

肺線維症発症要因におけるインスリン様受容体シグナル

池上 隆司 清水 孝彦 玉置 正勝 白澤 卓二

肺線維症は加齢依存的に発症することが知られているが、病態生理の詳細は未だ明らかでない。加齢依存によることに着目し、線虫で長寿や酸化ストレス耐性を示すインスリン様受容体変異をマウスに導入した加齢遅延モデルマウスを作製・解析した。その結果、肺における酸化ストレスの生体反応として活性酸素の処理酵素である MnSOD の発現が上昇していた。MnSOD の欠損マウスはホモ接合体では生後早期で死亡するという報告があり、慢性疾患と活性酸素の関連を解析することは困難であった。この問題を解決する方法として、臓器特異的に MnSOD の欠損マウスの作製を試みた。このモデル系を用いて肺特異的に MnSOD を欠損させることにより、肺線維症過程における活性酸素の発症要因としての意義を解析できると期待される。

Insulin receptor signaltransduction and lung injury

Takashi Ikegami, Takahiko Simizu, Masakatsu Tamaki, Takuji Shirasawa

Molecular Genetics, Tokyo Metropolitan institute of Gerontology

We generated a mouse for MnSOD conditional knockout because longevity mutant *C.elegans*, *daf-2* expressed MnSOD higher than wild-type. Using this mouse model we bred CAG-cre transgenic mouse and confirmed the deletion of MnSOD expression. Our data suggest the possible preventative measure by antioxidant treatment for the development of lung fibrosis.

はじめに

1997年に木村らにより線虫の長寿命変異体である *daf-2* の遺伝学的解析および分子生物学的解析の結果この線虫のインスリン様受容体遺伝子で長寿命遺伝子変異が発見された²⁾。この解析から、*daf-2* 線虫ではインスリン様シグナル伝達に異常があること、および、インスリン様シグナル伝達異常が個体寿命を延長させる可能性が示唆された。この機構により抗酸化酵素である MnSOD の発現が増大し、酸化ストレス耐性を獲得されるからと考えられる²⁾。

肺線維症の発症原因として加齢的要因が多く占めているが、プレオマイシンによる肺線維症は薬剤から誘導された活性酸素が誘因になると言われている。この活性酸素による酸化ストレスに対して生体では様々な防御機構が働くが、MnSOD は中心的な抗酸化酵素である。この酵素が肺で欠損したモデルにより肺線維症の発症メカニズムが解析可能になると考えられる。

MnSOD 欠損マウスは 1995 年に Li らにより拡張型心筋症を伴い生後早期に死亡してしまうことが報告されている³⁾。MnSOD 欠損マウスを用いて肺線維症等慢性的な酸化ストレスを長期に渡って解析することは困難である。そこで、我々は *cre-loxp* system を用いて、臓器特異的な MnSOD 欠損マウスを作製し、長期の解析を可能にした。このことにより、肺特異的に抗酸化酵素を欠損させたマウスは肺線維症モデルマウスとなる可能性が示唆される。

対象と方法

MnSOD コンディショナルノックアウトマウスの作製

エクソン 3 は 39 アミノ酸をエンコードしており MnSOD は 4 量体を形成するが、その結合ドメインが含まれているためこの部分を欠失するように戦略を立てた。生体内でエクソン 1 から 5 までを含む genome DNA から PCR 法によりエクソン 3 を取り出し、ネオマイシン耐性遺伝子にの 3', 5' 側に lox 配列が付加されたカセットに挿入することによ

りネオマイシン選別が可能となるようにした。さらにその 3' 側に lox 配列を付加した。この上、下流にショートアーム、ロングアームを組み込み相同組換えが起こり易くした(図 1)。このターゲットベクターを線状化し、エレクトロポレーション法によって ES 細胞に導入した。ネオマイシン耐性 ES クローンを G418 および GANC (ガンシクロビル) によって選択し、サザンブロット法、PCR 法によって相同組換え体を同定した。相同組換えの起こった ES クローンを用い、生殖系列のキメラマウスを作製した。マウスを野生型の C57BL/6 の雌マウスと交配させ、PCR 法によってヘテロ接合体マウス (F1: 雑種一代) の産出を確認した。

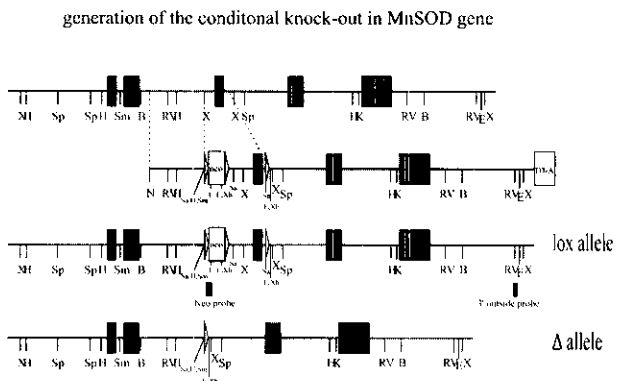


図 1 MnSOD コンディショナルノックアウトマウス作製のための標的ベクターの構築

PCR 法

イントロン 2 上にセンスプライマー、エクソン 3 上とネオマイシン耐性遺伝子上にアンチセンスプライマーを設定し増幅を行った。野生型は 500 bp、変異遺伝子は 300 bp の PCR 増幅産物が得られた。

サザンハイブリダイゼーション

3' 側のアウトサイドプローブとネオマイシン耐性遺伝子上プローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを施行した。各々のバンドが検出され、相同組換えが期待通りになっていることを確認した(図 2)。

CAG-cre トランスジェニックマウスとの交配

前述の lox 配列はバクテリオファージ P1 のリコンビナーゼ (Cre) によって認識され、lox 配列ではさまれた部分は環状に切り取られるように除去さ

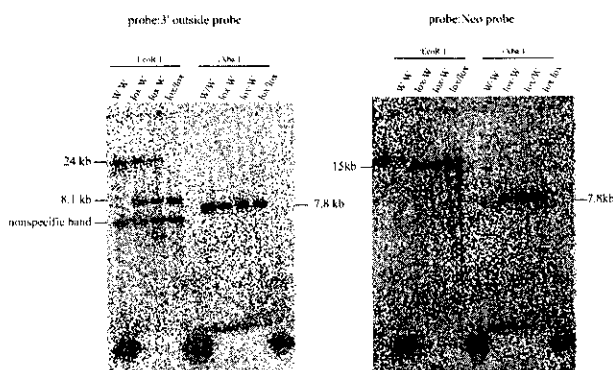


図2 サザンハイブリダイゼーション
2つのプローブを用いて、各々の遺伝子型を確認した。

れる⁴⁾。従って、図1のようにエクソンを lox 配列によってはさみこむことにより、Cre 存在下で knockout mouse を作製できる。Cre を導入する方法のひとつとして、Cre-トランスジェニックマウスが挙げられる。臓器特異的(組織特異的)プロモターによって制御されたトランスジェニックマウスと交配させることにより、その子は臓器特異的(組織特異的) MnSOD ノックアウトマウス⁵⁾となることが予想された。胎生早期から全身性に発現する cytomegalovirus immediate early enhancer chicken β-actin hybrid (CAG) promoter によって制御された Cre-トランスジェニックマウスと交配した。産出子は期待に反して0匹であった為(図3)、胎生期致死が考えられた。E14.5 と思われるマウスの肝臓の遺伝子型を確認し、と抗 MnSOD 抗体を用いてウェスタンブロットングを施行した(図4)。

	del/W CAG/+		lox/lox +/+	
	del/W CAG/+	del/del CAG/+	del/lox +/+	lox/W +/+
offsprings	9	0	9	12
Mendelian ratio	1	1	1	1
E 14.5	1	4	2	1

図3 産出子と遺伝子型の割合
生後約4週のマウスの尾を用いて遺伝子型を確認したところ MnSOD 欠損マウス homozygous 体は期待と異なり0匹であった。

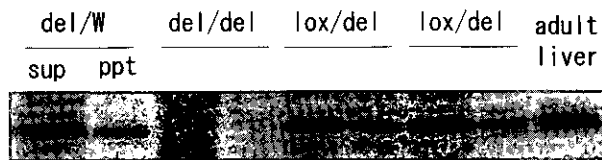


図4 ウェスタンブロットング
胎生 14.5 日において肝臓をサンプルに抗 MnSOD 抗体を用いてウェスタンブロットングを施行した。MnSOD 欠損マウス homozygous 体の期待通りにバンドの検出がなかった。

結 果

臓器特異的な MnSOD 欠損マウスを作製し、遺伝子型の確認を行った。さらに全身性に MnSOD が欠損すると胎生期致死になることを確認した。

考案、結論

肺線維症には原因不明(特発性)に発症するタイプと、放射線や薬剤性、膠原病などの基礎疾患からの続発性が存在する。発症原因に関して未だ不明な部分もあり特定できていない。活性酸素種、好中球プロテアーゼ、ウイルス、線維化促進因子の関与が示唆されるも、炎症の真の原因は解明できていない。我々は加齢依存性という点から、この疾患の発症要因に酸化ストレスの関与が非常に大きいと考えた。この酸化ストレスを除去する MnSOD の役割を解析することが、肺線維症の発症要因の解析につながると考える。

実験の進行状況は現時点では遺伝子型の確認のみであるが、今後肺特異的な MnSOD 欠損マウスを作製し、肺線維症の発症要因を含め線維化のさらなるメカニズムを解析する予定である。

参考文献

- 1) Kimura, K.D., Tissenbaum H.A., Liu Y., and Ruvkun G.: *daf-2* an insulin receptor-like gene that regulation longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 227, 5328, 942-6. 1997
- 2) Honda, Y. and Honda S. :The *daf-2* gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mnsuperoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *Faseb J*, 13, 11, 1385-1393. 1999

