

# HGF による肺線維症遺伝子治療の臨床応用

三木 誠 秋山 健一 海老名雅仁 渡辺 正之  
鯉沼代 造 萩原 弘一 中村 晃 貫和 敏博\*

特発性間質性肺炎に対する hepatocyte growth factor (HGF) を用いた遺伝子治療法の確立と臨床応用を目的とし、その前段階としてマウス肺臓炎モデルにて方法論および有効性を検討した。

HGF 発現アデノウイルスベクター (Ad-HGF) を経気道的、経血管的、経腹腔的に投与し、HGF 蛋白の肺内発現を ELISA 法で確認した。経気道的投与は、少ないベクター量 ( $4 \times 10^7$  pfu) で高容量 ( $312.5 \pm 63.4$  ng/g tissue, day 3) の HGF を発現させたにも関わらず、ウイルスベクターが炎症を遷延させてしまい、肺臓炎を軽快させるに至らなかった。Ad-HGF の経腹腔的投与 ( $6 \times 10^8$  pfu) では、HGF を肝臓で発現させ、血行性に肺に到達し ( $231.3$  ng/g tissue, day 3)、マウス肺臓炎モデルにて有意にハイドロキシプロリン量を減少させ ( $177 \pm 9\%$  vs.  $128 \pm 5\%$ ,  $p < 0.005$ )、線維化を改善した。さらに、HGF は肺胞上皮細胞のアポトーシスを抑制 ( $35 \pm 4\%$  vs.  $13 \pm 1\%$ ,  $p < 0.05$ ) して肺の傷害を防ぎ、また TGF- $\beta$  を減弱して線維化を抑制することも判明した。経血管的投与では、約 1/10 のウイルスベクター投与量で経腹腔的投与と同様の結果が得られた。また、naked plasmid DNA や macro-aggregated albumin (MAA) 結合 plasmid DNA を用いて、肺での HGF 発現に成功し、より安全性の高い遺伝子治療法を検討している。

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。

## Clinical application of gene therapy with HGF for idiopathic pulmonary fibrosis

M. Miki, K. Akiyama, M. Ebina, M. Watanabe,  
D. Koinuma, K. Hagiwara, A. Nakamura, T. Nakamura and T. Nukiwa

*Department of Respiratory, Oncology, Molecular Medicine, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University*

Hepatocyte growth factor (HGF) is a humoral mediator of epithelial-mesenchymal interactions, acting on a variety of epithelial cells as mitogen, motogen, and morphogen. Exogenous HGF acts as a hepatotrophic factor and an organotrophic factor during experimental injury. We have already reported that exogenous HGF protein acts as a pulmotrophic factor *in vivo* and prevents the progression of bleomycin (BLM)-induced lung injury when administered in either a simultaneous or delayed fashion. HGF is a potent candidate to prevent or treat lung fibrosis.

On the basis of these findings and in order to step up for the clinical application of HGF in the field of respiratory diseases, we examined the adenoviral mediated HGF treatment. While the direct intratracheal administration of adenoviral vector expressing rat HGF (Ad-HGF) ( $4 \times 10^7$  pfu) yielded high transient HGF expression in the lung ( $312.5 \pm 63.4$  ng/g tissue, day 3), adenovirus caused neutrophil alveolitis and extended the duration of BLM-induced inflammation. In spite of indirect intraperitoneal (i. p.) administration of Ad-HGF ( $6 \times 10^8$  pfu) to C57BL/6 mice with BLM-induced lung fibrosis expressing 231.3 ng/g of rat HGF in lung tissue at day 3, the significantly reduced hydroxyproline content ( $128 \pm 5\%$ ) was resulted, comparing with the mice treated by adenovirus without cDNA insertion (Ad-Null,  $177 \pm 9\%$ ,  $p < 0.005$ ). Furthermore, the ratio of apoptotic cells per total alveolar cells in BLM-induced lung injury was reduced by the i. p. administration of Ad-HGF ( $35 \pm 4\%$  vs.  $13 \pm 1\%$ ,  $p < 0.05$ ). Ad-HGF also reduced the expression of TGF- $\beta$  mRNA induced by BLM in the lung. Intravenous administration of Ad-HGF ( $4 \times 10^7$  pfu) ameliorated BLM-induced lung fibrosis as well as i. p. ( $6 \times 10^8$  pfu). These results indicate the potential therapeutic effect of Ad-HGF for lung fibrosis, and the necessity to establish a route of a vector administration avoiding additional infection to diseased lung.

We also have established the safer method using plasmid vector conjugated with macro-aggregated albumin (MAA) for expressing HGF specifically in the lung thorough lung vessels. We concluded that the gene therapy using HGF is promising field for lung fibrosis.

## はじめに

肺線維症は、肺実質が慢性進行性に炎症および線維化、すなわち肺胞の虚脱、間質への膠原線維の蓄積など肺胞構造のリモデリングをきたし、ひいては呼吸不全に至る予後不良な疾患である<sup>1)</sup>。感染症や膠原病に伴い二次性に起こることもあるが、主として病因不明の特発性間質性肺炎 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) に代表される。我々は IPF にも家族性集積が認められることを報告してきた<sup>2)</sup> が、現時点では IPF に特異的な遺伝子異常は解明されていない。一方 IPF に対して現在まで確立された治療法はなく、通常ステロイドやサイクロフォスファミドなどの免疫抑制剤が用いられているが、反応は不良であることから、新規薬剤の開発が待たれている<sup>3,4)</sup>。

