

図1 BLM投与後の生存曲線

次に、BLM投与7週後の解剖時の肺組織所見を図2に示す。標本はHematoxyline-Eosin染色である。肺に形成された病変を比較すると、BLM投与による肺病変の程度はWild-typeよりもIFN- γ KOマウスの方が軽度であった。またrIFN- γ 併用の効果についてであるが、Wild-typeでは、BLM単独投与群と比較してrIFN- γ 併用群の病変の程度は軽減されているのがわかる。一方、IFN- γ KOマウスでは逆にBLM単独投与群よりもrIFN- γ 併用群の方が病変の程度が明らかに高度であった。

肺組織中のヒドロキシプロリン含有量を図3に示す。データは肺1gあたりのヒドロキシプロリン含有量を表した。BLM単独投与群では、Wild-typeの方がIFN- γ KOマウスよりも高かった。rIFN- γ の投与効果は、Wild-typeマウスでは投与によりヒドロキシプロリンは低下し、IFN- γ KOマウスは増加した。これらは肺組織所見と合致した。

肺組織のTGF- β 1の遺伝子発現をRT-PCR法で解析した結果を図4に示す。TGF- β 1の発現はBLM投与によって増加するが、これはWild-typeマウス

の方がIFN- γ KOマウスよりもやや発現量が多い。また、IFN- γ KOマウスではBLM単独投与よりもrIFN- γ を投与したマウスの方がTGF- β 1の発現量は多く見られた。

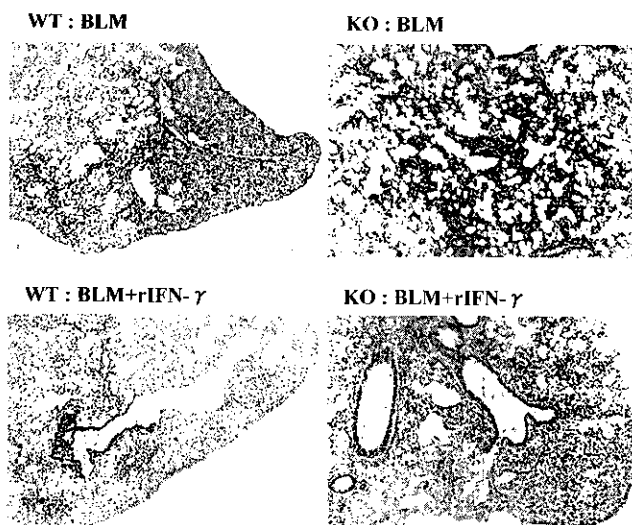


図2 BLM投与7週後の肺組織像

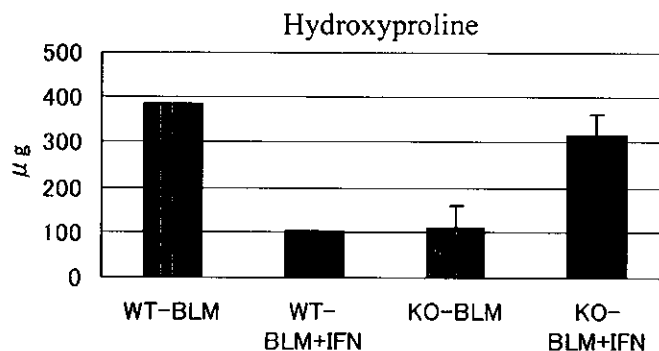


図3 肺組織ヒドロキシプロリン含有量

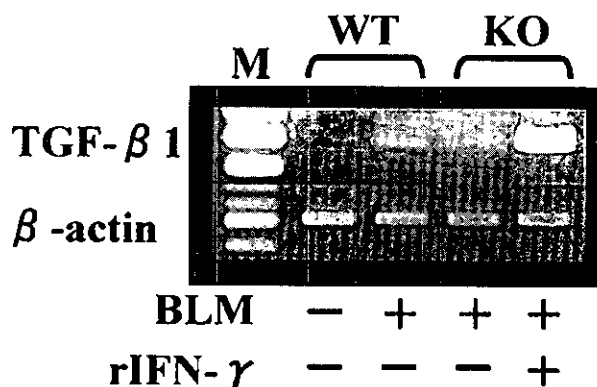


図4 肺組織のTGF- β 1 mRNA発現

考案・結論

BLM投与による肺線維症は、IFN- γ KOマウスの方がWild-typeマウスよりも軽度であり、Wild-typeマウスのBLM肺線維症はrIFN- γ の投与により軽快するが、IFN- γ KOマウスのBLM肺線維症はrIFN- γ の投与により悪化した。

過去の研究報告からIFN- γ は抗線維化作用を有することがわかっており、IFN- γ KOマウスのBLM肺線維症はWild-typeマウスと比べて悪化すること、さらにrIFN- γ の投与は線維化を抑制することが予測されたが、実際にわれわれが行った実験では逆の結果が得られた。本実験と同じようにIFN- γ KOマウスのBLM肺線維症に関する検討の報告は過去に一つだけ存在するが⁶⁾、結果はIFN- γ KOマウスの方がWild-typeマウスよりもBLM肺線維症が軽度であり、本実験と同じ結果であった。われわれはさらにrIFN- γ の効果についても検討し、その効果に二面性があることを明らかにした。以上より、宿主の背景が異なると、IFN- γ の効果が異なることがわかったが、詳細な機序に関しては今後の検討課題である。臨床応用で、肺線維症に有効であったとする報告はあるものの、われわれの実験結果から考慮すると、rIFN- γ を肺線維症患者に投与すると、なかには悪化させる症例が出てくる可能性もあり、臨床応用する前に、さらなる基礎的研究が必要と考える。

参考文献

- 1) Ziesche, R., E. Hofbauer, K. Wittman, V. Petkov, L. H. Block. 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: 1264-1269. 1999.
- 2) Elias, JA., B. Freundlich, JA. Kern, J. Rosenbloom. Cytokine networks in the regulation of inflammation and fibrosis in the lung. *Chest* 97: 1439-1445. 1990.
- 3) Narayanan, AS., J. Whitheny, A. Souza, G. Raghu. Effect of gamma-interferon on collagen synthesis by normal and fibrotic human lung fibroblasts. *Chest* 101 (5): 1326-31. 1992.
- 4) Hyde, DM., TS. Henderson, SN. Giri, NK. Tyler, MY. Stovall. Effect of murine gamma interferon on the cellular responses to bleomycin in mice. *Exp Lung Res* 14: 687-704. 1988.
- 5) Gurujeyalakshmi, G., SN. Giri. Molecular mechanisms of antifibrotic effect of interferon gamma in bleomycin-mouse model of lung fibrosis: Down regulation of TGF- β and procollagen I and III gene expression. *Exp Lung Res* 21: 791-808. 1995.
- 6) Edward S. Chen, Brian M. Greenlee, Marsha Will-Karp, David R. Moller. Attenuation of lung inflammation and fibrosis in interferon- γ -deficient mice after intratracheal bleomycin. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24: 545-555. 2000.

放射線肺臓炎における CD13/aminopeptidase N の役割

曾根 三郎* 谷 憲治 西岡 安彦 黄 陸平

【目的】ラット放射線肺臓炎モデルを用いて放射線肺臓炎における CD13/aminopeptidase N の役割について検討する。**【研究方法】**放射線肺臓炎モデルは 6 週齢ウイスター系ラット(約 200g)に Ward らの方法に準じて全肺に 15Gy の単回照射を行うことで作成した。放射線照射後、2, 4, 8, 18 週後に 6ml の生理食塩水にて 5 回気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い BALF を回収した。1200rpm にて遠心後、上清を -80℃ に保存した。Aminopeptidase 活性の測定には、BALF および気管支肺胞洗浄によって回収した肺胞マクロファージ (AM) を使用した。Aminopeptidase 活性は L-leucine-7-amino-4-methyl-coumarine (L-leucine-AMC) 基質の分解による比色定量法を用いて測定した。同時に AM の lysate を用いて抗 CD13 抗体による Western blotting を行い AM の CD13 発現を検討した。肺局所へのリンパ球の遊走に及ぼす CD13 の作用を検討するため、ラット脾より採取したリンパ球に対する放射線照射ラットの BALF による遊走活性を Boyden チャンバー法にて検討した。同時に、aminopeptidase 阻害剤である Bestatin を加えてリンパ球遊走活性の抑制効果を検討した。組織学的検討には、ヘマトキシリン・エオジン染色、アザン・マロリー染色を使用した。**【研究結果】**照射肺組織所見では照射 2 週目から間質の浮腫が出現し、4 週目をピークとする胞隔炎に続いて 18 週目に線維性変化を認めた。aminopeptidase 活性は非照射ラットの BALF 中にも弱いながら検出された。一方、放射線照射後 2 週から 4 週にかけて aminopeptidase 活性の上昇が見られ 4 週目でピークとなった。8 週目、18 週目ではコントロールと同程度に減少していた。次に AM の aminopeptidase 活性を検討したところ、非照射ラットの AM においても BALF 同様弱い活性が検出されたが、放射線照射後 2 週目、4 週目にはその増強が認められた。実際に CD13 が AM において発現しているか否かを検討するため AM の lysate を用いて抗 CD13 抗体による Western blotting を行ったところ、放射線照射後 4 週の AM で CD13 の高発現が確認された。BALF のリンパ球遊走活性は 4 週目で最も高くその活性は Bestatin の処理で部分的に抑制された。**【考察】**ラット放射線肺臓炎モデルにおいて、CD13/aminopeptidase N は放射線肺線維症の発症過程におけるリンパ球性胞隔炎形成にリンパ球遊走因子として重要な役割を担っていることが示唆された。

ROLE OF CD13/AMINOPEPTIDASE N IN RAT LYMPHOCYTIC ALVEOLITIS CAUSED BY THORACIC IRRADIATION

Saburo Sone, Kenji Tani, Yasuhiko Nishioka, Luping Huang

The Third Department of Internal Medicine, School of Medicine, Tokushima University