- 3) Li Y., Huang T.T., Carlson E.J., Melov S., Ursell P.C., Olson J.L., Noble L.J., Yoshimura M.P., Berger C., Chan P.H., Wallace D.C., Epstein C.J.: Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet*, 11, 376-81. 1995
- 4) Sternberg N., Hamilton D., Hoess R.: Bacteriophage P1 site-specific recombination. II. Recombination between loxP and the bacterial chromosome. *J Mol Biol* 25, 150, 487-507. 1981
- 5) Sakai K., Miyazaki Ji.: A transgenic mouse line that retains Cre recombinase activity in mature oocytes irrespective of the cre transgene transmission. *Biochem Biophys Res Commun*, 18, 237, 318-24. 1997

特発性肺線維症における TT ウイルス (TTV) の関与に関する研究

坂東 政司 大野 彰二 徳永 隆成 杉山幸比古*

原因不明の輸血後肝炎患者から分離・同定された TT ウイルス (TTV) は、非 A-G 型肝炎以外にもリウマチ因子陰性の慢性間接リウマチや後天性免疫不全症候群における病態や予後への関与が示唆されている。これまでの 2 年間の検討において、TTV 感染は特発性肺線維症 (IPF) の活動性や予後に関与している可能性を報告した。今回、IPF と肺癌との合併における TTV の関与について、当科で経験した IPF 合併肺癌 10 例および IPF 非合併肺癌 140 例の血清を用い、PCR 法により TTV DNA を測定した。IPF 合併肺癌 10 例中 5 例 (50%)、非合併肺癌 140 例中 51 例 (36.4%) で TTV DNA は陽性であった。また、健常者と比較し、これらの症例では陽性例の中で 10^2 copies/mL 以上の高タイターを示す患者の比率が有意に高かった。以上より、TTV 感染は IPF の活動性や予後に関与するとともに、肺癌合併の病態にも影響を与えている可能性が示唆された。

UNENVELOPED DNA VIRUS (TTV) ASSOCIATED WITH NON-A TO G HEPATITIS IN PATIENTS WITH IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS

Masashi Bando, Shoji Ohno, Takanari Tokunaga, Yukihiko Sugiyama

Division of Pulmonary Medicine, Department of Medicine, Jichi Medical School, Tochigi, Japan

It has been suggested that TT virus (TTV) which is isolated and identified among patients with post-transfusion hepatitis of unknown etiology, is associated with the pathogenesis and prognosis of patients with rheumatoid factor-negative rheumatoid arthritis or acquired immunodeficiency syndrome. On the basis of our study conducted over the past two years, we reported that infection with TTV is associated with the activity and prognosis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). To study whether TTV is associated with IPF complicated with primary lung cancer, we determined the presence of TTV DNA by the polymerase chain reaction (PCR) method in the sera of 10 patients who had both lung cancer and IPF and 140 patients who had lung cancer alone. TTV DNA was detected in 5 (50%) of the 10 patients who had both IPF and lung cancer, while it was detected in 51 (36.4%) of the 140 patients with lung cancer without accompanying IPF. The percentage of TTV-positive patients whose TTV titer was high in the two patient groups were each significantly higher than that in healthy subjects. These results suggest that TTV infection affects not only the activity and prognosis of IPF, but also the disease state of patients with IPF complicated with primary lung cancer.

はじめに

特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis ; IPF) は肺構築の改変と線維化をきたし蜂巣肺にいたる原因不明のびまん性間質性肺炎・肺線維症である¹⁾。近年、線維化肺と肺癌との合併が注目されており、IPFと肺癌との合併頻度は5.4 - 65.2%と報告され、対象とした症例の違いによりかなりの差がみられるが、観察中のIPF患者に年間数%程度に肺癌を見いだす可能性があると考えられている^{2,3)}。IPF合併肺癌の臨床像はいくつかの点で一般の肺癌とは異なっており、線維化に至る慢性進行性の炎症反応が遺伝子の変異やサイトカイン、ケモカイン、増殖因子の産生などを介し、発癌過程に深く関与している可能性が指摘されている。また、両疾患の合併はその治療法の選択や予後に大きな影響を与える。

これまでの2年間の検討において、TTV感染はIPFの活動性や予後に関与している可能性を報告した。そこで今回、IPF合併肺癌症例におけるTTV DNAの陽性率を測定し、その病態への関与について検討した。

対象と方法

1994年から2000年に当科に入院し、血清を保存していたIPF合併肺癌10例(男性9例、女性1例、平均年齢65.6歳)、IPF非合併肺癌140例(男性104例、女性36例、平均年齢67.3歳)およびこれらと年齢をマッチさせた健常者148名を対象とした。IPF合併肺癌症例の組織型は腺癌、扁平上皮癌、大細胞癌が各々3例で、小細胞癌が1例であった。IPF非合併肺癌の組織型は腺癌62例、扁平上皮癌35例、小細胞癌18例、大細胞癌6例であった。TTV DNAの測定はN22プライマーを用いたPCR法により行った。本研究は当大学倫理委員会の承認および患者の同意のもとに行われた。

結 果

(1) IPF 合併肺癌および非合併肺癌患者における血清 TTV DNA 陽性率 (表 1)

IPF 合併肺癌 10 例のうち、TTV DNA が陽性であったのは 5 例 (50%) であった。また、IPF 非合併肺癌 140 例中 51 例 (36%)、健常者 148 例中 69 例 (47%) で TTV DNA は陽性であった。肺癌非合併 IPF 症例の陽性率は昨年までの検討により 37% であった。その中で 10^2 copies / mL 以上の高タイターを示したのは IPF 合併肺癌で 4 例 (80%)、非合併肺癌で 35 例 (67%) であり、その比率は健常者 (42%) と比較し有意に高かった。

表 1

IPF合併および非合併肺癌症例における TTV DNA陽性率

	健常者 (n=148)	IPF合併肺癌 (n=10)	IPF非合併肺癌 (n=140)
TTV陽性例 (%)	69 (47%)	5 (50%)	51 (36%)
Titer 10^2 copies/ml \leq (陽性例における 高タイター群の比率(%))	29 (42%)	4 (80%)*	35 (67%)*

(2) TTV DNA 陽性および陰性の IPF 合併肺癌症例の臨床的特徴 (表 2)

TTV DNA が陽性を示した IPF 合併肺癌 5 例の組織型は扁平上皮癌が最も多く 3 例で、小細胞癌、大細胞癌が各々 1 例であり、腺癌症例は認めなかった。一方、TTV DNA 陰性の 5 例では腺癌が 3 例、大細胞癌が 2 例で、扁平上皮癌と小細胞癌は認めなかった。臨床病期では両群間で特記すべき特徴は認めなかった。IPF の診断から肺癌発見までの期間は TTV 陽性例は全例 IPF 診断後 4 年以内に肺癌が発生していたが、陰性例では 5 例中 3 例で IPF 診断後 6 年以上経過して肺癌が発見されていた。

考察・結論

IPF は診断のみならず治療面においても多くの未解決の問題を残している疾患群である⁴⁾。近年、IPF と肺癌との合併頻度が高いことが注目され、線維化に至る慢性進行性の炎症反応が遺伝子の変異や炎症性サイトカイン、ケモカイン、増殖因子な

表 2

	TTV(+)	TTV(-)
	5	5
Adeno	0	3
Small	1	0
Squamous	3	0
Large	1	2
Stage I	1	2
II	1	0
III	1	2
IV	2	1
IPF診断から肺癌発見までの期間(年)		
同時	2	1
0~2	2	0
2~6	1	1
6以上	0	3

どを介し、発癌のイニシエーションからプログレッションの過程に深くかかわっている可能性が指摘されている。これまでに慢性炎症線維化病巣における発癌として、慢性肝炎-肝硬変-肝癌がよく知られており、イニシエーションとしての肝炎ウイルスに対して、慢性肝炎病態がプロモーション作用していることが明らかとなっている。また、ヒトの発癌の約15%にウイルスが関与していると考えられており、原因ウイルスとしてEBウイルスやC型肝炎ウイルスが知られており、これらのウイルスは間質性肺炎を惹起させる可能性のあるウイルスとしても知られている^{5,6)}。IPFにおける発癌についてはこれまでに重喫煙の関与を示唆する報告⁷⁾がみられるが、その詳細は依然不明であり、未知のウイルスの関与も否定できない。

昨年の本研究において、輸血後肝炎ウイルスであるTTVが気管支・肺動脈領域の組織中においても存在することを初めて証明し、IPFの活動性や予後に関与している可能性を報告した。そこで今回、IPF合併肺癌の病態におけるTTVの関与について、当科で経験したIPF合併肺癌症例の血清を用い、PCR法によりTTV DNAを測定した。IPF合併肺癌10例中5例(50%)、非合併肺癌140例中51例(36.4%)でTTV DNAは陽性であった。また、この両群とも健常者と比べ、 10^2 copies/mL以上の高タイターを示す患者の比率が有意に高かった。今回の検討は対象症例数が少なく、今後症例数を増やし、さらなる検討が必要であるが、これらの結果はTTV感染がIPFの活動性や予後に関与するとともに、肺癌合併の病態にも影響を与えている可能性も考えられる。

過去2年間、輸血後肝炎ウイルスと考えられてい

るTTVの肝外症状としての間質性肺炎・肺線維症の病態への関与の可能性について報告してきた⁸⁾。これまでにC型肝炎ウイルスにおいてはその肝外症状としてクリオグロブリン血症、血管炎、リンパ球系細胞に対する異常、肝細胞以外の細胞への感染、口腔内病変などが報告され⁹⁾、その発症機序としてC型肝炎ウイルスと免疫グロブリンによる免疫複合体、自己免疫現象などの関与が示唆されている。TTVの肝外症状の病態解明においても、今後は分子生物学的にTTVの局在を証明し、その発症機序について免疫複合体の関与や自己免疫現象などの面から解明していく必要があるものと考えられる。

参考文献

- 1) The ATS board of directors and the ERS executive committee. Idiopathic pulmonary fibrosis: Diagnosis and treatment. International consensus statement. *Am J Respir Crit Care Med.* 161: 646-664, 2000.
- 2) 竹内栄治, 山口俊彦, 森 雅秀: 肺癌を合併した特発性間質性肺炎症例の臨床的検討. *日胸疾会誌* 34: 653-658, 1996.
- 3) 清水英男: 特発性間質性肺炎に合併した肺癌の病理学的研究. *日胸疾会誌* 23: 873-880, 1985.
- 4) 小倉 剛, 近藤有好, 佐藤篤彦: 特発性間質性肺炎における肺癌の合併とその臨床的特徴. *日胸疾会誌* 35: 294-298, 1997.
- 5) Ueda T, Ohta K, Suzuki N: Idiopathic pulmonary fibrosis and high prevalence of serum antibodies to hepatitis C virus. *Am Rev Respir Dis* 146: 266-268, 1992.
- 6) 山田和人: 特発性間質性肺炎とEpstein-Barr virusの関連性についての検討. *炎症* 20: 51-55, 2000.
- 7) 貫和敏博: 特発性間質性肺炎の病態および肺癌の合併. *日内会誌* 83: 739-744, 1994.
- 8) Bando M, Ohno S, Oshikawa K, Takahashi M, Okamoto H, Sugiyama Y: Infection of TT virus in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Med.* 95: 935-942, 2001.
- 9) 斎藤 英: C型肝炎の肺外症状. *日医雑誌* 125: 1593-1598, 2001.