我々は、特発性間質性肺炎患者肺組織における HGF の発現とその重要性を示し<sup>5,6)</sup>、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor: HGF) のリコンビナントタンパクを用いて、実験的肺線維症の制御を試みてきた。その結果、肺傷害モデル完成後の HGF 投与によっても線維化は有意に抑制される事実を報告し、HGF が肺においても器官再生因子として機能することを明らかにした<sup>9)</sup>。しかし臨床応用を想定した場合、十分量の HGF タンパクが入手困難と思われる。そこで本研究では HGF 発現アデノウイルスベクター (Ad-HGF) を用い、遺伝子導入による外因性 HGF 発現が HGF リコンビナントタンパク投与と同様に肺線維化を抑制するかについて、さらには安全で有効なベクターと投与経路の探求により遺伝子治療の確立を目的とし、ヒトへの臨床応用する前段階として、HGF 発現アデノウイルスベクターおよび HGF 発現プラスミドベクターを開発し、とマウス肺臓炎モデルにおける有効性を検討した。

## 方 法

### 1) HGF 発現アデノウイルスベクター (Ad-HGF) と HGF 発現プラスミドベクター (pUC-SR $\alpha$ -HGF) の作製

Graham らの方法<sup>10)</sup>に従って作製された CAG プロモーターを含むラット HGF 発現アデノウイルスベクター (Adex1CAHHGF: Ad-HGF) を札幌医科大学浜田先生より供与された (図 1)。ウイルス液の力価は、293 細胞を使用したプラーク・アッセイにて測定し、pfu (plaque forming units) にて表示した。Ad-HGF の DNA を抽出し、E1A 領域を増幅するプライマーを用いて PCR を行い、同領域の混入が無いことを確認した。対照としては、外来性の挿入遺伝子を組み込んでいない非増殖型アデノウイ

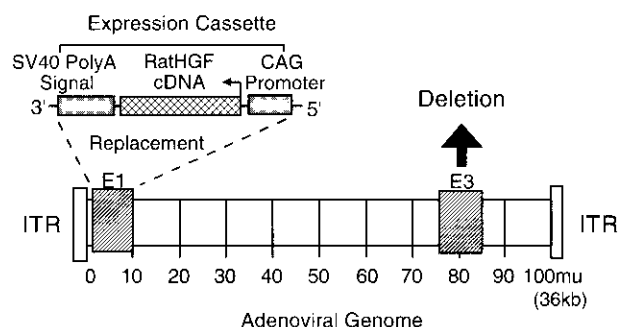


図 1 Structure of recombinant adenovirus vector containing rat HGF cDNA.

The recombinant vector (Adex1CAHHGF:Ad-HGF) is constructed from Ad5-derived virus that has a deletion of E1a, E1b and a portion of E3 regions.

ルスベクター Ad-Null を使用した。

HGF 発現プラスミドベクターは、ヒト HGF cDNA および SR  $\alpha$  プロモーターを pUC- プラスミドに組み込み作製した (pUC-SR  $\alpha$ -HGF)。また、肺特異的発現のため、Orson らの方法<sup>11)</sup>に従い、凝集マクロアルブミン (macroaggregated albumin: MAA) を結合した pUC-SR  $\alpha$ -HGF を作製し、経血管的に投与して肺での発現を調べた。

### 2) Northern blotting

Ad-HGF を A549 細胞や C57BL/6 マウスに感染させ *in vitro* および *in vivo* での発現を Northern blotting 法にて確認した。また、Ad-HGF を投与後、day3 の肺のホモジネートから Acid guanidine phenol chloroform (AGPC) 法にて total RNA を抽出し、ラット HGF および線維化の中心的役割を担っている TGF- $\beta$  の mRNA 発現量を Northern blotting 法で定量した。対照として、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) プロブを用いた。

### 3) Enzymed-linked immunosorbent assay (ELISA)

Ad-HGF を C57BL/6 マウスに感染させた後の発現量の経時変化を ELISA 法にて定量した。Ad-HGF を投与後、day0, 3, 7, 14 の肺のホモジネートを遠心後、上清を rat HGF ELISA キット (Institute of immunology, Tokyo, Japan) を用いて、蛋白量を測定した。pUC-SR  $\alpha$ -HGF による HGF 蛋白発現の定量には、human HGF ELISA キット (Institute of immunology, Tokyo, Japan) を用いた。

### 4) *in situ* hybridization (ISH)

経気道的に投与した際の発現部位を同定するため、ISH を行った。Ad-HGF を C57BL/6 マウスに感染させ、day3 の肺の凍結切片を作製し、digoxigenin (DIG) 標識 HGF リボプローブを用いてハイブリダイゼーションを行い、アルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体を反応させ、酵素触媒による発色反応を行い、検鏡した。

東北大学加齢医学研究所腫瘍制御部門呼吸器腫瘍研究分野

\* びまん性肺疾患研究班 分担研究者

### 5) マウスブレオマイシン肺臓炎モデル

C57BL/6 マウス (メス, 8 週齢) に bleomycin chlorate 0.75mg を隔日 4 回 (day 1, 3, 5, 7) 腹腔内投与して肺の線維化を惹起した。ブレオマイシン投与開始 28 日後にマウスを屠殺し、気管より 4% パラホルムアルデヒドを注入し伸展後に肺を摘出し、固定した。左肺はハイドロキシプロリン含量の測定に用い、右肺はパラフィン包埋後、5 $\mu$ m に薄切し、病理形態学的評価のために Hematoxylin-Eosin (HE) および Elastica-Masson (EM) 染色標本を作製して、線維化の程度を判定した。

実効的投与経路の探索を目的として、Ad-HGF を day0 に経気道的、経腹腔的、経血管的に投与し、正常なマウスにおける経時的な HGF 蛋白の肺内分布量を ELISA 法で定量した。また、上記モデルに投与して、治療効果を判定した。対照群として PBS および Ad-Null を同様の方法で投与した。

### 6) ハイドロキシプロリン・アッセイ

Woessner らの方法<sup>12)</sup>に準じて行った。すなわち、マウス右肺を乾燥粉碎後、6N 塩酸にて 110℃ で 16 時間加水分解し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC: high performance liquid chromatography) にてハイドロキシプロリン含量を測定した。

