

Figure 5 Production of MDC by alveolar macrophages of normal subjects and EP patients.

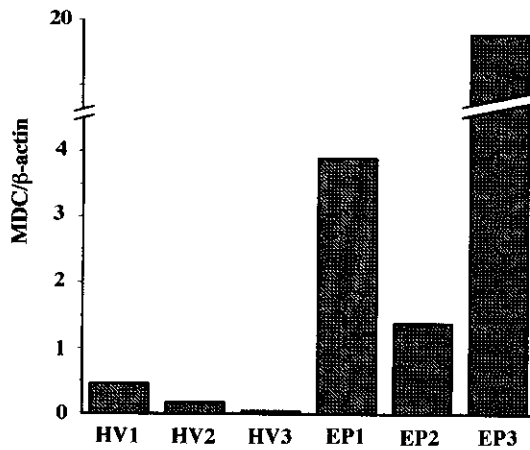


Figure 6 Expression of mRNA of MDC by alveolar macrophages of normal subjects and EP patients.

が増加していた患者においては、いずれも MDC が TARC より有意に高値であった。また、Imaiらは MDC と TARC の CCR4 陽性細胞に対する遊走活性を検討し、MDC の遊走活性が TARC より有意に高いことを報告している⁵⁾。以上から、好酸球性肺炎患者の肺局所における Th2 細胞の遊走には MDC がより重要な役割を果たしていることが推測される。

また、MDC と TARC の産生細胞が異なることが報告されている。MDC は、主にマクロファージ系細胞から産生される⁶⁾。今回の検討においても好酸球性肺炎患者から回収した AM は、無刺激の状態でも高い MDC 産生を示した。一方、AM から TARC の産生についても検討したが、健康人および好酸球性肺炎患者からの AM には TARC 産生は検出されなかった。さらに、好酸球性肺炎患者の AM では、MDC mRNA の発現が亢進していたことから、好酸球性肺炎において AM は肺局所で MDC 産生亢進をきたす何らかの刺激をうけていることが推測される。一方、TARC は気道上皮からの産生が報告されており⁷⁾、好酸球性肺炎における産生亢進も気道上皮からの産生亢進の可能性がある。また、樹状細胞には高い MDC, TARC 産生能があり、また、MDC は B リンパ球, T リンパ球からも産生されることが知られており、これらの細胞の関与も考えられる^{8,9)}。

今回の検討では、MDC, TARC とともに BAL 中リ

table 1

Group	male/female	Age (yr)	Bronchoalveolar lavage				
			Total cells ($\times 10^5/\text{ml}$)	Percentages of total cells			
				AM	Ly	Neut	Eo
EP	9/9	48.0 \pm 4.2	10.1 \pm 2.3*	25.9 \pm 3.8 [†]	21.1 \pm 5.3	3.2 \pm 1.4	49.8 \pm 5.7 [‡]
IPF	7/1	67.1 \pm 1.7	3.2 \pm 1.0	66.4 \pm 8.3 [†]	21.3 \pm 4.7	5.8 \pm 3.1	6.5 \pm 3.1
COP	3/5	51.7 \pm 5.1	6.2 \pm 2.3	50.7 \pm 6.9 [†]	41.5 \pm 7.0*	3.4 \pm 1.7	4.4 \pm 1.3 [‡]
SAR	3/5	47.0 \pm 4.9	3.9 \pm 0.6 [†]	48.3 \pm 6.5 [†]	50.6 \pm 6.6 [†]	0.7 \pm 0.3	0.6 \pm 0.3
HP	4/4	54.4 \pm 3.1	9.2 \pm 2.0 [§]	39.3 \pm 7.8 [†]	56.0 \pm 8.4 [†]	1.5 \pm 0.5	3.3 \pm 1.5
HV	6/1	21.9 \pm 0.8	2.0 \pm 0.2	88.9 \pm 2.6	10.0 \pm 2.5	0.7 \pm 0.2	0.3 \pm 0.2

Definition of abbreviations: AM = alveolar macrophages; COP = cryptogenic organizing pneumonia; Eo = eosinophils; EP = eosinophilic pneumonia; HP = hypersensitivity pneumonitis; HV = healthy volunteers; IPF = idiopathic pulmonary fibrosis; Ly = lymphocytes; Neut = neutrophils; SAR = sarcoidosis.

Data are shown as Mean \pm SEM.

* $P < 0.005$, compared with the group of healthy volunteers.

[†] $P < 0.001$, compared with the group of healthy volunteers.

[‡] $P < 0.05$, compared with the group of healthy volunteers.

[§] $P < 0.01$, compared with the group of healthy volunteers.

ンパ球数との相関は認められなかったが、これらのケモカインは CCR4 陽性細胞にのみ働くことから、今後は、フローサイトメトリー法を用いて CCR4 陽性細胞数を検出し、CCR4 陽性リンパ球との相関を検討する必要があると思われる。IPF においては線維化期には Th2 タイプの炎症反応が関与しているとする報告もあるが¹⁰⁾、今回の検討では好酸球性肺炎以外の間質性肺疾患患者 BALF 中には、MDC、TARC ともに検出されなかった。今回使用した BALF サンプルは濃縮していないため、微細な MDC、TARC の変化を検出できていない可能性がある。濃縮したサンプルを用いることにより詳細な解析が可能であり、今後検討すべき課題と思われる。

以上の結果より間質性肺疾患の中で好酸球性肺炎においては MDC、TARC の関与する Th2 パターンの炎症反応が疾患病態に関与しており、MDC の産生細胞として AM が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) Mosmann TR & Coffman RL. TH1 and TH2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different function properties. *Annu Rev Immunol* 1989; 7: 145-173.
- 2) Baggiolini M. Chemokine and leukocyte traffic. *Nature* 1998; 392: 565-568.
- 3) Walker C, Bauer W, Braun RK, Menz G, Braun P, Schwarz F, Hansel TT and Villiger B. Activated T cells and cytokines in bronchoalveolar lavages from patients with various lung diseases associated with eosinophils. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 1038-1048.
- 4) Miyazaki E, Nureki S, Fukami T, Shigenaga T,

- Ando M, Ito K, Ando H, Sugisaki K, Kumamoto T, Tsuda T. Elevated levels of thymus- and activation-regulated chemokine in bronchoalveolar lavage fluid from patients with eosinophilic pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 1125-1131.
- 5) Imai T, Chantry D, Raport CJ, Wood CL, Nishimura M, Godiska R, Yoshie O, Gray PW. Macrophage-derived chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor 4: *J Biol Chem* 1998; 273: 1764-1768.
- 6) Mantovani A, Gray PA, Van Damme J and Sozzani S. Macrophage-derived chemokine (MDC). *J Leukoc Biol* 2000; 68: 400-404.
- 7) Berin MC, Eckmann L, Broide DH, Kagnoff MF. Regulated production of the T helper 2-type T-cell chemoattractant TARC by human bronchial epithelial cells in vitro and in human lung xenografts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24: 382-389.
- 8) Vulcano M, Albanesi C, Stoppacciaro A, Bagnati R, D'Amico G, Struyf S, Transidico P, Bonecchi R, Del Prete A, Allavena P, Ruco LP, Chiabrandi C, Girolomoni G, Mantovani A, Sozzani S. Dendritic cells as a major source of macrophage-derived chemokine/CCL22 in vitro and in vivo. *Eur J Immunol* 2001; 31: 812-822.
- 9) Galli G, Chantry D, Annunziato F, Romagnani P, Cosmi L, Lazzeri E, Manetti R, Maggi E, Gray PW, Romagnani S. Macrophage-derived chemokine production by activated human T cells in vitro and in vivo: preferential association with the production of type 2 cytokines. *Eur J Immunol* 2000 ; 30: 204-210.
- 10) 曾根三郎. 特発性間質性肺炎 (IIP) とサイトカインネットワーク. *呼吸* 1997 ; 16 : 372-379.

マウス肺線維化モデルにおける ST2 発現に関する検討

田島 俊児 押川 克久 大野 彰二 杉山幸比古*

肺の線維化亢進過程では Th2 サイトカインが優位であるとの報告があるが、明確な結論はでない。我々はブレオマイシン (BLM) 肺線維化モデルにおける Th1/Th2 サイトカインバランスと Th2 特異的に発現する ST2 との関連を検討した。BLM 感受性で強い肺線維化を来す C57BL/6 マウスと BLM 耐性の Balb/c マウスに BLM (5mg/kg) を気管内投与して肺組織の ST2, IL-4, IL-5, IFN- γ mRNA の経時的な発現を RT-PCR 法で比較検討した。C57BL/6 では IL-4/IFN- γ と IL-5/IFN- γ が線維化開始期である Day 7 において Balb/c と比較し有意に高値を示した。また、C57BL/6 での ST2 は day 7-21 に発現増強を認め、その発現量は IL-5 の発現量とヒドロキシプロリン量に相関した。以上の結果から BLM モデルにおける肺線維化には Th2 にシフトしたサイトカインバランスと ST2 遺伝子の発現増強が関与している可能性が示唆された。

Soluble ST2 Gene Expressions of The Lung in Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis

Shunji Tajima, Katsuhisa Oshikawa, Shoji Ohno, and Yukihiko Sugiyama

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

Background: The murine ST2 gene can be specifically induced by growth stimulation in fibroblasts, and can be also induced by antigen stimulation in type-2 helper T cell (Th2). Recently, it has been reported that the inflammatory response in idiopathic pulmonary fibrosis is thought to be associated closely with Th2-type immune response. Therefore, we investigated ST2 gene expression and the presence of Th1/Th2 cytokine imbalance in bleomycin (BLM)-induced pulmonary fibrosis model.