5. 病態に関する基礎研究

肺傷害，線維化の病態解析：

スーパー抗原誘導性間質性肺炎を用いたフリーラジカルの検討

宮川比佐子 佐藤 圭創 新堀 俊文 岡本 竜哉
具嶋 泰弘 菅 守隆*

近年，肺傷害や線維化の病因の一つに活性酸素種や反応性窒素酸化物の関与が報告されている。また以前より，一酸化窒素(nitric oxide: NO)が自己免疫疾患の組織傷害におけるメディエーターとして機能する可能性が示唆されている。Shinboriらは自己免疫疾患モデルマウス(MRL-lpr/lprマウス, MRL-+/+マウス, NZB/W F1マウス)と細菌性スーパー抗原(staphylococcal enterotoxin B: SEB)を用いて，自己免疫疾患における肺病変の発症にスーパー抗原が関与することを明らかにした。本研究では自己免疫疾患における間質性肺炎に認められる肺胞上皮細胞障害が下気道に存在する酸化ストレスやニトロ化ストレスの増強による可能性があると仮定し，SEBをMRL-+/+マウスに経気道的に投与し，NO及びスーパーオキシド(superoxide anion: O_2^-)の産生を直接的，間接的に検討した。またこれらの阻害剤を投与することによる炎症性サイトカインの変化やBALF細胞数，肺病変の変化を検討した。NOの代謝産物であるnitrite/nitrateはSEB投与3日後のBALF及び血清中で増加していた。この増加したNOの産生量はinducible NO synthase (iNOS)阻害剤を投与することにより減少した。肺，BALF，血漿中のxanthine oxidase (XO)活性もSEB投与3日後にピークを認め，XO阻害剤で抑制された。更にiNOSやXO阻害剤の投与にてBALF中のサイトカイン産生量，総細胞数の減少を認め，そして肺病変が改善された。以上の結果より，本自己免疫疾患モデルにおける間質性肺炎の発生にはNO及び O_2^- の過剰産生が重要な役割を果たしており，更にiNOS及びXO阻害剤がこのモデルにおいて防御的効果を持つことが示唆された。これらの結果は間質性肺炎における胞隔炎と線維化に対する今後の治療戦略を考える上で重要な知見と考えられた。

Mechanism of lung injury and fibrosis:

Role of free radicals on SEB-induced interstitial pneumonia in autoimmune-prone mice

Hisako Miyakawa, Keizo Sato, Toshifumi Shinbori, Tatsuya Okamoto
Yasuhiro Gushima, and Moritaka Suga.

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

There has been an explosion of papers in the last several years arguing that both reactive oxygen species and reactive nitrogen species are involved in the pathogenesis of lung injury and fibrosis. Extensive circumstantial evidence suggests that nitric oxide (NO) can function as a mediator of tissue damage in autoimmune diseases. To examine whether superantigens participate in the development of interstitial pneumonia (IP) in autoimmune diseases, Shinbori *et al.* instilled the bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin B (SEB) into the tracheas of autoimmune strains, MRL-lpr/lpr, MRL-+/+, and NZB/W F1 mice and non-autoimmune strain mice. These data suggest that bacterial superantigens may be involved in the development of IP associated with autoimmune diseases. We hypothesize that the alveolar epithelial cell injury that characterizes IP associated with autoimmune diseases may result, at least in part, from enhanced oxidative and nitrosative stress that may exist in the lower respiratory tract. Thus, we investigated involvement of NO and superoxide anion (O_2^-) in the pathogenesis of IP in this autoimmune-prone mice. Nitrite/nitrate levels were increased in BALF and serum from SEB-injected mice, and peaked at 3 days after SEB instillation. NO production was significantly decreased by inducible NO synthase (iNOS) inhibitor treatment. Xanthine oxidase (XO) activity in the lung, BALF, and plasma was increased with instillation of SEB, and peaked at 3 days. Moreover, both iNOS and XO inhibitors decreased production of proinflammatory cytokines, the numbers of total cell in BALF, and the area of the pathological changes in the SEB-injected lung. These data suggested that overproduction of NO and O_2^- was implicated in the pathogenesis of IP, and iNOS and XO inhibitors have protective effects against IP in this model.

はじめに

近年、肺傷害や線維化の病因の一つに活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) や反応性窒素酸化物 (reactive nitrogen species: RNS) の関与が報告されている。また以前より、一酸化窒素 (nitric oxide: NO) が自己免疫疾患の組織傷害におけるメディエーターとして機能する可能性が示唆されている。NO は生体内で NO synthase (NOS) によりアルギニンのグアニジノ基が酸化されて生成する¹⁾。NOS には神経型 (neuronal NOS)、誘導型 (inducible NOS: iNOS)、内皮型 (endothelial NOS) の3種類がある。非刺激下では iNOS はマクロファージ、線維芽細胞、Th1 細胞や好中球といった細胞には発現していないが、ある種のサイトカインにより細胞が刺激を受けると iNOS の発現は著しく上昇する^{1,2)}。NO は血管拡張因子、神経伝達物質としての作用のみならず、細胞傷害性やアポトーシスといった病理的作用が示唆されている^{3,4)}。

膠原病において高頻度に病変を来す臓器の一つとして肺・胸郭が挙げられ、その病変は多様で、間質性肺炎、肺胞出血、末梢気道病変、胸膜炎、血管炎等の病像を呈する⁵⁻⁷⁾。これらのうち間質性肺炎は頻度も高く、経過・生命予後を規定する因子となる。また自己免疫疾患の発症には遺伝的要因と環境的要因の関与が考えられており、近年この環境因子の一つとしてスーパー抗原の関与が報告されている⁸⁾。staphylococcal enterotoxin B (SEB) のようなスーパー抗原は抗原提示細胞によるプロセッシングを受けることなく、直接 MHC クラス II 分子の溝の外側と TCR β 鎖 V 領域 (V β) に結合する⁹⁾。通常の抗原が $1/10^4 \sim 1/10^6$ の少数の T 細胞に認識されるのに対し、スーパー抗原は数% ~ 20% 程度の非常に大きなレパートリーの T 細胞に認識され、T 細胞の活性化を誘導する。

そこで自己免疫疾患における肺病変の発症に対するスーパー抗原の関与を調べる目的で、以前 Shinbori らは自己免疫疾患モデルマウス (MRL-lpr/lpr マウス, MRL-+/+ マウス, NZB/W F1 マウス) と非自己免疫疾患モデルマウスに細菌性スーパー

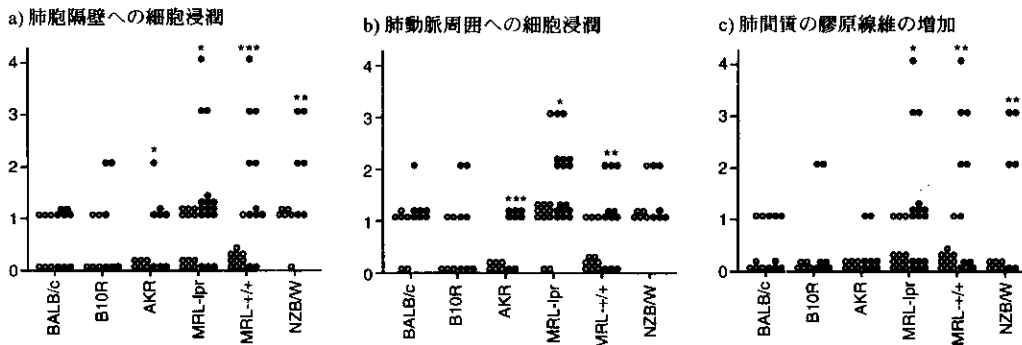
抗原である staphylococcal enterotoxin B (SEB) を経気道的に投与した。その結果、自己免疫疾患モデルマウスでは間質性肺炎が誘導され、自己免疫疾患における肺病変の発症に対するスーパー抗原の関与が示唆された (Fig.1)¹⁰⁾。次に、我々はこの自己免疫疾患における間質性肺炎の発生機序を明らかにする目的で、この SEB 誘導間質性肺炎モデルマウスにおける気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid: BALF) の解析を行った¹¹⁾。その結果、BALF 中の総細胞数、肺胞マクロファージ、リンパ球及び好中球の増加を認めた。また SEB に反応性の V β 8⁺T 細胞が増加しており、SEB によって活性化された細胞が肺胞腔内で重要な役割を果たしていることが示唆された。

本研究では自己免疫疾患における間質性肺炎に認められる肺胞上皮細胞傷害が下気道に存在する酸化ストレスやニトロ化ストレスの増強による可能性があるかと仮定し、自己免疫疾患における間質性肺炎の発症に対するフリーラジカルの関与を調べる目的で、この SEB 誘導間質性肺炎モデルマウスにおける iNOS 及び XO 阻害剤を投与することによる炎症性サイトカイン産生や BAL 細胞数、肺病変の変化を評価した。また、このモデルにおける局所及び全身の NO 及び O₂⁻ の産生を直接的、間接的に検討した。