### 7) 気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid: BALF)

炎症の程度を評価するため、day3 の BALF を解析した。気管支肺胞洗浄は生理食塩水 1ml で計 8 回行い、約 90% を回収した。1500rpm で 5 分間遠心後、沈殿した細胞成分を RPMI 液に再浮遊させ細胞数と細胞分画を調べた。

### 8) Tunel 法

Ad-HGF 投与後、day7 の肺のパラフィン切片を作製し、*In situ* Apoptosis detection kit (Takara, Tokyo, Japan) を用い、肺胞上皮細胞のアポトーシス評価を Tunel 法で解析した。

### 9) 統計学的検討

統計学的解析には、異なる 2 群のデータを対応のない Student's t-test を用いて検定し、危険率 5% 以下を有意差ありとした。

## 結 果

### Ad-HGF によるラットの HGF の発現

Ad-HGF を肺胞上皮細胞由来の癌細胞である A549 細胞に感染させ、ラットの HGF mRNA の発現を Northern blotting 法で、培養液中への HGF 蛋白の分泌を ELISA 法

にて確認した (データ呈示せず)。In vivo でも、C57BL/6 マウスに 3 経路 (経気道的、経腹腔的、経血管的) より感染させ、実際に発現し肺内に分布することを Northern blotting 法と ELISA 法にて確認した (図 2, 4, 8)。

### 実効的投与経路の決定

Ad-HGF を経気道的、経腹腔的、経血管的に投与し、臨床応用する際の実効的な投与経路を探索した。Ad-HGF ( $4 \times 10^7$  pfu) を経気道的に投与した結果、気道上皮細胞 (図 3a)、肺胞マクロファージ、肺胞上皮細胞 (図 3b) で HGF を過剰発現させることに成功した。投与 3 日後には  $312.5 \pm 63.4$  ng/g tissue の HGF 蛋白が発現し、7 日後にピーク ( $350.9 \pm 10.4$ ) となり、その後漸減した。しかし、経気道的投与は、高容量の HGF を発現させたにもかかわらず、アデノウイルス (ベクター) が BALF 中の炎症細胞数を増加させて炎症を遷延させてしまい (図 5)、プレオ

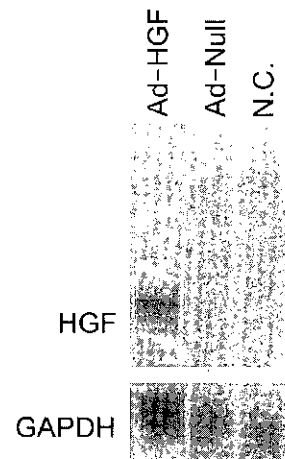


図 2 Expression of the rat HGF transcripts in the mice lung transfected with Ad-HGF.

Shown are autoradiograms of Northern blot analysis of HGF mRNA from the lung 3 days after intratracheal administration of Ad-HGF. Total RNA (20 $\mu$ g) from Ad-HGF-treated, Ad-Null-treated, and control mice at day 3 were electrophorized in 1% agarose, blotted, and hybridized with <sup>32</sup>P labeled rat HGF cDNA. The HGF mRNA from the transgene was indicated at 2.6 Kb.

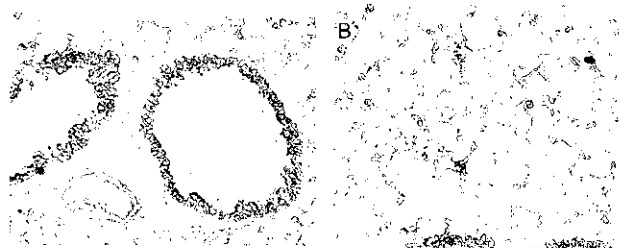


図 3 Localization of the rat HGF mRNA in the mice lung transfected with Ad-HGF.

*In situ* hybridization (ISH) with HGF antisense probe showed that the bronchial cells (A), alveolar epithelial cells (B) and alveolar macrophages (B) expressed rat HGF mRNA.

マイシン投与開始 28 日後のマウス肺標本所見にて、肺臓炎を軽快させるに至らなかった (図 6)。ハイドロキシプロリン量もコントロール群と有意差を認めなかった (図 7)。

経腹腔的投与では、経気道的投与の 15 倍量の  $6 \times 10^7$  pfu を投与し、肝臓で発現させ、血液を介して、肺に  $231.3 \text{ ng/g tissue (day3)}$  の HGF 蛋白を分布させた (図 8)。プレオマイシン投与開始 28 日後のマウス肺標本所見では、Ad-HGF 投与群において明らかな線維化像を認めず (図 9)、ハイドロキシプロリン量もコントロール群と比

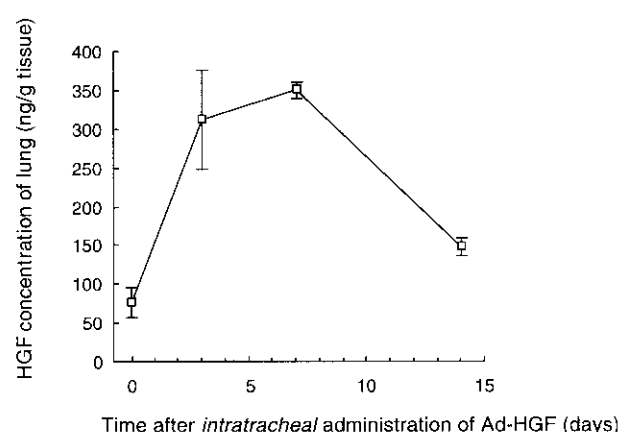


図 4 Quantitative analysis of HGF transgene expression in the lungs of mice after intratracheal administration of Ad-HGF.

The time course of the HGF mRNA expression was examined by ELISA 0, 3, 7, and 14 days after administration of Ad-HGF ( $4 \times 10^7$  pfu) (n=3 each). The expression levels reached maximum level between day 3 ( $312.6 \pm 63.4 \text{ ng/g tissue}$ ) and day 7 ( $351.0 \pm 10.4 \text{ ng/g tissue}$ ), and gradually decreased until day 14 ( $149.1 \pm 11.4 \text{ ng/g tissue}$ ).

