田寛治, 慶長直人	特発性肺胞蛋白症の病因と抗 GM-CSF 自己抗体	Annual Review 免疫 2001, 東京, 工藤翔二, 土屋了介, 金沢実, 大田健編集, 中外医学社		62-67	2001
中田光, 内田寛治, 慶長直人	特発性肺胞蛋白症と抗 GM-CSF 自己抗体	矢田純一, 奥村康, 佐藤昇志編集, 中外医学社		328-333	2001
Tadashi Kohyama, H. Takizawa, Shin Kawasaki, Norihisa Akiyama, Makoto Sato and Koji Ito	Fourteen-member macrolides inhibit IL-8 release by human eosinophils from atopic donors	Antimicrob. Agents Chemother	43	907-911	1999
T. Kohyama, H. Takizawa, S. Kawasaki, N. Akiyama, M. Sato, K. Ito, K. Yamamoto	A potent immunosuppressant FK506 inhibits IL-8 expression in human eosinophils	Mol. Cell Biol. Res. Commun	1	72-77	1999

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
Sunazuka T, Takizawa H, Desaki M, Suzuki K, Obata R, Otoguro K, Omura S	Effects of erythromycin and its derivatives on interleukin-8 release by human bronchial epithelial cell line BEAS-2B cells	J. Antibiotics	52	71-74	1999
Desaki M, Takizawa H, Ohtoshi T, Kasama T, Kobayashi K, Sunazuka T, Omura S, Yamamoto K, Ito K	Erythromycin suppresses nuclear factor-kappa B and activator protein-1 activation in human bronchial epithelial cells	Biochem. Biophys. Res. Commun	267	124-128	2000
H. Takizawa, M. Tanaka, K. Takami, T. Ohtoshi, K. Ito, M. Satoh, Y. Okada, F. Yamasawa, A. Umeda	Increased expression of inflammatory mediators in small airway epithelium from tobacco smokers	Am. J. Physiol	278	L906-913	2000
Hajime Takizawa, Mitsuru Tanaka, Kazutaka Takami, Takayuki Ohtoshi, Koji Ito, Masaru Satoh, Yasumasa Okada, Fumihiko Yamasawa, Akira Umeda	Increased Expression of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 in Small Airway Epithelium from Tobacco Smokers and Patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD)	Am J Respir Crit Care Med			in press
松井弘稔, 滝沢 始	クラリスロマイシンと粘液繊毛輸送能増強作用-気道分泌に対するCAMの効果	分子呼吸器病	3	367-372	1999
滝沢 始, 高見和孝, 大川隆行, 幸山 正, 河崎 伸, 出崎真志, 中原一彦, 山本一彦, 田中 満	慢性気道炎症におけるサイトカイン/ケモカインと成長因子	炎症	20	603-606	2000
滝沢 始	マクロライドの作用点: サイトカイン産生-その現状までの到達点と今後の課題, 医業ジャーナル社	炎症・免疫とマクロライド Up to Date シリーズ 2, 清水喜八郎, 大村 智編集 東京		74-80	1999
田口善夫	びまん性汎細気管支炎: 看護のための最新医学講座	呼吸器疾患 監修 日野原重明, 井村裕夫, 中山書店	2	251-257	2001
田口善夫	DPB にたいするマクロライド少量療法の治療指針および副作用報告: マクロライドの新作用研究	The Japanese Journal of Antibiotics 2000, 日本抗生物質学術協議会	54	S29-32	2001
○ Eishi Y, Suga M, Ishige I, Kobayashi D, Yamada T, Takizawa T, Koike M, Takemura T, Kudoh S, Costabel U, Guzman J, Rizzato G, Gambacorta M, du Bois R, Nicholson AG, Sharma Om P, Ando M.	Quantitative analysis of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese and European patients with sarcoidosis	J Clin Microbiol			in press
Kobayashi D, Eishi Y, Ohkusa T, Ishige I, Cho Y, Minami J, Yamada T, Takizawa T, Koike M.	Accuracy of urea breath test and histological grading to estimate density of Helicobacter pylori in gastric mucosa as evaluated by real-time polymerase chain reaction	J Gastroenterol Hepatol (in submission)			
Akashi T, Ito E, Eishi Y, Koike M, Nakamura K, Burgeson RE.	Reduced expression of laminin alpha 3 and alpha 5 chains in non-small cell lung cancers	Jpn J Cancer Res	92	293-301	2001



発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
Ohkusa T, Fujiki K, Takashimizu I, Kumagai J, Tanizawa T, Eishi Y, Yokoyama T, Watanabe M.	Improvement in atrophic gastritis and intestinal metaplasia in patients in whom Helicobacter pylori was eradicated	Ann Intern Med	134	380-386	2001