対象と方法

12 週齢の雌性 MRL-+/+ マウスの気管に針を刺入し、1ml シリンジで SEB 40 μ g あるいは 2 μ g を投与した¹⁰⁾。また経気道的 SEB 投与の前日より XO 阻害剤 4-amino-6-hydroxypyrazolo[3, 4-d]-pyrimidine (AHPP: 1.0mg/mouse) を連日経口投与した。また SEB 気管投与の前日より iNOS 阻害剤 aminoguanidine (AG: 100 mg/kg/mouse) を 1 日 2 回腹腔内投与した。

BAL は経気道的 SEB あるいは PBS 投与、各々 1, 3, 5, 7, 14 日後のマウスにて施行した。気管に 20 ゲージのプラスチック製チューブを挿入し、各マウスとも 1ml の冷 PBS で 2 回洗浄した。Hemocytometer で細胞数を計測し、細胞分画はサイトスピンでスライドグラス上に細胞を固定後、Diff-Quick 染色を行った。細胞成分 (以下 BAL 細胞)



Shinbori T., *Cell. Immunol.* p129-137, 1996

Fig.1 経気道的SEB投与による肺組織への影響

自己免疫疾患モデルマウス (MRL-lpr/lpr マウス, MRL-+/+ マウス, NZB/W マウス), 非自己免疫疾患モデルマウス (BALB/c マウス, B10R マウス, AKR マウス) に PBS (40-50 μ l) あるいは SEB (50 μ g/40-50 μ l PBS) を経気道的に投与し, 14 日後に肺組織を評価した. 各々のポイントは個々のマウスの値を示している. * p <0.05, ** p <0.02, *** p <0.005 対 PBS 群.

は以下の mRNA の抽出に用いた.

経気道的 SEB あるいは PBS 投与 7 日後に肺を取り出し, 縦断面にて葉の中心を通るように薄切し, hematoxylin-eosin (HE) 染色及びアザン染色を行った. このモデルにおける病理学的特徴は間質の炎症と線維芽細胞の増殖を伴った肺胞隔壁の肥厚である¹⁰⁾. 全葉の面積当たりのこの病理学的変化を認める領域の面積を NIH イメージを用いて算出し, 全葉あたりの割合 (Area Percentages of Thickened Alveolar Septa) で表示した.

血清及び BALF 上清中の NO 代謝産物 nitrite/nitrate 量を測定した¹²⁾. 除タンパクしたサンプル中の nitrite/nitrate 濃度は autoanalyzer system (TCI-NOX 1000: Tokyo Chemical Industry, Tokyo, Japan) を用いて Griess 法を応用して測定した.

経気道的 SEB あるいは PBS 投与 3 日後に肺を取り出し, 免疫染色に使用した. 1:500 に希釈した抗 iNOS 抗体 (Wako, Osaka, Japan) 及び 1:100 に希釈した抗 nitrotyrosine 抗体 (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY) を用いて間接免疫ペルオキシダーゼ法を行った.

Xanthine oxidase (XO) 及び xanthine dehydrogenase (XD) 酵素活性は蛍光分光光学的方法を用いて測定した. これは XO/XD が pterine を基質として蛍光物質である isoxanthopterin を産生することを利用して, その酵素活性を測定する方法である¹⁴⁾. 血漿は阻害剤 (2mM EDTA, 2mM PMSF, 10mM DTT) を付加して採取した. BALF は leupeptin 0.5 μ g/ml をさらに追加して採取した. これらの液は 4 $^{\circ}$ C, 400g, 10 分遠心し, 細胞細分を除去した. 肺組織は

leupeptin 0.5mg/ml を加えた阻害剤を含む 50mM PPB (pH 7.6) 2ml 中で組織 homogenizer (Polytron homogenizer; Kinematica GmbH, Luzern, Switzerland) を用いて磨碎した. そのホモゲネートは 4 $^{\circ}$ C, 10000g, 20 分遠心にて細胞細分を除去し, 低分子量成分を除去するために BALF 及び肺ホモゲネートの上清は 4 $^{\circ}$ C, 18 時間 PBS を用いて透析を行った. 蛍光吸光計 (F-4500, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) を用い, excitation 345nm, emission 390nm にてこれらのサンプルにおける isoxanthopterin の蛍光測定を行った.

経気道的 SEB あるいは PBS 投与, 各々 1, 3, 5, 7, 14 日後のマウスから回収した BAL 細胞から mRNA を抽出, cDNA を作成し, PCR を施行した. 最初の denaturing (95 $^{\circ}$ C, 10min) 後, denaturing (94 $^{\circ}$ C, 1min), annealing (54 $^{\circ}$ C, 2min), extension (72 $^{\circ}$ C, 3min) を 1 サイクルとし, β -actin: 28 サイクル, iNOS 及び XO/XD: 38 サイクルで施行した.

β -actin 及び iNOS のプライマー配列は以下の通りである.

β -actin: 5'-AGGGTGTGATGGTGGGAATG-3'

5'-GGCTGGGGTGTGGAAGGTCTC-3'

iNOS: 5'-CCCTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGCGGC-3'

5'-GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG-3'

XO/XD: 5'-CAGGGTCTTGGTCTTTTCAC-3'

5'-CGTTGGTTTCAGCGTCAGGA-3'

BALF 上清中の NOS-inducing activity はマウスのマクロファージ細胞株 RAW 264 (American Type Culture Collection, Rockville, MD) を刺激することで評価した¹⁵⁾. 前日 24 穴プレートに RAW 264 1 \times

10⁶個/穴ずつ分注し、24時間後、SEB投与群及び非投与群から回収したBALF上清100μlあるいは250μlを250μlの培地DMEM/F12+10%FCSとともに加え培養した。48時間後培養上清を回収し、nitrite/nitrate量を測定した。

SEBあるいはPBS投与3日後のBALF中のTNF-α、IL-1β、IFNγ濃度を、各々のELISA kit (BioSource International社, Camarillo, CA)を用いて測定した。また、AGあるいはAHPP投与群においても同様の検討を行った。

結果はmean ± SEMで示した。統計学的処理はunpaired Student's *t* testを用い、P < 0.005を統計学的有意差とした。

結 果

SEB誘導間質性肺炎モデルの病因におけるNO及びO₂⁻の関与を評価するために、iNOS及びXOの阻害剤であるAG及びAHPPを用いて検討した。SEB投与7日後の肺組織のHE染色及びアザン染色を行った (Fig.2)。肺胞腔及び肺胞隔壁への炎症細胞の浸潤、線維芽細胞の浸潤した領域での膠原線維の増生を認めた。縦断面にて葉の中心を通るように薄切し、全葉の面積当たりのこの病理学的変化を認める領域の面積をNIHイメージを用いて算出したところ、AG及びAHPP投与群では、これら

の所見の減少を認めた (Fig.3A)。

次にSEB投与後のBAL細胞所見におけるiNOS及びXO阻害剤の効果をみた。PBS投与3日後のBALでは総細胞数が1.2 ± 1.1 × 10⁶/mlで、その大部分がマクロファージであった (Fig.3B)。一方、SEB投与後のBALでは総細胞数が9.2 ± 3.6 × 10⁶/mlと有意に上昇していた。細胞分画においてマクロファージ、リンパ球、好中球の各々の細胞数の上昇を認めた。このSEB投与マウスはAG及びAHPPの投与によって総細胞数、マクロファージ数、リンパ球数は有意に減少した。

以上の所見より、NO及びO₂⁻がSEB誘導間質性肺炎の病因に関与し、更に各々の阻害剤が間質性肺炎の治療的効果を有する可能性が示唆された。そこでSEB誘導間質性肺炎モデルにおけるNOの産生を明らかにする目的でNOの代謝産物であるnitrite/nitrate産生量を評価した。血清及びBALF中のnitrite/nitrate産生量の経時的变化をFig.4Aに示す。SEB投与群において血清及びBALF中いずれもnitrite/nitrate産生量の増加を認めた。血清においてSEB投与3日後nitrite/nitrate量 (131.55 ± 14.8μM)はピークを示し、PBS投与群のnitrite/nitrate量 (19.8 ± 2.81μM)と比べ、有意に上昇していた。またBALF中のnitrite/nitrate量においても同様にSEB投与群で増加を認めた (3日後SEB投与群: 19.27 ± 0.74 μM, PBS投与群: 11.84 ± 1.699μM)。AGの

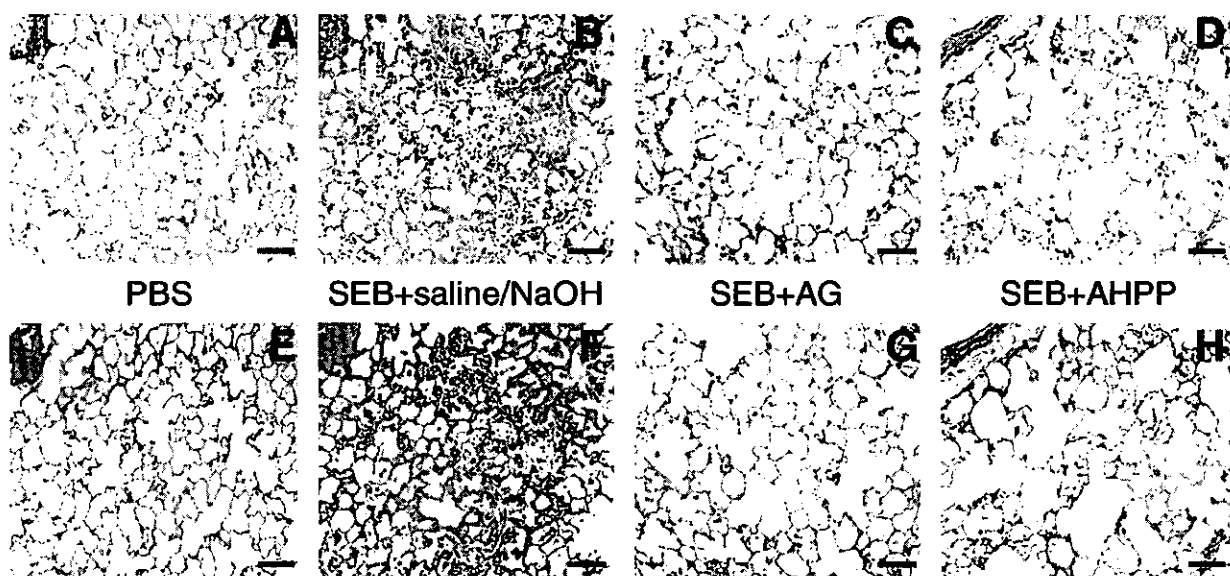


Fig.2 経気道的SEB投与後の肺組織所見に対するAG及びAHPPの影響

PBS投与マウス (A, E), saline/NaOH投与 (B, F), AG投与 (C, G), そしてAHPP投与 (D, H)を行ったSEB投与マウスから肺組織を7日後に採取した。それぞれの組織はH, E, 染色 (A-D) 及びアザン染色 (E-H)を行った。SEB投与マウスでは肺胞隔壁への明らかな炎症細胞の浸潤と膠原線維の増生を認めた (B, F)。AG及びAHPPの投与で炎症細胞の浸潤と膠原線維の増生が減少した (C, G, D, H)。Scale barは50μmを示す。