CD13/aminopeptidase N is a cell surface glycoprotein widely distributed in a variety of mammalian cells. CD13/aminopeptidase N has chemotactic activity for T lymphocytes and helps recruit lymphocytes to disease sites in pulmonary sarcoidosis. This study examined the role of CD13/aminopeptidase N on lymphocytic alveolitis in radiation-induced lung injury caused by bilateral single-dose thoracic irradiation (15Gy) in a rat model. Significantly increased aminopeptidase activity was detected in bronchoalveolar lavage fluid obtained from irradiated rats at 4 weeks after irradiation compared with the activity in unirradiated rats. Significantly higher aminopeptidase activity was detected on alveolar macrophages from irradiated rats at 2 and 4 weeks than from unirradiated rats. Western blot analysis showed increased expression of CD13/aminopeptidase N protein in alveolar macrophages from irradiated rats at 4 weeks. Chemotactic activity for normal rat lymphocytes was detected in the bronchoalveolar lavage fluid from irradiated rats at 4 weeks, and approximately sixty percent of the activity was inhibited by pretreatment of bronchoalveolar lavage fluid with bestatin, a specific aminopeptidase inhibitor. This study suggests that CD13/aminopeptidase N may be important as a lymphocyte chemoattractant in lymphocyte-mediated alveolitis in experimental radiation-induced lung injury.

はじめに

胸郭の悪性腫瘍に対する放射線治療による肺障害—線維化は、臨床上しばしば遭遇する重要な問題であり、治療を制限し予後、QOLに大きな影響を与える。その頻度は放射線を 30Gy 以上肺へ照射を行った患者の 5-15% に発症すると報告されている¹⁾。これらのことより、悪性腫瘍に対する放射線治療成績向上のためには放射線肺臓炎の病態解析および治療法の開発は重要な研究課題である。これまでに放射線照射肺においては、TNF- α 、IL-1、PDGF などの種々の可溶性因子が産生され線維化に重要な役割を果たしていると推測されているがその詳細なメカニズムは十分解明されているとは言えない²⁾。

一方、CD13/aminopeptidase N は単球—マクロファージ、好中球などの血球系の細胞ばかりでなく、線維芽細胞や内皮細胞に発現し、これらの細胞の活性化、増殖に重要な役割をもつ細胞表面膜蛋白である³⁻¹⁰⁾。我々は CD13/aminopeptidase N が肺サルコイドーシスにおいてリンパ球遊走因子として働いていることを報告してきた¹¹⁾。

今回ラット放射線肺臓炎モデルにおけるリンパ球性胞隔炎における CD13/aminopeptidase N の役割について検討した。

対象と方法

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

放射線照射後、2、4、8、18 週後に 6ml の生理食塩水にて 5 回気管支肺胞洗浄を行い BALF を回収した。1200rpm にて遠心後、上清を -80°C に保存した。

Aminopeptidase 活性は L-leucine-7-amino-4-methylcoumarine (L-leucine-AMC) 基質の分解による比色定量法を用いて測定した。BALF の aminopeptidase 活性および BAL 細胞から付着操作にて回収した

AM の aminopeptidase 活性を測定した。同時に AM の lysate を用いて抗 CD13 抗体を用いた Western blott 法にて CD13 発現を検討した。肺局所へのリンパ球の遊走に及ぼす CD13 の作用を検討するため、ラット脾より採取したリンパ球を用いて放射線照射ラットの BALF によるリンパ球遊走活性を Boyden チャンバーを用いて検討した。同時に、aminopeptidase 阻害剤である Bestatin を加えてリンパ球遊走活性の抑制効果を検討した。組織学的検討には、ヘマトキシリン・エオジン染色、アザン・マロリー染色を使用した。

結 果

照射肺組織所見では照射 2 週目から間質の浮腫が出現し、4 週目をピークとする胞隔炎 (Figure 1) に続いて 18 週目に線維性変化を認めた。

Aminopeptidase 活性は非照射ラットの BALF 中にも弱いながら検出された。一方、放射線照射後 2 週から 4 週にかけて aminopeptidase 活性の上昇が見られ 4 週目でピークとなったがその後 8 週目、18 週目ではコントロールと同程度に減少していた (Figure 2)。AM の aminopeptidase 活性の検討では、BALF 同様非照射ラットの AM においても弱い活性が検出されたが、放射線照射後 2 週目、4 週目の AM で高い活性が検出された (Figure 3)。実際に CD13 が AM において発現しているか否かを検討す

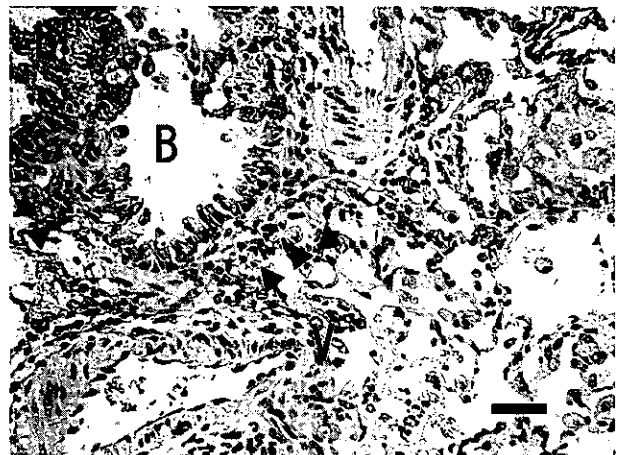


Figure 1 Photographs of lung specimens obtained from irradiated rats at 4 weeks. Irradiated rats at 4 weeks, the inflammatory cells, such as lymphocytes, macrophages and neutrophils infiltrated in the alveolar walls, the alveolar exuded and minimal fibrous thickened in alveolar walls are observed (H&E; original magnification: $\times 200$). Clusters of lymphocytes (arrow heads), bronchus (B), and vessel (V) are shown. Bar=50 μ m.

徳島大学医学部第三内科

* びまん性肺疾患研究班 分担研究者

るため放射線照射後4週のAMのlysateを用いて抗CD13抗体によるWestern blottingを行ったところ、CD13を示す約150kDaのバンドが検出された (Figure 4).

また放射線照射後のBALF中のリンパ球数を経時的に計測したところ、放射線照射後4週でリンパ球数の著増が認められた (Figure 5).

BALFのリンパ球遊走活性は4週目で最も高くその活性はBestatinの処理で部分的に抑制された (Figure 6).

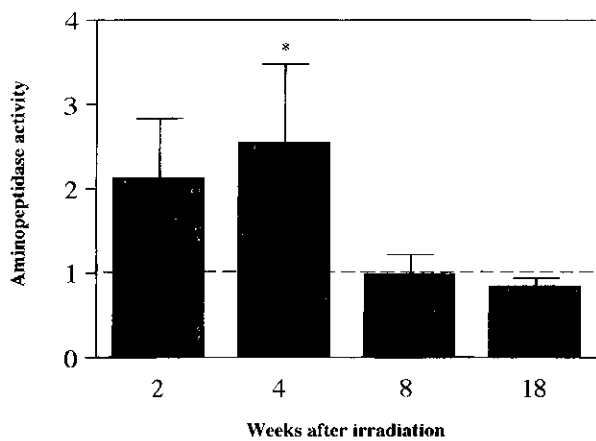


Figure 2 Aminopeptidase activity in BALF from unirradiated and irradiated rats at 2, 4, 8 and 18 weeks. Aminopeptidase activity was assayed fluorometrically with L-leucine-AMC as a substrate as described in Materials and Methods. Aminopeptidase activity was expressed as the ratio of irradiated rats to unirradiated rats. Results are expressed as mean ± SEM, with n=5 in each group. * indicates statistically significant ($p < 0.05$) differences from the value of unirradiated rats.

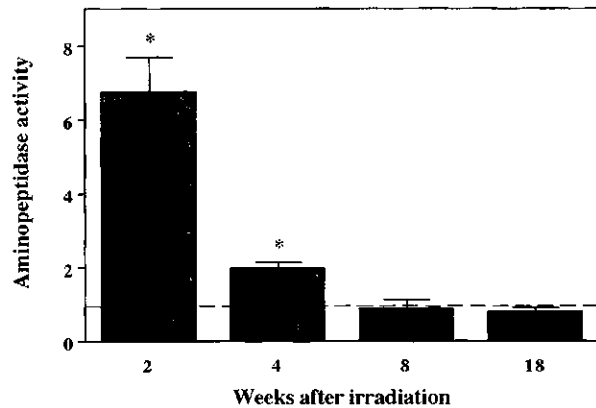


Figure 3 Aminopeptidase activity on AM from unirradiated and irradiated rats at 2, 4, 8 and 18 weeks. Aminopeptidase activity was assayed fluorometrically with L-leucine-AMC as a substrate as described in Materials and Methods. Aminopeptidase activity was expressed as the ratio of irradiated rats to unirradiated rats. Results are expressed as mean ± SEM, with n=5 in each group. * indicates statistically significant ($p < 0.05$) differences from the value of unirradiated rats.