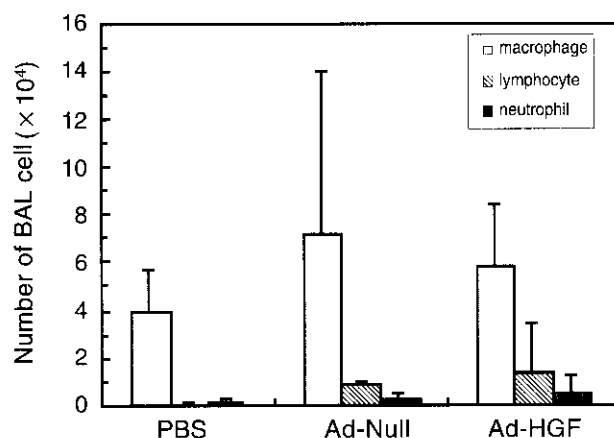


図 5 Distribution of BAL cell types in mice after intratracheal administration of adenoviral vectors.

Mice were administered intratracheally with Ad-Null, Ad-HGF, or PBS as control, and bronchoalveolar lavage (BAL) was performed to determine leukocyte cell number and composition. Increased pulmonary accumulation of leukocytes, especially lymphocytes and neutrophils, were detected at day 3 after administration of adenoviral vectors, Ad-HGF as well as Ad-Null.

較し、有意に減少させた ( $177 \pm 9 \% \text{ vs. } 128 \pm 5 \%, p < 0.005$ ) (図 10)。

経静脈的投与 ( $4 \times 10^7$  pfu) でも、Ad-HGF 投与群において明らかな線維化像を認めず (データ呈示せず)、ハイドロキシプロリン量もコントロール群と比較し、有意に減少させた ( $149.4 \pm 24.0 \% \text{ vs. } 127.6 \pm 14.9 \%, p < 0.05$ ) (図 11)。

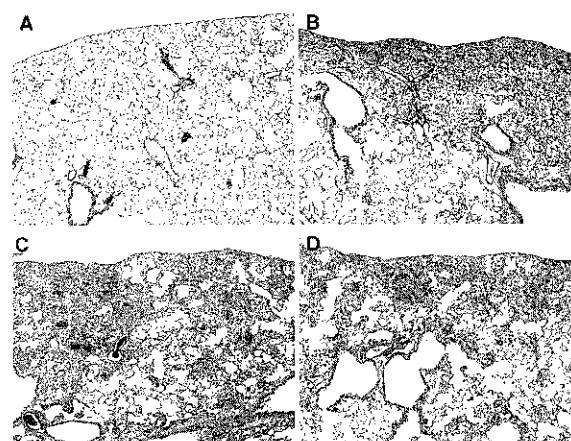


図 6 Histopathology of bleomycin-injured lungs and adenoviral vector-treated lungs.

Adenoviral vectors were administered intratracheally at day 0, and then BLM instillation intraperitoneally at day 1, 3, 5 and 7. Mice were sacrificed at day 28 for histopathological study, and the lung sections were evaluated by H & E staining (data not shown) and Elastica-Masson staining (A to D). Mice treated with Ad-HGF ( $4 \times 10^7$  pfu) (C) did not improve the fibrotic changes induced by BLM infusion, and showed the similar histopathological findings to BLM only (B) and BLM with Ad-Null treated mice (D) ( $\times 40$ ). A was negative control without BLM and adenoviral vector.

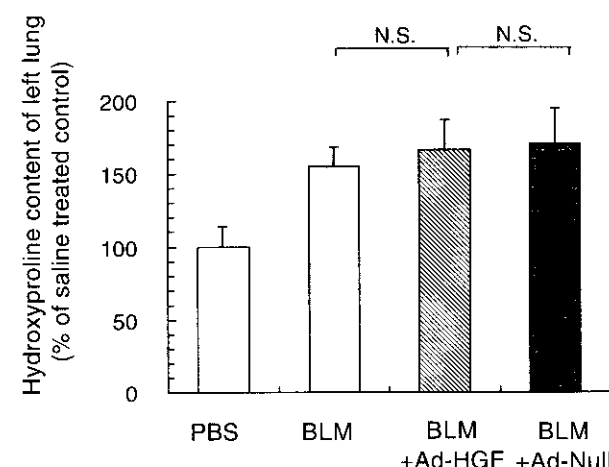


図 7 Analysis of lung collagen content quantitated by hydroxyproline assay.

Whole collagen content was evaluated by determining hydroxyproline content of left lung at day 28, and the values were shown as % of saline treated control. Intratracheal administration of Ad-HGF (■) did not affect lung hydroxyproline content in BLM-injured mice, and has significant difference from Ad-Null (■) (n=5 in each group).

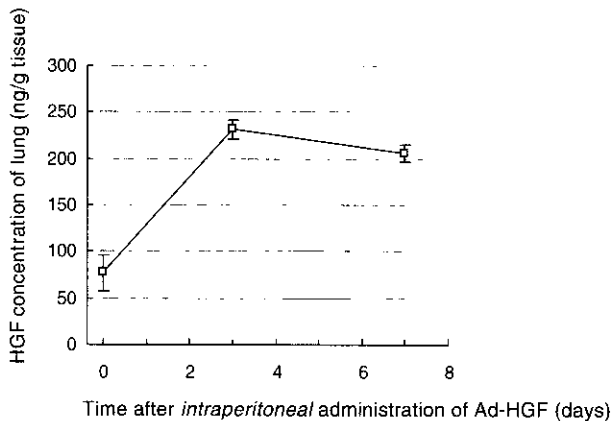


図8 Quantitative analysis of HGF transgene expression in the lungs of mice after intraperitoneal administration of Ad-HGF.