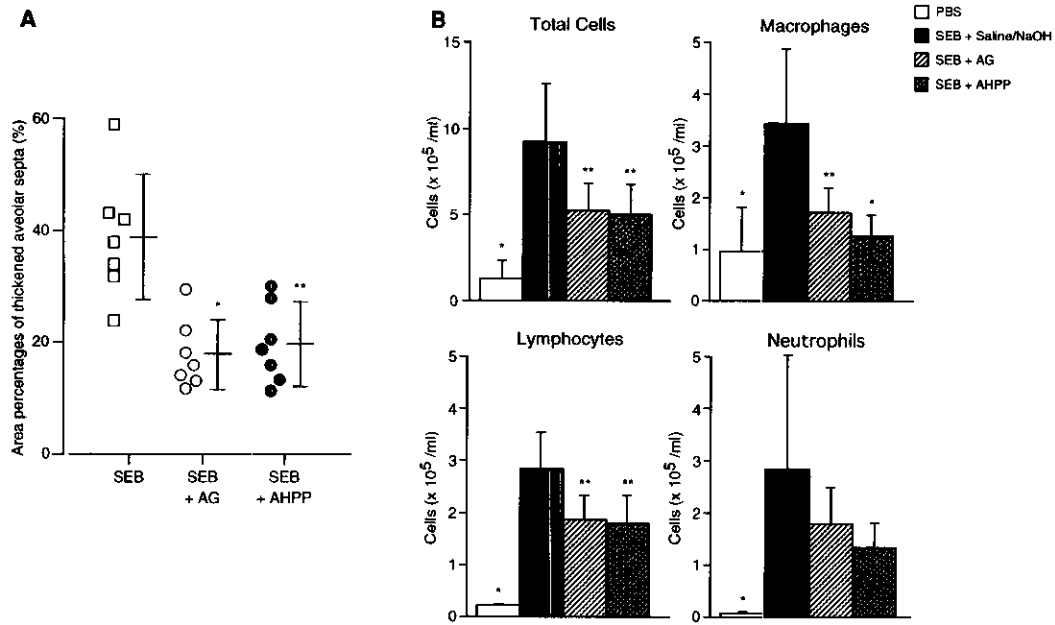


Fig.3 SEB 投与後の肺組織所見に対する AG 及び AHPP の影響のスコア化及び BAL 所見

(A) saline/NaOH 投与, AG 投与, そして AHPP 投与を行った SEB 投与マウスの 7 日後の全肺面積当たりの肺病変領域の割合を算出することによりスコアリングを行った。炎症及び線維芽細胞による肺胞隔壁の肥厚を認める領域のパーセントを平均値 ± 標準偏差で示した。saline/NaOH 投与マウスと比較すると AG 及び AHPP 投与マウスではその病変領域が明らかに減少した。* $p < 0.001$, ** $p < 0.005$ 対 SEB+saline/NaOH 群。(SEB+saline/NaOH マウス:n=7, SEB+AG マウス:n=7, SEB+AHPP マウス:n=7) (B) saline/NaOH 投与, AG 投与, そして AHPP 投与を行った SEB 投与マウスの 3 日後に BAL を施行。BALF 中の総細胞数, マクロファージ数, リンパ球数, そして好中球数について検討した。AG 及び AHPP 投与で BALF 中への炎症細胞の集積が抑制された。細胞数は平均値 ± 標準偏差で示した。* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ 対 SEB+saline/NaOH 群。(SEB+saline/NaOH マウス:n=8, SEB+AG マウス:n=8, SEB+AHPP マウス:n=8)

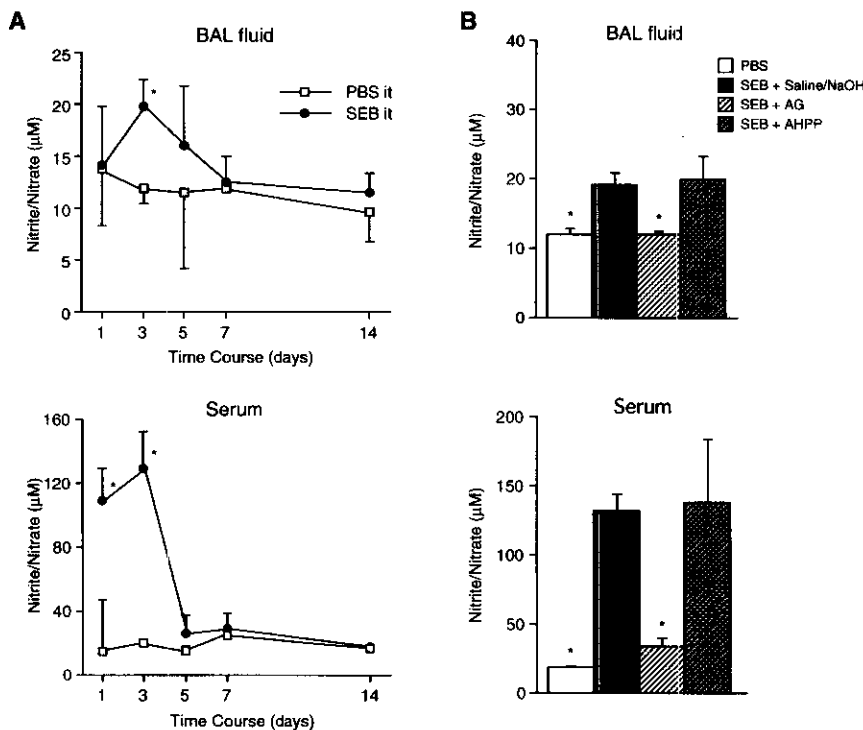


Fig.4 SEB 投与後の nitrite/nitrate の経時的变化及び AG, AHPP の影響

(A) BALF 及び血清中の nitrite/nitrate 産生量を経時的に評価した。PBS 投与マウスと比較し SEB 投与マウスでは 3 日後, nitrite/nitrate 産生量が上昇していた。産生量は平均値 ± 標準偏差で示した。* $p < 0.001$ 対 PBS 群。(PBS マウス:n=6, SEB マウス:n=6) (B) SEB 投与 3 日後の BALF 及び血清中の nitrite/nitrate 産生量は AG 及び AHPP の投与により抑制された。産生量は平均値 ± 標準偏差で示した。* $p < 0.001$ 対 SEB+saline/NaOH 群。(SEB+saline/NaOH マウス:n=6, SEB+AG マウス:n=6, SEB+AHPP マウス:n=6)

投与にて血清及び BALF いずれの場合も SEB 投与 3 日後の nitrite/nitrate 産生量は明らかに減少していた (Fig.4B). AHPP の投与は nitrite/nitrate 産生量に影響を及ぼさなかった.

次に SEB 投与 3 日後の肺組織および BAL 細胞における iNOS 蛋白の発現をみるために抗 iNOS 抗体を用いて免疫組織化学法を行った. iNOS 陽性細胞は SEB 投与肺組織の肺胞及び肺胞隔壁に浸潤したマクロファージ及び好中球であり, PBS 投与肺組織

においては陽性細胞をほとんど認めなかった (Fig.5). また SEB 投与 BAL 細胞においても陽性細胞はマクロファージ及び好中球であった. PBS 投与群ではほとんど染色されなかった. 次に SEB 投与肺及び BAL 細胞における ONOO⁻ の生成および局在を明らかにするために nitrotyrosine の形成を評価した. Nitrotyrosine 陽性細胞はマクロファージ及び好中球であり, iNOS と同様の結果を示した.