考察・結論

CD13/aminopeptidase Nは、血球系細胞、線維芽細胞、内皮細胞の細胞表面に発現する膜蛋白で、細胞増殖や活性化に関与していることが報告されている。我々はサルコイドーシス患者のBALF中にCD13/aminopeptidase N活性が見られ、Tリンパ球に対する遊走因子として働いていることを報告してきた¹¹⁾。

一方、ラット放射線肺臓炎モデルを用いた今回の検討から、放射線照射後2週目、4週目のBALF中にaminopeptidase活性が検出されることが明らかとなった。一般にaminopeptidase familyには、leucin aminopeptidase、CD13/aminopeptidase Nおよびcystyl aminopeptidaseがある¹²⁾。今回aminopeptidase活性測定の際として用いたL-leucine-AMCはleucin aminopeptidaseおよびCD13/aminopeptidase

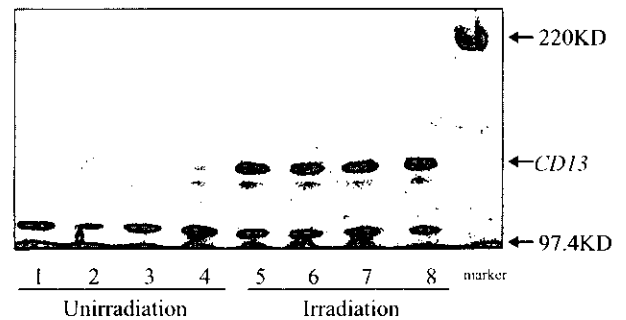


Figure 4 The expression of CD13/aminopeptidase N protein in AM from unirradiated and irradiated rats at 4 weeks by Western blotting using a polyclonal anti-rat CD13 antibody. Lanes 1 to 4 contain lysates of AM from unirradiated rats, and lanes 5 to 8 contain lysates from irradiated rats.

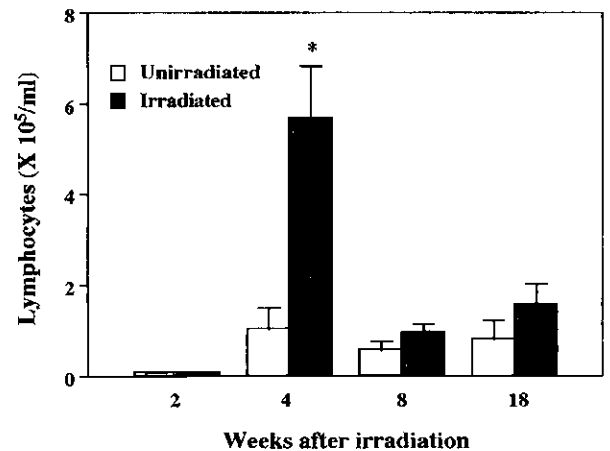


Figure 5 Time course of lymphocytes. Results are expressed as mean ± SEM, with n=5 in each group. * indicates statistically significant ($p < 0.05$) differences from the value of unirradiated rats.

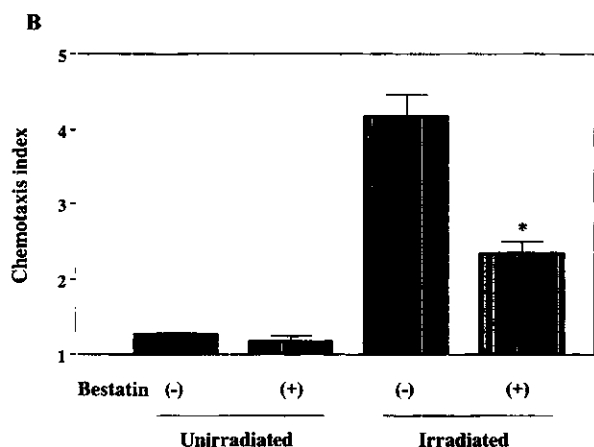


Figure 6 Effect of bestatin on aminopeptidase activity and chemotactic activity for lymphocytes in BALF. (A) The BALF from irradiated rats at 4 weeks was preincubated with an equal volume of bestatin solution (500 μ g/ml) or medium alone at 37 $^{\circ}$ C for 60 min. The solution was then assayed for enzymatic activity of aminopeptidase fluorometrically with L-leucine-AMC as a substrate as described in Materials and Methods. Results are expressed as mean \pm SEM. Experiments were repeated three times with different samples (n=3). *indicates statistically significant ($p<0.05$) differences from the value of medium control.

(B) Effect of bestatin on chemotactic activity for lymphocytes in BALF. The BALF from unirradiated rats and irradiated rats at 4 weeks was preincubated with an equal volume of bestatin solution (500 μ g/ml) or medium alone at 37 $^{\circ}$ C for 60 min. The solution was then tested for chemotactic activity for lymphocytes as described in Materials and Methods. Experiments were repeated three times with cells from different rats (n=3). Results are expressed as mean \pm SEM. *indicates statistically significant ($p<0.05$) differences from the value of untreated samples.

Nにより分解される¹⁴⁾。しかしながら、肺における主要な aminopeptidase は CD13/aminopeptidase N であることが報告されており¹⁵⁾、従って今回放射線照射ラットの BALF 中で増加が見られた aminopeptidase 活性は CD13/aminopeptidase N である可能性が高い。また、放射線照射後の AM を用いた検討でも、照射 2 週目、4 週目の AM に aminopeptidase 活性の増加が認められた。しかしながら、BALF における aminopeptidase 活性のピークが 4 週目であるのに対し、AM のそれは 2 週目の方が高値を示し時間経過が一致しなかった。CD13 を産生する細胞としては AM のほか、線維芽細胞、肉皮や上皮細胞が知られており、これらの細胞から産生される CD13/aminopeptidase N が BALF 中の aminopeptidase 活性に関与していた可能性もある。しかしながら、抗 CD13 抗体を用いた Western blotting による検討で、放射線照射ラット AM の lysate で CD13 発現を示す約 150kDa のバンドが増強していたことから、少なくとも AM は大量の

CD13 を発現していることが証明された。

また、放射線照射ラットの BALF による脾リンパ球に対する遊走実験から、照射後 4 週の BALF には非照射ラットの BALF に比し有意に高いリンパ球遊走活性が認められた。さらに、この BALF を Bestatin で前処理することでリンパ球遊走活性が約 60% 抑制されたことから、BALF によるリンパ球遊走活性には aminopeptidase が重要な役割をしていることが示唆された。しかし、リンパ球遊走活性の抑制効果は部分的であったことから、aminopeptidase 以外の因子が関与していることが推測される。実際に、放射線肺臓炎モデル肺において IL-4¹⁶⁾、RANTES や MCP-1 の発現増強¹⁷⁾ が報告されており、これら以外のケモカインやサイトカインを含めた詳細な検討が必要と思われる。

以上より、CD13/aminopeptidase N は、放射線肺臓炎におけるリンパ球形細胞隔炎においてリンパ球遊走因子として重要な役割を果たしていることが示唆された。

参考文献

- 1) E. Cameron and R. Crystal, Radiation-induced lung injury. In Crystal RG, West JB, Weibel ER, Barnes PJ, eds, *The Lung* 2nd ed. Lippincot-Raven Publishers, New York. 1997:2647-2651.
- 2) C. J. Johnston, B. Piedboeuf, P. Rubin, J. P. Williams, R. Baggs, and J. N. Finkelstein, Early and persistent alterations in the expression of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta and tumor necrosis factor alpha mRNA levels in fibrosis-resistant and sensitive mice after thoracic irradiation. *Radiat. Res.* 145, 762-767 (1996).
- 3) A. T. Look, R. A. Ashmun, L. H. Shapiro, and S. C. Peiper, Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp 150) is identical to aminopeptidase N. *J. Clin. Invest.* 83, 1299-1307 (1989).
- 4) J. Olsen, G. M. Cowell, E. Konigshofer, E. M. Danielsen, J. Moller, L. Laustsen, O. C. Hansen, K. G. Welinder, J. Engberg, W. Hunziker, M. Spiess, H. Sjostrom, and O. Noren, Complete amino acid sequence of human intestinal

- aminopeptidase N as deduced from cloned cDNA. *FEBS Lett* 238, 307-314 (1988).
- 5) C. A. Harris, B. Hunte, M. R. Krauss, A. Taylor, and L. B. Epstein, Induction of leucine aminopeptidase by Interferon-gamma. *J. Biol. Chem.* 267, 6865-6869 (1992).
- 6) E. J. Favalaro, CD13 (gp150; aminopeptidase N) : Co-expression on endothelial and haemopoietic cells with conservation of functional activity. *Immunol. Cell. Biol.* 69, 253-260 (1991).
- 7) G. P. Smith, R. R. Macgregor, and T. J. Peters, Subcellular localisation of leucine aminopeptidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Biochem. Biophys. Acta.* 728, 222-227 (1983).
- 8) J. J. Turek, and J. P. Robinson, Leucine aminopeptidase activity by flow cytometry. *Methods Cell. Biol.* 41, 461-467 (1994).
- 9) A. E. Koch, J. C. Burrows, A. Skoutelis, R. Marder, P. H. Domer, B. Anderson, and S. J. Leibovich, Monoclonal antibodies detect monocyte/macrophage activation and differentiation antigens and identify functionally distinct subpopulations of human rheumatoid synovial tissue macrophages. *Am. J. Pathol.* 138, 165-173 (1991).
- 10) A. A. Amoscato, J. W. Alexander, and G. F. Babcock, Surface aminopeptidase activity of human lymphocytes. I. Biochemical and biologic properties of intact cells. *J. Immunol.* 142, 1245-1252 (1989).
- 11) K. Tani, F. Ogushi, L. Huang, T. Kawano, H. Tada, N. Hariguchi, and S. Sone, CD13/aminopeptidase N, a novel chemoattractant for T lymphocytes in pulmonary sarcoidosis. *Am. J. Respir Crit Care Med.* 161, 1636-1642 (2000).
- 12) H. E. Ward, L. Kemsley, L. Davies, M. Holecek, and N. Berend, The pulmonary response to sublethal thoracic irradiation in the rat. *Radiat. Res.* 136, 15-21 (1993).
- 13) G. J. Sanderink, Y. Artur, and G. Siest, Human aminopeptidases: a review of the literature. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 26, 795-807 (1988).
- 14) P. T. W. Van Hal, J. P. M. Hopstaken-Broos, J. M. Wijkhuijs, A. A. Te Velde, C. G. Figdor, and H. C. Hoogsteden, Regulation of aminopeptidase-N (CD13) and FcεRIIb (CD23) expression by IL-4 depends on the stage of maturation of monocytes/macrophages. *J. Immunol.* 149, 1395-1401 (1992).
- 15) K. Tani, S. Yasuoka, F. Ogushi, Y. Noda, K. Asada, T. Ozaki, and T. Ogura, Fibroblast growth-stimulating activity in bronchoalveolar lavage fluid of patients with pulmonary sarcoidosis. *Jpn. J. Med.* 29, 576-582 (1990).
- 16) C. Buttner, A. Skupin, T. Reimann, E. P. Rieber, G. Unteregger, P. Geyer, and K. H. Frank, Local production of interleukin-4 during radiation-induced pneumonitis and pulmonary fibrosis in rats: macrophages as a prominent source of interleukin-4. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 17, 315-325 (1997).
- 17) C. J. Johnston, T. W. Wright, P. Rubin, and J. N. Finkelstein, Alterations in the expression of chemokine mRNA levels in fibrosis-resistant and -sensitive mice after thoracic irradiation. *Exp. Lung Res.* 24, 321-337 (1998).

