

BALF 中に含まれる蛋白のプロテオーム解析

中田 光* 寺川 貴裕 慶長 直人**

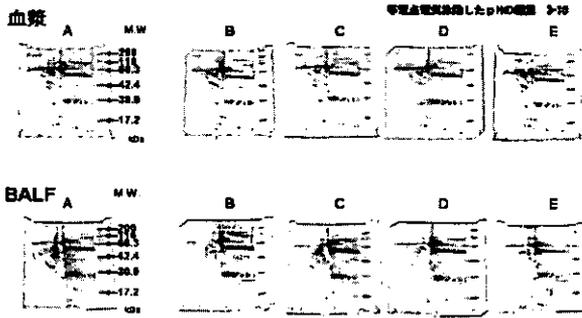
ヒトの気管支肺胞洗浄液 (BALF) の上清には、気管、気管支、肺胞を覆う粘液中のタンパクが含まれており、肺に特異的に発現している蛋白を含んでいるため、呼吸器疾患領域の病因蛋白の検索や病態の解析には極めて優れた生体試料である。また、呼吸器疾患の診断に際して、BALF の採取は広く行われており、BALF 蛋白のプロテオーム解析が進めば、ヒトゲノム塩基配列データベースとのデータリンクにより、呼吸器疾患の病因・病態に関する研究が飛躍的に進展することが予想される。今回われわれは、この BALF 上清中に含まれているタンパクに着目し、健常者の BALF 上清と血漿を精製、濃縮後に得られたタンパクを二次元電気泳動に供し、両者を比較した。

Proteome Analysis of Proteins in Broncho Alveolar Lavage Fluid

K. Nakata, T. Terakawa, and Naoto Keicho

Department of Respiratory Diseases, Research Institute, International Medical Center of Japan, Tokyo, Japan

Two dimensional gel electrophoresis (2DE) is a powerful tool for proteome research. Previous studies have shown that BALF contains many proteins which either derive from the circulation or are locally released by inflammatory or epithelial cells. Detection and identification of numerous BALF proteins is hampered by large amount of phospholipids, salts, and relatively low concentrations of BALF proteins due to dilution. We found that precipitation of BALF proteins by cold acetone is most convenient and excellent method for sample preparation of BALF 2DE. Using this method, the differences of proteins between the plasma and BALF from 5 normal volunteers obtained at the same time were investigated. Acetone precipitated plasma and BALF proteins resulted in an excellent separation of protein spots on 2-DE with 460.6 ± 41.0 and 473.4 ± 46.5 spots per each sample for BALF and plasma, respectively. Matched spots between BALF and plasma in each subject was 45.3% and 44.3%, respectively. More than 80 % of spots from both BALF and plasma were observed within PI range of 5-8 and molecular weight of 25-100. Percentages of matched protein spot from BALF which were almost the same amount (within 2 folds) of corresponding plasma spots were 50.3, 54.0, 57.1, and 51.6%, for PI range of 3-10, 3-6, 5-8, and 7-10. These results suggested that BALF proteins are remarkably different from plasma proteins in both the composition and content.



これら5名の血漿とBALFをそれぞれ比較した

図1 5人の健康者から同時に採取した血漿およびBALFの二次元電気泳動パターン

表1 5例の健康者のBALFと血漿サンプルを用いた、二次元電気泳動のスポットマッチング解析

subject		number of total spots	number of matched spots	% matched spots	number of spots within low pH	% (only within low pH)
A	BALF	516	249	48.3	97	39.0
	PLASMA	558		44.6		
B	BALF	468	210	45.9	76	35.4
	PLASMA	437		48.1		
C	BALF	442	205	46.4	79	38.5
	PLASMA	458		44.8		
D	BALF	483	210	43.5	81	38.6
	PLASMA	429		49.8		
E	BALF	394	169	42.8	44	27.2
	PLASMA	435		34.8		

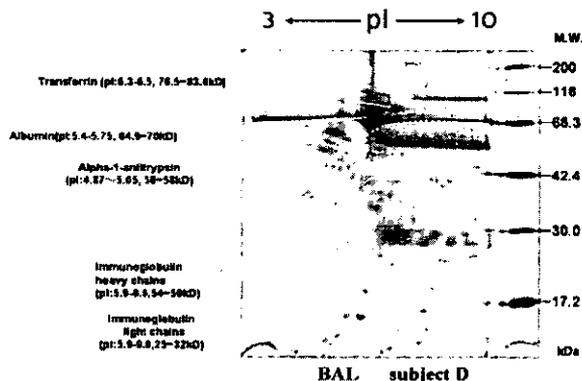


図2 血漿とBALFに共通して存在する蛋白のスポット

また、Albumin, Immunoglobulin 以外に、BALFと血漿で共通であった主な蛋白の種類と存在範囲は、Transferrin が、pH 6.3-6.5 分子量 76.5 ~ 83.6kD Alpha-1-antitrypsin が pH 4.87-5.05 分子量 56 ~ 58kD にそれぞれ検出された。(図2)

この5名の健康者BALF蛋白に関して、さらに各種の一次元電気泳動用 narrow range IPG strip を用いて広い pH 範囲で電気泳動を試みた。それぞれの pH での検出されたスポット数の平均は、pH3-10では、414.6、pH3-6では222.2、pH5-8では380.4、pH7-10では188.4であった。このときの最大マッチ

率と平均マッチ率は、それぞれ、pH3-10では、73.6%、49.6% pH3-6では60.0%、34.6% pH5-8では75.2%、49.8% pH7-10では61.7%、33.2%であった(表2)。

同様に、BALFの二次元電気泳動上同じ位置に認められる、(重なり合った) マッチしたスポットの中で、蛋白の量がデンストメーターによる画像解析上ほぼ等しい(増減の差が2倍以内)スポットの割合(%)の最大値は、pH3-10では、50.3%、pH3-6では54.0%、pH5-8では57.1%、pH7-10では51.6%であった。(表3、図3)

表2 5例の健康者BALFの二次元泳動スポットマッチング解析

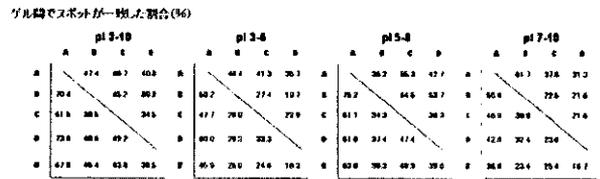


表3 マッチしたスポット間で、蛋白発現量の差が2倍以内である割合(%)

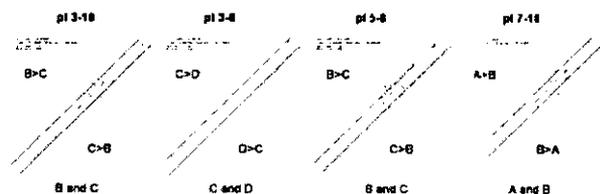
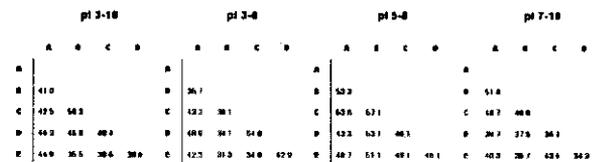


図3 各 pH 範囲で蛋白発現量の相同性が最も高い組み合わせの Scaller plot

結論

これまでBALFと血漿を構成する蛋白成分はほとんど同じものであると考えられていたが、今回の結果から、同一人でも両者を構成する蛋白の成分、量ともに異なっていることが明らかとなった。さらに、pHを3-10、3-6、5-8、7-10の4つの範囲を設定してBALFを泳動した結果から、BALF蛋白はpH5-8の範囲に特に集中して存在していること

が明らかとなった。また、5名のBALF蛋白の互いのスポットマッチ率は低く、BALF構成蛋白の組成にはかなりの個体差が認められた。

考 察

今回本研究では、銀染色法によって蛋白を検出したが、検出精度に限界があることが知られている。実験を通して、蛋白解析精度をさらに向上させることは以下の点を改善する必要があると思われる。