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.

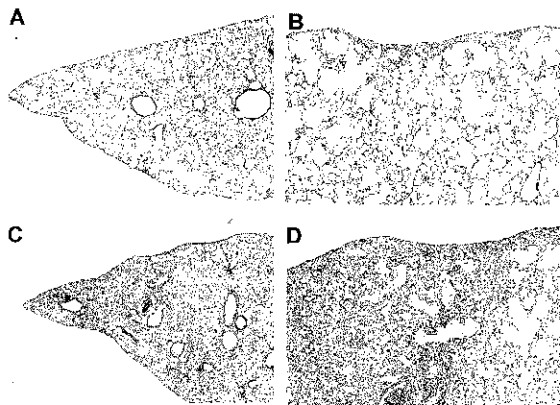


図9 Intraperitoneal injection of Ad-HGF ameliorated bleomycin-induced pneumonitis.

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.

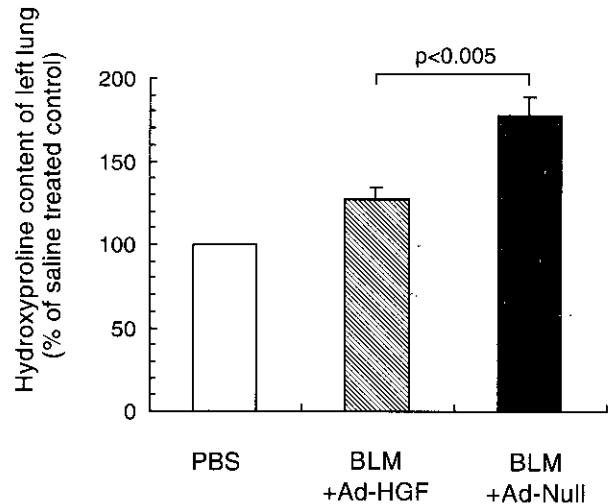


図10 Analysis of lung collagen content quantitated by hydroxyproline assay.

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).

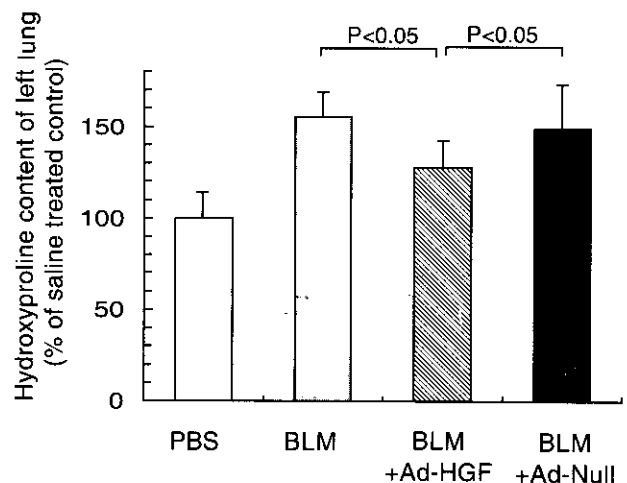


図11 Intravenous administration of Ad-HGF ameliorated bleomycin-induced pneumonitis.

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).

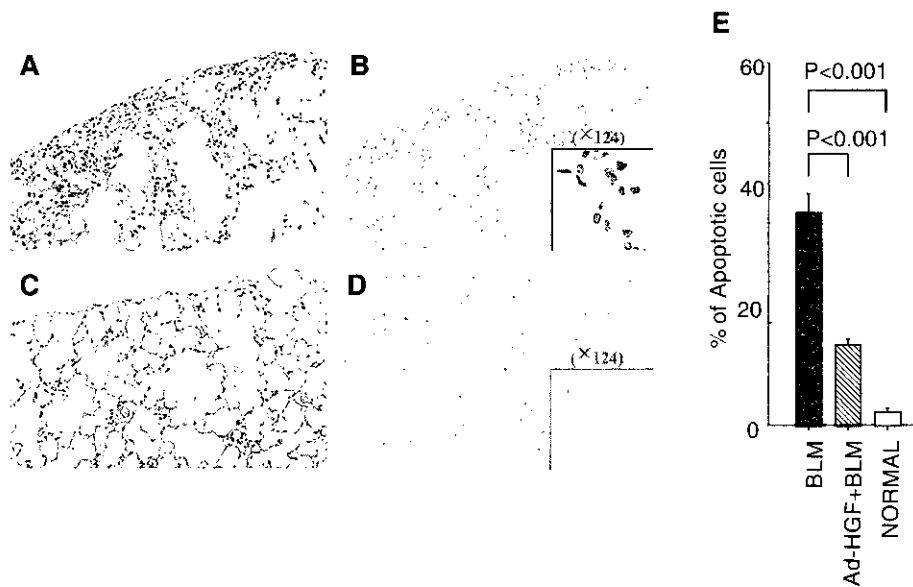


図 12 Ad-HGF rescued apoptotic alveolar epithelial cells from bleomycin-induced injury.

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.