実験的ブレオマイシン肺線維症における エラスターゼ活性をもつ MMP の発現

白杵 二郎 松田久仁子 青山 昭徳 吾妻安良太
工藤 翔二*

間質性肺炎・肺線維症は、膠原線維や弾性線維など細胞外基質の量的、質的变化を特徴とする。matrix metalloproteinase (MMP) は細胞外基質の分解を担う主要な酵素であり、多くの種類の酵素を含む。しかし、間質性肺炎における MMP の役割は gelatinase 以外、ほとんど不明である。本研究では実験的肺線維症において、弾性線維の主成分であるエラスチンを基質とする MMP の発現を経時的に観察し、その役割を検討した。

マウスにブレオマイシンを経静脈的に投与後経時的に肺を摘除し、組織学的・生化学的観察を行った。組織学的には MMP-7, -9, -12 と TIMP-2 について免疫染色を行った。生化学的には、肺組織の全 elastase 活性を測定した。また BALF 中のマクロファージを分離し、その MMP-12 mRNA 発現を半定量的に解析した。その結果、経静脈的ブレオマイシン投与では、胸膜下を中心に線維化を生じた。MMP-9 は比較的早期に線維化部のマクロファージ、細胞外基質に分布した。一方 MMP-12 の発現はタンパク、mRNA レベル共により遅く、14 日目以降に増加し、その分布は線維化部に再生した弾性線維と一致していた。以上の結果より、MMP のうち特に MMP-9 と MMP-12 では発現の時期・役割が異なり、MMP-9 は急性期の肺傷害に主に関与し、MMP-12 は線維化期の弾性線維の分解・再生に関与していることが示唆された。

Expression of elastolytic matrix metalloproteinases in bleomycin-induced pulmonary fibrosis

Jiro Usuki, Kuniko Matsuda, Akinori Aoyama, Arata Azuma, Shoji Kudoh

Fourth Department of Internal Medicine, Nippon Medical School

Pulmonary fibrosis is characterized by remodeling of extracellular matrix (ECM) in the lung. Matrix metalloproteinases (MMPs) family consists of many kinds of enzymes which are potent proteases degrading a number of ECM components. Despite their potential importance, little is known about the roles of these enzymes in pulmonary fibrosis. In this study, we investigated the sequential expression of elastolytic MMPs in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. Lung fibrosis was induced in mice by a single intravenous injection of bleomycin. At several phases following bleomycin, mice were sacrificed. We did biochemical and histological studies including immunohistochemistry for MMP-7, -9, -12, and TIMP-2. Semiquantitative real-time RT-PCR analysis was also applied to compare mRNA expression of MMP-12 with alveolar macrophages from bronchoalveolar lavage fluids. Pulmonary fibrosis was induced mainly in subpleural areas of the lung by a single intravenous injection of bleomycin. At early phase of fibrosis, immunohistochemical staining showed that MMP-9, known also as an elastase, was highly expressed in macrophages and ECM at damaged areas. In contrast, both mRNA and protein of MMP-12 were upregulated at later phase. At 28 days following bleomycin, immunoreaction for MMP-12 was colocalized with regenerating elastic fibers in fibrotic lesions. These data indicate different expression and roles between MMP-9 and MMP-12 in pulmonary fibrosis. MMP-9 is possibly associated with the lung injury at acute phase. In contrast, MMP-12 may contribute to elastin degradation at later phase of pulmonary fibrosis.

はじめに

特発性肺線維症をはじめとして、間質性肺炎・肺線維症は、膠原線維や弾性線維など細胞外基質の量的、質的変化を特徴とする。matrix metalloproteinase (MMP) は、細胞外においてこれら細胞外基質の分解を担う主要な酵素である。間質性肺炎・肺線維症においては、MMP およびその共通した阻害物質である TIMP の発現の変化が、病態や予後に大きく関与することが示されており¹⁾、今後の治療戦略の一つとして、MMP の誘導や阻害の可能性を示している。しかし MMP は多くの酵素からなるファミリーを形成しており、各酵素の肺線維症における役割はゼラチナーゼ群やコラゲナーゼ群など一部を除きほとんどわかっていないのが現状である。

肺は弾性線維を豊富に含む臓器であり、弾性線維の主要成分であるエラスチンを基質とするエラスターゼ MMP (MMP-2, -7, -9, -12) の肺線維症における役割を解析することは重要と考えられる。そこで本研究では、プレオマイシンによる実験的肺線維症を用い、各種エラスターゼ MMP の発現を経時的に観察し、解析を試みた。

対象と方法

7 週齢雄、C57BL/6 マウスにプレオマイシン 100mg/kg を経静脈投与。投与後 1, 7, 14, 28 日目にエーテル麻酔下に脱血し、肺を摘出した。片側肺は 10% 中性緩衝ホルマリンにより灌流固定後、パラフィン包埋とし、組織学的観察に用いた。対側肺はそのまま急速に凍結し、エラスターゼ活性測定に供した。対照として、プレオマイシンの代わりに生理食塩水を投与した。また別の個体において、屠殺直後に気管内にチューブを挿入し、両肺より生理食塩水 1ml × 3 回で気管支肺胞洗浄を行った。回収した気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中を遠沈し、細胞分画をガラス板上にて付着させマクロファージを分離した。

組織学的検討には、H-E, Masson's trichrome,

Victoria blue の各染色を行った。また MMP-7, -9, -12 と TIMP-2 について ABC 法を用い免疫組織化学的検討を行った。特に MMP-12 と弾性線維の分布を比較するため、同一切片上で MMP-12 の免疫染色を行った後、Victoria blue 染色を行った。

エラスターゼ活性は摘除凍結後の肺組織をホモジェナイズし、EnzChek elastase assay kit (Molecular Probes 社) を用い、肺組織の全エラスターゼ活性を、蛍光マイクロプレートリーダーにて測定した。なお本 kit により測定される活性は、MMP のみならず、好中球エラスターゼなど他のエラスターゼ活性も含まれる。

MMP-12 mRNA 測定は、BALF 中のマクロファージを分離し、抽出した全 RNA より cDNA を作成。蛍光標識の TaqMan probe を用いた半定量的 real-time PCR を行った。MMP-12 mRNA の発現は、同一サンプルにおける GAPDH mRNA との比により評価した。

結 果

経静脈的プレオマイシン投与により、胸膜下を中心に胞隔炎および線維化を生じた。投与後 7 日目には炎症細胞浸潤が目立ち、肺胞壁の弾性線維の破壊がみられた。7 日目以降、病変部に膠原線維の増加を認めた。投与後 28 日目には線維化巣は胸膜陥入を伴う瘢痕様となり、この中に Victoria blue 染色により示される再生弾性線維 (elastosis) もみられた。

免疫組織化学による染色性を、線維化巣のマクロファージと細胞外基質に分け半定量した結果を表 1 に示す。MMP-9 は、7 日目をピークに比較的早期にマクロファージや細胞外基質に分布し (図 1)、投与後 14 から 28 日目にはその染色性は低下していった。一方 MMP-12 は他の MMP と異なり、プレオマイシン投与後 14 日目以降発現が増加し、特に 28 日目には線維化巣に強く陽性となった (図 2)。投与後 28 日目の MMP-12 と Victoria blue の二重染色では、MMP-12 の分布は線維化部の再生弾性線維の分布とほぼ一致していた。MMP-7 は 28 日目にマクロファージに陽性を示したが、線維化巣の細胞外基質には各時期とも反応性は乏しかった。TIMP-2 は投与後 1 日目のマクロファージに陽性を示したが、以降の反応は弱かった。

日本医科大学第四内科

* びまん性肺疾患研究班 主任研究者

表1 免疫組織化学的検討 (MMP-7, -9, -12, TIMP-2)

Macrophages in fibrotic lesions				
	Day1	Day7	Day14	Day28
MMP-7	--~±	--~±	±~+	+
MMP-9	--~+	+~++	--~±	--~±
MMP-12	--~±	--~±	±~+	++
TIMP-2	+	--~+	--~±	--~±

ECMs in fibrotic lesions				
	Day1	Day7	Day14	Day28
MMP-7	NE	-	--~±	-
MMP-9	NE	±~+	--~±	--~±
MMP-12	NE	-	±~+	+~++
TIMP-2	NE	-	-	-

- no reaction; ± mild staining; + intermediate staining; ++ intense staining; NE not evaluable

MMP-12 の染色性が急増する投与後 28 日目の全肺組織のエラスターゼ活性を対照群と比較した。ブレオマイシン投与群は対照群に比しやや高い傾向を示したが、有意差は得られなかった(表2)。