Materials and Methods: The C57BL/6 (fibrosis-prone) mice and Balb/c (fibrosis-resistant) mice were intratracheally instilled with BLM (5U/kg/mouse/50 μ l) under anesthesia. The mRNA expressions of soluble ST2 (ST2), IL-4, IL-5 and IFN- γ in whole-lung homogenates of BLM treated mice were analyzed by reverse transcription polymerase chain reaction and normalized to that of β -actin expression. Values were compared with baseline levels determined in untreated animals.

Results: Lung IL-4/IFN- γ and IL-5/IFN- γ mRNA ratio of BLM-treated C57BL/6 mice were significantly increased on Day 7, comparing with those of Balb/c mice. In C57BL/6 mice, lung ST2 mRNA expression increased significantly between Day 7 and 21 after instillation of BLM, which declined to the baseline levels after Day 56. In addition, ST2 mRNA expression statistically correlated with IL-5 mRNA expression and hydroxyproline levels.

Conclusions: These findings suggested that the inflammatory response in the lung was shifted to a predominance of Th2 cytokine pattern in a murine model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis, and that upregulated expression of the ST2 gene may play a pivotal role in bleomycin-induced pulmonary fibrosis.

はじめに

ヘルパー T 細胞は、interleukin (IL)-12 により誘導されるヘルパー T 細胞 type 1 (Th1) と IL-4 により誘導されるヘルパー T 細胞 type 2 (Th2) に分けられる¹⁾。Th1 細胞は interferon (IFN)- γ を産生し、Th2 細胞は IL-4, IL-5, IL-13 を産生することで、種々の疾患において Th1/Th2 バランスの変化が病態形成に重要な役割を演じていると考えられている。Th2 サイトカインである IL-4 は線維芽細胞の増殖や線維芽細胞からの collagen 産生を促進する一方、Th1 サイトカインである IFN- γ はこれらを抑制する²⁾。Wallace らは特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis, 以下 IPF) 患者 10 例の肺生検組織で免疫染色と in situ hybridization を行い、肺組織への浸潤細胞の IFN- γ 陽性率は 5% 以下であるも、50% 以上の細胞が Th2 サイトカイン (IL-4, IL-5) に陽性であることを示した³⁾。これらのことから、肺の線維化亢進過程では Th1/Th2 バランスが、Th2 にシフトしていると考えられるが、否定的な報告もあり⁴⁾、明確な結論はでていない。

肺の線維化過程を検討するモデルとして使用されているブレオマイシン (以下 BLM) 肺線維化モデルでも、IL-12 の投与による肺線維化抑制の報告があり⁵⁾、Th1/Th2 バランスが病態に関与することが示唆されている。しかし、Th1 サイトカインである IFN- γ のノックアウトマウスで肺線維化が抑制されるとの報告もあり⁶⁾、ヒトと同様に Th1/Th2 バランスと肺線維化の関連についての明確な結論はでていない。また、肺線維化に関与する因子を同定する手段として、BLM 感受性で強い肺線維化を来す C57BL/6 マウスと BLM 耐性の Balb/c マウスの比較検討が多数報告されているが、Th1/Th2 バランスについての十分な検討はなされていない。

ST2 遺伝子は BALB/c-3T3 細胞の増殖過程で誘導的に発現する遺伝子としてクローニングされ、膜貫通受容体型の ST2L と分泌型の可溶性 ST2 (以下 ST2) に分類される⁷⁾。近年、ST2 の発現がリンパ球においては Th2 特異的に発現するとの報告があり⁸⁾、我々は、アトピー型気管支喘息患者において

血清中 ST2 が上昇し、喘息発作の重症度と関連することを報告した⁹⁾。さらに我々は IPF 患者において血清中の ST2 が健常対照群よりも有意に高値を示し、LDH と正の相関を、PaO₂、%VC と負の相関を認めることを報告した (投稿中)。

これらのことから ST2 は Th2 の活性化と関連し、肺線維化過程にも何らかの影響を及ぼしているのではないかと考えた。そこで今回我々は BLM 肺線維化モデルにおける Th1/Th2 インバランスと ST2 発現について検討した。

対象と方法

マウスは 6-8 週齢の雌性を使用した。Day 0 に、ネンブータル腹腔内投与にて麻酔後、頸部を縦切開、気管を露出後、Bleomycin chlorate (5mg/kg) を生理食塩水 50 μ l で溶解して 26G 注射針にて気管内に投与し、BLM 肺線維化モデルを作成した。

Th1/Th2 バランスの検討については、BLM 感受性の C57BL/6 マウスと BLM 耐性の Balb/c マウスの 2 群について比較検討した。Day 0 (無処置)、BLM 投与後 Day 7, Day 28 にネンブータル麻酔下に脱血後、両肺を採取した。左肺組織にてハイドロキシプロリン含有量の測定を行い、右肺組織は液体窒素で凍結後、ホモジネートして TRIzol (LIFE TECHNOLOGIES) で total RNA を抽出した。肺組織中の IL-4, IL-5, IFN- γ mRNA を reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法にて検出し、PCR 産物は 3% agarose gel に泳動した。mRNA 発現量はデンストメーターで定量化後、 β -actin で補正し、さらに Day 0 (無処置群) での発現量が 1 となるように Day 0 群の平均値で補正した。ハイドロキシプロリン量についても Day 0 (無処置群) での含有量が 1 となるように同様に補正を行った。

ST2 mRNA 発現については、BLM 感受性 C57BL/6 マウスの肺線維化モデルを用いて、Day 0, 1, 4, 7, 14, 21, 28, 56 について前記と同様に検討を行った。

結果は平均値 \pm 標準誤差で記し、 $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。

結 果

従来報告と同様に、肺線維化の指標であるハイドロキシプロリン量は、BLM 感受性の C57BL/6 では Day 7 以降に有意な増加を認め、BLM 耐性の Balb/c では増加を認めなかった (Fig. 1A)。Balb/c と C57BL/6 における Th1/Th2 サイトカイン・インバランスの有無を確認するため、Th2 サイトカインと IFN- γ の肺組織のサイトカイン mRNA 発現量の比をとったところ、C57BL/6 では Balb/c と比較し、IL-4/IFN- γ 、IL-5/IFN- γ とともに day7 に有意な発現比増強が認められた (Fig. 1B, 1C)。

次に BLM 感受性で強い肺線維化を来す C57BL/6 でハイドロキシプロリン量と IL-4、IL-5、IFN- γ mRNA の詳細な経時的発現変化について検討した。肺線維化の指標であるハイドロキシプロリン量は

Day7 より有意に増加し始めていた (Fig. 2A)。Th2 サイトカインと IFN- γ の発現比の検討では、Balb/c との比較で確認された Th2 にシフトしたサイトカインバランスは、Day 7 でのみ認められた (Fig. 2B, 2C)。

最後に BLM 肺線維化モデルにおける ST2 の関与を検討するため、C57BL/6 における ST2 遺伝子の発現を調べた。ST2 は day 14 を最大に Day 7 ~ 21 で発現増強を認めた (Fig. 3)。BLM 肺線維化モデルで、ST2 と Th2 サイトカインの発現増強を認めたことから、ST2 と他のサイトカイン発現の関連について検討したところ、ST2 は IL-5 と有意な正の相関関係を認めた (Table 1)。また、肺線維化の指標であるハイドロキシプロリン量との相関を検討したところ IL-5 と ST2 が有意な正の相関関係を認めた (Table 1)。

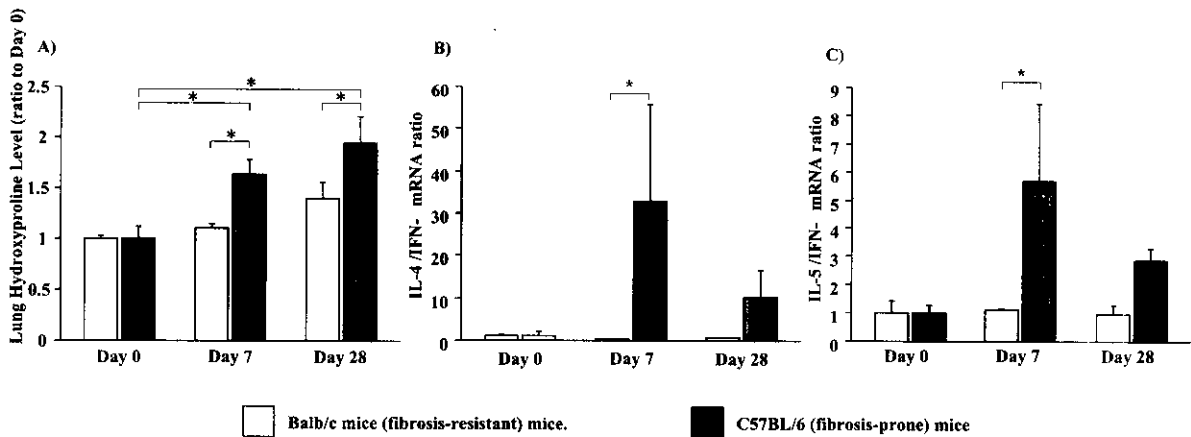


Fig. 1 Balb/c (fibrosis-resistant) マウスと C57BL/6 (fibrosis-prone) マウスの BLM モデル肺におけるハイドロキシプロリン量と Th1/Th2 サイトカイン・インバランスの比較。

結果は全て Day0 (無処置群) を 1 とした比で表示、(A) C57BL/6 マウスは Day0 (無処置群) と比較し、Day7 以降に有意なハイドロキシプロリン量の増加を認めるが、Balb/c マウスではハイドロキシプロリン量の増加を認めない。(B) (C) Balb/c マウスと比較し C57BL/6 マウスでは、Day7 において IL-4/IFN- γ および IL-5/IFN- γ の有意な増加を認める。各群 n=4, *p<0.05 versusu Days 0.