Ikeda S, Kimura H, Honma E, Shibata T, Yamazaki S, Hashimoto K, Eishi Y.	A study of reduction of NF 2 protein, mRNA and loss of 22 q in sporadic meningiomas	No To Shinkei (Japanese)	52	973-977.	2000
Mimura M, Tanaka N, Kimijima Y, Eishi Y, Amagasa T, Okada N.	Melanotic neuroectodermal tumor of infancy -immunohistochemical and ultrastructural study-	Asian J Oral Maxillofac Surg	12	217-224	2000
○ Ebe Y, Ikushima S, Yamaguchi T, Kohno K, Azuma A, Sato K, Ishige I, Usui Y, Takemura T, Eishi Y	Proliferative response of peripheral blood mononuclear cells and levels of antibody to recombinant protein from Propionibacterium acnes DNA expression library in Japanese patients with sarcoidosis	Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis	17	256-265	2000
Ohkusa T, Fujiki K, Takashimizu I, Kumagai J, Tanizawa T, Eishi Y.	Endoscopic and histological comparison of nonulcer dyspepsia with and without Helicobacter pylori infection evaluated by the modified Sydney system	Am J Gastroenterol	95	2195-2199	2000
Kato C, Sato K, Wakabayashi A, Eishi Y.	The effects of allopurinol on immune function in normal BALB/c and SCID mice	Int J Immunopharmacol	22	547-556	2000
Tanaka M, Kawaguchi Y, Yokofujita J, Takagi M, Eishi Y, Hirai K.	Sequence variations of Epstein-Barr virus LMP2A gene in gastric carcinoma in Japan	Virus Genes	19	103-111	1999
Kato C, Sato K, Eishi Y, Nakamura K.	The influence of initial exposure timing to beta-lactoglobulin on oral tolerance induction	J Allergy Clin Immunol	104	870-878	1999
○ Ishige I, Usui Y, Takemura T, Eishi Y.	Quantitative PCR of mycobacterial and propionibacterial DNA in lymph nodes of Japanese patients with sarcoidosis	Lancet	354	120-123	1999
○ Eishi Y, Ishige I, Usui Y, Ebe Y, Tamemura T.	Propionibacteria as a possible causative agent of sarcoidosis	Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis	16	8-10	1999
Akashi T, Miyagi T, Ando N, Suzuki Y, Nemoto T, Eishi Y, Nakamura K, Shirasawa T, Osa N, Tanaka N, Burgeson RE.	Synthesis of basement membrane by gastrointestinal cancer cell lines	J Pathol	187	223-228	1999
永井英明, 倉島篤行, 米田良蔵	高齢者サルコイドーシスの8例	日本胸部臨床	45	29	1986
倉島篤行, 山口理恵子, 蛇沢晶	多発結節影を呈し, 著しい肉芽腫性血管炎を認めた症例	最近のサルコイドーシス, 東京, 現代医療社		28-29	1993
東田修二, 赤川志のぶ, 三浦寧子 ほか	尿崩症, 下垂体前葉機能障害と中枢性肺胞低換気を合併したサルコイドーシスの1例	日内会誌	78	344-348	1989
室田直樹, 宮坂信之, 中村裕子, 赤川志のぶ ほか	サルコイドーシスにおける肺胞リンパ球のIL-2産生能および肺胞マクロファージのIL-1産生能の検討	日胸疾会誌	24	49-55	1986
Keicho N., Kitamura K., Takaku F., Yotsumoto H.	Serum concentration of soluble interleukin-2 receptor as a sensitive parameter of disease activity in sarcoidosis	Chest	98	1125-1129	1990

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
Yotsumoto H.	Longitudinal observations of serum angiotensin-converting enzyme activity in sarcoidosis with and without treatment	Chest	82	556-559	1982
Zhao DM, Xue HH, Chida K, Suda T, Kanai M, Uchida C, Ichiyama A, Nakamura H	Effect of erythromycin on ATP-induced intracellular calcium response in A549 cells	Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol	278 (4)	L726-736	2000
Todate A, Chida K, Suda T, Imokawa S, Sato J, Ide K, Tsuchiya T, Inui N, Nakamura Y, Asada K, Hayakawa H, Nakamura H	Increased Numbers of Dendritic Cells in the Bronchiolar Tissue of Diffuse Parenchymal Bronchiolitis	Am J Respir Crit Care Med	162 (1)	148-153	2000
Nakano Y, Tsuchiya T, Hirose K, Chida K	Occupational Asthma Caused by Pyrazolone Derivative Used in Halide Photographic Paper	Chest	118 (1)	246-248	2000