更に O₂⁻ の産生に対する SEB 投与の影響をみる

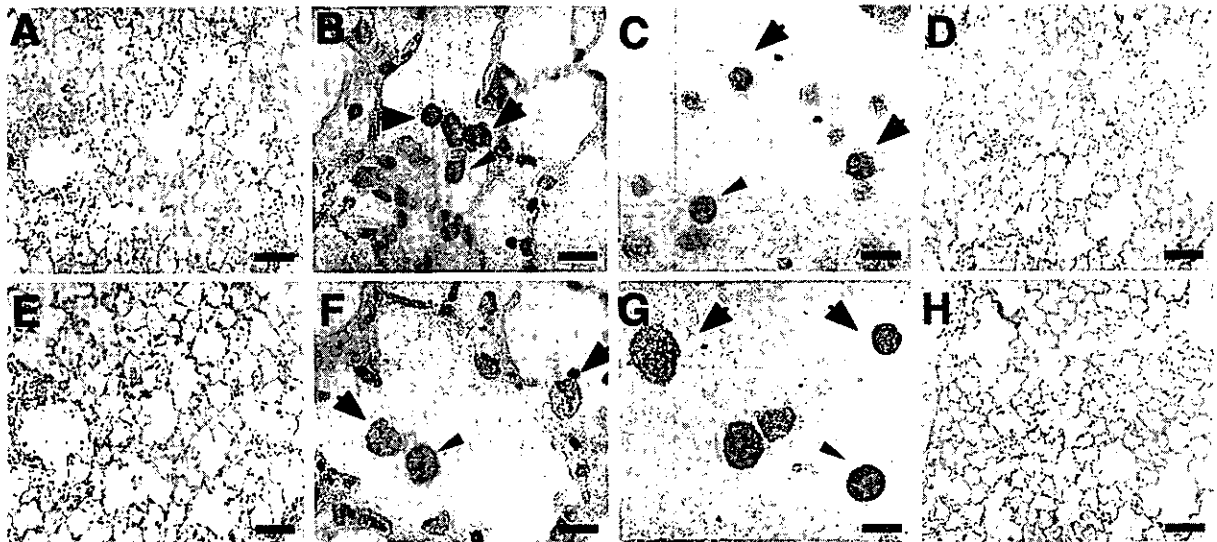


Fig.5 SEB 投与後の肺組織所見における免疫学的検討

SEB 投与 3 日後のマウス肺及び BAL 細胞において抗 iNOS 抗体 (A-D) と抗 nitrotyrosine 抗体 (E-H) を用いて免疫染色を行った. 抗 iNOS 抗体での染色では SEB 投与マウス肺の肺胞と肺胞隔壁に浸潤したマクロファージ (矢印) と好中球 (矢頭) に陽性像が認められた (A, B). SEB 投与 BAL 細胞でもマクロファージ (矢印) と好中球 (矢頭) に陽性像が認められた (C). コントロールとして PBS 投与肺を抗 iNOS 抗体で染色した (D). 抗 nitrotyrosine 抗体での染色で, 同様の結果を得た (E-H). Scale bar は A, D, E, H で 50µm を示し, B, C, F, G で 10µm を示す.

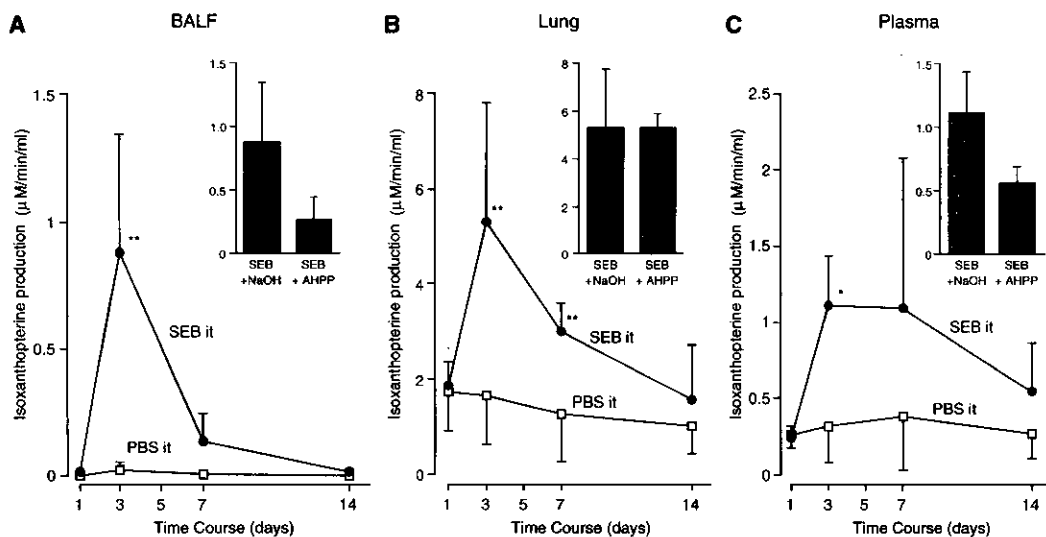


Fig.6 SEB 投与後の XO/XD 活性の経時的変化

BALF, 肺及び血漿中の XO/XD 活性を経時的に評価した. PBS 投与マウスと比較し SEB 投与マウスでは 3 日後, XO/XD 活性が上昇していた. 活性は平均値 ± 標準偏差で示した. *p<0.001, **p<0.005 対 PBS 群. (PBS マウス: n=5, SEB マウス: n=5) AHPP 投与によって SEB 投与 3 日後の BALF, 肺及び血漿中の XO/XD 活性は抑制された. 活性は平均値 ± 標準偏差で示した. *p<0.005 対 SEB+NaOH 群. (SEB+NaOH マウス: n=5, SEB+AHPP マウス: n=5)

目的で O_2^- の産生に関与する XO/XD 酵素活性について蛍光分光学的方法を用いて評価した。肺、BALF 及び血漿中の XO/XD 酵素活性の経時的变化を Fig.6 に示す。SEB 投与群において肺、BALF 及び血漿中いずれも XO/XD 活性の増加を認め、肺及び BALF におけるそのピークは投与後3日目であった。BALF 及び血漿中の投与3日目における XO/XD 酵素活性は XO/XD 阻害剤である AHPP の投与で著明に低下した (Fig.6, $p < 0.05$)。

NO 及び O_2^- の過剰産生が iNOS 及び XO/XD mRNA の誘導を介しているか明らかにするために

SEB 投与 1, 3, 5, 7, 14 日後の BAL 細胞における iNOS 及び XO/XD mRNA の発現について RT-PCR 法を用いて検討した (Fig.7)。iNOS 及び XO/XD mRNA レベルは SEB 投与群で増加しており、そのピークは3日後であった。しかし PBS 投与群では iNOS 及び XO/XD mRNA レベルの増加を認めなかった。

次に SEB 投与後 BALF における NOS-inducing activity を評価するために、RAW264 細胞株の培養液中の nitrite/nitrate 量を評価した。SEB 投与マウスから3日後回収した BALF を RAW264 細胞に付加

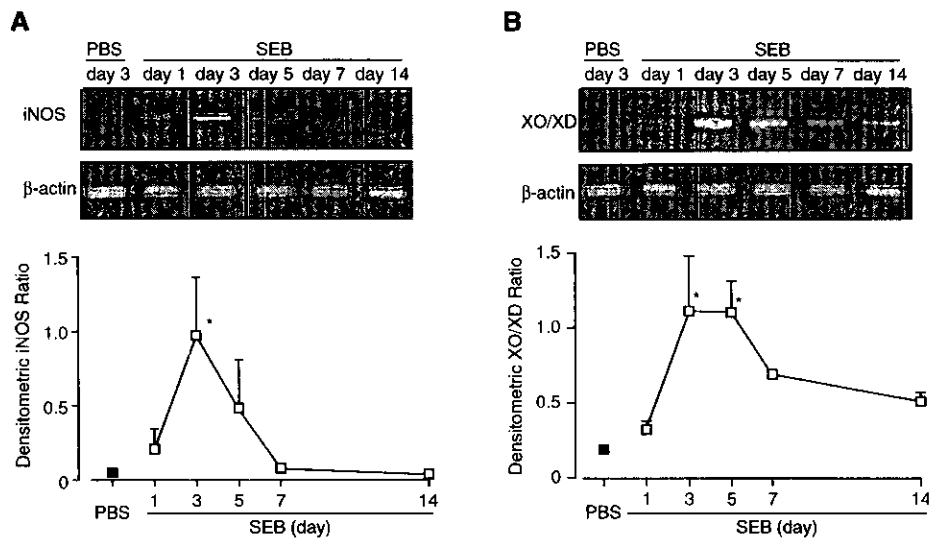


Fig.7 BAL 細胞中の iNOS 及び XO/XD mRNA 発現の経時的变化

PBS 投与3日後及び SEB 投与 1, 3, 5, 7, 14 日後の BAL 細胞における iNOS 及び XO/XD mRNA 発現を RT-PCR 法を用いて経時的に評価した。β-actin mRNA に対する iNOS 及び XO/XD mRNA の Densitometric ratio は平均値 ± 標準偏差で示した。* $p < 0.005$ 対 PBS 群。(PBS マウス: $n = 5$, SEB マウス: $n = 5$)

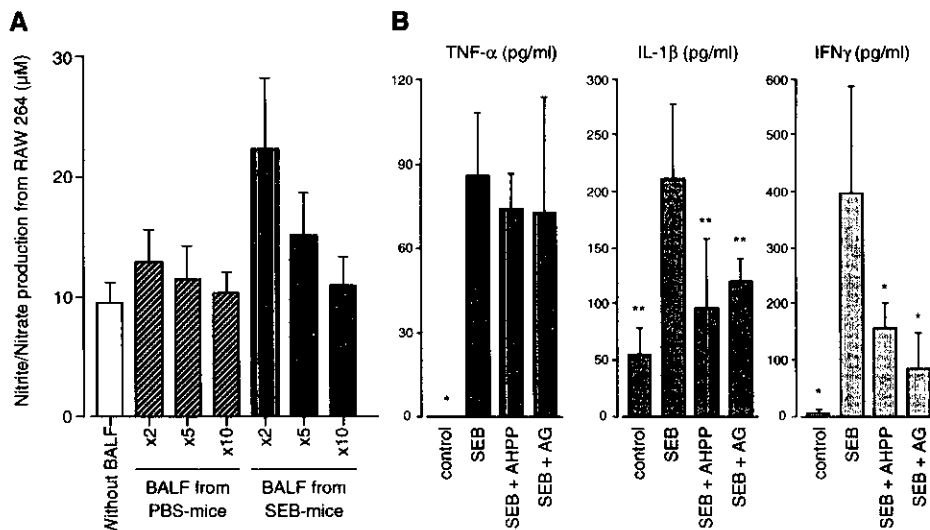


Fig.8 SEB 投与後 BALF における NOS-inducing activity 及びサイトカイン濃度

(A) SEB 投与後の BALF 希釈付加し RAW264 細胞株の培養液中の nitrite/nitrate 産生量を測定することにより iNOS の誘導を評価した。産生量は平均値 ± 標準偏差で示した。(B) PBS 投与マウス, saline/NaOH 投与, AG 投与, そして AHPP 投与を行った SEB 投与マウスからの3日後の BALF におけるサイトカイン濃度を ELISA を用いて評価した。サイトカイン濃度は平均値 ± 標準偏差で示した。* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ 対 SEB 群。(PBS マウス: $n = 6$, SEB マウス: $n = 6$)