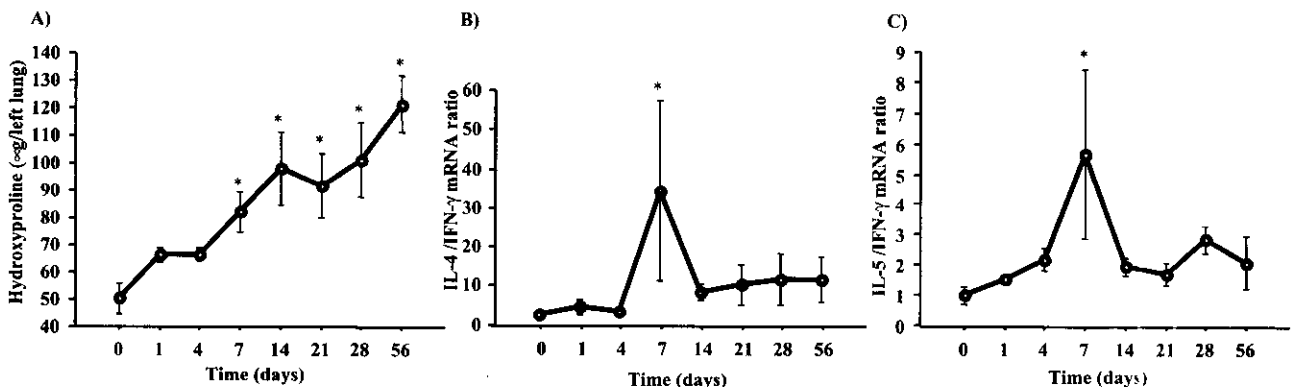


Fig. 2 C57BL/6 マウス BLM モデル肺におけるハイドロキシプロリン量と Th1/Th2 サイトカイン・インバランス。

(A) ハイドロキシプロリン量は Day0 (無処置群) と比較し、BLM 投与後 Day7 より有意に増加している。(B) (C) Day0 (無処置群) を 1 とした比で表示、IL-4/IFN- γ および IL-5/IFN- γ は、Day7 で有意に増加している。各群 n=4, *P<0.05 versusu Days 0.

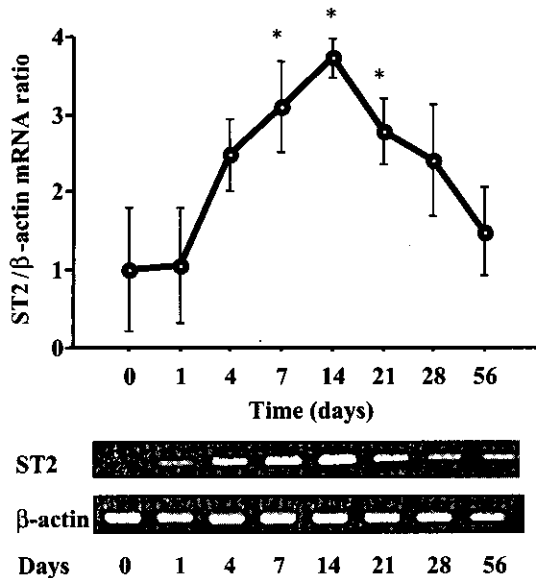


Fig. 3 C57BL/6 マウス BLM モデル肺における ST2mRNA の発現。結果は Day 0 (無処置群) を 1 とした比で表示。Day 0 (無処置群) と比較し、BLM 投与後 Day 7 ~ 21 で有意に ST2mRNA の発現が増強している。各群 n=4, *P<0.05 versus Days 0.

考 案

今回、C57BL/6 の BLM 肺線維化モデルでは、肺の線維化開始期に Th2 にシフトした Th1/Th2 サイトカイン・インバランスが存在することを報告した。近年 Th1 および Th2 サイトカインの BLM 肺線維化モデルにおける役割については、様々な報告がなされている。IL-12⁵⁾ や IFN- γ ¹⁰⁾ の投与により Th1 にシフトすることで肺線維化を抑制するとの報告がある一方、IL-4¹¹⁾ や IL-5¹²⁾ のノックアウトマウスでは肺の線維化が抑制されないとされており、さらに IFN- γ のノックアウトマウスで肺線維化が抑制されるとの報告がある⁶⁾。Th1/Th2 サイトカイン以外に肺の線維化に関与する因子としては、tumor necrosis factor (TNF)- α ¹³⁾ や IL-1 β ¹⁴⁾ などの pro-inflammatory cytokine が報告されている。また Jhon らは IL-4 の抗体では BLM による肺線維化は抑制されないが、IL-13 の抗体投与で CC ケモカインで

ある C10 を抑制することで肺線維化を抑制すると報告している¹⁵⁾。このように、肺の線維化には Th1/Th2 サイトカインバランスのみではなく、種々のケモカインや pro-inflammatory cytokine が様々な複雑に関与している可能性が考えられる。

ST2 遺伝子は、Th1 細胞には発現せず、Th2 細胞特異的に発現するとされており⁸⁾、今回 C57BL/6 マウスの BLM モデルで Day 14 を最大に発現が増強した。また、ST2 の発現量は IL-5 およびヒドロキシプロリン量と相関したことから、ST2 は Th2 サイトカインおよび肺の線維化に関与している可能性が示唆された。ST2 の産生細胞については線維芽細胞⁷⁾ や Th2 細胞⁸⁾ の他に、我々は *in vitro* において気道上皮細胞、II 型肺胞上皮細胞、肺胞マクロファージ、肺の血管内皮細胞や平滑筋細胞での ST2 の発現も確認している¹⁶⁾。今後、BLM モデルにおける ST2 の産生細胞について、肺組織の免疫染色や *in-situ hybridization* による検討が必要と考えられる。

ST2 の肺線維化における役割については不明であるが、他の疾患モデルでは ST2 が Th2 サイトカインのみならず pro-inflammatory サイトカインにも関与しているとの興味深い報告がある。我々は、マウスの喘息モデルに ST2 遺伝子を導入すること¹⁷⁾ により、IL-4 と IL-5 の産生が抑制され、好酸球性炎症が改善することを報告した。ST2 による Th2 関連炎症抑制機序の仮説としては、可溶性の ST2 蛋白が、受容体型の ST2L に結合する未知の ligand を競合的に阻害する可能性を考えている。さらに ST2 は TNF- α や IL-1 β などの pro-inflammatory サイトカインの刺激により発現が増強すると報告されており¹⁸⁾、Sweet らはマウスの LPS ショックモデルに ST2 融合蛋白を投与することで、Toll like receptor 4 の down-regulation を介して、TNF- α の産生を抑制して予後を改善することを報告している¹⁹⁾。膜貫通受容体型の ST2L は IL-1 receptor type

Table 1 C57BL/6 マウス BLM モデル肺における ST2 およびヒドロキシプロリン量と Th1/Th2 サイトカインの相関関係

	ST2 mRNA		Hydroxyproline	
	r	p Value	r	p Value
IL-4 mRNA	0.20	0.27	0.20	0.29
IL-5 mRNA	0.53	0.001*	0.36	<0.05*
IFN- γ mRNA	0.30	0.10	0.19	0.30
IL-4/IFN- γ	0.06	0.74	0.05	0.74
IL-5/IFN- γ	0.05	0.81	0.04	0.83
ST2 mRNA	-	-	0.36	0.04*

I と 相 同 性 が 高 く TIR (Toll like receptor/IL-1 receptor) superfamily に属しており²⁰⁾, 現在までのところ ST2 遺伝子産物は, Th2 と pro-inflammatory サイトカンの両方に関与する可能性が考えられている. 今回は ST2 の発現を検討したが, ST2L についても検討を加える予定である. 今後, ST2L に対する ligand の同定や ST2L の細胞内シグナル伝達についてのさらなる検討が望まれる.

結 論

BLM モデルにおける肺線維化には Th2 にシフトしたサイトカイン・インバランスと ST2 の発現増強が関与している可能性が示唆された. 今後, 肺の線維化における ST2 の役割について, ST2 のトランスジェニックマウスやノックアウトマウスを使用した BLM モデルの検討を行う予定である.