BALF 中のマクロファージにおける MMP-12 mRNA の発現は、ブレオマイシン投与後 7 日目までは、投与前のマウスと比較しほとんど同等であった。しかし、14 日目および 28 日目には著増を示した(図3)。

表2 エラスターゼ活性 (ブレオマイシン投与後 28 日目)

Bleomycin-treated	6.72±3.04] N.S.
Control	6.07±2.40	

エステラーゼ活性は相当するブタ膵臓のエステラーゼ活性で示す (10⁴U/ml)。

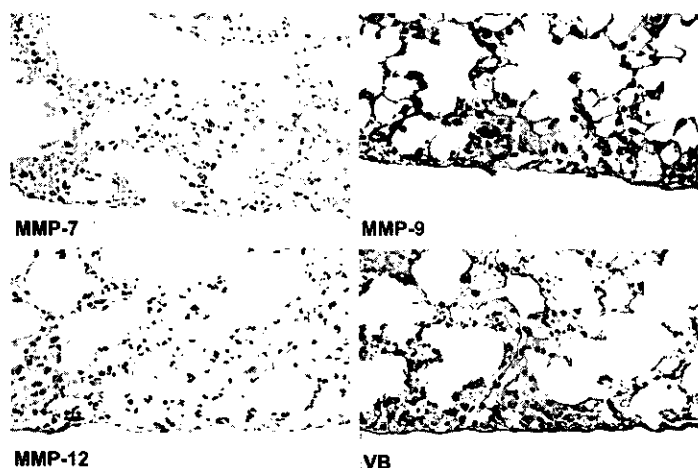


図1 ブレオマイシン投与後 7 日目

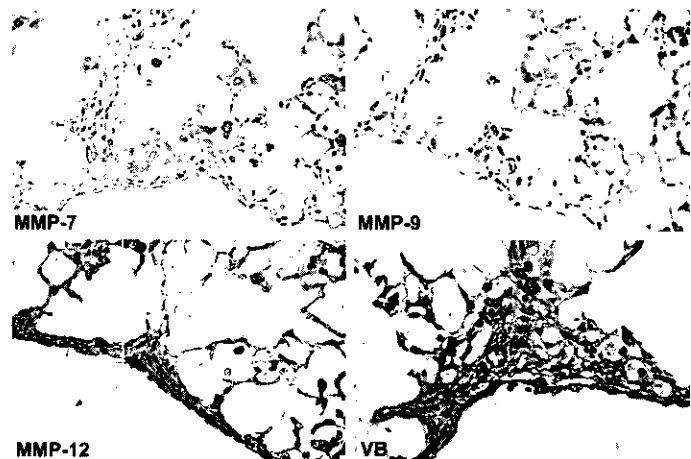


図2 ブレオマイシン投与後 28 日目
*は elastosis を示す (Victoria blue 染色)。

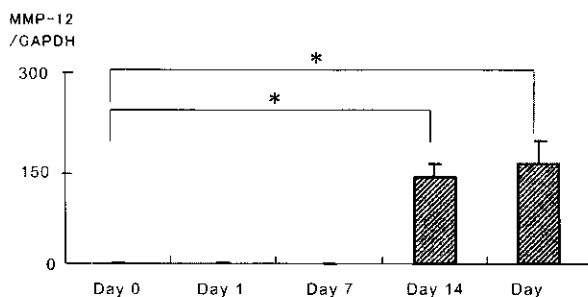


図3 BALFマクロファージにおける MMP-12 mRNA 発現
投与前 (Day 0) の MMP-12/GAPDH を 1 とした場合の値を示す (*p<0.05)

考案

今回の結果からエラスターゼ活性を持つ MMP の発現は一様でなく、特に MMP-9 と MMP-12 ではその発現時期が明らかに異なっていることが判った。MMP-9 はゼラチナーゼ B ともいわれ、基底膜の主成分である IV 型コラーゲンも基質とする。ゼラチナーゼは基底膜分解を通して早期の肺傷害に関与すると考えられてきたが、本研究の結果はこれまでの知見と一致する。さらに MMP-9 の発現に一致して肺胞壁の弾性線維の断裂が認められたことから、本酵素は肺胞壁の弾性線維の傷害にも関与する可能性が示唆された。

MMP-12 はマトリックスメタロエラスターゼともいわれ、その名の通りエラスチンが主要な基質であるが、これまで肺線維症における役割は不明

であった。今回の結果より、弾性線維の再生と部位および時期が一致して発現が見られたこと、またプレオマイシン投与後28日以降、線維化巣は次第に縮小していくことが知られていることをあわせ、MMP-12は弾性線維の再生や分解に関わると考えられる。プレオマイシン肺線維症における癆痕様線維化巣では、電顕的に異常な形態の弾性線維が見られることも知られており⁶⁾、その形成とMMP-12の作用との関係に興味をもたれる。一方皮膚の光線傷害によるelastosis部においても、弾性線維の増加に一致しMMP-12の発現が増加することが報告されており⁷⁾、肺線維化と共通の病態が関与しているものと考えられる。またヒト肺線維症においては、膠原線維をはじめとする過剰な細胞外基質の処理にMMPが働き、MMP/TIMPのバランスが予後を決する重要な因子となることが報告されている^{3,5)}。これらは、MMP-12が過剰な再生弾性線維の分解を担う可能性を間接的に支持するものである。

今回の結果から、一つの病態においてもMMPの種類により、その発現が一様でないことが示唆された。生体内でのMMPは、大きく遺伝子レベル(転写・翻訳)、潜在型の活性化、そして阻害物質であるTIMPによる3段階の調節を受けると考えられる。本研究は、少なくとも肺胞マクロファージにおいて、MMPタンパク発現以前のレベルで、MMP間で異なった反応を生じることを示した。この傾向は特にMMP-9とMMP-12の間で目立った。MMPの発現は一般に、TNF- α やIL-1 β などの炎症性サイトカインにより増加し、TGF- β といった線維化を促進するサイトカインにより抑制されるといわれている。MMP-12発現調節機構については、その遺伝子のプロモーター領域に、転写因子のAP-1とEtsの結合部位が存在することが知られている。またTGF- β の下流であるSmad3がAP-1結合部位を介してMMP-12の発現を抑制することも報告されている⁸⁾。今後は*vivo*においても、各MMPの発現の調節機構について検討する必要があると考えられる。

本実験の結果がヒトの肺線維症にそのままあてはまるかは疑問であるが、病態には共通した点も多い。今後MMP阻害剤などMMPを標的とした治療を考える際、細胞ごと、MMPごとにその影響を

評価することが重要になるとと思われる。

文 献

- 1) Hayashi T, Stetler-Stevenson WG, Fleming MV, Fishback N, Koss MN, Liotta LA, Ferrans VJ, Travis WD. : Immunohistochemical study of metalloproteinases and their tissue inhibitors in the lungs of patients with diffuse alveolar damage and idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 149, 1241-56, 1996
- 2) Swiderski RE, Dencoff JE, Floerchinger CS, Shapiro SD, Hunninghake GW. : Differential expression of extracellular matrix remodeling genes in a murine model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 152, 821-8, 1998
- 3) Fukuda Y, Ishizaki M, Kudoh S, Kitaichi M, Yamanaka N. : Localization of matrix metalloproteinases-1, -2, and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in interstitial lung diseases. *Lab Invest* 78, 687-98, 1998
- 4) Selman M, Ruiz V, Cabrera S, Segura L, Ramirez R, Barrios R, Pardo A. : TIMP-1, -2, -3, and -4 in idiopathic pulmonary fibrosis. A prevailing nondegradative lung microenvironment? *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L562-74, 2000
- 5) Suga M, Iyonaga K, Okamoto T, Gushima Y, Miyakawa H, Akaike T, Ando M. : Characteristic elevation of matrix metalloproteinase activity in idiopathic interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 162, 1949-56, 2000
- 6) Usuki J, Fukuda Y: Evolution of three patterns of intra-alveolar fibrosis produced by bleomycin in rats. *Pathol Int* 45, 552-64, 1995
- 7) Saarialho-Kere U, Kerkela E, Jeskanen L, Hasan T, Pierce R, Starcher B, Raudasoja R, Ranki A, Oikarinen A, Vaalamo M: Accumulation of matrilysin (MMP-7) and macrophage metalloelastase (MMP-12) in actinic damage. *J Invest Dermatol* 113, 664-72, 1999
- 8) Feinberg MW, Jain MK, Werner F, Sibinga NE, Wiesel P, Wang H, Topper JN, Perrella MA, Lee ME: Transforming growth factor-beta 1 inhibits

cytokine-mediated induction of human
metalloelastase in macrophages. J Biol Chem 275:
25766-25773, 2000

NSIP, COP/BOOP のモデルとしての matrix metalloproteinase-2 ノックアウトマウスにおけるブレオマイシン肺線維症

福田 悠*

間質性肺炎における線維化は常に肺胞腔内に形成され、再生肺胞上皮または気管支由来上皮に覆われる。また、活性化 MMP-2 が、間質性肺炎の肺胞治癒および胎生肺の肺胞形成過程に重要であることが示唆されている。このような背景から、MMP-2 のノックアウト (KO) マウスと野生型マウスのブレオマイシン肺モデルを作成し、観察した。ブレオマイシンを経気道的に投与し、経時的に屠殺した。電顕的検索、MMP-2、ケラチン、PCNA、フィブロネクチンに対する免疫組織化学を行った。線維化の程度は Ashcroft 法および肺組織のヒドロキシプロリン定量により検討した。MMP-2 の活性化はウエスタンブロッティングとゲラチンゼイモグラフィにより解析した。線維化の程度は、両群で同様であった。肺胞上皮の増生は両群で同様であったが、上皮による腔内線維化の被覆は KO マウスで優位に遅延していた。KO マウスでは、基底膜からの初期の上皮細胞の分離、細胞移動が阻止されているものと考えられる。KO マウスでは、腔内線維化の型は壁在型主体で、ポリープ型は少なかった。その理由は、腔内線維化の上皮による被覆が遅いことによると考えられる。この結果は、ヒトの疾患および実験モデルの両者ともに、NSIP 型病変は肺胞腔内線維化を覆う肺胞上皮の再生が、COP/BOOP 病変に比べより悪いときに形成されることが確認された。