- ・人の手に依存する実験ステップが多いため、作業が煩雑、長時間となる。
- ・一次元目の等電点電気泳動、二次元目のSDS-PAGEともに電気泳動パターンが歪みやすい。
- ・ゲルの銀染色結果にばらつきが生じる。
- ・染色によるバックグラウンド、ノイズが見られやすい。
- ・コンピュータを用いたスポット検出、パターンマッチングアルゴリズムの精度のさらなる向上。

Coomassie brilliant blue R-250 染色、銀染色による従来の方法ではこれらの問題点の解決して、現状以上の感度および精度を実現することは極めて困難であると思われた。そこで現在、われわれは、感度、精度の飛躍的向上を目指して、Amersham Biosciencesが供給している、Cy3, Cy5による蛍光染色法を用いた、二次元電気泳動によるディファレンシャルディスプレイ解析の準備を進めている³⁾。この解析法では、異なるサンプルから抽出したタンパク質の二次元電気泳動分離パターンを同一の二次元泳動ゲルで比較し、特異的に出現する、あるいは消失する蛋白質を容易に検出することが

可能である。将来的には、BALFの二次元電気泳動画像の比較・検討をすることにより、

1. BALFから得られる情報を飛躍的に増加させる。健常者の蛋白泳動パターンと疾患別のパターンを比較することによって、診断、病勢、病態の解析に寄与する。
2. 疾患特異的な蛋白の探索、あるいは蛋白の欠損、減少、異常増加、酸化状態、修飾を見出すことにより、病因の解明を目指す。
3. 他の医療機関、研究機関が利用できるように疾患ごとに匿名化した解析データをデータベース化し、インターネットを通じて公開する。といったことを目標としている。

健康危険情報

特記すべきことなし

参考文献

- 1) O'Farrell, P. H., :High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.*, 250 (10) :4007-21 (1975)
- 2) Bjellqvist, B., Ek, K., Righetti, P. G., *et al.* : Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 6 (4) :317-39 (1982)
- 3) Von Eggeling, F., Gawriljuk, A., Fiedler, W., *et al.* : Fluorescent dual colour 2D-protein gel electrophoresis for rapid detection of differences in protein pattern with standard image analysis software. *Int. J. Mol. Med.*, 8 (4) :373-7 (2001)

Idiopathic Pulmonary Fibrosis におけるマスト細胞増加の意義： 免疫組織学的検討

井上 義一^{1*} 松本 久美¹ 岡 美穂¹ 黒川 恵理¹
山本 暁² 新井 徹³ 林 清二³ 岡田 全司¹
坂谷 光則³

肺組織中でマスト細胞の役割を検討するために IPF 肺組織 (n=14), コントロール肺組織 (n=10) を用い, マスト細胞と筋線維芽細胞, 肺胞 II 型上皮細胞等との関係について免疫組織学的に検討した. IPF では肺組織中で bFGF 陽性マスト細胞がコントロールに比べ有意に増加し (p<0.05), その多くは chymase 陰性であった. IPF では α -smooth muscle actin (SMA) 陽性の筋線維芽細胞, 肺胞 II 型上皮細胞および肺胞マクロファージが増加しており (p<0.05), これらの細胞は bFGF のレセプターである Flg を発現していた. マスト細胞は bFGF とそのレセプターを介して肺胞 II 型上皮細胞, 筋線維芽細胞を含む間質細胞の増加あるいは活性化に関与している事が示唆された.

MAST CELLS IN THE LUNGS WITH IDIOPATHIC PULMONARY FIBROSIS: IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY

Yoshikazu Inoue, Kumi Matsumoto, Miho Oka, Eri Kurokawa
Satoru Yamamoto, Toru Arai, Seiji Hayashi, Masaji Okada
Mitsunori Sakatani

National Kinki-Chuo Hospital for Chest Diseases, Osaka Sakai

Mast cells are supposed to have important roles in tissue injury, angiogenesis, and fibrosis. We have reported that the number of basic fibroblast growth factor (bFGF) expressing mast cells (MCs) increases in the lungs with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). In the present study, we demonstrated that α -smooth muscle actin (SMA) positive myofibroblasts, type II pneumocytes, alveolar macrophages increased, and that those cells expressed the receptors of bFGF, such as Flg (FGFR1) and Bek (FGFR2). Mast cells may affect fibroproliferative response in IPF.

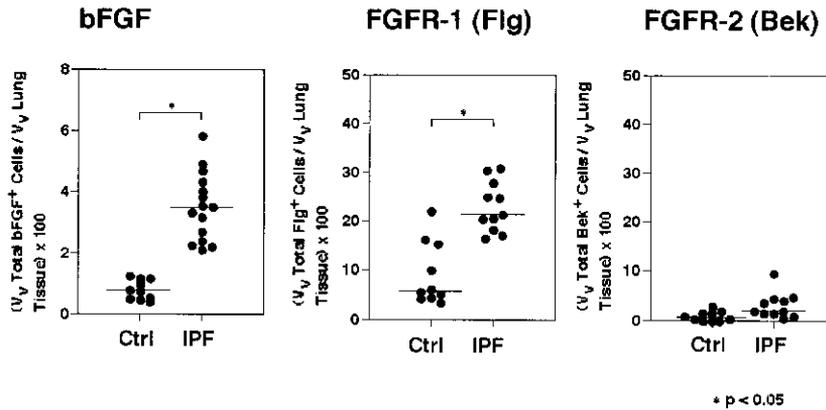


図2 IPF 肺および control 肺における bFGF, Flg, Bek 陽性細胞の volume density の比較 (文献 1 から引用改変)

表 1 Tryptase 陽性細胞 (mast 細胞), bFGF 陽性細胞, Flg 陽性細胞, Bek 陽性細胞と Collagen fiber, Elastic fiber, SMA 陽性細胞との相関 (文献 1 から引用改変)

	IPF		
	V _v Collagen or reticular fibers	V _v Elastic fibers	V _v SMA ⁺ cells
V _v total tryptase ⁺ cells	0.58 (0.03) *	0.73 (0.00)*	0.57 (0.03)*
V _v total bFGF ⁺ cells	0.56 (0.04)*	0.82 (0.00)*	0.55 (0.04) *
V _v total Flg ⁺ cells	-0.27 (0.43)	-0.13 (0.73)	0.0 (1.00)
V _v total Bek ⁺ cells	0.05 (0.88)	-0.20 (0.58)	-0.05 (0.87)

All data are expressed as Spearman's correlation with P value in parenthesis. All volume density data were normalized by V_v Lung tissue. The subjects number of V_v total tryptase⁺ cells and V_v total bFGF⁺ cells; IPF=15. The subjects number of V_v total Flg⁺ cells and V_v total Bek⁺ cells; IPF=11. * p < 0.05.

考 察

われわれは肺線維症の肺組織で線維化の程度に応じて mast 細胞が増加し、bFGF を発現している事をこれまで報告してきた。mast 細胞は collagen fibers の蓄積している線維化部位で増加していたが筋線維芽細胞も同部位で mast 細胞と共に増加しており、かつ bFGF のレセプターを発現していた。つまり mast 細胞から産生された bFGF は paracrine 的に近傍に存在する筋線維芽細胞を刺激しコントロールしている可能性が示唆された。また線維化部位で増殖している肺胞 II 型上皮細胞にも bFGF のレセプター特に Flg が多く発現しており bFGF の影響を受けている可能性が示唆された。

結 論

IPF の肺で mast 細胞は bFGF とそのレセプターを介して線維化部位での肺障害、リモデリングに関与している事が示唆された。

参考文献

- 1) Yoshikazu Inoue, Talmadge E, King Jr., Elizabeth Barker, Elaine Daniloff, and Lee S. Newman. Basic Fibroblast Growth Factor and Its Receptors in Idiopathic Pulmonary Fibrosis and Lymphangiomyomatosis. Am J Resp Crit Care Med 2002, 166: 765-773.
- 2) Yoshikazu Inoue, Talmadge E. King Jr. Sally S. Tinkle, Karen Dockstader, and Lee S. Newman: Human mast cell basic fibroblast growth factor in fibrotic pulmonary disorders. Am J Pathol 1996, 149: 2037-2054.
- 3) Hironobu Hamada, Val Vallyathan, Carlyne D. Cool, Elizabeth Barker, Yoshikazu Inoue, and Lee S. Newman : Mast Cell Basic Fibroblast Growth Factor in Silicosis. Am J Respir Crit Care Med. 2000, 161: 2026-2034.
- 4) Yoshikazu Inoue, Cornebise M, Daniloff, Yoshikazu Inoue, Mark Cornebise, Elaine Daniloff, Lloid J, Tingle S, King TE Jr. Mast cell-associated basic fibroblast growth factor in the fibrotic response to environmental toxins. The Beryllium Model. Chest 1996 Mar; 109 (3) : 43S-44S.
- 5) 井上義一, 山本暁, 岡田全司, 坂谷光則. 肺の線維化と mast 細胞由来 basic fibroblast growth factor. 黒沢元博編; 肥満細胞の臨床. 先端医学社, 2001, p135-p141.