Shirai T, Ohtake T, Kimura M, Fujigaki Y, Takayanagi Y, Chida K, Nakamura H, Hishida A, Irie F	Atypical Fabry's Disease Presenting with Cholesterol Crystal Embolization	Internal Medicine	39 (8)	646-649	2000
Nakano Y, Enomoto N, Kawamoto A, Hirai R, Chida K	Efficacy of adding multiple doses of oxitropium bromide to salbutamol delivered by means of a metered-dose inhaler with a spacer device in adults with acute severe asthma	J Allergy Clin Immunol	106 (3)	472-478	2000
Xue HH, Zhao DM, Suda T, Uchida C, Oda T, Chida K, Ichiyama A, Nakamura H	Store Depletion by Caffeine/Ryanodine Activates Capacitative Ca <sup>2+</sup> Entry in Nonexcitable A549 Cells	J Biochem	128 (2)	329-336	2000
Sato J, Chida K, Suda T, Sato A, Nakamura H	Migratory patterns of thoracic duct lymphocytes into bronchus-associated lymphoid tissue of immunized rats	Lung	178 (5)	295-308	2000
Toyoshima M, Chida K, Sato A	Antigen uptake and subsequent cell kinetics in bronchus-associated lymphoid tissue	Respirology	5 (2)	141-145	2000
Tsukamoto K, Hayakawa H, Sato A, Chida K, Nakamura H, Miura K	Involvement of Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 in disease progression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis	Thorax	55 (11)	958-961	2000
Fujii M, Hayakawa H, Urano T, Sato A, Chida K, Nakamura H, Takada A	Relevance of tissue factor and tissue factor pathway inhibitor for hypercoagulable state in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis	Thromb Res	99 (2)	111-117	2000
Toyoshima M, Chida K, Suda T, Imokawa S, Nakamura H	Wegener's granulomatosis responding to antituberculous drugs	Chest	119 (2)	643-645	2001
Inui N, Chida K, Suda T, Nakamura H	Th1/Th2 and Tc1/Tc2 profiles in peripheral blood and bronchoalveolar lavage cells in pulmonary sarcoidosis	J Allergy Clin Immunol	107 (2)	337-344	2001
Itakura M., Tokuda A., Kimura H., Nagai S., Yoneyama H., Ishikawa S., Kuriyama T., and Matsushima K.	Blockade of secondary lymphoid tissue chemokine (SLC) exacerbates Propionibacterium acnes-induced acute lung inflammation	J. Immunol	166	2071-2079	2001
板倉 明司, 徳田 敦子, 松島 綱治	炎症細胞とサイトカイン	Annual Review	呼吸器	1-9	2000

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
Itoh H, Nakatsu M, Yoxtheimer LM, Uematsu H, Ohno Y and Hatabu H	Strutural basis for pulmonary functional imaging	European Journal of Rediology	37	143-154	2001
中田肇, 伊藤春海	胸部 CT - 読影と診断のテキスト (第3版)	秀潤社, 東京			2001
伊藤春海	CT 診断	酒井文和, 永井厚志, 大田健, 飛田渉編. 呼吸器疾患の画像診断, メディカルビュー社, 東京			2001
伊藤春海	画像診断からみた間質性肺炎: IPF とその周辺	日本胸部臨床	60 (6)	514-524	2001
Abe S. and Takahashi H.	Diffuse infiltrative lung disease: New clinical biomarker in diffuse interstitial pneumonia	Int. Med	40	159-162	2001
Takahashi H., Imai Y., Fujishima T., Shiratori M., Murakami S., Chiba H., Kon H., Kuroki Y. and Abe S.	Diagnostic significance of surfactant protein A and D in sera from patients with radiation pneumonitis	Eur Respir J			2001
Takahashi H., Fujishima T., Koba H., Murakami S., Kurokawa K., Shibuya Y., Shiratori M., Kuroki Y., Abe S.	Serum surfactant proteins A and D as prognostic factors in idiopathic pulmonary fibrosis and their relationship to disease extent	Am J Respir Crit Care Med	162	1109-14	2000
Takahashi H., Kuroki Y., Tanaka H., Saito T., Kurokawa K., Chiba H., Sagawa A., Nagae H. and Abe S.	Serum Levels of Surfactant Proteins A and D are useful biomarkers for interstitial lung disease in patients with progressive systemic sclerosis	Am J Respir Crit Care Med	162	258-263	2000