Bleomycin treated lung fibrosis in MMP-2 KO mice as a model of NSIP and COP/BOOP

Yuh Fukuda

Department of Pathology, Nippon Medical School

Fibrosis in interstitial pneumonia is usually formed in intraalveolar spaces and covered by regenerated alveolar or bronchogenic epithelial cells. In addition to that, activated MMP-2 is suggested to be important to the process of alveolar repair in interstitial pneumonia and the alveolization in fetal lungs. In this context, we investigated the bleomycin lungs in MMP-2 KO and wild mice. After intratracheal administration of bleomycin to mice, animals were sequentially sacrificed. Electron microscopic studies and immunohistochemistry for MMP-2, keratin, PCNA, fibronectin were performed. The degree of fibrosis was quantified by Ashcroft's method and the amount of hydroxyproline in lung tissues. Active form of MMP-2 of lung homogenates was analyzed with Western blotting and gelatin zymography. Degree of fibrosis was similarly observed in both KO and wild mice. Type II alveolar epithelial cell coverage on intraalveolar fibrosis was markedly less observed in KO mice, though the rate of proliferation of alveolar epithelial cells was similar in KO and wild mice. The initial detachment of alveolar epithelial cells from basement membrane and the migration may be blocked in KO mice. Intraalveolar fibrosis in KO mice was mainly mural incorporation and obliteration types, but bud type was less prominent than wild mice, because of the retarded alveolar epithelial cell coverage on intraalveolar fibrosis. This result confirmed that NSIP pattern is formed in the situation of less regeneration of alveolar epithelial cells on intraalveolar fibrosis compared to COP/BOOP pattern in both human diseases and experimental models.

はじめに

臨床的に非特異的間質性肺炎 (NSIP) と器質化肺炎型間質性肺炎 (COP/BOOP) は類似しており, 移行例の報告もみられる. 病理学的にこの2疾患は, 肺胞上皮傷害の後に出現する腔内線維化の型の違いにより形成されることが示唆されている. すなわち, 上皮傷害の軽い場合, ポリープ型の腔内線維化が形成され COP/BOOP パターンとなり, 重い場合には, 壁在型, 閉塞型の腔内線維化が形成され NSIP パターンになると考えられる¹⁾. また, 実験的プレオマイシン肺線維症でも COP/BOOP, NSIP にみられるポリープ型, 壁在型, 閉塞型の腔内線維化が認められることが明らかにされている²⁾. 一方, IV 型コラゲナーゼである matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) は, 肺胞上皮細胞の再生, 移動に重要なマトリックスプロテアーゼであることが示唆されている^{3,4)}. MMP-2 ノックアウトマウス (KO) と野生型マウス (WT) におけるプレオマイシン肺線維症を, 腔内線維化の型の違いに注目し検索することにより, COP/BOOP, NSIP の病態解析をさらに深化させる.

材料と方法

MMP-2 KO マウスは理化学研究所の糸原重美博士より供与を受けた⁵⁾. ヘテロ同士の掛け合わせにより繁殖させ, KO, WT とヘテロマウスを得た. KO マウスの MMP-2 遺伝子の「プロモーター領域からエクソン 1」は pgk-Neo gene により置き換えられている. すべての動物を PCR により型分けをして, ヘテロマウスは繁殖用に, KO と WT マウスを実験に用いた. マウスの気道よりプレオマイシンを投与して 1 週から 6 週後に経時的に屠殺した. 肺組織について光顕的に, HE 染色, Elastica Masson 染色, Alcian blue PAS 染色を行い観察した. 抗 MMP-2 抗体, 抗ケラチン抗体, 抗 α 平滑筋アクチン抗体, 抗フィブロネクチン抗体, 抗 PCNA 抗体を用い, 免疫組織化学的に観察した. 透過型電顕により, 各ステージの超微形態を観察した. また, 生

凍結の肺組織について gelatin zymography, WT マウスには抗 MMP-2 抗体による Western blotting を行った. 線維化の程度は, 光顕的組織切片における Ashcroft 法, 生凍結組織中のヒドロキシプロリンを定量した.

結 果

肺組織の gelatin zymography では, KO マウスの MMP-2 の欠損が確認された. 0 週肺では, 淡い MMP-9 のバンドがみられ, 1 週から 3 週では MMP-9 の増加がみられた. gelatin zymography と Western blotting の観察により, WT では 0 週に比し MMP-2 の増加とその活性型の増加が 1 週から 6 週にかけて観察された.

線維化の程度は, KO と WT で, Ashcroft 法, ヒドロキシプロリンの定量ともに 2 週目からその増加が確認されたが, KO と WT にその有意差は認められなかった. また, 肺胞領域の細気管支化も両者に差がなく観察された (図 1). しかし, Elastica Masson 染色による観察では, 5, 6 週で, 両者に腔内線維化の型に差が認められた. すなわち, WT に比べ, KO では優位に壁在型, 閉塞型の腔内線維化が多く, ポリープ型の腔内線維化はすくなかった (図 2). また, ポリープ型の腔内線維化の終末像であるコラーゲン球は WT に優位に多く観察された.

免疫組織化学的に, WT において MMP-2 は再生増生した肺胞上皮細胞に陽性であった. フィブロネクチンは, 各動物の肺胞腔内線維化部に KO, WT

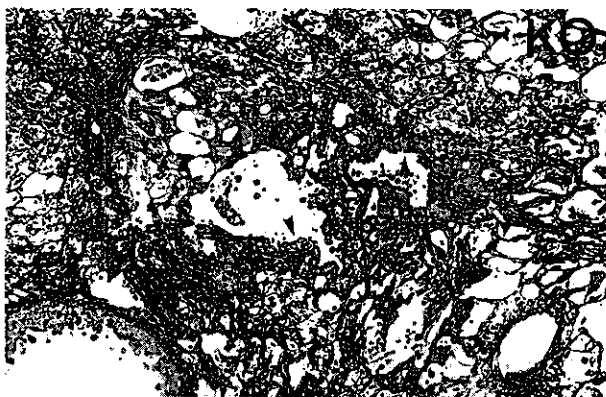


図 1 KO マウス 3 週目で, 肺胞領域への細気管支上皮の侵入像, すなわち肺胞領域の細気管支化 (矢頭) が観察される. 細気管支化は WT と KO マウスで同様に観察された. (PAM 染色)

日本医科大学第一病理学教室

* びまん性肺疾患研究班 研究協力者

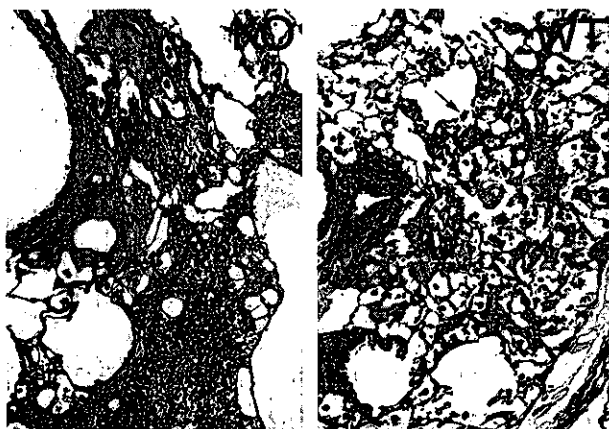


図2 6週目で、KOでは壁在型、閉塞型の腔内線維化(*)が多く認められる。NSIPパターンをしめす。WTでは、ポリープ型の腔内線維化(*)が目立つ部分がある。同部は、COP/BOOPパターンをしめす。一部では、コラーゲン球(矢印)をみる。

の両者に差がなく沈着していた。 α 平滑筋アクチン陽性の筋線維芽細胞も、肺胞腔内線維化部に両者に差がなく散在性に認められた。抗PCNA抗体による増生細胞は、肺胞領域の細気管支化、再生肺胞上皮細胞、肺胞腔内筋線維芽細胞に陽性であり、両者に差は認められなかった。抗ケラチン抗体による観察でより明らかとなったが、ケラチン陽性の上皮細胞の分布では、0週、1週、2週ではその差は認めないが、3週、4週ではWTではほぼ肺胞腔内線維化部が被覆されているのに対して、KOでは、多くの線維化部分が被覆されておらず、代わりにマクロファージに被われていた。

電顕的観察では、特に3週目において、その差があきらかであった。すなわち、KOでは、多くの場所で、腔内線維化はむき出しになっており、所々でマクロファージの付着が観察された。線維化部を被いつつある肺胞上皮細胞は、その先端部分で球状となっており、移動が出来ない様子を示していた。WTでは肺胞腔内線維化部の多くの場所で、再生肺胞上皮細胞に良く被われていた。

考察・結論

今回の実験において、次の点が明らかとなった。

1) KOマウス、WTマウスともに線維化の程度には差が無く認められた。2) KOマウスでは、肺胞腔内線維化は再生肺胞上皮には十分に被われず、マクロファージに被われていた。3) 肺胞上皮細胞の増生、すなわちDNA合成は両者に差が無く認め

られたが、その移動、再生はKOマウスで遅れていた。4) KOマウスでは、肺胞腔内線維化の型は、主に壁在型・閉塞型であり、肺胞構造の改築傾向が強く、WTに比べ、よりNSIPパターンを示していた。5) 肺胞領域の細気管支化はKOマウス、WTマウスと差が無く認められた。