気道上皮細胞における Matrix metalloproteinase (MMP)-9 誘導に 対する S- ニトロソチオールの調節作用

岡本 竜哉¹ Giuseppe Valacchi² 彌永 和宏¹ 一門 和哉¹
Carroll E. Cross² Albert van der Vliet² 菅 守隆^{1*}

気道上皮やマクロファージなどにより産生される一酸化窒素 (NO) は、肺の傷害・修復過程にメディエーターとして機能していることが示唆されている。NO はその酸化状態に応じ、反応性窒素酸化物 (NO₂, ONOO⁻, NO⁺ etc.) へと変換され、多様な生理活性を発現する。なかでも NO⁺ は、種々の蛋白の Cys 残基に結合し S- ニトロソチオール (RSNO) を形成し、その生理活性を調節するとして近年注目されている。一方、Matrix metalloproteinase (MMP) は細胞外基質の代謝に関与する蛋白分解酵素で、我々はこれまでに基底膜の IV 型コラーゲンを基質とする MMP-9 が、肺の組織傷害・修復に関与することを報告した。今回我々は、肺の炎症における NO のメディエーターとしての役割を解析するため、MMP-9 の誘導に対する NO の作用について検討した。ヒト気道上皮細胞 (HBE1) を無血清培地にて種々の NO 放出試薬の存在下で TNF α にて刺激し、MMP-9 の活性および mRNA の発現を測定した。その結果、MMP-9 の誘導は、NONOate によっては影響を受けなかったが、RSNO により濃度依存性に抑制された。またこの抑制能は細胞内グルタチオンを枯渇させることで増強したことから、細胞内蛋白を標的としたニトロソ化反応を介していることが示唆された。抗 NF- κ B (p50) 抗体を用いた免疫蛍光染色では、TNF α 刺激により細胞質に存在する NF- κ B の核への translocation が認められ、この現象は NONOate では影響されなかったが、RSNO では著明に抑制された。以上より RSNO は気道上皮細胞において NF- κ B の活性化経路、ひいては MMP-9 の誘導を抑制し、このことは NO の抗炎症作用を説明する一つの機序と考えられた。

S-nitrosothiols inhibit cytokine-mediated induction of Matrix metalloproteinase-9 in airway epithelial cells

Tatsuya Okamoto¹, Giuseppe Valacchi², Kazuhiro Iyonaga¹, Kazuya Ichikado¹
Carroll E. Cross², Albert van der Vliet², Moritaka Suga¹

¹ Division of Respiratory Medicine, Graduate School of Medicine, Kumamoto University

² Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, University of California Davis School of Medicine

Inflammatory lung diseases are associated with increased production of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) from infiltrating granulocytes or from the respiratory epithelium, and inappropriate expression and activation of MMP-9 may be associated with tissue injury and airway remodeling. Inflammatory conditions also result in increased expression of inducible nitric oxide synthase (iNOS), and nitric oxide (NO) has been reported to have variable effects on MMP-9 gene expression and activation in various cell types. We investigated the involvement of NO or its metabolites on MMP-9 expression in human bronchial and alveolar epithelial cells by studying effects of NOS inhibition or exogenous NO donors on cytokine-induced MMP-9 expression. Although addition of NO donors did not affect MMP-9 induction by inflammatory cytokines, addition of S-nitrosothiols dramatically inhibited MMP-9 expression, which was potentiated by depletion of cellular GSH. Cytokine-induced MMP-9 expression involves the activation of the transcription factor NF- κ B, and S-nitrosothiols, in contrast to NO, were found to inhibit cytokine-induced nuclear translocation and DNA binding of NF- κ B. The inhibitory effects of S-nitrosothiols on cytokine-induced lung epithelial MMP-9 expression illustrate an additional mechanism by which nitrosative stress may affect epithelial injury and repair processes during conditions of airway inflammation.

はじめに

MMP (Matrix metalloproteinase) は細胞外マトリックス蛋白を基質とする蛋白分解酵素で、種々の肺疾患において病巣局所での産生が亢進し、組織傷害や癌の転移浸潤に寄与する事が知られている¹⁾。ことに基底膜の主成分である IV 型コラーゲンを基質とする MMP-9 (gelatinase B) や MMP-2 (gelatinase A) と病勢との関連については多くの研究がなされている²⁾。気道上皮細胞は好中球やマクロファージと並んで MMP の産生細胞の一つとして重要とされる。MMP には MMP-2 のように恒常的に発現しているものと³⁾、MMP-9 のように誘導型のものがあり、後者は炎症性サイトカイン、酸化ストレス、LPS などの刺激によって、NF- κ B や AP-1 などの転写因子の活性化を経て誘導される⁴⁾。近年、誘導型一酸化窒素合成酵素 (iNOS) により産生される一酸化窒素 (NO) が、抗炎症性作用を有しているとして注目されている⁵⁾。そこで、我々は、気道上皮細胞における炎症性サイトカインによる MMP-2, -9 の誘導に対する NO の効果について検討した。

対象と方法

3 種類の気道上皮細胞 (HBE1: 正常気道上皮細胞株, CFT1: cystic fibrosis 患者由来気道上皮細胞株, NHBE: 正常気道上皮細胞初代培養) および II 型肺胞上皮細胞株 (A549) を種々の NO 放出試薬 (S-nitroso N-acetyl penicillamine, SNAP; S-nitrosoglutathione, GSNO; NO-amine complex, NONOate) の存在下で TNF α にて刺激し、培養上清中の MMP-2, -9 の活性をゼラチンザイモグラム法にて測定した。また、MMP-2, -9 の mRNA の誘導を RT-PCR にて測定した。NO が細胞に及ぼす redox status への影響を検討するため、細胞内グルタチオン (GSH) の濃度を HPLC にて測定した。また、NF- κ B の活性化、核内移行に対する NO の影響を、抗 NF- κ B (p50) 抗体を用いた免疫蛍光染色法、お

び EMSA (electrophoretic mobility shift assay) にて検討した。

結 果

TNF α は 4 種類の細胞いずれにおいても活性および mRNA レベルにて用量依存性に MMP-9 の発現を誘導した (Fig. 1)。TNF α による MMP-9 の誘導は、SNAP, GSNO といった S-ニトロソチオール (RSNO) にて用量依存性に活性および mRNA ともに抑制されたが、NONOate といった NO そのもの、あるいは ONOO⁻ ではほとんど抑制されなかった (Fig. 2)。細胞内での NF- κ B の局在を免疫蛍光染色で検討したところ、TNF α の刺激により NF- κ B が細胞質から核内へと速やかに移行 (nuclear translocation) する様子が観察された。この現象は RSNO により完全に抑制され、一方 NO では全く影響を受けなかった。EMSA にても同様の現象が認められた (Fig. 3)。RSNO を細胞に与えると、細胞内 GSH の濃度は加えた RSNO の濃度に依存して速やかに減少し、24 時間後には回復した (Fig. 4)。細胞内 GSH 濃度を BSO (buthionine sulfoximine) を用いて枯渇させた細胞は、そうでない細胞に比べ

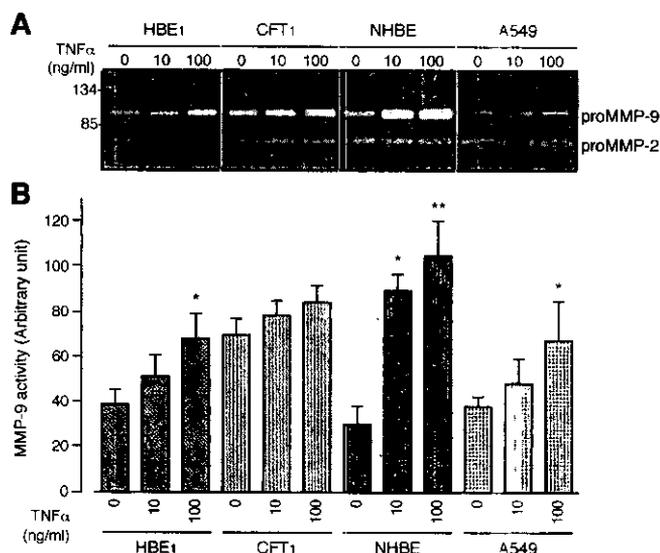


Fig. 1 Induction of MMP-9 in various pulmonary epithelial cells by TNF α . HBE1, CFT1, NHBE, and A549 cells were stimulated with 0-100 ng/ml TNF α for 24h. (A) MMP-9 and MMP-2 activities in the medium were analyzed by gelatin zymography. (B) Densitometric analysis of the gelatinolytic activity in the zymography gel. Data represent the mean \pm SEM of five separate determinations. Significantly different from control (without TNF α): *P<0.05; **P<0.005.