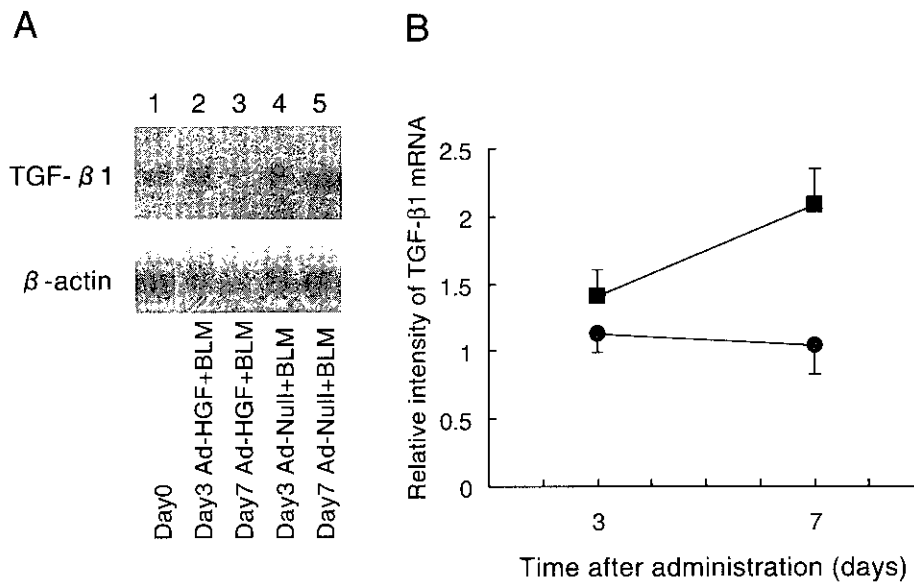


図 13 Ad-HGF decreased TGF- $\beta$  1 mRNA expression in the mice lung after bleomycin-induced injury.

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  $\mu$ 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 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)。

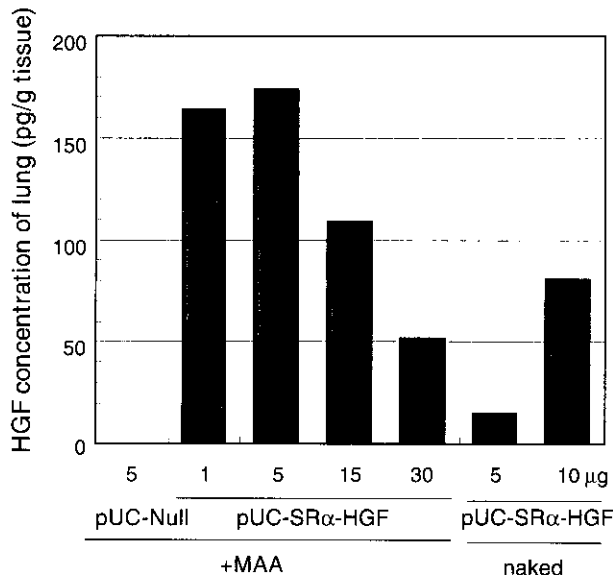


図 14 Expression of HGF after Intravenous injection of plasmid vectors with or without macroaggregated albumin (MAA). Intravenous administration of pUC-SR  $\alpha$ -HGF (5  $\mu$ g) conjugated with MAA induced the expression of HGF (174 pg/g tissue) in the lung eleven times as much as naked pUC-SR $\alpha$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

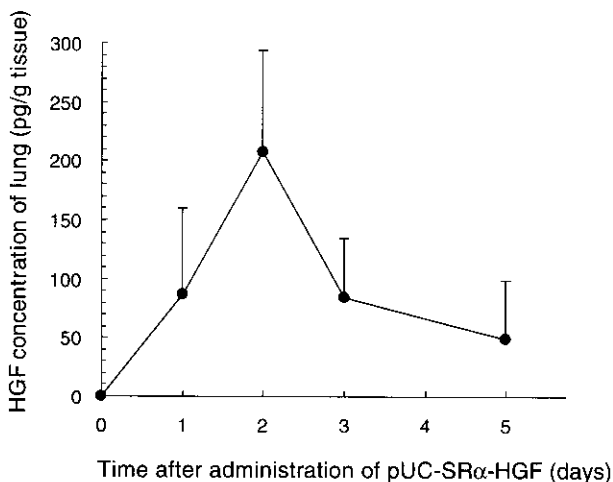


図 15 Time Course of HGF Expression after Intravenous Administration of pUC-SR  $\alpha$ -HGF Conjugated MAA. The expression level reached a peak (148.1  $\pm$  63.1 pg/g tissue) 2 days after injection, and slightly decreased thereafter.

## 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の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 1 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 Resear 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 Gaudie: 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.



# 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、ブ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  $\mu$ g/ $\mu$ 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  $\mu$ g (33  $\mu$ 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 100V125  $\mu$ 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。

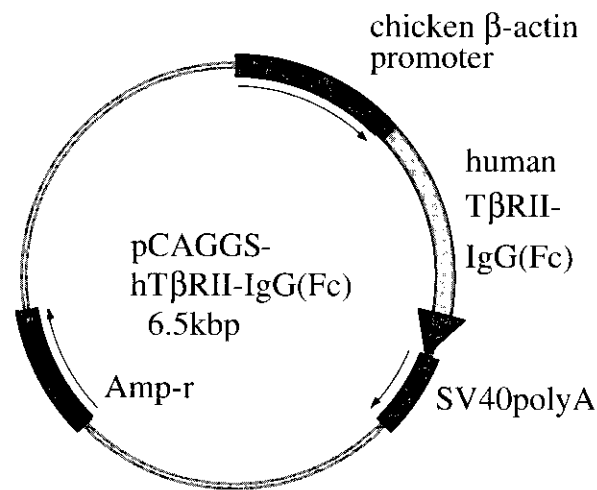


Fig.1

### (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 mg/kg 体重を生理食塩水 (3ml/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  $\mu$ g 投与した。対照群として、pCA-lacZ を各 100  $\mu$ 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-Tek に包埋して -20℃ に保存した。5  $\mu$ 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% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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℃ 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 Western 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)。