すると nitrite/nitrate の産生が増加するも、PBS 投与群では nitrite/nitrate 量の増加は認められなかった (Fig.8A)。また RAW264 細胞に SEB を直接付加しても NOS-inducing activity は認められなかった (data not shown)。以上の結果より SEB 投与により iNOS を誘導しうる TNF- α や IL-1 β , IFN- γ のような炎症性メディエーターの産生が BALF 中に誘導される可能性が示唆された。

そこで SEB 投与後 3 日後における BALF 中の炎症性サイトカインレベルに対する AG 及び AHPP の効果を調べた (Fig.8B)。SEB 投与群では PBS 投与群と比較し TNF- α , IL-1 β , IFN- γ レベルの上昇を認めた。AG 及び AHPP の投与で IL-1 β レベルは有意に低下し各々その程度は 50.4%, 38.3% であった。IFN γ レベルは AG 及び AHPP の投与で各々 78.6%, 59.9% 低下した。以上のことより、NO 及び O $_2^-$ のは炎症性サイトカインの産生に関与しており、そして AG 及び AHPP が炎症性サイトカインの産生の抑制を介した抗炎症作用を有していることが示唆された。

考察・結論

本研究では自己免疫疾患における間質性肺炎に認められる肺胞上皮細胞傷害が下気道に存在する酸化ストレスやニトロ化ストレスの増強による可能性があるかと仮定し、細菌性スーパー抗原である SEB を自己免疫疾患モデルマウスに経気道的に投与することにより誘導される間質性肺炎における NO 及び O $_2^-$ のの関与について解析を行った。そこで SEB 誘導間質性肺炎モデルにおいて NO 及び O $_2^-$ のが上昇することを見いだした。そして、この NO 及び O $_2^-$ のの過剰産生は BALF 中の炎症性サイトカインである TNF- α や IL-1 β , IFN γ の上昇と密接に関連していた。また iNOS 及び XO 阻害剤である AG 及び AHPP を投与することにより NO 及び O $_2^-$ の産生が抑制されると、炎症性サイトカインの生成が抑制され、BAL 細胞数が減少し、間質性肺炎の進展に防御的効果を示した。これらの結果は間質性肺炎の発生機序を理解する上で有用であり、新しい間質性肺炎の治療戦略を考える上で重要な知見と考えられる。

SEB 投与マウスにおいて血清及び BALF 中の

nitrite/nitrate 産生量が増加していた。同様に SEB 投与マウスにおける XO/XD の産生分泌が蛋白レベル及び mRNA レベルで促進し、肺胞腔内へ放出されていることを観察した。今まで NO は細胞機能を調節したり、肺傷害に対し抗炎症作用を示したりすることが報告されている^{16,17)}。しかし、肺の炎症局所において NO は肺胞腔内の高濃度酸素や O $_2^-$ のの産生により、速やかに ONOO $^-$ や NO $_2$ などの RNS へと変換される。つまり、NO の細胞障害性を考えると NO が単独で作用する場合と ONOO $^-$ 等の RNS が作用する場合の 2 つが存在する。そして NO そのものは化学反応に乏しく、NO によりもたらされる病理学的現象のかなりの部分が ONOO $^-$ 等の RNS により発現されている。RNS は肺の炎症の重要なメディエーターとして考えられており、肺細胞にとって極めて毒性が高いという報告がされている^{15,16)}。生体内での ONOO $^-$ の検出はその半減期が非常に短いため困難である。しかし、抗 nitrotyrosine 抗体を用いた免疫組織化学法は、生体内における ONOO $^-$ の生成の fingerprint として広く用いられており、今回の検討でも iNOS の局在に一致した nitrotyrosine の存在を証明しており、iNOS/XO に依存して ONOO $^-$ が生成することを直接的に証明することに成功している。また AG 及び AHPP が BALF 中のマクロファージ数、リンパ球数、そして好中球数を減少させ、病理学的にも肺傷害の及んだ面積を減少させたという所見は ONOO $^-$ が肺傷害に関与し、SEB 誘導間質性肺炎の病因の一つである可能性を示唆するものである。

ヒトやマウスのマクロファージにおいて NO は TNF- α と IL-1 β の産生に対し調節的役割を果たすことが報告されている^{15,19,20)}。内因性の NO は TNF- α の産生を促進することがヒト未熟単核細胞株である U937 や肺胞マクロファージにおいて認められている^{19,20)}。しかしながら、ある状況下では NO がサイトカインの発現を抑制するという報告もある^{9,15)}。これらの報告の矛盾を説明する理由はなおもって不明である。

本研究で SEB 投与マウスから得られた BALF はマウスマクロファージ細胞株 RAW264 に対して強い iNOS 誘導活性を示した。マクロファージに対して iNOS 誘導能を有するいくつかの炎症性サイトカインが知られている。更に XO/XD の発現も IL-1 β

のような炎症性サイトカインによって調節されている。XD はそれ自体 O_2^- の産生能が低い、システインの酸化や蛋白分解反応により高い O_2^- 産生能を有する XO へと変換される。実際、SEB 投与マウスから得た BALF 中には炎症性サイトカインである TNF- α や IL-1 β 、IFN γ の上昇が認められた。これらの所見より SEB より活性化された Th1 細胞より産生される IFN γ や SEB により活性化された炎症細胞より産生される TNF- α 、IL-1 β が肺腔内へ浸潤したマクロファージを刺激して iNOS や XO を誘導するものと考えられる。加えて、AG や AHPP が炎症性サイトカインの産生を抑制したという結果は NO 及び O_2^- がこれらのサイトカインの生成を促進していることを示唆するものである。以上のことより、iNOS 及び O_2^- と炎症性サイトカインの誘導は positive feedback loop を形成し、お互いに増強しあい、そのことが SEB 投与肺における ROS や RNS の過剰産生をもたらしていると考えられる。

本研究では iNOS 及び XO 阻害剤である AG 及び AHPP を投与することにより NO 及び O_2^- の産生が抑制されると、炎症性サイトカインの生成が抑制され、BAL 細胞数が減少し、間質性肺炎の進展に防御的効果を示した。SEB によるショックモデルにおいて、iNOS 阻害剤である AG の投与が防御的な効果を有したという報告がある一方、SEB 投与による内因性 NO が防御的効果を有し、iNOS 阻害剤を投与することによりショックの死亡率が上昇したという報告がある^{21,22)}。つまり SEB による組織傷害における NO の役割は微妙なバランスの上に成り立っている。

以上をまとめると、V β 8⁺ T 細胞に作用するスーパー抗原は NO と O_2^- の産生と炎症性サイトカインの産生を肺の炎症局所で増加させることが見いだされた。NO は O_2^- と反応し、肺の炎症に重要な ONOO⁻ へと変換される。炎症性サイトカイン産生は内因性の NO と O_2^- の産生に調節されており、また ONOO⁻ は本モデルにおける肺傷害に関与していることが示唆された。更に iNOS 及び XO 阻害剤は間質性肺炎における胞隔炎と線維化に対して治療薬として期待させるものと思われる。

参考文献

- 1) Vladutiu AO. Role of nitric oxide in autoimmunity. Clin. Immunol. Immunopath. 76: 1-11 (1995)
- 2) Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. Ann. Intern. Med. 120: 227-237 (1994)
- 3) McCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JE, Xie QW, Nathan CF, Wahl SM. Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. J. Exp. Med. 178: 749-754 (1993)
- 4) Weinberg JB, Granger DL, Pisetsky DS, Seldin MF, Misukonis MA, Mason SN, Pippen AM, Ruiz P, Wood ER, Gilkeson GS. The role of nitric oxide in the pathogenesis of spontaneous murine autoimmune disease: increased nitric oxide production and nitric oxide synthase expression in MRL-lpr/lpr mice, and regulation of spontaneous glomerulonephritis and arthritis by orally administered N^G-monomethyl-L-arginine. J. Exp. Med. 179: 651-660 (1994)
- 5) Kelly C, Gardiner P, Pal B, Griffiths I. Lung function in primary Sjogren's syndrome: a cross sectional and longitudinal study. Thorax 46: 180-183 (1991)
- 6) Schwarz MI, Sutarik JM, Nick JA, Leff JA, Emlen JW, Tuder RM. Pulmonary capillaritis and diffuse alveolar hemorrhage. A primary manifestation of polymyositis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 151: 2037-2040 (1995)
- 7) Tazelaar HD, Viggiano RW, Pickersgill J, Colby TV. Interstitial lung disease in polymyositis and dermatomyositis. Am. Rev. Respir. Dis. 141: 727-733 (1990)
- 8) Paliard X, West SG, Lafferty LA, Clements JR, Kappler JW, Marrack P, Kotzin BL. Evidence for the effects of a superantigen in rheumatoid arthritis. Science 253: 325-329 (1991)
- 9) Persoons JHA, Schornagel K, Tilders FFH, Vente J, Berkenbosch F, Kraal G. Alveolar macrophages autoregulate IL-1 and IL-6 production by endogenous nitric oxide. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 14: 272-278 (1996)