1 熊本大学大学院呼吸器病態学分野
 2 University of California Davis School of Medicine
 * びまん性肺疾患研究班 分担研究者

て、より低い濃度の RSNO にて MMP-9 の活性と mRNA レベルが抑制され、このことから、RSNO による MMP-9 の誘導抑制能は、細胞内のグルタチオン濃度に依存しており、何らかの細胞内チオールに対するニトロソ化反応を介していることが示唆された (Fig. 5)。

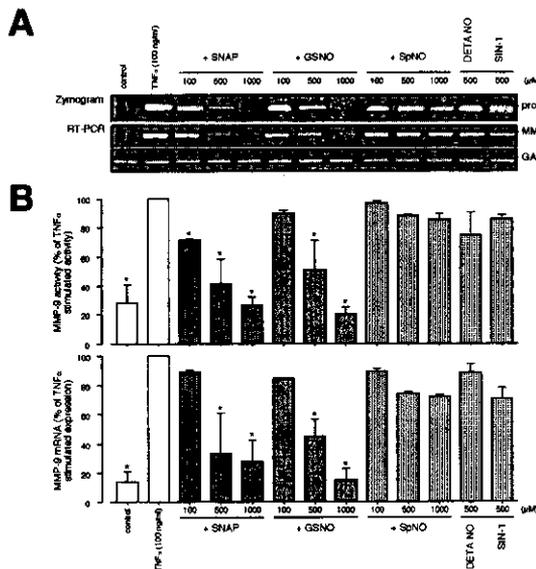


Fig. 2 Effects of exogenous NO or RNS on cytokine-induced MMP-9 expression. (A) HBE₁ cells were preincubated with *S*-nitrosothiols (GSNO/SNAP), NO-releasing agents (spermine NONOate, DETA NONOate), or the peroxynitrite-generating compound SIN-1 for 30 min. Cells were then stimulated with TNFα (100 ng/ml) for 24h, and MMP-9 activity in the media and MMP-9 mRNA expression were analyzed by zymography and RT-PCR, respectively. (B) MMP-9 activity and MMP-9 mRNA expression were quantified densitometrically and expressed relative to TNFα-stimulated values (%). Significantly different from TNFα-stimulated value (without NO compounds): *P<0.05.

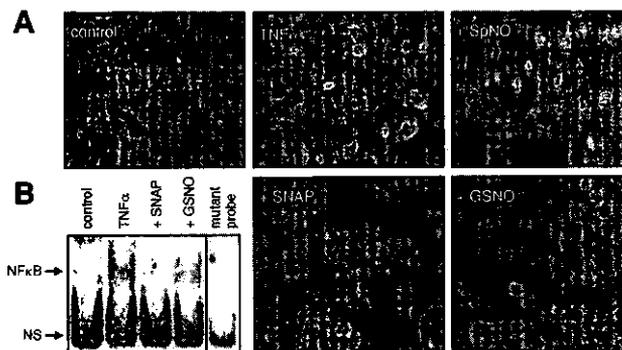


Fig. 3 Effects of NO and RNS on TNFα-induced NF-κB activation in HBE₁ cells. (A) HBE₁ cells were pretreated with 500 μM of *S*-nitrosothiols (GSNO/SNAP) or spermine NONOate for 30 min and stimulated with TNFα (100 ng/ml) for 30 min. Cellular localization of NF-κB was analyzed by immunofluorescence staining using anti-NF-κB (p50) antibody. (B) Nuclear extracts from TNFα and/or *S*-nitrosothiol-treated HBE₁ cells were analyzed by EMSA.

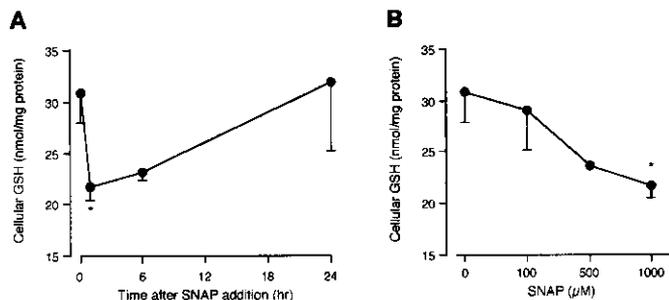


Fig. 4 Modulation of cellular GSH levels by SNAP. HBE₁ cells were treated with various concentrations (0-1,000 μM) of SNAP for various time periods (1, 6 and 24 h), and cellular GSH was determined after derivatization with monobromobimane and HPLC analysis and expressed as nmol GSH/mg protein. (A) Time-dependent changes in cellular GSH levels after incubation with 1 mM SNAP. (B) Dose-dependent effects of SNAP on the cellular GSH levels after 1 h. Data represent the mean ± SEM of three separate determinations. Significantly different from control (without SNAP or GSNO): *P<0.05.

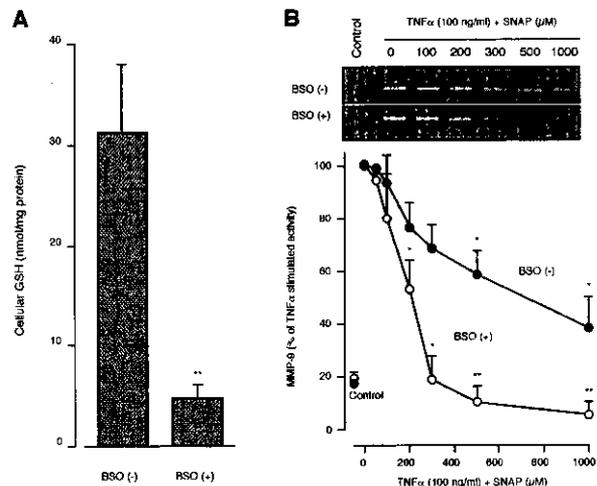


Fig. 5 Effect of depletion of cellular GSH on SNAP-mediated inhibition of MMP-9 expression (A) HBE₁ cells were treated with or without BSO (500 μM) for 18 h, and cellular GSH levels were measured. (B) BSO-treated or untreated HBE₁ cells were incubated with the indicated concentrations of SNAP for 30 min and stimulated with TNFα (100 ng/ml) for 24 h. MMP-9 activity in the culture media was analyzed by zymography and is represented as a percentage of TNFα-stimulated activity of untreated cells. All data represent the mean ± SEM of three separate determinations. Significantly different from TNFα-stimulated activity (without SNAP): *P<0.05; **P<0.005.

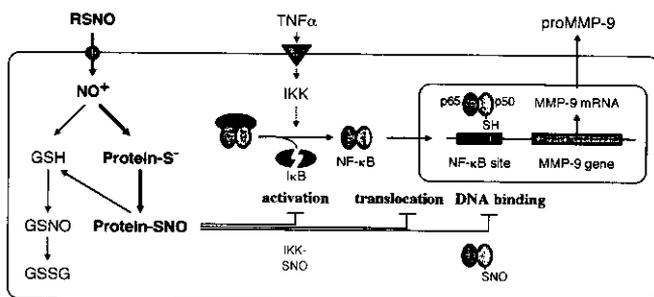


Fig. 6 Ubiquitous regulatory mechanism of RSNO on NF-κB activation pathway through protein S-nitrosylation. S-nitrosylation of cysteine residues is increasingly being recognized as a ubiquitous regulatory mechanism, comparable to phosphorylation, and represents a post-translational modification that can influence cellular signal transduction pathway.