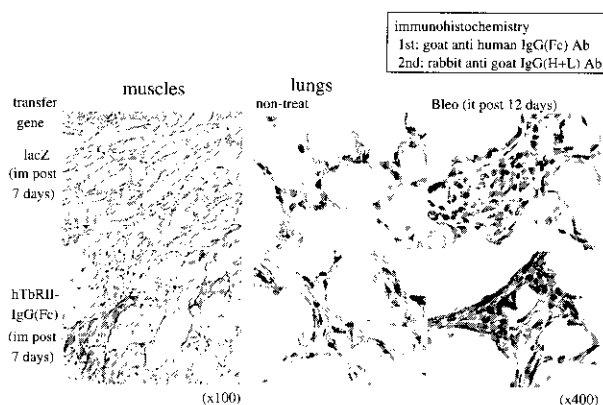


Fig.2

## Western Blotting

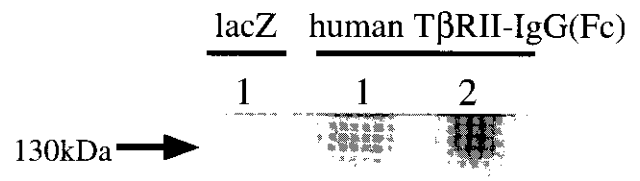


Fig.3

### (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。

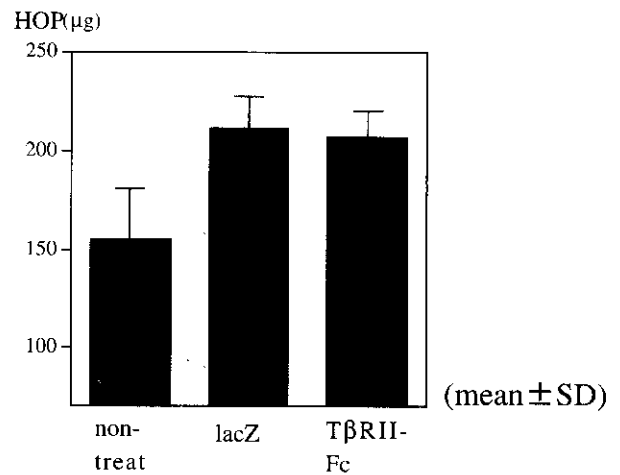


Fig.4

## 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, Branellec 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, Koteliansky 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.

# 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 intrapneumotally 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 IFN- $\beta$ ) 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>1-4)</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>5,6)</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>7)</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>8)</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>9)</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- $\beta$  ( $10^5$ 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

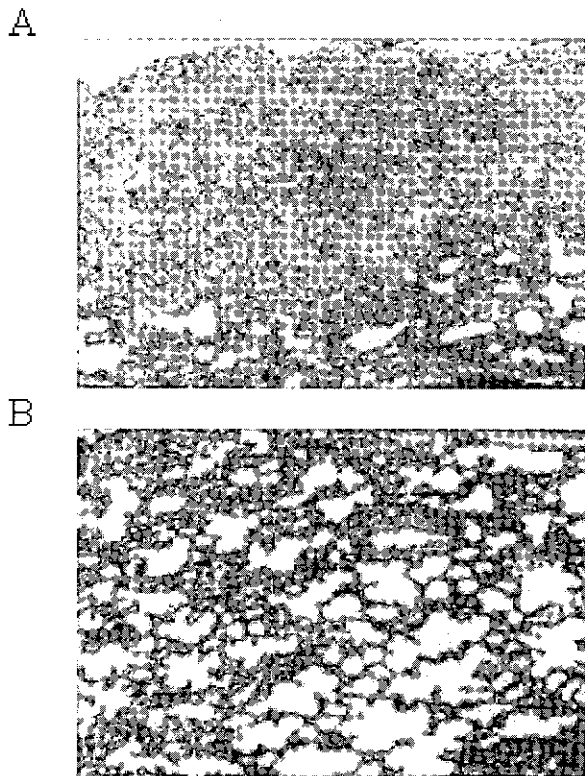


Figure 1 Histological findings of mouse lung tissue 28days after BLM-injection (Azan stain). A) BLM alone B) BLM+MuIFN- $\beta$  ( $10^4$ U/head)

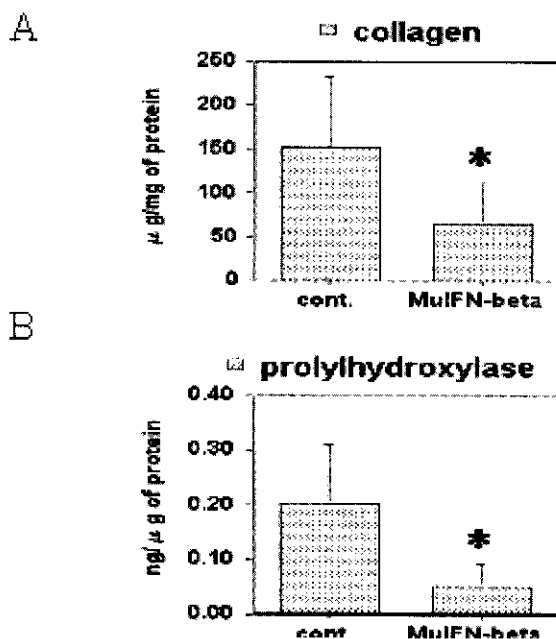


Figure 2 Comparison of lung collagen contents and prolylhydroxylase contents 28days after BLM-injection. A) soluble collagen contents. Accumulation of lung collagen was measured as salt- and acid-soluble collagens. (\* $p < 0.05$  vs. cont.). B) Prolylhydroxylase contents. (\* $p < 0.05$  vs. cont.).

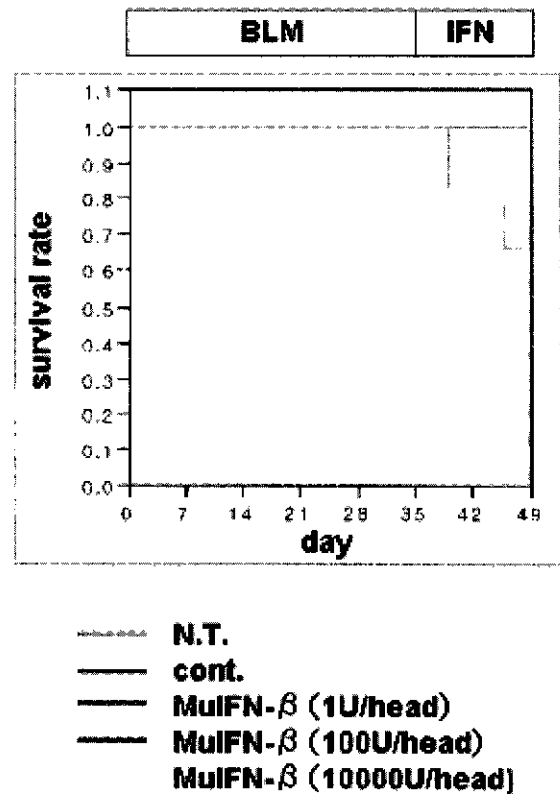


Figure 3 Comparison of survival rate between cont. group and MuIFN- $\beta$  groups.