重要な点は、肺胞上皮細胞の速やかな再生・移動にMMP-2が必須であることが明らかとなったことである。以前から、胎生肺の後期に肺胞上皮細胞にMMP-2の高発現、MMP-2の活性化に関与する膜型のMT-MMPの高発現があることが知られている⁷⁾。また、実験的なプレオマイシン肺線維症で、再生上皮細胞にゲラチナーゼ活性があることが *in situ zymography* により明らかにされている⁴⁾。さらに、通常型間質性肺炎 (UIP) に比べ、COP/BOOPでは、MMP-2、MMP-9がTIMP-1、TIMP-2に比べ優位であることが報告されている⁴⁾。特に、予後不良なUIP、AIPの活動性線維化巣、UIPではfibroblastic focus、AIPではびまん性の線維化巣には、上皮細胞に被われないむき出しになった肉芽病巣が多く観察される⁸⁾。これらの部位での肺胞上皮細胞の再生不良にMMP-2の低発現が関与している可能性がある。

MMP-2 KOマウスでは、肺胞上皮細胞の再生・被覆不良により、よりNSIP的線維化のパターンを示した。この点については、COP/BOOPとNSIPの線維化形成過程の解析にこのマウスが役立つことを示している。ヒトの疾患であるCOP/BOOPに認められる腔内線維化巣は、ポリープ状であり、一般の創傷後の肉芽の所見に一致している(図3)。時間がたつと、腔内線維化巣は縮小してコラーゲンの球となり、後に消失する。腔内線維化が肺胞壁に癒合しないので、肺胞構造を改築することはない。一方、ヒトのNSIPは、閉塞型・壁在型優位の腔内線維化を示し、肺胞壁を癒合させるため肺胞構造は改築される(図3)。ヒトにおける観察から予想されていたように、実験的肺線維症のNSIPパターンと比較して、COP/BOOPパターンでは、肺胞上皮細胞の再生・被覆がよりよいことが実験的にも明らかになったといえる。

UIPの蜂巢肺に典型的にみられる肺胞領域の「真の細気管支化」は、不可逆的線維化の終末像と考えられている。すなわち、肺胞が喪失して細気管支

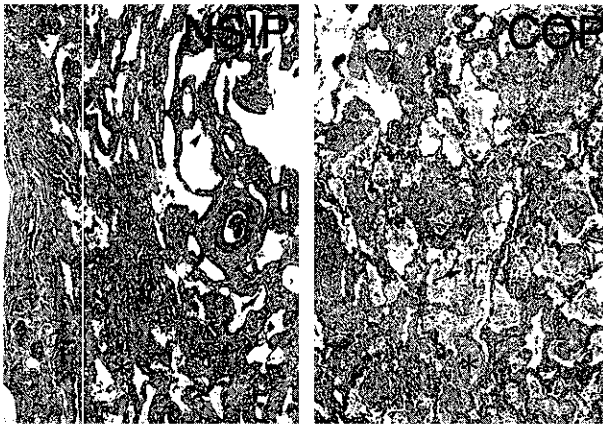


図3 ヒトのNSIP, COP/BOOP症例の標本を対比して示す。NSIPでは、壁在型、閉塞型の腔内線維化(*)が認められる。腔内線維化により肺胞壁は癒合するため、肺胞構造は改変されている。一部では、肺胞道の細気管支化(矢頭)が観察される。COP/BOOPでは、ポリープ型の腔内線維化(*)が多くみられ、肺胞壁に癒合しないため、肺胞構造自体は保たれている。一部では、コラーゲン球(矢印)をみる。図2を参照。(Elastica Masson染色)

構造に置き換わってしまう変化である。NSIPや実験的肺線維症にも、上皮のみの細気管支化は観察される⁹⁾。すなわち、肺胞上皮の障害の強い、線維化病変の強い部位には、細気管支上皮が肺胞上皮細胞障害を補うように肺胞領域に入り込んでくる。しかし、UIP以外のこれらの病態では平滑筋細胞の増生は伴わず、「上皮のみの細気管支化」である。「上皮のみの細気管支化」は、実験的線維化の観察から可逆的な要素が強いことが知られている⁹⁾。MMP-2に類似のMMP-9の欠損マウスでのプレオマイシン肺線維症では、線維化の程度がWTと同様であるにもかかわらず肺胞領域の細気管支化が起きないことが知られている¹⁰⁾。これは、細気管支上皮の再生・移動にMMP-9が必須であるためと理解される。今回のMMP-2 KOマウスでは、細気管支化はWTと同様に観察された。細気管支上皮と肺胞上皮の再生・移動がそれぞれ異なるMMPに支配されている可能性がある。今後、COP/BOOP, NSIPの可逆性, UIPの不可逆性にこれらの機序が絡んでいるのかどうかさらに検索をすすめたいと考える。

参考文献

1) Fukuda, Y., Mochimaru, H., Terasaki, Y., Kawamoto, M., Kudoh S. : Mechanism of structural remodeling in pulmonary fibrosis. *Chest* 120: 41S-43S, 2001

- 2) Usuki, J., Fukuda, Y.: Evolution of three patterns of intraalveolar fibrosis produced by bleomycin in rats. *Pathol Intern* 45: 552-564, 1995
- 3) Fukuda, Y., Ishizaki, M., Kudoh, S., Kitaichi, M., Yamanaka, N. : Localization of matrix metalloproteinases-1, -2 and -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in interstitial lung diseases. *Lab Invest* 78: 687-698, 1998
- 4) Kunugi, S., Fukuda, Y., Ishizaki, M., Yamanaka, N. : Role of MMP-2 in alveolar epithelial cell repair after bleomycin administration in rabbits. *Lab Invest* 81: 1309-1318, 2001
- 5) Buckley, S., Driscoll, B., Shi, W., Anderson, K., Warburton, D. : Migration and gelatinase in cultured fetal, adult, and hyperoxic alveolar epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L427-L434, 2001
- 6) Itoh, T., Ikeda, T., Gomi, H., Nakao, S., Suzuki, T., Itohara, S. : Unaltered secretion of beta-amyloid precursor protein in gelatinase A (matrix metalloproteinase 2)-deficient mice. *J Biol Chem* 272: 22389-22392, 1997
- 7) Fukuda, Y., Ishizaki, M., Okada, Y., Seiki, M., Yamanaka, N. : Matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 in fetal rabbit lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 279: L555-L561, 2000
- 8) Fukuda, Y., Basset, F., Ferrans, V. J., Yamanaka, N. : Significance of early intraalveolar fibrotic lesions and integrin expression in lung biopsies from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Human Pathol* 126: 53-61, 1995
- 9) Fukuda, Y., Takemura, T., Ferrans, V.J.: Evaluation of metaplastic squamous cells of alveolar walls in pulmonary fibrosis produced by paraquat: An ultrastructural and immunohistochemical study. *Virchows Arch [B]* 58: 27-43, 1989
- 10) Betsuyaku, T., Fukuda, Y., Parks, W.C., Shipley, J.M., Senior R.M. : Gelatinase B is required for alveolar bronchiolization after intratracheal bleomycin. *Am J Pathol* 157: 525-535, 2000

末梢血由来線維芽細胞様樹状細胞とその肺線維化における役割 — 単球由来樹状細胞，肺胞マクロファージとの比較 —

石井 芳樹* 知花 和行 福田 健

循環血液中に存在する CD34 陽性 progenitor cells に由来する樹状細胞 (DC) の亜群の 1 つに、組織傷害部位に集積して組織修復に働く細胞があり、組織の線維化に関与している可能性が考えられている。我々は、ヒト末梢血から分離した PBMC を 2 週間培養し、線維芽細胞様形態を示す樹状細胞を確立した。本細胞の由来は CD34 陽性 progenitor cell, およびさらに分化した CD14 陽性単球からも誘導されることを確認した。同一個体から得られた単球由来樹状細胞や disease control から得た肺胞マクロファージと比較し細胞外基質を多量に産生していた。さらに TGF- β 1 によって本細胞が筋線維芽細胞様の phenotype を示し、線維化形成において本細胞の重要性が示唆された。本細胞の機能と肺線維化における役割を検討することが肺線維化病態解明と治療に有用である可能性があると考えられた。

Characterization of fibroblast-like dendritic cells derived from human peripheral blood. — Comparison with monocyte-derived dendritic cells and alveolar macrophages —

Yoshiki Ishii, Kazuyuki Chibana, Takeshi Fukuda

Department of Pulmonary Medicine and Clinical Immunology, Dokkyo University School of Medicine, Mibu, Tochigi, Japan.

We isolated fibroblast-like dendritic cells (FDC) from human peripheral blood and examined their characteristics. Although adherent FDC showed fibroblast-like appearance on a culture plate, they demonstrated dendritic cell-like villi on the cell surface when removed from the plate. FDC can be differentiated from not only CD34 positive progenitor cells but also CD14 positive-monocytes. We found that FDC expressed higher levels of type I collagen and fibronectin mRNA than monocyte-derived DC from same individuals or alveolar macrophages. FDC also displayed cell surface antigens such as CD83, CD86, and HLA-DR. FDC induced antigen-presenting cell-dependent naive T cell proliferation. This proliferation activity was significantly higher than that induced by monocytes. Furthermore, we demonstrated that TGF- β 1 (10ng/ml), an important fibrogenic cytokine, increased the differentiation and expression of α -smooth muscle actin and prolyl 4-hydroxylase. These findings indicated that FDC have both fibroblast-like and DC-like characteristics.