考 案

RSNO は、MMP-9 の TNF α による誘導を転写レベルで抑制した。TNF α による MMP-9 の誘導機序の一つに NF- κ B を介する経路が知られている。細胞が RSNO に暴露されることにより、細胞内蛋白のチオール基がニトロソ化され NF- κ B の情報伝達経路を抑制するものと考えられる (Fig. 6)。一つの機序として NF- κ B の p50 サブユニットがニトロソ化される結果、DNA の promotor 領域に結合できなくなるという知見が報告されている⁶⁾。しかしながら、今回の我々のデータでは NF- κ B の核内への translocation もまた RSNO により阻害されることが示唆された。その機序としては、1) NF- κ B を活性化する IkB kinase の失活、2) NF- κ B の核移行シグナルのマスキング、3) 核内への translocation に関与するモーター蛋白あるいは細胞骨格蛋白の機能障害などを想定しており、今後の課題としている。

結 論

炎症局所における oxidative もしくは nitrosative ストレスは NF- κ B の情報伝達経路を修飾することで MMP の発現に影響を及ぼしており、このことが肺傷害やリモデリングの病態形成に重要な役割を演じているものと考えられた。

参考文献

- 1) Parks, W. C. & Shapiro, S. D. : Matrix metalloproteinases in lung biology. *Respir Res.*, 2 : 10-19, 2001.
- 2) 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: 1949-1956, 2000.
- 3) Qin, H., Sun, Y. & Benveniste, E. N. : The transcription factors Sp1, Sp3, and AP-2 are required for constitutive matrix metalloproteinase-2 gene expression in astrogloma cells. *J Biol Chem.*, 274 : 29130-29137, 1999.
- 4) Gum, R., Lengyel, E., Juarez, J., Chen, J. H., Sato, H., Seiki, M. & Boyd, D. : Stimulation of 92-kDa gelatinase B promoter activity by ras is mitogen-activated protein kinase kinase 1-independent and requires multiple transcription factor binding sites including closely spaced PEA3/ets and AP-1 sequences. *J Biol Chem.*, 271 : 10672-10680, 1996.
- 5) Eberhardt, W., Beeg, T., Beck, K. F., Walpen, S., Gauer, S., Bohles, H. & Pfeilschifter, J. : Nitric oxide modulates expression of matrix metalloproteinase-9 in rat mesangial cells. *Kidney Int.*, 57: 59-69, 2000.
- 6) Matthews, J. R., Botting, C. H., Panico, M., Morris, H. R. & Hay, R. T. : Inhibition of NF-kappaB DNA binding by nitric oxide. *Nucleic Acids Res.*, 24: 2236-2242, 1996.

インスリンシグナルと酸化ストレス

馬場 智規¹ 清水 孝彦¹ 玉置 正勝¹ 吾妻安良太^{2*}
青山 昭徳² 白澤 卓二¹

線虫の長寿変異体である *daf-2* の遺伝的および分子生物学的解析の結果、インスリン様受容体遺伝子に長寿命遺伝子変異が発見された。その後、線虫やショウジョウバエでインスリンシグナル伝達の異常により、酸化ストレス耐性を獲得し、寿命が延長する変異体が相次いで報告された。本研究で我々は、*daf-2* 線虫の長寿命変異と相同の変異をマウスインスリン受容体遺伝子に導入したノックインマウス(インスリン受容体変異マウス)を作製した。インスリン受容体変異マウスは高酸素負荷、パラコート投与、およびブレオマイシン投与のいずれの酸化ストレスに対しても強い耐性を示した。この結果は哺乳類(マウス)においても、インスリンシグナルの異常が酸化ストレス耐性を高めることを示すもので、線虫から哺乳類までの高等多細胞生物に保存された普遍のシグナルの存在を明らかにした。

Insulin signaling and oxidative stress

Tomonori Baba¹, Takahiko Shimizu¹, Masakatu Tamaki¹, Arata Azuma²
Shotoku Aoyama², Takuji Shirasawa¹

¹ *Molecular Gerontology, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology*

² *Fourth department of Internal Medicine, Nippon Medical School*

Insulin-like signal transduction pathway plays a physiological role in the determination of lifespan and stress resistance in nematode and fly. In order to address the possibility that the insulin signal pathway play a biological role in the determination of lifespan in mammals, we generated insulin receptor gene-modified mice with IR^{P1195L}, one of tyrosine kinase-null mutations. The homozygous mice died by diabetic ketoacidosis within 48 hours after birth. To address the stress resistance of these model mice, we investigated the survival of heterozygous mice (IR mutant mice) in the oxygen chamber with 80% oxygen. The IR mutant mice survived longer than control mice in oxygen chamber in association with the enhanced induction of manganese superoxide dismutase (MnSOD) in lungs. Furthermore, we investigated the survival of IR mutant mice by paraquat administration. The mutant mice also significantly survived longer than control mice. Administration of bleomycin that induces the lung fibrosis, one of the age-associated diseases of the lung, failed to provoke the fibrotic foci of IR mutant mice while it induced fibrotic foci with inflammatory cell infiltrates in the lungs of wild-type mice. These results suggest that the mutation in IR gene conferred the resistance for various kinds of oxidative stress, indicating that insulin signal controls the stress responses for oxidative stresses. The up-regulated defense system in mutant mice may account for the enhanced stress resistance in mice, suggesting that insulin signal plays a biological role in stress resistance and lifespan in mice.

はじめに

線虫の長寿変異体である *daf-2* の遺伝的および分子生物学的解析の結果、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¹⁾。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。線虫やショウジョウバエではインスリン様シグナル伝達の異常により、老化の一因である活性酸素等を無毒化する MnSOD 等の発現が増大し、酸化ストレス耐性を獲得し寿命が延長することが示唆されている^{2,3)}。本研究の目的はインスリン様シグナル伝達の異常が哺乳類においても酸化ストレス耐性を獲得し、寿命が延長するのかを検討することである。

これまでに我々は、線虫の長寿変異と相同の変異を持つノックインマウスの作製に成功した⁴⁾。このマウスはインスリン受容体蛋白 1195 番目のプロリン残基がロイシン残基に置換している。インスリン受容体変異マウスは、ホモ接合体にすると生後約 48 時間以内に糖尿病性ケトアシドーシスで死亡することが判明し、インスリン受容体欠損ホモ接合体マウスと同じ表現形を示した。ヘテロ接合体マウスは、インスリン抵抗性を示すが糖尿病は発生せず、いわば前糖尿病状態のまま健康に生存することがこれまでの実験結果から示唆されている。

対象と方法

高酸素負荷

8 週、12 週、16 週、9 ヶ月齢の雄マウス（各 10 匹）を 80% 酸素濃度チャンバーにて飼育し、その生存率と加齢による影響を比較検討した。また、高酸素負荷による Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) 中の細胞浸潤およびタンパク量の変化を以下の方法で測定した。マウスをエーテル麻酔し、正中気管切開後チューブを挿入し、0.6ml の PBS を注入後、

回収した。これを計 3 回行い回収液量が 90% 以上のものを使用した。回収した BALF を 300G で遠心し、全細胞数およびマクロファージ数、リンパ球数、好中球数を測定した。全細胞数はヘモサイトメーターを使用してカウントした。ギムザ染色後それぞれマクロファージ数、リンパ球数、好中球数をカウント（計 400 細胞以上）し全細胞数に占めるパーセント値から細胞数を算定した。上清はさらに 15000 回転で遠心した後、肺障害、血管透過性の指標としてタンパク量をローリー法にて定量した。また、BAL 施行後の肺は -80℃ で保存し RT-PCR を行う試料とした。

パラコート投与

15 週齢雌マウス（各 10 匹）にパラコート 70mg/kg を腹腔内注射し、その生存率を検討した。2 時間毎に死亡の有無を確かめ、計 120 時間観察した。

ブレオマイシン投与

マウスの尾静脈より、ブレオマイシン 50mg/kg または 100mg/kg 静脈注射した。コントロール群には生理的食塩水を投与した。投与は初回のみとし、3 週間後に肺の病理学的検討を行い点数化した。