参考文献

- 1) Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996; 17: 138-146
- 2) Lawrence DA. Transforming growth factor-beta: a general review. *Eur Cytokine Netw* 1996; 7: 363-374
- 3) Wallace WA, Ramage EA, Lamb D, *et al.* A type 2 (Th2-like) pattern of immune response predominates in the pulmonary interstitium of patients with cryptogenic fibrosing alveolitis (CFA). *Clin Exp Immunol* 1995; 101: 436-441
- 4) Walker C, Bauer W, Braun RK, *et al.* Activated T cells and cytokines in bronchoalveolar lavages from patients with various lung diseases associated with eosinophilia. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 150: 1038-1048
- 5) Keane MP, Belperio JA, Burdick MD, *et al.* IL-12 attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281: L92-L97
- 6) Chen ES, Greenlee BM, Wills-Karp M, *et al.* Attenuation of lung inflammation and fibrosis in interferon-gamma-deficient mice after intratracheal bleomycin. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2001; 24: 545-555
- 7) Tominaga S. A putative protein of a growth specific cDNA from BALB/c-3T3 cells is highly similar to the extracellular portion of mouse interleukin 1 receptor. *FEBS Lett* 1989; 258: 301-304
- 8) Yanagisawa K, Naito Y, Kuroiwa K, *et al.* The expression of ST2 gene in helper T cells and the binding of ST2 protein to myeloma-derived RPMI8226 cells. *J Biochem (Tokyo)* 1997; 121: 95-103
- 9) Oshikawa K, Kuroiwa K, Tago K, *et al.* Elevated soluble ST2 protein levels in sera of patients with asthma with an acute exacerbation. *Am J Respir Crit Care Med* 2001; 164: 277-281
- 10) Okada T, Sugie I, Aisaka K. Effects of gamma-interferon on collagen and histamine content in bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *Lymphokine Cytokine Res.* 1993; 12: 87-91
- 11) Izbicki G, Or R, Christensen TG, Segel MJ, *et al.* Bleomycin-induced lung fibrosis in IL-4-overexpressing and knockout mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002; 283: L1110-L1116
- 12) Hao H, Cohen DA, Jennings CD, *et al.* Bleomycin-induced pulmonary fibrosis is independent of eosinophils. *J Leukoc Biol.* 2000; 68: 515-521
- 13) Sime PJ, Marr RA, Gauldie D, *et al.* Transfer of tumor necrosis factor-alpha to rat lung induces severe pulmonary inflammation and patchy interstitial fibrogenesis with induction of transforming growth factor-beta1 and myofibroblasts. *Am J Pathol* 1998; 153: 825-832
- 14) Kolb M, Margetts PJ, Anthony DC, *et al.* Transient expression of IL-1beta induces acute lung injury and chronic repair leading to pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 2001; 107: 1529-1536
- 15) Interaction of IL-13 and C10 in the pathogenesis of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002; 27: 419-427
- 16) Oshikawa K, Yanagisawa K, Tominaga S, *et al.* ST2 protein induced by inflammatory stimuli can modulate acute lung inflammation. *Biochem*

- Biophys Res Commun 2002; 299: 18-24
- 17) Oshikawa K, Yanagisawa K, Tominaga S, *et al.*
Expression and function of the ST2 gene in a murine
model of allergic airway inflammation. Clin Exp
Allergy. 2002; 32: 1520-1526
- 18) Kumar S, Tzimas MN, Griswold DE, *et al.*
Expression of ST2, an interleukin-1 receptor
homologue, is induced by proinflammatory stimuli.
Biochem Biophys Res Commun 1997; 235: 474-478
- 19) Sweet MJ, Leung BP, Kang D, *et al.* A novel
pathway regulating lipopolysaccharide-induced
shock by ST2/T1 via inhibition of Toll-like receptor
4 expression. J Immunol 2001; 166: 6633-6639
- 20) Yanagisawa K, Takagi T, Tsukamoto T, *et al.*
Presence of a novel primary response gene ST2L,
encoding a product highly similar to the interleukin
1 receptor type 1. FEBS Lett 1993; 318: 83-87

マウスの肺線維症モデルを用いた肺線維化のメカニズムの研究 放射線照射による肺線維化の過程に対する加齢，遺伝的背景および 他の線維化促進物質との相互作用の検討

大田 健* 中野 純一

我々は C57BL/6 マウスを用いてシリカによる肺の線維化で PDGF が重要であることを報告した。ヒトの放射線肺炎でも同サイトカインが重要であることが報告されている。今回 C57BL/6 マウスを用いて 10Gy と 15Gy の設定で照射を施行した。炎症と線維化の変化を検討するために BALF, 病理学的な所見 (Ashcroft score), 生化学的な線維化の指標 (ヒドロキシプロリン) について 8 (16) 週まで評価した。照射後 8 週までで胞隔炎を確認し PDGF の発現も確認した。しかし、その後の病理学的に確立した線維化にはさらに時間的な検討が必要であり、また他には遺伝的な側面までを含めた解析が必要と考えられた。

Investigation of lung fibrosis with murine models — Examination of an interaction with aging, the hereditary background, and other promotion factors of fibrosis after irradiation —

Ken Ohta, Junichi Nakano

Teikyo university school of medicine

We reported that PDGF was important in fibrosis of the lungs with murine model using C57BL/6 mouse with silica particles. It is reported that PDGF is important also in human's radiation pneumonitis. Irradiation was enforced to the same strain of mouse (C57BL/6) in a dose of 10Gy and 15Gy. In order to evaluate the change of inflammation and fibrosis, we studied about the index of inflammatory and fibrous changes including BALF in mouse, a pathological findings (Ashcroft score), and hydroxyproline as a biochemical marker of fibrosis. Alveolitis was demonstrated even in eight weeks after irradiation, and the elevated level of mRNA of PDGF was also represented in this study. However, it is important to investigate further time point after irradiation for understanding of these processes of fibrosis. Furthermore it is still to be discussed in a view of genetic factors in which some strains of mouse such as C57BL/6 or Balb/C are sensitive to irradiation and some others such as CH3 are not sensitive to same stimulation.

背景

肺線維症はその有効な治療法も確立しておらず予後不良であり、その病態の解明が必要である。多くは実験的な肺線維症の検討によるが、この成立過程では、急性期における炎症反応とその後の線維芽細胞の分裂・増殖（線維化）のそれぞれの局面で種々のサイトカインが関与していると考えられる。まず前者の急性期のサイトカインとしては interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-8, tumor necrosis factor (TNF)- α , macrophage chemotactic protein-1 (MCP-1), また後者の線維化の成立期には tumor growth factor (TGF)- β , insulin-like-growth factor (IGF)-1, platelet derived growth factor (PDGF), basic fibroblast growth factor (b-FGF) などのサイトカインの関与が示唆されている。

我々は、その中で線維芽細胞の competence factor である PDGF に注目し検討をしている。まずシリカによるマウスの線維症モデルにおいては ELISA による測定で PDGF が上昇することを確認している (図 1)。PDGF に対するモノクローナル抗体 (中和抗体) により気管支洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid: BALF) 中の好中球浸潤が抑えられ (図 2), かつ病理学的なスコア (図 3) や病理所見 (図 4), また線維化の生化学的な指標であるヒドロキシプロリンも有意に低下する (図 5) ことを実験で示した。以上の結果はマウスのシリカを用いた肺線維症モデルでサイトカインとして PDGF が重要であり、その活性を抑制することが治療的にも有用であることを示している。

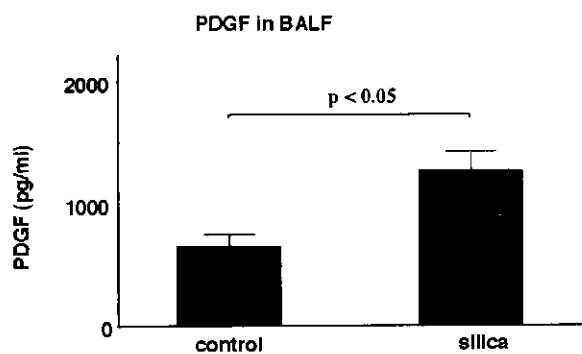


図 1

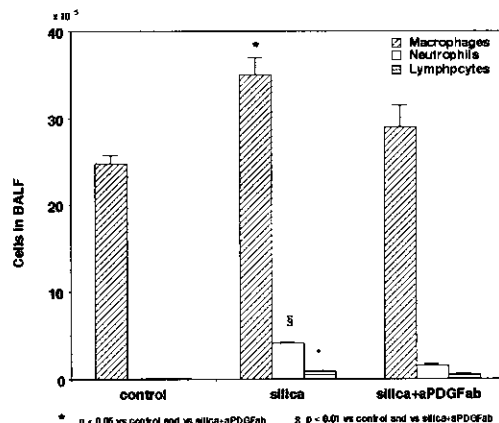


図 2 Formation of cells in BALF

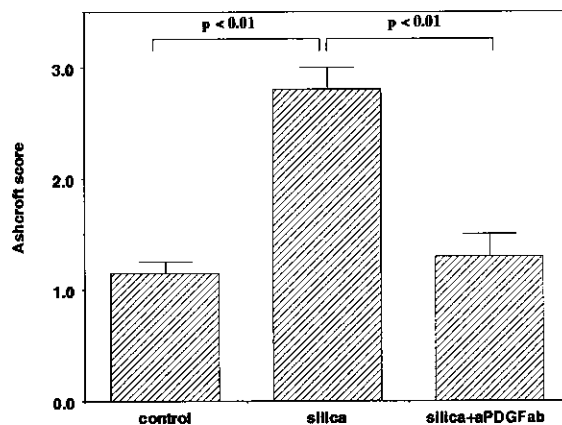


図 3 Pathological scoring with Ashcroft methods in lung

目的

肺線維症がその病因が多因子である可能性を考えればシリカ以外の肺線維症モデルにおけるサイトカインの研究は重要である。その一つのモデルとして放射線照射による肺の炎症と線維化 (放射線肺臓炎) におけるサイトカインについて検討する。また実際に Thornton ら (Clin Exp Immunol 1996) は照射後のヒトの気管支肺胞洗浄液の検討でマクロファージ由来の線維芽細胞の成長・増殖因子である PDGF と IGF-1 が上昇していることを報告している (図 6)。