はじめに

線維化病変部に集積する線維芽細胞および筋線維芽細胞の由来を探り, そのメカニズムと病態における役割を解明することは, 治療を考えるうえで極めて重要である. 循環血液中に存在する CD34 陽性 progenitor cells に由来する dendritic cell (DC) の亜群の1つに, 組織傷害部位に集積して組織修復に働く細胞があり, 組織の線維化に関与している可能性が考えられている¹⁾. この細胞は抗原提示能を持つと同時に collagen や fibronectin を産生し組織修復を行うと考えられる^{2,3)}. 我々は, これまで線維芽細胞様樹状細胞 (fibroblast-like DC; FDC) の末梢血からの分離法を確立し, その性状を検討して報告した⁴⁾. 今回, さらに FDC の由来を検討し, その phenotype を単球由来樹状細胞 (monocyte-derived DC; MoDC), および disease control から得た肺胞マクロファージ (Alveolar Macrophage; AM) と比較検討した. さらに TGF- β 1 による phenotype の変化を検討した.

対象と方法

線維芽細胞様樹状細胞 (FDC) の分離: 健康成人末梢血より PBMC を分離して Fibronectin でコートしたプレートに播き, 20%FBS 入り DMEM 培地で培養した. Day4 に非付着細胞を吸引除去, 培地は1週間に2度交換し, day14 まで培養した. トリプシンで細胞を剥がし, CD14 ビーズで negative selection し, 目的の細胞を分離した. DC にある professional な抗原提示能を確認するため, naive T cell を分離し, リンパ球混合試験を施行した.

FDC の由来の検討: 健康成人末梢血より得た PBMC から CD34 ビーズを用いて CD34 陽性 progenitor cell を得た後に, DiI で染色し CD34 negative cell と再び共培養し, day14 に蛍光顕微鏡で検討した. 同様に CD14 ビーズを用いて CD14 陽性の単球を分離後 DiI で染色し CD14 negative cell と再び共培養し, day14 に蛍光顕微鏡で検討した.

MoDC の分離: 健康成人末梢血より得た PBMC

を2等分し一部は上記方法で FDC を分離した. 残りの群を GM-CSF と IL-4 で1週間培養し, 未熟な DC を誘導し LPS で3日間培養し同一個体から成熟した MoDC を得た.

AM の分離: インフォームドコンセントを得た上で肺癌精査および血痰精査健側肺より気管支鏡を施行し気管支肺胞洗浄液 (BALF) を得た. BALF 中の細胞を medium に浮遊させ, plastic plate に播き, 2時間後非付着細胞を除去し, AM を得た. Purity は95%以上であった.

FDC, MoDC, AM の比較: 得られた FDC, MoDC, AM の表面抗原を FACS にて解析し, RT-PCR で Type I collagen, Fibronectin を検討した. また, 細胞上清中の Fibronectin を測定した.

TGF- β 1 による筋線維芽細胞への分化誘導: FDC を分化誘導する day4 より培養上清中に TGF- β 1 を 1 ~ 10 ng/ml を添加し day14 まで培養し, 細胞内の α -smooth muscle を FACS で確認した.

結 果

培養 day4 よりコロニー形成が始まり, day7 には線維芽細胞様の形態を示す細胞が増加し, day14 にはほとんどが線維芽細胞様の形態の細胞となった (Fig. 1). この細胞をトリプシンで剥離し CD14 negative selections 後, 検鏡すると樹状突起を持ち樹状細胞様の形態を示した (Fig. 1, 2). 同一個体から得た MoDC は浮遊細胞であり, 付着して増殖する FDC とは全く異なるものであった (Fig. 2). DC としての機能を確認するため, リンパ球混合試験を施行した. FDC は naive T cell を活性化増殖させることが可能であり, professional な抗原提示細胞であることが示された (Fig. 3).

本細胞の由来を確認するため, CD34 陽性 progenitor cell を DiI で標識し day14 まで培養した. CD34 陽性 progenitor cell の中から紡錘形の細胞が出現した. しかし, CD34 negative cell から同様に紡錘形の細胞が出現し, FDC は CD34 陽性 progenitor cell のみからだけではなく, 単球からも出現する可能性が考えられた (Fig. 4). そこで CD14 陽性単球を positive selection し, 同様に DiI で標識し day14 まで培養した. 付着し, 紡錘形の細胞はすべて CD14 positive 由来であった (Fig. 5). また CD14

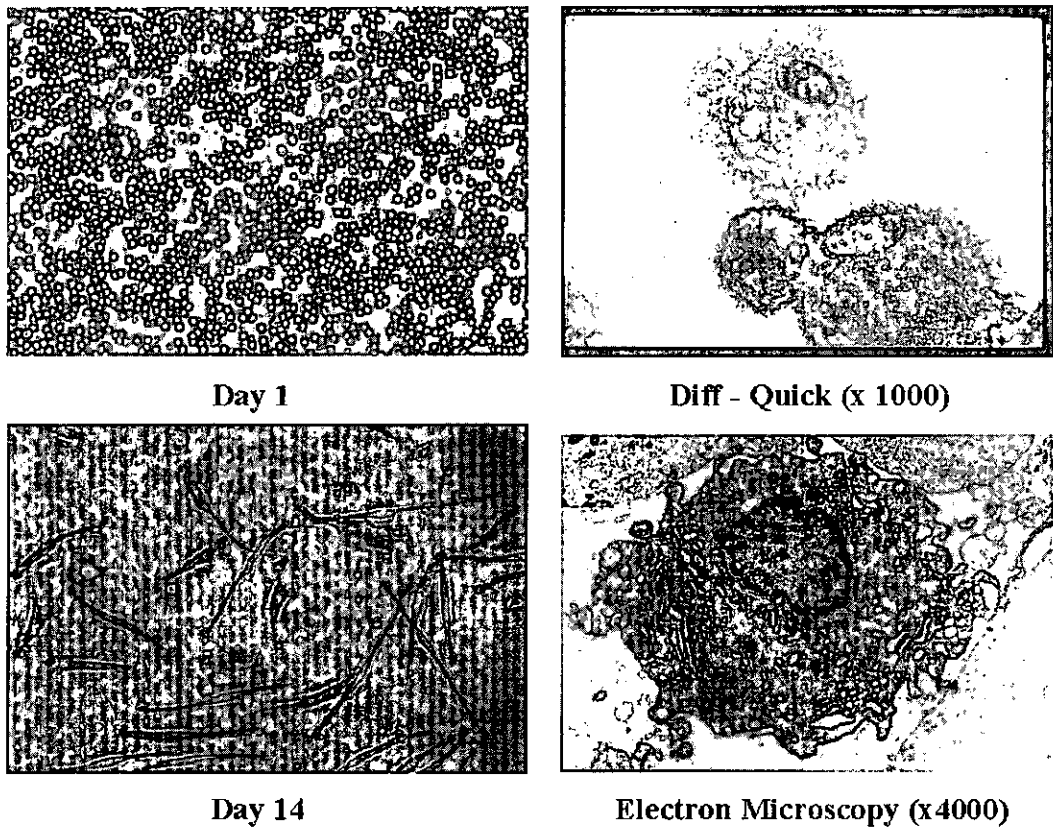


Figure 1 線維芽細胞様樹状細胞の形態. ヒト末梢血単核球 (左上) をプレートに蒔くと day14 にはほとんどが線維芽細胞様の形態の細胞となった (左下). この細胞をトリプシンで剥離し検鏡すると樹状突起を持ち樹状細胞様の形態を示し (右上), 電顕像でも樹状突起を認める (右下).

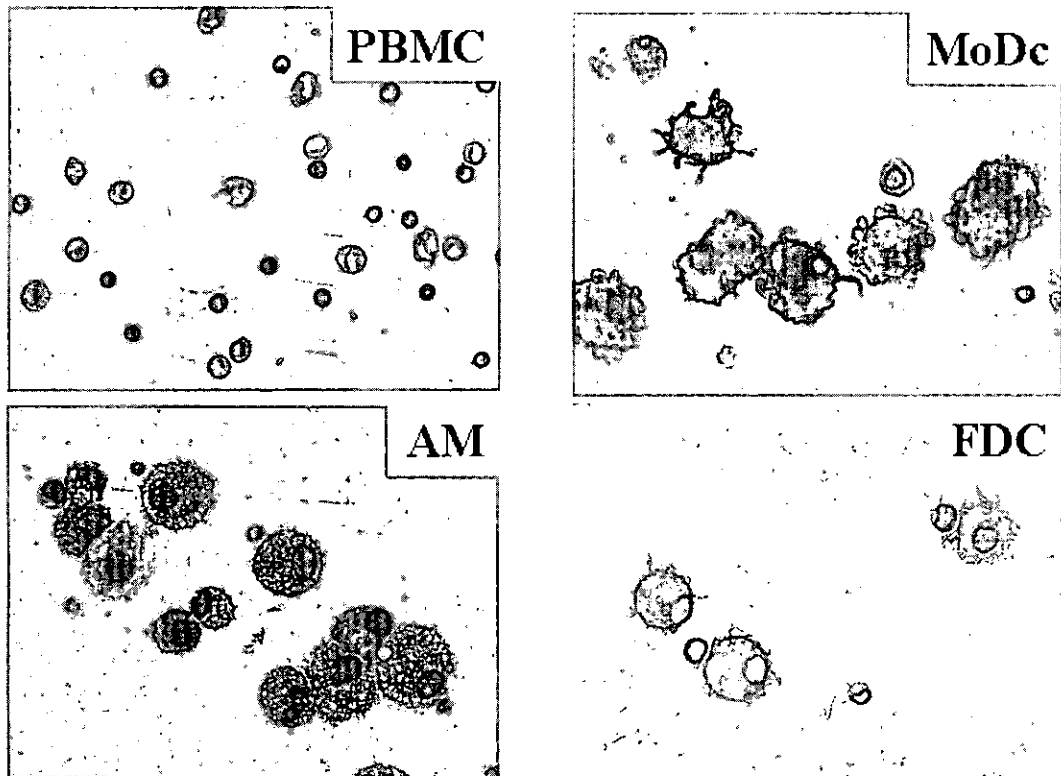


Figure 2 線維芽細胞様樹状細胞 (FDC) と単球由来樹状細胞 (MoDc)