結 果

高酸素負荷

酸化ストレスは老化の原因の一つと考えられており、線虫やショウジョウバエでは酸化ストレス耐性は寿命延長に関連すると考えられている⁵⁾。そのメカニズムはスーパーオキシドを無毒化する酵素である MnSOD 活性の上昇で説明されている²⁾。インスリン受容体変異マウスでもインスリンシグナル伝達の異常により、抗酸化酵素の発現が増大し酸化ストレス耐性を獲得している可能性がある。80% 酸素濃度チャンバー内での生存率を比較したところ、インスリン受容体変異マウスは野生型マウスより有意に生存の延長を示した（図 1）。8 週齢マウスではインスリン受容体変異マウスは 6 日目に 1 匹死亡するものの 14 日目まで 80% が生存していた。野生型マウスは 7 日目より死にはじめ、その後急激に死亡し 14 日目までに 40% の生存に留まった（図 1A）。12 週齢では、野生型マウスが 5 日目より死にはじめるのに対し、インスリン受容体

1 東京都老人総合研究所分子老化研究グループ

2 日本医科大学第四内科

* びまん性肺疾患研究班 分担研究者

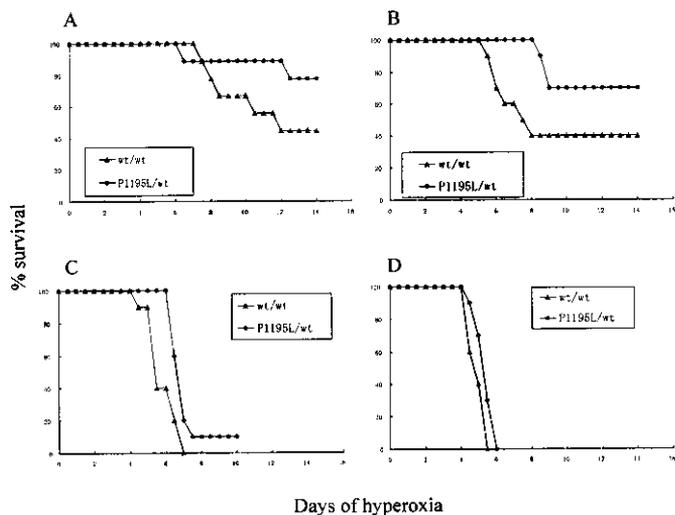


図1 80%酸素条件下での生存曲線 (P1195L/wt (■) : インスリン受容体変異マウス, wt/wt (●) : 野生型マウス)
A:8週齢 B:12週齢 C:16週齢 D:9か月齢
インスリン受容体変異マウスは有意に生存が延長した。

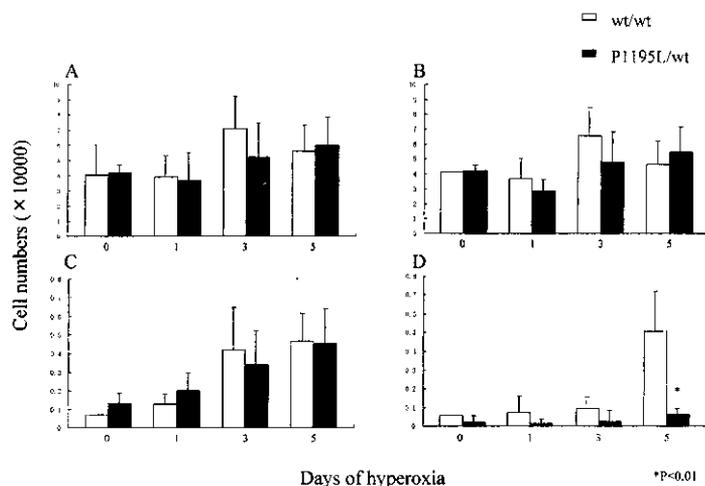


図2 80%酸素負荷によるBALFの細胞数の変化 (P1195L/wt: 黒カラム, wt/wt: 白カラム)
A: 全細胞数 B: マクロファージ C: リンパ球 D: 好中球
酸素負荷により細胞数は増加傾向にあるが、インスリン受容体変異マウスで好中球の増加は有意に抑制していた。

変異マウスは8日まで死亡しなかった。最終的にはインスリン受容体変異マウスは70%生存し野生型マウスは40%が生存していた(図1B)。16週齢になると野生型マウスは4日目より死にはじめ、7日目に全て死亡した。インスリン受容体変異は7日目から死にはじめるが8日目以降も10%が生存していた(図1C)。9ヶ月齢では生存率の差は非常に小さくなり両者ともに4日目より死にはじめる6日目までに全て死亡するが、5日目の時点での生存率はインスリン受容体変異マウスで70%、野生型マウスで40%となっていた(図1D)。以上よりインスリン受容体変異マウスは高酸素負荷による酸化ストレスに対して耐性を獲得していることが判明し

た。この耐性能は週齢によって差があり、若いインスリン受容体変異マウスほど高酸素負荷に対する耐性が高い傾向を示した。

次に高酸素負荷による肺障害を調べるために、12週齢マウスの野生型マウスが死にはじめる酸素負荷5日までのBALを行った。全細胞数は、酸素負荷後増加傾向にあるがコントロール群との間に有意差を認めなかった(図2A)。細胞分画ではマクロファージ数、リンパ球数において有意差はなかった(図2B, C)。一方、好中球はコントロール群で酸素負荷5日目に急激な増加を認めたが、インスリン受容体変異マウスではほぼ定常状態時と変わらなかった(図2D)。BALF中のタンパク量は酸

素負荷 1 日目より 3 日まで両群ともに増加した。コントロール群で酸素負荷 5 日目に急激なタンパク量の増加を認めたが、インスリン受容体変異マウスでは増加が緩やかであった(図 3)。このタンパク質の本体は、ほとんどがアルブミンであることから、インスリン受容体変異マウスでは血管透過性の亢進を抑制していることが示唆された。

MnSOD の発現を解析するために BAL 処理後の肺組織から mRNA を抽出し cDNA を合成した。MnSOD と GAPDH に特異的なプライマーを用いて RT-PCR を行った。その結果、定常状態ではインスリン受容体変異マウスで MnSOD の発現が有意に亢進していた(図 4)。酸素負荷 3 日目においてインスリン受容体変異マウスの MnSOD 発現の亢進は持続していた。一方野生型マウス MnSOD の発現亢進も認められた。RT-PCR の解析から、インスリン受容体変異マウスの肺では、MnSOD の発現が恒常的に高く持続され、その発現は高酸素負荷によっても保たれていることが示された。

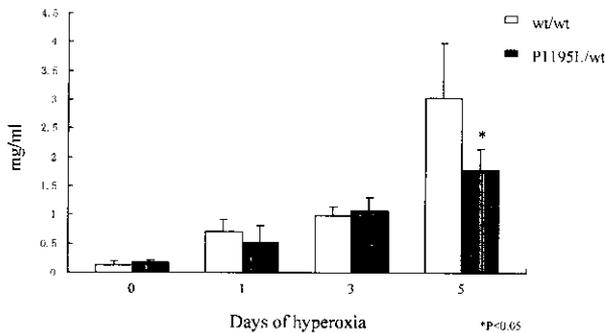


図 3 80%酸素負荷による BALF のタンパク量の変化
インスリン受容体変異マウスは酸素負荷後 5 日目に有意にタンパク量を抑制していた。

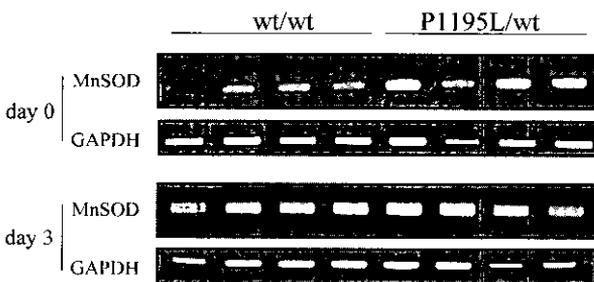


図 4 RT-PCR
各 4 匹ずつ、肺をサンプルに RT-PCR を施行した。インスリン受容体変異マウスで MnSOD の発現亢進が持続していた。

パラコート投与実験

70mg/kg を腹腔内投与したマウスを 2 時間おきに観察した。その結果、48 時間より死亡するマウスが観察された。投与後 4 日目に野生型マウスは急激に死亡するがインスリン受容体変異マウスは生存していた。以上より、インスリン受容体変異マウスは、高酸素負荷による酸化ストレス耐性に加えてパラコートに対する酸化ストレス耐性能も有していることが判明した(図 5)。