以上のような検討結果と、現在ヒトの癌治療として放射線療法が多く施行されていることも踏まえれば、この研究は肺線維症の病態解明のみならず放射線肺臓炎の予防と治療にも結びつく期待される。

ここでシリカモデルで PDGF の重要性を示すことの出来た C57BL/6 マウスを用いた実験を示す。

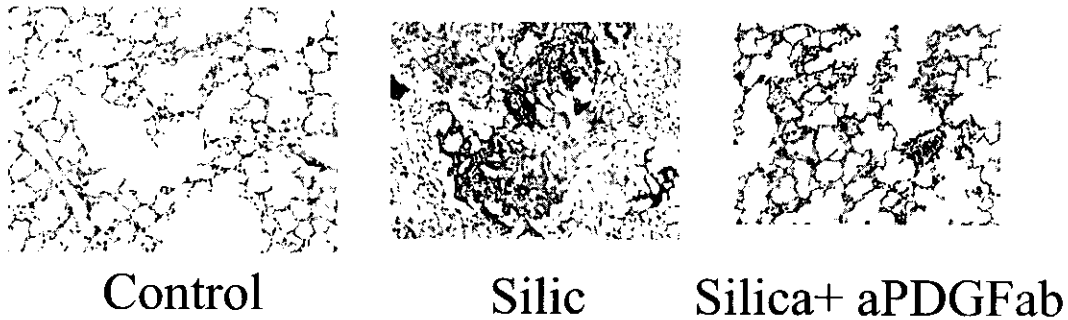


図4 Pathological findings

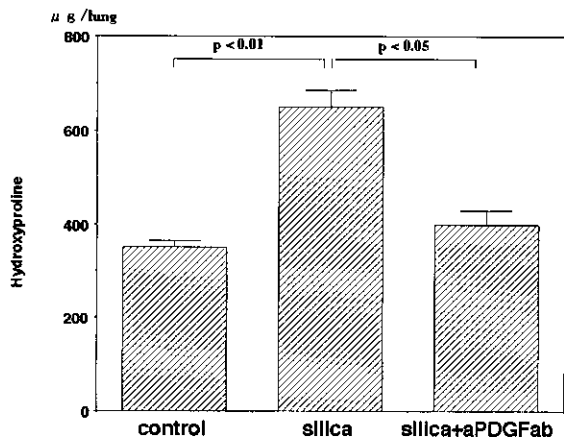


図5 Hydroxyproline in Lung

実験

方法

従来よりシリカの肺線維症モデルで使用した C57Bl/6 マウス 6 週齢の雄を用いて照射を行い、マウスが生存しうるのか、また肺での急性期およびその後の線維性変化について検討した。照射部位を胸部に限定するために放医研の器具に鉛によるスリットも加え照射した。文献的にはマウス一匹あたりの照射が 10-15Gy であることより、10Gy と 15Gy の設定で照射を施行した。また一部のマウスでは anti-PDGF を照射前日より持続注入ポンプを用いてマウスに投与した。炎症と線維化の変化を検討するために BALF、病理学的な所見 (Ashcroft score)、生化学的な線維化の指標 (ハイドロキシプロリン) について評価した (図 7)。

結果

照射後 1 週間での BALF は総細胞数とその分画でコントロール、10Gy、15Gy いずれの群でも有意差を認めず、また病理学的にも差を認めなかった。照射後 2 週間での BALF では、シリカモデルでも重要な炎症性細胞 (好中球とリンパ球) が分画とし

ては有意に上昇していることが示された。しかし細胞の絶対数では有意差は認めなかった。また病理では肺胞出血が存在しており、急性の炎症が惹起されていると思われたが、Ashcroft 病理スコアでははっきりとした線維性変化は認められなかった。4 週以後の病理は 15Gy で検討した。病理学的には 8 週の時点で照射マウスには線維化の傾向をみとめた (Ashcroft score で照射マウス vs コントロールが 1.8 vs 1.0)、しかし Ashcroft score およびハイドロキシプロリンに関して統計学的に有意な差を認めていない。以上の BALF およびハイドロキシプロリンにつて図 8、図 9 にまとめる。

なお照射前日より anti-PDGF 抗体を持続ポンプで投与したマウスの BALF は炎症性細胞の好中球が細胞分画 (比率) としては 4 週で有意に抑制されていることが示された。しかし病理学的には線維化に関しては有意差を認めてない。

以上の C57Bl/6 マウスを用いた実験では、病理学的スコアで著名な変化を認めず、またハイドロキシプロリンの有意な上昇を認めなかった。これは、4 週以降の長期の観察が必要であることも考えられるが、さらに今回用いた C57Bl/6 マウスの放射線感受性に依存する要因も考慮が必要と考えられた。そこで放射線感受性が高いと考えられている Balb/C の系 (マウス) でも次の検討を行った。

実験 2

方法

実験 1 と同様であるが、Balb/C マウス 6 週齢の雄を用いて照射を行った。また照射量としては前回と同様の 15Gy に加え、強く病変を作成する目的で 20Gy の群も作成し実験を施行した。BALF、

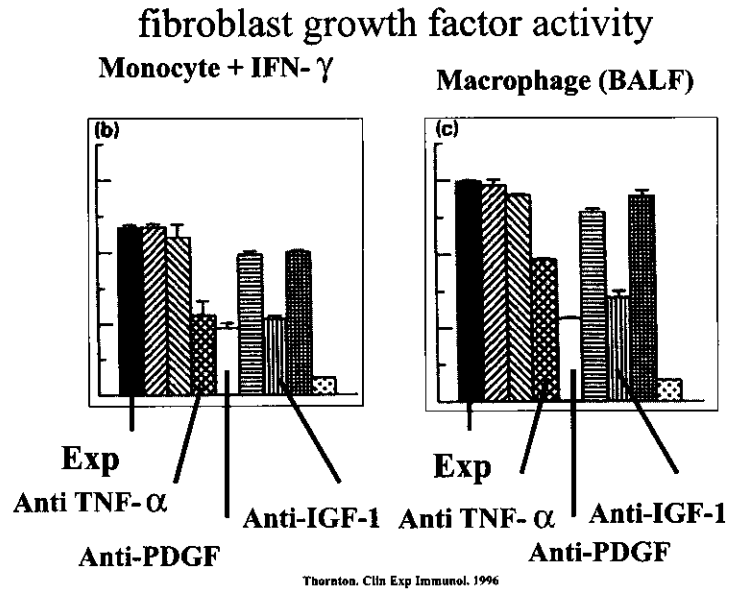


図 6

方法

C57BL/6 の 6 週齢 (雄) を使用する。
 10, 15Gy を 250kVp (15mA), 全肺野に照射する。
 照射後に病理, BALF, ハイドロキシプロリンについて検討する。