Takahashi H., Kuroki Y., Fujishima T., Shiratori M., Koba H., Murakami S., Akino T., Abe S.	Serum surfactant protein A and D in idiopathic pulmonary fibrosis; Relationship with disease extent and prognosis	Applied Cardiopulmonary Pathophysiology	9	304-305	2000
Murakami M., Takahashi H., Chiba H., Aisaka H., Kon H., Takezawa C., Shiratori M., Fujishima T., Kuroki Y., Abe S.	The mechanisms by which surfactant protein A and D appear in the bloodstream and the intra-alveolar space are different between idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary alveolar proteinosis	Proc Airway Secetion Res	2	57-64	2000
阿部庄作, 高橋弘毅	ミニレビュー: 間質性肺炎のバイオマーカーとしての肺サーファクタント蛋白質	日呼吸会誌	38	157-165	2000
阿部庄作, 高橋弘毅	呼吸器疾患の分子病態と臨床 - びまん性肺疾患	日本内科学会雑誌 2000	89	1804-1808	2000
高橋弘毅, 原田一暁, 白鳥正典, 藤嶋卓哉, 阿部庄作	末梢気道肺傷害における SP-A の変動と病態との関係	気管支学	22 (8)	657-663	2000
佐川 昭, 篠原正英, 谷村一秀, 北野明美, 三上通英, 宇野美穂子, 成田明宏, 高橋弘毅, 田中裕士, 阿部庄作	強皮症における肺病変の診療 - 間質性肺炎のマーカー (SP-D, KL-6) を用いて -	リウマチ科	23	29-35	2000
Ichikado K., Suga M., Gushima Y., Johkoh T., Iyonaga K., Yokoyama T., Honda O., Shigeto Y., Tomiguchi S., Takahashi M., Itoh H., Ikezoe J., Muller NL, and Ando M.	Hyperoxia-induced diffuse alveolar damage in pig: Correlation between thin-section computed tomographic and pathologic findings	Radiology	261 (1)	531-538	2000

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
Takano Y., Sakamoto O., Suga M., Suda T., and Ando M.	Elevated levels of macrophage-stimulating protein in induced sputum of patients with bronchiectasis	Respir Med	94 (2)	784-790	2000
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 (5)	1949-1956	2000
Fujiki M., Shinbori T., Suga M., Miyakawa H., Mizobe T., and Ando M.	Bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin B induces interstitial pneumonia in SCID mice reconstituted with peripheral blood mononuclear cells from collagen vascular disease patients	Clin Immunol	96 (1)	38-43	2000
Yamanaka T., Saita N., Kawano O., Matsumoto M., Kohroggi H., Suga M., Ando M., Hirashima M.	Isolation of a lactose-binding protein with monocyte/macrophage chemotactic activity. Biological and physicochemical characteristics	Int Arch Allergy Immunol	122 (1)	66-75	2000
Johkoh T., Muller NL., Akira M., Ichikado K., Suga M., Ando M., Yoshinaga T., Kiyama T., Mihara N., Honda O., Tomiyama N., and Nakamura H.	Eosinophilic lung diseases: Diagnostic accuracy of thin-section CT in 111 patients	Radiology	216 (3)	773-780	2000
Takahashi T., Suga M., Matsukawa A., Sato K., Okamoto T., Ohkawara S., Yoshinaga M., and Ando M.	Erythromycin attenuates an experimental model of chronic bronchiolitis via augmenting MCP-1	Eur Respir J			in press
Sakamoto O., Suga M., Suda T., and Ando M.	Expression of discoidin domain receptor 1 throsine kinase on the human bronchial epithelium	Eur Respir J			in press
安藤正幸, 菅 守隆, 一門和哉	特発性間質性肺炎	臨床と研究	77	16-20	2000
菅 守隆	間質性肺炎	治療薬	53	65-69	2000
菅 守隆	過敏性肺炎	臨床医	26	989-992	2000
菅 守隆	過敏性肺炎	今日の診断指針, 医学書院			印刷中
菅 守隆	特発性間質性肺炎	今日の診断指針, 医学書院			印刷中
菅 守隆	過敏性肺炎の診断と治療	呼吸器疾患－専門医にきく最新の臨床－(工藤翔二, 永井厚志 編), 中外医学社		p183-185	2000
菅 守隆	過敏性肺炎	呼吸器疾患 日常診療の手引き(清水喜八郎, 松島敏春, 佐々木英忠, 永井厚志 監修・編集)		p1-8	2000
菅 守隆	過敏性肺炎	呼吸器疾患最新の治療 2001-2003 工藤翔二, 中田紘一郎, 貫和敏博 編, 南江堂		306-308	2001
菅 守隆	間質性肺炎	老年呼吸器病学 福地義之助 編, 永井書店		434-445	2001