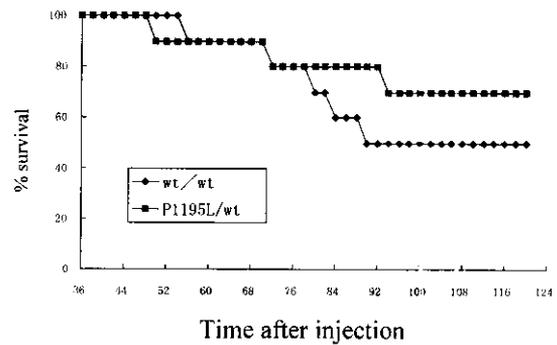


図 5 パラコート投与による生存曲線
パラコート (70mg/kg) を腹腔内投与し生存を観察した。80%酸素負荷と同様にインスリン受容体変異マウスで生存が延長した。

ブレオマイシン投与実験

ブレオマイシンをマウスの尾静脈より投与し、3 週間後に肺病変を観察した。ブレオマイシン 50mg/kg 投与群では野生型マウスに対してインスリン受容体変異マウスで肺の線維化は抑えられる傾向にあった。ブレオマイシン 100mg/kg 投与群で有意差を認め、インスリン受容体変異マウスでは野生型マウスで著明に認められた線維性病変や炎症細胞の浸潤は軽度であった(図 6)。

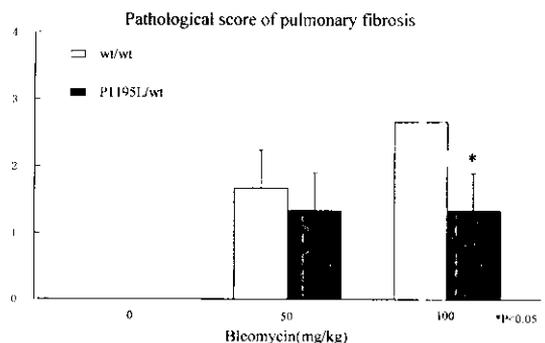


図 6 ブレオマイシン投与による肺線維化
ブレオマイシンを尾静脈注射し肺病変を点数化した。インスリン受容体変異マウスはブレオマイシン誘発性肺線維症の病変を軽減した。

考察、結論

Clancy⁶⁾らはインスリン受容体基質の変異ショウジョウバエ (Chico) の解析から、インスリン様シグナルの異常が酸化ストレス耐性を獲得し、寿命が延長することを報告した。この寿命延長は雌にだけ認められインスリンシグナルの異常が性によってコントロールされていることが示唆された。Holzenberger⁷⁾らはインスリン様成長因子1受容体 (IGF-1R) 欠損ヘテロマウスが雌マウスで寿命延長とパラコートによる酸化ストレス耐性を獲得することを明らかにした。このことから哺乳類(マウス)において IGF-1 シグナルが寿命および酸化ストレス耐性をコントロールしていることが明らかになった。また、IGF-1R 欠損ヘテロ雄マウスには寿命延長および酸化ストレス耐性が認められなかったことから哺乳類においても性差が IGF-1 シグナルに影響を及ぼしていることが示唆された。しかしながら、脂肪組織特異的なインスリン受容体欠損マウスは性差に関係なく寿命が延長する⁸⁾という報告もあることから、インスリン受容体変異マウスについて性差の影響を検討することが今後の課題である。

肺における MnSOD の発現を mRNA level で調べたところ、酸素負荷前の定常状態では発現は野生型マウスに比べて有意に上昇していた。酸素負荷により MnSOD の発現は亢進状態が維持されていた。このことは、インスリン受容体変異マウスにおける酸化ストレス耐性獲得には MnSOD の発現亢進が重要な役割の一端を担っていることが示唆された。

また、BALF の解析から酸素負荷5日目にコントロールマウスで急激な好中球の浸潤、血管透過性の亢進が認められた。80%酸素負荷の条件では5日目にコントロールマウスが死亡することから、これらの現象が肺障害の進行に重要な役割を担うことが裏付けられた。一方、インスリン受容体変異マウスは有意に好中球の浸潤、血管透過性を抑制することからインスリンシグナルの異常が高酸素負荷による肺障害の進行に抑制的に働くことが明らかになった。急性肺障害では好中球の影響が示唆されており⁹⁾、なかでも傷害物質である好中球エラスターゼの関与が注目されている¹⁰⁾。つまり、

肺障害の少ないインスリン受容体変異マウスでは、好中球エラスターゼの活性が抑制され肺胞内への好中球の浸潤を阻害している可能性がある。

特発性肺線維症の発症要因は活性酸素種、好中球エラスターゼなどの傷害物質、ウイルス感染などが考えられている。本研究においてインスリン受容体変異マウスがブレオマイシンによる肺線維症の発症を抑制したこと、肺での MnSOD の定常的な発現の誘導、好中球浸潤の抑制を示したことから、活性酸素による酸化ストレスと好中球浸潤がブレオマイシンによる肺線維化の増悪因子であることを裏付けた。

本研究からインスリン受容体変異マウスは、高酸素負荷、パラコート投与およびブレオマイシン投与による酸化ストレスに対して耐性を獲得していることが明らかになった。酸化ストレス耐性と寿命延長は密接に関連することから、インスリン受容体変異マウスの寿命が有意に延長することが期待される。現在、インスリン受容体変異マウスの寿命の解析中であり、マウスにおいてインスリンシグナルの異常が寿命をコントロールしているかどうか明らかにしていく予定である。

参考文献

- 1) Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G: daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 277: 942-6, 1997
- 2) Honda Y, Honda S: The daf-2 gene network for longevity regulates oxidative stress resistance and Mn-superoxide dismutase gene expression in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J*, 13 (11): 1385-93, 1999
- 3) Tatar M, Kopelman A, Epstein D, Tu MP, Yin CM, Garofalo RS: A mutant *Drosophila* insulin receptor homolog that extends life-span and impairs neuroendocrine function. *Science*, 292 (5514): 107-10, 2001. 4
- 4) 玉置正勝, 鈴木陽一, 白澤卓二, 青山昭徳, 吾妻安良太: 肺線維症発症要因としてのインスリン様受容体シグナル。厚生科学研究(特定疾患対策研究事業)びまん性肺疾患研究班平成12年

- 度研究報告書. 206-212, 2001.
- 5) Melov S, Ravenscroft J, Malik S, Gill MS, Walker DW, Clayton PE, Wallace DC, Malfroy B, Doctrow SR, Lithgow GJ: Extension of life-span with superoxide dismutase/catalase mimetics: Science, 289 (5484) : 1567-9, 2000.
 - 6) Clancy DJ, Gems D, Harshman LG, Oldham S, Stocker H, Hafen E, Leevers SJ, Partridge L: Extension of life-span by loss of CHICO, a Drosophila insulin receptor substrate protein. Science, 292: 104-6, 2001
 - 7) Holzenberger M, Dupont J, Ducos B, Leneuve P, Geloën A, Even PC, Cervera P, Le Bouc Y : IGF- I receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. Nature, 421 : 182-7. 2003
 - 8) Bluher M, Kahn BB, Kahn CR: Extended longevity in mice lacking the insulin receptor in adipose tissue. Science, 299: 572-4, 2003
 - 9) Davis WB, Rennard SI, Bitterman PB, Gadek JE, Sun XH, Wewers M, Keogh BA, Crystal RG: Pulmonary oxygen toxicity. Bronchoalveolar lavage demonstration of early parameters of alveolitis. Chest, 83: 35S, 1983
 - 10) Lee WL, Downey GP. : Leukocyte elastase: physiological functions and role in acute lung injury. Am J Respir Crit Care Med, 164 (5) : 896-904, 2001