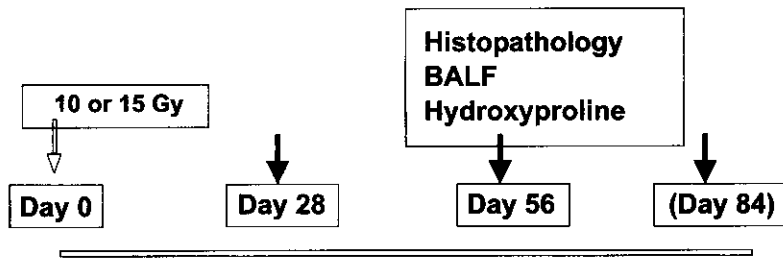


図 7

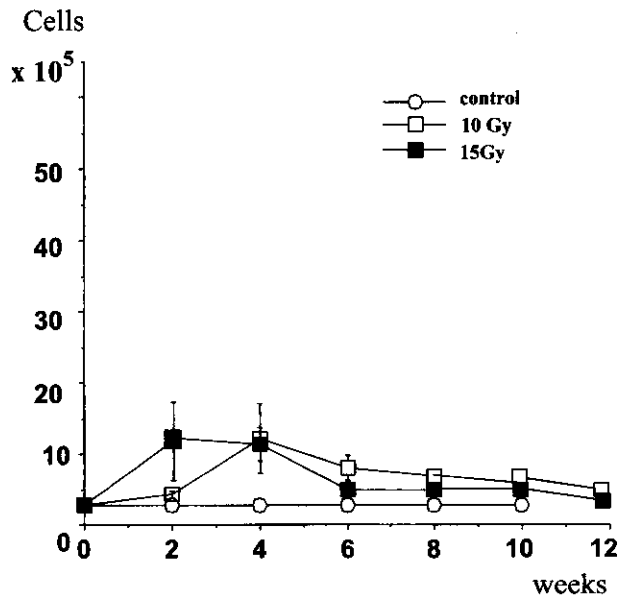


図 8 BALF (C57BL/6) after irradiation

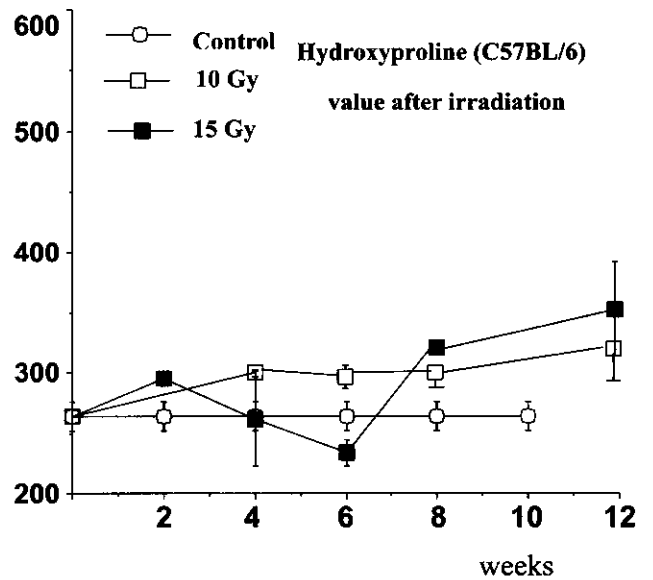


図 9 Hydroxyproline ($\mu\text{g}/\text{lung}$)

Ashcroft score, ハイドロキシプロリンについて 8-
(12) 週目まで測定した。

結 果

まず BALF に関して 20Gy では 2 週目にピークを示し、4 週目でもコントロールと比較して明らかに細胞数の増加を示しており、総細胞数、好中球、リンパ球が絶対数として増加していた。しかし、6～8 週目ではその BALF の細胞増加が消失し、コントロールと差を認めなくなった。一方で 15Gy 照射した場合の BALF では 20Gy の群より遅れて照射後 4 週目にピークを示す細胞増加が認められ、統計学的には 4～6 週目で有意に総細胞数、好中球数、リンパ球数の増加が認められた。しかし、8 週目では細胞数は 20Gy と同様にコントロール群と有意差を認めなくなった。

次に病理学的な所見では 15Gy および 20Gy とともに 4 週目をピークとしておもに単核球の間質への浸潤と間質の浮腫性変化を認め、Ashcroft score が上昇し、病理学的に有意な変化を認めた。しかし 20Gy では 6 週目に病理上の変化が減少しコントロールと有意差が認められなくなり、また 15Gy でも 6～8 週目では病理学的な変化の減少傾向を示した。

さらにハイドロキシプロリン (HOP) の測定では 15Gy と 20Gy のいずれの群においてもコントロールと有意差を認めず、15Gy では 6 週目で有意差を認め、8 週目では誤差が大きいため HOP は増加傾向を示すも統計学的には有意ではなかった。また 20Gy では 6 週目においても HOP は上昇せず 8 週目に増加傾向を示すにとどまっている。以上の結果の一部をマウスストレインによる比較を目的に図 10 にまとめた。Balb/C は C57Bl/6 よりやや線維化の促進を認めたが、まだ統計学的に有意ではなく、かつその線維化の程度もシリカと比較すると現在までの検討では十分な強さではなかった。

考 案

まず BALF の検討では 15Gy の 2 週と 4 週で Balb/C マウスは総細胞数、好中球、リンパ球数ともに増加していた。これを C57Bl/6 マウスに 15Gy 照射したときの同時点での BALF と比較すると C57Bl/6 では細胞分画では好中球やリンパ球の比

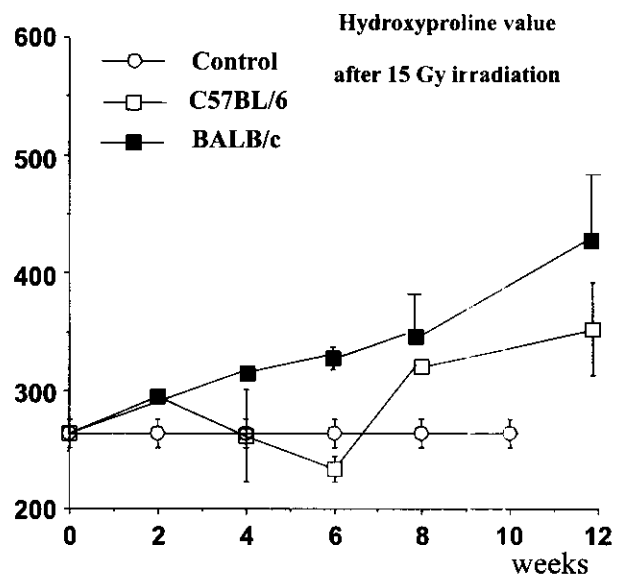


図 10 Hydroxyproline (µg/lung)

率が上昇するも絶対数ではコントロールと有意差がなかったことより、やはり Balb/C マウスの方が C57Bl/6 より放射線感受性が高い可能性がある。ただし Balb/C においても 2～4 週では BALF、病理ともに強い炎症所見を示したにもかかわらず、4 週目以降その炎症性変化が継続をはっきりとは示していないことはさらに検討を必要としている。まずこの一つの理由として病理学的に 2～4 週で認めた変化は急性期の細胞浸潤と間質の浮腫性変化であり、実際に線維化を惹起するまでにはさらに長期の経過を要する可能性がある。また他の原因としては急性期の後の骨髄抑制が強く出現したために炎症およびその後続く線維化に関与する細胞も減少し、その活性化が十分に得られず、6 週目以降の炎症性変化および線維化が十分惹起されていない可能性もある。また放射線傷害の遷延化および回復という点ではマウスの週齢数が若すぎる可能性も考慮する必要がある。

今回の検討では BALF および病理所見より照射後 2～4 週で強い炎症性変化を来することが示された。しかしその炎症性変化はその後やや減弱する傾向が示唆された。ハイドロキシプロリンの測定では 6 週目以降から徐々に線維化が生じてくる傾向が認められたが、まだ個体差が大きくさらに検討しなければならない。

おそらく今回の結果をさらに検討するには、時間的にさらに長期の観察が必要であると思われる。またストレインの差に関しては、Franko AJ ら

(Radiat Res 1996; 146: 68)で C57L/J vs CBA/J を比較して少なくとも2つの遺伝子の関与を示唆し, さらに Haston CK, Travis EL ら (Cancer Res 1997; 57: 5286) は放射線やブレオマシンに付いても同様に2つ以上の遺伝子の関与が考えられ, 特に染色体11と17に注目した報告をしている. すなわち線維化の形成における遺伝的な背景についての検討も今後の課題であると考えられた.

分子標的治療薬による肺線維症治療の可能性

石井 芳樹* 才 麗平 降旗 友恵 三好 祐顕
福田 健

分子標的治療薬の肺線維症治療応用の可能性を探るためブレオマイシン (BLM) 肺線維症モデルを用いて EGF-receptor tyrosin kinase inhibitor (RTKI) AG1478 および PDGF-RTKI AG1296 の作用を検討した。 *In vitro* でこれらの薬剤はそれぞれのリガンド刺激による線維芽細胞増殖を抑制した。また、両薬剤は、マウスモデルで BLM による肺線維化を著明に抑制した。これらの分子を標的とする同効の薬剤が、すでに抗悪性腫瘍薬として臨床使用されており、抗線維化薬としての肺線維症に対する応用の可能性が期待される。しかし、これらの薬剤による急性肺傷害や間質性肺炎の発症が報告されており、そのメカニズムを十分に解明する必要がある。

Treatment of Pulmonary Fibrosis by Molecular Target-based Drugs

Yoshiki Ishii, Cai Liping, Tomoe Furihata, Masaaki Miyoshi
Takeshi Fukuda

Department of Pulmonary Medicine and Clinical Immunology, Dokkyo University School of Medicine

Molecular target-based drugs that block a signal of growth factor and inhibit cell growth attract attention as new cancer therapy. Inhibition of a growth signal in fibroblasts by molecular target-based drugs may be useful for a pulmonary fibrosis treatment. We used a bleomycin pulmonary fibrosis model in order to investigate the possible application of molecular target-based drugs for pulmonary fibrosis treatment.

EGF receptor-tyrosine kinase inhibitor (RTKI) AG1478 and PDGF-RTKI AG1296 inhibited fibroblast proliferation induced by each ligand *in vitro*. Both drug inhibited pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice. As drugs having the similar effect have already used clinically, such drugs may be applicable to treatment for pulmonary fibrosis. Because interstitial pneumonia and acute lung injury induced by these drugs was reported, it is necessary for us to elucidate enough the mechanism.