- 10) Shinbori T, Matsuki M, Suga M, Kakimoto K, Ando M. Induction of interstitial pneumonia in autoimmune mice by intratracheal administration of superantigen staphylococcal enterotoxin B. *Cell. Immunol.* 174: 129-137 (1996)
- 11) Fujiki M, Shinbori T, Suga M, Miyakawa H, Ando M. Role of T cells in bronchoalveolar space in the development of interstitial pneumonia induced by superantigen in autoimmune-prone mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 21: 675-683 (1999)
- 12) Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126: 131-138 (1982)
- 13) Doi K, Akaike T, Horie H, Nogichi Y, Fujii S, Beppu T, Ogawa M, Maeda H. Excessive production of nitric oxide in rat solid tumor and its implication in rapid tumor growth. *Cancer* 77: 1598-1604 (1996)
- 14) Akaike T, Ando M, Oda T, Doi T, Ijiri S, Araki S, Maeda H. Dependence on O₂⁻ generation by xanthine oxidase of pathogenesis of influenza virus infection in mice. *J. Clin. Invest.* 85: 739-745 (1990)
- 15) Akaike T, Noguchi Y, Ijiri S, Setoguchi K, Suga M, Zheng YM, Dietzschold B, Maeda H. Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93: 2448-2453 (1996)
- 16) Suga M, Okamoto T, Ando M. Nitric oxide and interstitial lung disease. *Curr. Op. Pul. Med.* 4: 251-255 (1998)
- 17) Cantin AM, North SL, Fells GA, Hubbard RC, Crystal RG. Oxidant-mediated epithelial cell injury in idiopathic pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* 79: 1665-1673 (1987)
- 18) Rubbo H, Darley-Usmar V, Freeman BA. Forum on nitric oxide: chemical events in toxicity. Nitric oxide regulation of tissue free radical injury. *Chem. Res. Toxicol.* 9: 809-820 (1996)
- 19) Kuo HP, Wang CH, Huang KS, Lin HC, Yu CT, Liu CY, Lu LC. Nitric oxide modulates interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α synthesis by alveolar macrophages in pulmonary tuberculosis. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 161: 192-199 (2000)
- 20) Yan L, Wang S, Rafferty SP, Wesley RA, Danner RL. Endogenously produced nitric oxide increases tumor necrosis factor- α production in transfected human U937 cells. *Blood* 90: 1160-1167 (1997)
- 21) Sarawar SR, Blackman MA, Doherty PC. Superantigen shock in mice with an inapparent viral infection. *J. Infect. Dis.* 170: 1189-1194 (1994)
- 22) Florquin S, Amraoui Z, Dubois C, Decuyper J, Goldman M. The protective role of endogenously synthesized nitric oxide in staphylococcal enterotoxin B-induced shock in mice. *J. Exp. Med.* 180: 1153-1158 (1994)

ブレオマイシン肺線維症における IFN- γ の 役割についての基礎的研究

斉藤 好信¹ 菅原 勇^{2*} 吾妻安良太¹ 工藤 翔二^{1**}

肺線維症患者に IFN- γ -1b と少量のプレドニゾロンを長期間投与した結果、肺機能や血液ガスの酸素分圧が改善し、肺組織の TGF- β 1, CTGF mRNA 発現レベルが低下した (Ziesche *et al.* N Engl J Med. 1999; 341: 1246-49.) と報告され、IFN- γ の有効性が示された。肺線維症の病態における IFN- γ の役割は、*in vitro* や *in vivo* の実験から線維化抑制性のサイトカインとしてはたらくことが知られていた。われわれは肺線維症における IFN- γ の重要性を確認するため、IFN- γ 欠損 (以下 IFN- γ KO) マウスを用いて BLM 肺線維症を作成し、Wild-type のマウスと比較検討した。また、recombinant IFN- γ (以下 rIFN- γ) を BLM 投与後の Wild-type および IFN- γ KO マウスに追加投与することで病変がどのように変化するか検討した。BLM 肺線維症は IFN- γ KO マウスよりも Wild-type マウスの方が病変の程度は軽度であった。Wild-type マウスでは BLM 肺線維症は rIFN- γ の追加投与によって改善がみられた。IFN- γ KO マウスの BLM 肺線維症は逆に rIFN- γ 投与によって悪化した。肺組織のヒドロキシプロリン含有量も組織所見と同様の傾向を示した。以上から、BLM 肺線維症における IFN- γ の役割は重要であるが、線維化の促進作用と抑制作用の両面を持ち合わせていることがわかった。生体の条件により IFN- γ は有効にも有害にもなりうる因子であり、臨床応用は慎重に考慮する必要があると考えられた。

A role of interferon- γ in bleomycin-induced pulmonary fibrosis

Yoshinobu Saito¹, Isamu Sugawara², Arata Azuma¹, Shoji Kudo¹

1. Forth Department of Internal Medicine, Nippon Medical School

2. Department of Molecular Pathology, The Research Institute of Tuberculosis

It is reported that long-term treatment with recombinant interferon- γ 1b and low dose prednisolone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis ameliorated lung function, partial pressure of arterial oxygen and decreased the levels of messenger RNA for transforming growth factor β 1 and connective-tissue growth factor (Ziesche *et al.* N Engl J Med. 1999; 341: 1246-49.). *In vitro* and *in vivo* studies have shown that interferon- γ (IFN- γ) plays a role for pulmonary fibrosis as an antifibrotic cytokine. To confirm the importance of IFN- γ in pulmonary fibrosis, we prepared a model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis using IFN- γ deficient mice, and they were compared with wild-type mice in terms of pathogenesis. Second, we analyzed the effect of recombinant interferon- γ (rIFN- γ) on the bleomycin-treated wild-type and IFN- γ deficient mice. Lung fibrotic lesion of the wild-type mice were greater than those of IFN- γ deficient mice. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis was improved by administration of rIFN- γ in wild-type mice. However, the fibrosis was deteriorated by administration of rIFN- γ in IFN- γ deficient mice. Hydroxyproline content of the lung after bleomycin treatment revealed similar pattern with histological changes. In summary, we found that IFN- γ played a critical role for bleomycin-induced pulmonary fibrosis and had profibrotic and antifibrotic effects. IFN- γ may be useful in some cases, but it may be detrimental for the patients with pulmonary fibrosis. Therefore, IFN- γ should be carefully applied to patients with pulmonary fibrosis.

はじめに

肺線維症の治療薬として IFN- γ が有効であることを示す報告がある¹⁾。過去に, *in vitro* で線維芽細胞の増殖を抑制する²⁾, 線維芽細胞のコラーゲン産生を IFN- γ が抑制する³⁾ という報告や, *in vivo* ではマウスの BLM 肺線維症において IFN- γ の投与が線維化を抑制し⁴⁾, また TGF- β , プロコラーゲン I, III が down regulate される⁵⁾ とする報告がある。これら実験レベルでは IFN- γ の抗線維化作用が確認され, 肺線維症においても重要な役割をもち, 治療薬としても期待されていたわけであるが, 臨床応用で有効性が示されたのはこれが初めてである。

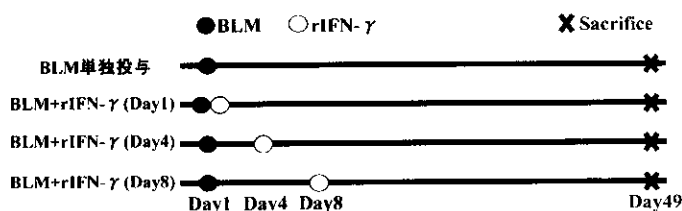
IFN- γ が肺線維症の病態に深く関わることに ついてさらに傍証を得るため, われわれは IFN- γ KO マウスを用いて BLM 肺線維症の実験を行った。もし IFN- γ が線維化を抑制する主要な因子であれば IFN- γ が欠損した状態では BLM 投与によって肺線維症は悪化するはずであり, またそこに r IFN- γ を追加投与すれば線維化が抑制されることが予測される。これを確認することが本実験の目的である。

対象と方法

使用したマウスは C57Bl/6 (雌, 10 ~ 20 週令) の Wild-type, IFN- γ KO マウスで, ともに SPF で管理されたものを用いた。グループ分けは, Wild-type, IFN- γ KO マウス両群とも BLM のみ投与する群 (BLM 単独投与群) と BLM と rIFN- γ を投与する群 とに分けた。BLM はマウス体重 1kg あたり 100mg を mini osmotic pump (ALZA 製) にて皮下投与した。また recombinant mouse IFN- γ (Genzyme-Techne 製) は 50 μ g/body を mini osmotic pump にて皮下投与した。なお rIFN- γ の投与時期は BLM 投与日 (Day1) と同時としたが, IFN- γ KO マウス群ではさらに, Day4 投与群, Day8 投与群も設置した。表 1 に実験スケジュールを示す。

全てのマウスは BLM 投与 7 週後に解剖し, 肺は

表 1 実験スケジュール



一部を除きホルマリン固定し, 組織病理学的検索を行った。また肺組織線維化を定量化するため, 肺組織のヒドロキシプロリン含有量を測定した。これは解剖したマウスの片肺を使用して, 重量測定後, ホモジネートとして 6N HCl を混合し 16 時間 120 $^{\circ}$ C でインキュベート。この溶液 5 μ l に citrate acetate buffer 5 μ l, chloramine-T solution 100 μ l を加えて 20 分間室温に置き, これに Ehrlich's solution 100 μ l を加えて 65 $^{\circ}$ C, 15 分間インキュベート。冷却後 550nm で吸光度を測定し, ヒドロキシプロリン溶液で作製した検量線より定量した。さらに線維化に関連する代表的なサイトカインである TGF- β 1 mRNA の肺組織における発現を解析した。肺組織の一部を液体窒素で凍結し, これを粉砕後 TRIzol で total RNA を抽出。cDNA に逆転写後, PCR を行った。内部標準は β -actin を用いた。

結 果

まず, BLM 投与後のマウスの生存曲線を図 1 に示す。Wild-type マウス, IFN- γ KO マウスともに BLM 単独投与群は全例が 7 週後の解剖時まで生存した。r IFN- γ 併用 (Day1 投与) 群に関しては, Wild-type マウスでは 50% の生存率, IFN- γ KO マウスでは 0% であった。繰り返し実験を行ったが, 同様の結果であった。そこで r IFN- γ の投与時期を BLM 投与後にずらしたところ, Day4 投与群, Day8 投与群ともに 50% の生存率であった。Wild-type マウス, IFN- γ KO マウスともに r IFN- γ によって死亡したマウスの肺は, 解剖した結果, 炎症の程度がごく軽度であった。これが直接死因とは考えられず, 他臓器を検索したが死因を特定できなかった。

- 1. 日本医科大学第四内科
- 2. 結核予防会結核研究所
- * びまん性肺疾患研究班 主任研究者
- ** 同 研究協力者