間質性肺疾患における気管支肺胞洗浄液中 MDC, TARC の検討

西岡 安彦 岸 潤 曾根 三郎*

間質性肺疾患における macrophage-derived chemokine (MDC), thymus and activation-regulated chemokine (TARC) の関与を検討する目的で, 好酸球性肺炎 (EP) 18 症例, 特発性間質性肺炎 (IIP) 8 症例, COP8 症例, サルコイドーシス 8 症例, 過敏性肺臓炎 8 症例および健康人 7 例の気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の MDC および TARC を ELISA 法にて測定した。さらに, EP 症例 BALF より付着法にて肺胞マクロファージ (AM) を採取し, その培養上清中の MDC, TARC を測定し, 健康人の AM と比較した。また, 非刺激の状態から AM から total RNA を抽出し real-time PCR にて MDC mRNA の発現について定量解析を行った。その結果 EP 症例の BALF 中のみ MDC (13/18 症例), TARC (9/18 症例) の上昇が認められた。一方, その他の間質性肺疾患患者 BALF 中には, MDC, TARC は検出されなかった。EP 症例の AM 上清中には, 健康人の AM に比較して高濃度の MDC が検出されたが, TARC は検出できなかった。EP 症例の AM には, 健康人の AM に比較して有意に高い MDC mRNA が発現していた。以上から, EP における肺局所への炎症細胞浸潤にはケモカインとして MDC, TARC, 特に MDC の関与がしており, AM が MDC 産生を介して重要な役割を果たしていることが示唆された。

Analysis of macrophage-derived chemokine (MDC) and thymus and activation-regulated chemokine (TARC) in bronchoalveolar lavage fluid of patients with interstitial lung disease

Yasuhiko Nishioka, Jun Kishi, Saburo Sone

Department of Internal Medicine and Molecular Therapeutics, Course of Medical Oncology, the University of Tokushima School of Medicine

Macrophage-derived chemokine (MDC/CCL22) and thymus and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17), which are ligands for CC chemokine receptor (CCR) 4, have been shown to play a role in T helper 2 (Th2) type immune responses. In the present study, we examined the level of MDC and TARC in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of patients with interstitial lung diseases. MDC was detected in BALF of thirteen of eighteen patients with eosinophilic pneumonia (EP), whereas we could not detect MDC in BALF of patients with other interstitial lung disease including idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), cryptogenic organizing pneumonia (COP), sarcoidosis and hypersensitivity pneumonitis (HP), and healthy volunteers (HV). Thymus- and activation-regulated chemokine (TARC/CCL17) was also detected in BALF of nine of eighteen patients with EP. The concentration of MDC was higher than that of TARC in all of seven cases whose BALF contained the detectable level of both MDC and TARC. The level of MDC in BALF was correlated with that of TARC in IEP. When the spontaneous production of MDC by alveolar macrophages (AM) was examined, MDC in the supernatant of AM from EP patients was significantly higher than that from HV. Furthermore, analysis of real-time PCR showed that AM in BALF of patients with EP expressed the higher level of MDC mRNA when compared with HV. These findings suggest that MDC might play more important role in Th2-dominant immune response in the lung circumstances of EP when compared with TARC, and AM play a critical role in the pathogenesis of EP as the main producer of MDC.

び健常人ではすべて検出感度以下であった (Fig. 1). 一方, BALF 中 TARC 濃度は好酸球性肺炎 18 症例中 9 症例で高値を示し, その他の間質性肺疾患および健常人ではすべて検出感度以下であった (Fig. 2). MDC, TARC の上昇が見られた個々の症例において, MDC と TARC の濃度を比較すると, すべての症例において, MDC がより高値であった (Fig. 3). また, MDC と TARC 濃度の間には相関を認めた (相関係数 0.62, $p=0.0297$) (Fig. 4). 一方, MDC および TARC の濃度と, BAL 中リンパ球数, 好酸球数, AM 数の間には, 有意な相関を認めなかった. 好酸球性肺炎と健常人の BALF 中の AM 培養上清を用いて, MDC 濃度を比較した結果, 培養 24 時間, 48 時間のいずれにおいても好酸球性肺炎群の MDC 濃度が有意に高値であった (Fig. 5). さらに, 好酸球性肺炎と健常人の AM における MDC mRNA を比較した結果, 好酸球性肺炎患者 3 名の AM において, 有意に高い MDC mRNA 発現を認めた (Fig. 6).

考案・結論

間質性肺疾患の BALF 中の MDC, TARC 濃度を測定した結果, 好酸球性肺炎 18 症例中 13 症例で MDC, 9 症例で TARC が高値を示した. その他の間質性肺疾患患者の BALF 中には, MDC, TARC は検出されなかった. 以上から好酸球性肺炎においては, 肺局所の炎症反応に Th2 タイプの炎症反応が関与していることが示唆される結果となった. 間質性肺疾患患者の BALF の濃縮液を用いた検討から, Walker ら³⁾ は好酸球性肺炎患者 BALF 中に IL-5, IL-6 の上昇を認めているが, 同時に IFN- γ も増加していることから, 好酸球性肺炎における BAL 中サイトカイン産生パターンは Th1, Th2 のどちらとも言えないと結論している. 一方, 最近 Miyazaki ら⁴⁾ は, 好酸球性肺炎患者 BALF 中に TARC の増加を報告しており, TARC が Th2 細胞の遊走に働いている可能性を報告している. 今回, 我々の検討から好酸球性肺炎患者 BAL 中に TARC ばかりでなく, MDC も増加していることが明らかとなった. さらに, これら Th2 タイプケモカイン

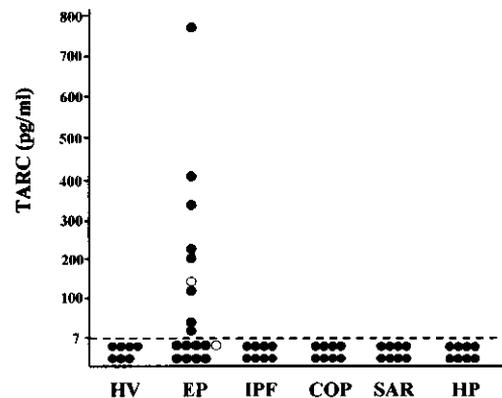


Figure 2 Levels of TARC in BALF of patients with interstitial pneumonia

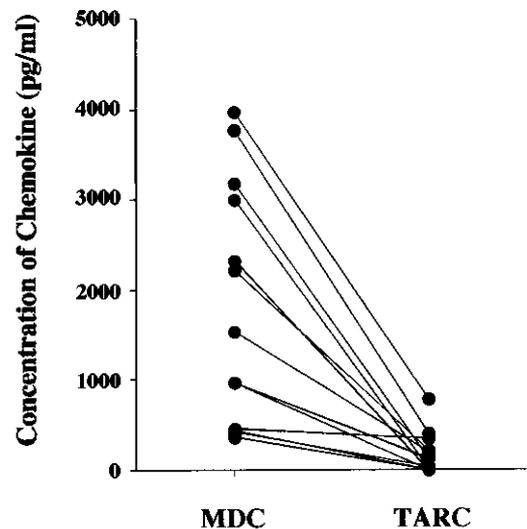


Figure 3 Comparison of concentration of MDC and TARC in BALF of patients with interstitial pneumonia.

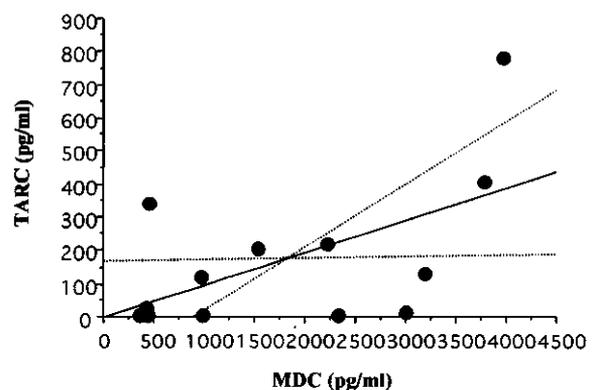


Figure 4 Correlation of concentration of between MDC and TARC in BALF of patients with interstitial pneumonia.