はじめに

分子標的治療薬は、増殖因子の受容体チロシンキナーゼなどを阻害することによって増殖シグナルを阻止し、癌細胞の増殖を抑制することを目標とし、新しい悪性腫瘍治療法として注目されている。増殖因子の受容体はがん細胞のみならず正常細胞にも存在し細胞増殖に関与している。したがって、線維芽細胞の増殖因子受容体シグナルを阻止すれば肺線維化治療に有用な可能性がある。線維芽細胞の増殖因子としては、TGF- β や PDGF, IGF-1 などのほか TGF- α や EGF があげられる。TGF- α は、EGF receptor (EGF-R) のリガンドのひとつであり線維芽細胞の増殖を刺激し¹⁾、IPF 症例の肺において発現が亢進していることが知られている。また、プレオマイシンによる肺線維症モデルにおいて TGF- α と EGF-R の mRNA 発現が亢進している²⁾。同様に PDGF も肺線維化の病態に重要な役割を演じている³⁻⁵⁾。Rat の vanadium pentoxide を用いた肺線維症モデルにおいて EGF-receptor tyrosine kinase inhibitor (RTKI) AG1478 および PDGF-RTKI AG1296 が線維化を抑制することが報告されている⁶⁾。そこで、EGF-R および PDGF-R のチロシンキナーゼ阻害薬 (TKI) の肺線維化に及ぼす作用を検討するため *in vitro* での培養線維芽細胞の増殖アッセイと *in vivo* でプレオマイシン肺線維症モデルを用いて検討した。

方 法

1) 線維芽細胞ヒト肺線維芽細胞 (HFL-1) の細胞増殖能を BrdU (5-bromo-2'-deoxyuridine) の取り込みにて測定した。Subconfluent の細胞を無血清下に 24 時間培養し growth arrest にしたのち、EGF, TGF- α および PDGF を添加しさらに 24 時間培養した。最後の 4 時間は BrdU を添加し uptake させた。ELISA kit (Amersham Pharmacia Biothech) を用いて測定した。各リガンドの増殖作用と EGF-R TKI (AG1478) および PDGF-R TKI (AG1296) (Fig. 1) の抑制効果を検討した。

獨協医科大学 呼吸器・アレルギー内科
* びまん性肺疾患研究班 研究協力者

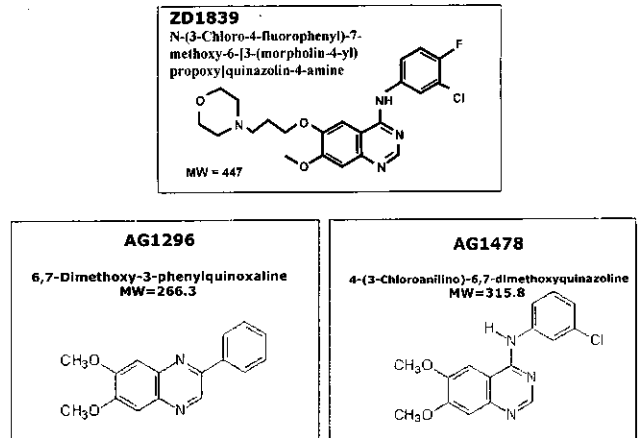


Fig. 1 Structure formula of receptor tyrosine kinase inhibitors

2) C57BL/6 マウスの気管内にプレオマイシン (3mg/kg) を生理食塩水 60 μ l に溶解して投与し肺線維症モデルを作成した。14 日後に肺を取り出し、右肺はホルマリン固定して H&E 染色および Masson & Trichrome 染色して病理学的変化をスコア化 (Aschcroft 法) して評価した。また、左肺は、ホモジナイズしてコラーゲン含量を測定した。生理食塩水を気管内注入したコントロール群、プレオマイシンを気管内注入し vehicle であるメチルセルロースを連日腹腔内投与した BLM 群、プレオマイシンを気管内注入し EGF-R TKI (AG1478) を連日腹腔内投与した EGF 群、プレオマイシンを気管内注入し PDGF-R TKI (AG1296) を連日腹腔内投与した PDGF 群の 4 群にわけて比較検討した。EGFR-TKI および PDGFR-TKI は、12mg/kg をメチルセルロースに溶いて day1 から day13 まで連日腹腔内投与した。Day1 の投与はプレオマイシン気管内投与 1 時間前に行った。

結 果

1) 線維芽細胞増殖アッセイ

In vitro で EGF 受容体のリガンドのひとつである TGF α は 10ng/ml および 100ng/ml の濃度で HFL-1 の増殖を有意に亢進させたが、この増殖を EGF-RTKI の AG1478 (10⁻⁶M) は有意に抑制した (Fig. 2)。同様に EGF も HFL-1 の増殖を刺激し、これを AG1478 (10⁻⁶M) は有意に抑制した (Fig. 3)。また、PDGF-RTKI である AG1296 は PDGF による HFL-1 の増殖を有意に抑制した (Fig. 4)。

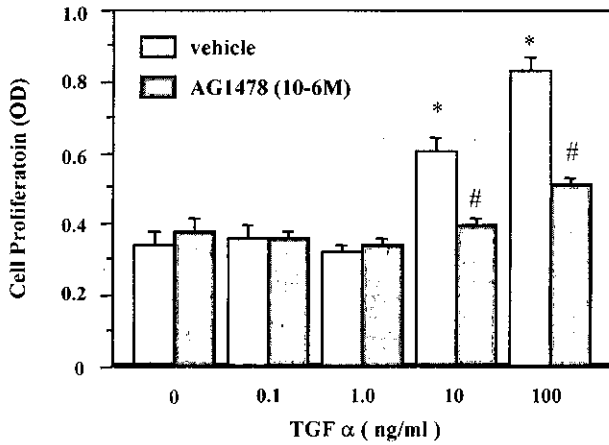


Fig. 2 Effect of EGF-RTKI AG1478 on TGF α -induced HFL-1 proliferation. (*p<0.01 vs TGF- α 0, #p<0.01 vs vehicle)

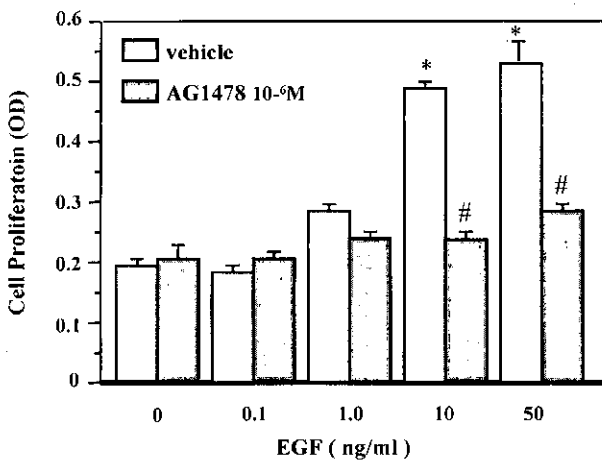


Fig. 3 Effect of EGF-RTKI AG1478 on EGF-induced HFL-1 proliferation (*p<0.01 vs EGF 0, #p<0.01 vs vehicle)

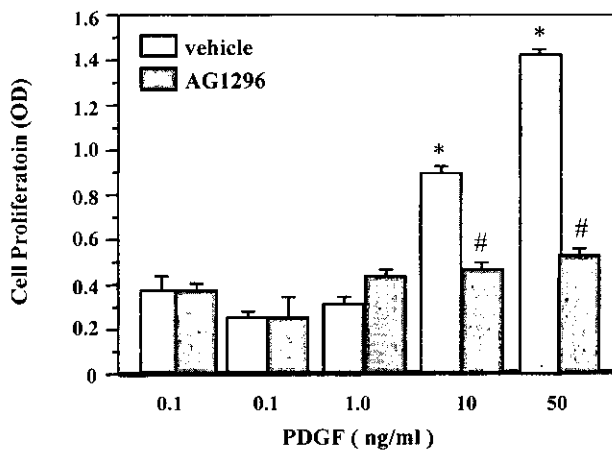


Fig. 4 Effect of PDGF-RTKI AG1296 on PDGF-induced HFL-1 proliferation (*p<0.01 vs PDGF 0, #p<0.01 vs vehicle)

2) プレオマイシン肺線維症モデル

プレオマイシン投与による著明な炎症細胞浸潤を伴う線維化形成を、EGF-RTKI の AG1478 および PDGF-RTKI である AG1296 はともに抑制した (Fig. 5, 6, 7). また、プレオマイシン投与による肺組織中のコラーゲン含量の増加も両薬剤によって有意に抑制された (Fig. 8).