4) 生存率評価モデルにおける病理組織学的結果：MuIFN- $\beta$  非投与群と同様に、MuIFN- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  ( $10^4$ 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- $\beta$  非投与群に比し、MuIFN- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  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- $\beta$  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>1-4)</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- $\beta$  の抗線維化作用について検討した報告は少ない。

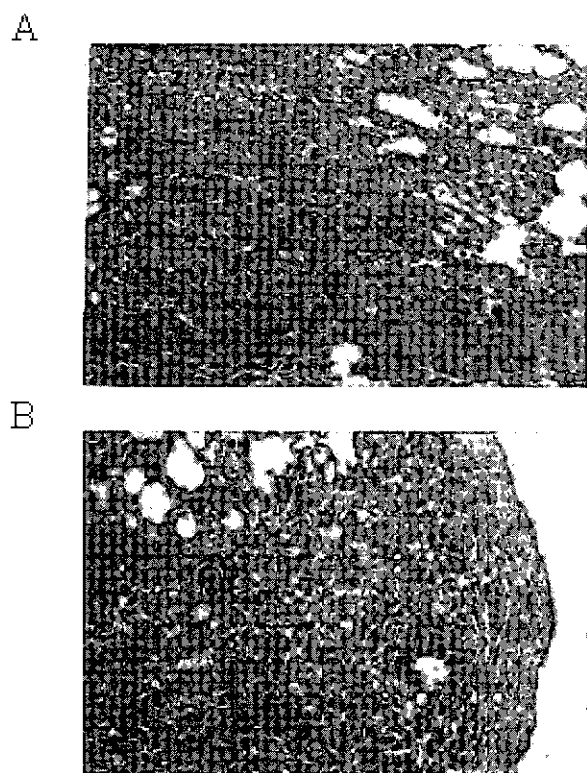


Figure 4 Histological findings of mouse lung tissue 14 days after administration of MuIFN- $\beta$  (Azan stain). A) BLM alone B) BLM+MuIFN- $\beta$  ( $10^4$ U/head)

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 Ingnot 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.

### **3. 治療に寄与する病態研究**

# 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リ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  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$  により、MMP-2 が  $\text{TGF-}\beta$  により誘導された。II 型上皮細胞株では MMP-2 が  $\text{TGF-}\beta$  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  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 $\text{TGF-}\beta$  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  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 $\text{TGF-}\beta$  によって誘導された MMP-2 あるいは MMP-9 が  $\text{IFN}\gamma$  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  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ , 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,  $\text{TGF-}\beta$  upregulated MMP-2 production in THP-1 and A549 cells and MMP-9 production in BET-1A cells.  $\text{IFN}\gamma$  or Dx suppressed  $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-1}\beta$ , and  $\text{TGF-}\beta$ -induced MMPs production in these cells. Furthermore, BET-1A cells cultured on type I collagen or fibronectin displayed greater constitutive,  $\text{TNF-}\alpha$ -,  $\text{IL-1}\beta$ -, or  $\text{TGF-}\beta$ -stimulated MMPs production than BET-1A cells cultured on type IV collagen. Our results suggest that cell type, proinflammatory cytokines, growth factor  $\text{TGF-}\beta$ , 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<sup>1,2)</sup>。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<sup>3,4)</sup>。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<sup>5,6)</sup>。

我々は以前 IPF 及び nonspecific interstitial pneumonia (NSIP), bronchiolitis obliterans organizing 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<sup>7)</sup>。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、異なった 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<sup>8)</sup>。特に TGF- $\beta$  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<sup>9,10)</sup>。

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- $\beta$ , 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- $\beta$ , 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- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  によって誘導された MMP-2 及び MMP-9 の発現の IFN $\gamma$  や Dexamethasone (Dx) による変化を同様にザイモグラムを用いて評価した。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て検討した。

## 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- $\beta$ , 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- $\alpha$  及び LPS, IL-1 $\beta$  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- $\alpha$  10-1000 U/ml あるいは LPS 1-10  $\mu$ g/ml, IL-1 $\beta$  10-100 ng/ml の投与で proMMP-9 の発現は約 5 倍増加した (Fig.1B)。TGF- $\beta$  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- $\beta$  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- $\alpha$  及び LPS, IL-1 $\beta$  の刺激にほとんど影響を受けなかった (Fig.2A-C)。しかし、TGF- $\beta$  は proMMP-2 の発現を濃度依存的に増加させた (Fig.2A)。TGF- $\beta$  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- $\alpha$  及び LPS, IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  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- $\alpha$  10-1000 U/ml あるいは IL-1 $\beta$  1-100 ng/ml, TGF- $\beta$  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- $\alpha$  及び LPS, IL-1 $\beta$  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- $\beta$  は proMMP-9 の発現を僅かながら増加させた。

TNF- $\alpha$  あるいは IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  に誘導された MMP-9 及び MMP-2 の発現の IFN $\gamma$  あるいは Dx による変化を評価した。THP-1 では IFN $\gamma$  あるいは Dx が TNF- $\alpha$  あるいは IL-1 $\beta$  によって誘導された proMMP-9 の発現を、また TNF- $\alpha$  あるいは IL-1 $\beta$ , TGF- $\beta$  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 $\gamma$  あ