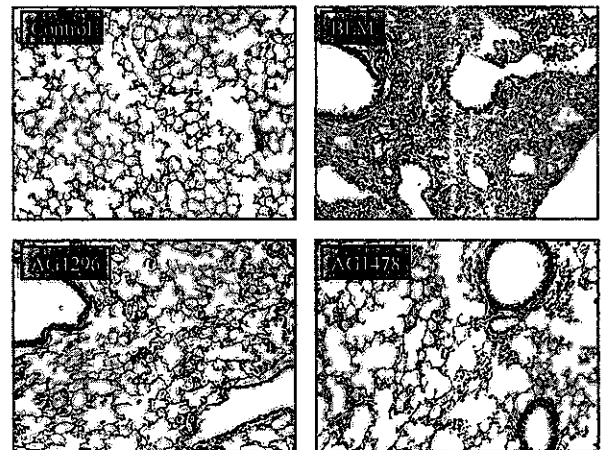


Fig. 5 Pathological findings on Day 14 (H. E. stain)

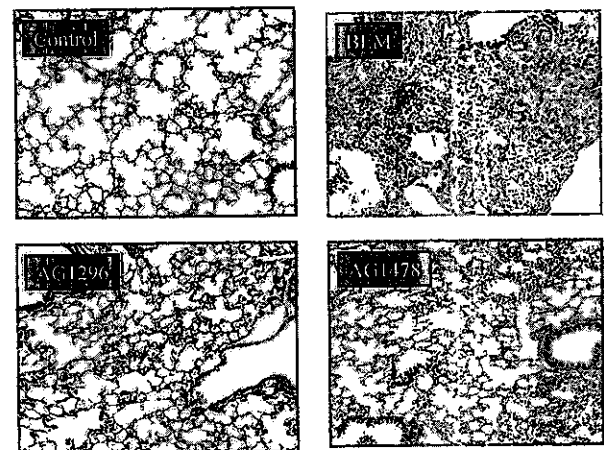


Fig. 6 Pathological findings on Day 14 (Masson&Trichrom stain)

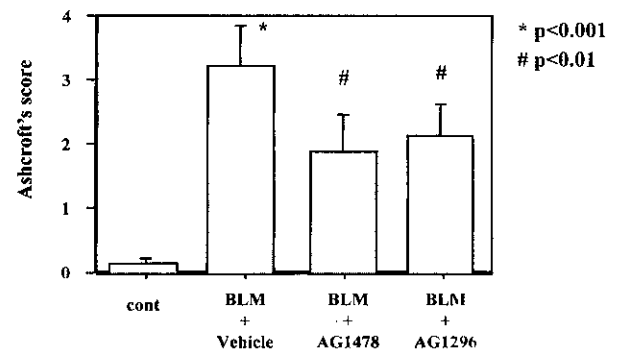


Fig. 7 Effects of AG1478 or AG1296 on BLM-induced lung fibrosis evaluated using an Ashcroft's score. (* p<0.001 # p<0.01)

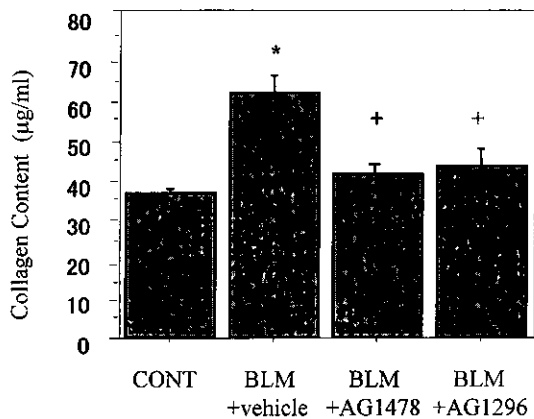


Fig. 8 Collagen content in left lung tissue (($*p < 0.01$ vs control, $+p < 0.01$ vs BLM+vehicle)

考 察

両薬剤ともプレオマイシンによる肺線維化形成を有意に抑制した。EGF-RTKIについては、線維化の病態においては、EGF-Rが肺組織に高発現するとともに、EGFRリガンドであるEGFやTGF α の産生が亢進しておりこれらの経路を遮断することが線維化形成を抑制したものと考えられる。一方で、EGF-RTKIであるgefitinibが副作用として急性肺傷害や間質性肺炎を併発することが報告されているが⁷⁾、今回の結果では、EGF-R TKIによる負の作用は認められなかった。EGFシグナルを阻害することで上皮の再生など組織傷害からの修復の過程が阻害される可能性も考えられるが、これよりもむしろ、線維芽細胞遊走や増殖の阻止作用が大きく働き線維化病態を抑制したものと考えられる。今後、急性肺傷害期および線維化形成期などに分けて薬剤の効果を検討する必要があると考えられた。また、gefitinibによる副作用が、EGF-RTKIの薬理作用に起因するものではなく薬剤そのものの作用である可能性も考えられるため、同じ実験系をもちいてgefitinibとAG1478の作用を比較する必要もあると考えられた。

PDGF-RTKIについては線維芽細胞増殖抑制を主たるターゲットとして使用できる薬剤であり、PDGF-RTKI作用を有するimatinibはすでに白血病治療薬として臨床使用されており、肺線維症治療への応用は容易であると思われる。

分子標的治療薬は、増殖因子による肺線維化を抑制し、IPFの治療薬として有用である可能性が示唆された。

参考文献

- 1) de Larco JE, Todaro GJ: Growth factors from murine sarcoma virus transformed cells. Proc Natl Acad Sci USA 75: 4001-5, 1978.
- 2) Madtes DK, Busby HK, Strandjord TP, Clark JG: Expression of transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor is increased following bleomycin-induced lung injury in rats. Am J Respir Cell Mol Biol 11: 540-51, 1994.
- 3) Walsh J, Absher M, Kelley J: Variable expression of platelet-derived growth factor family proteins in acute lung injury. Am J Respir Cell Mol Biol 9: 637-44, 1993.
- 4) Yoshida M, Sakuma-Mochizuki J, Abe K, Arai T, Mori M, Goya S, Matsuoka H, Hayashi S, Kaneda Y, Kishimoto T: *In vivo* gene transfer of an extracellular domain of platelet-derived growth factor beta receptor by the HVJ-liposome method ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Biochem Biophys Res Commun. 265: 503-8, 1999.
- 5) Brass DM, Tsai SY, Brody AR: Primary lung fibroblasts from the 129 mouse strain exhibit reduced growth factor responsiveness *in vitro*. Exp Lung Res 27: 639-53, 2001.
- 6) Rice AB, Moomaw CR, Morgan DL, Bonner JC: Specific inhibitors of platelet-derived growth factor or epidermal growth factor receptor tyrosine kinase reduce pulmonary fibrosis in rats. Am J Pathol 155: 213-21, 1999
- 7) Inoue A, Saijo Y, Maemond M, Gomi K, Tokue Y, Kimura Y, Ebina M, Kikuchi T, Moriya T, Nukiwa T: Severe acute interstitial pneumonia and gefitinib. Lancet 361: 137-9, 2003.

骨髄幹細胞による肺組織修復機序の検討

秋山 健一 海老名雅仁 大河内眞也 鈴木 拓児
太田 洋充 田澤 立之 貫和 敏博*

本研究では、肺炎後の肺組織修復過程における肺胞毛細血管再生のメカニズムを解明することを目標とした。まずドナー細胞として GFP マウス由来の細胞を用い、これをあらかじめ骨髄抑制をかけたマウスに静脈注射することで、生着した新しい骨髄由来の細胞の動態を、緑の蛍光色素を追うことで検討可能となった。まず、移植したマウスの 50%以上が約 6 週間で新しい骨髄に置き換わった事が分かり、移植が成功したことを確認した。また肺胞に存在する肺胞マクロファージの検討を行ったが、末梢血リンパ球同様、50%以上の肺胞マクロファージが骨髄由来の細胞で置き換わっているのが確認された。このことは、肺胞マクロファージは炎症のない定常状態においてその turn over に骨髄を供給源としている事を示した。次に骨髄由来細胞が血管内皮細胞へ分化するかどうかを検討したところ、ブレオマイシンによる肺炎症を起こしていない肺ではほとんど骨髄由来の血管内皮細胞を検出できなかったのに対し、ブレオマイシンで炎症を起こした肺切片では多くの視野で骨髄由来血管内皮細胞を認めることが出来た。今後は、血管内皮以外の細胞への分化、特に肺胞上皮細胞への分化についての検討を行っていく予定である。

Reorganization by bone marrow derived stem cells after lung injury

Kenichi Akiyama, Masahito Ebina, Shinya Oukouchi, Takuya Suzuki
Hiromitsu Ota, Ryu Tazawa, and Toshihiro Nukiwa

Respiratory Oncology and Molecular Medicine Institute of development, aging and cancer Tohoku University

Recent evidences revealed the important role of bone-marrow derived stem cells in reorganization of multiple organs including lungs. We reported previously that the alveolar capillaries with CD34-positive endothelial cells are increased in non-fibrotic lesions of the lungs of IPF/UIP. In this study, we attempted to show the possible roles of these stem cells to differentiate to alveolar capillary endothelial cells after bleomycin-lung injury. The bone marrow cells of green fluorescent protein (GFP) mice were transplanted to the irradiated C57BL/6 mice. Six weeks later, more than 50% of the peripheral lymphocytes were changed to GFP-positive lymphocytes. The alveolar macrophages corrected by bronchiolo-alveolar lavage (BAL) were also changed to GFP-positive macrophages more than 50%. These results indicated the bone-marrow derived stem cells are important for the supply of these inflammatory cells even in the normal status. In the bleomycin-injured lungs of C57BL/6 mice, which were transplanted by GFP-positive bone marrow cells 6 months before, the focal distribution of GFP-positive and CD34-positive alveolar capillary endothelial cells were observed. No fibroblast cells increased in these lungs were positive with GFP. These results indicated the important role of bone-marrow derived stem cells in the organization of lungs after injury.

研究目的

肺線維症の病態発生機序としては種々の要因から肺胞上皮細胞が傷害を受け、アポトーシスを引き起こし、サーファクタント生成が抑制される結果末梢肺胞の虚脱を生じ、蜂巢肺が形成されることが考えられる。特発性肺線維症はその原因が特定できない疾患であり、その病理像を UIP に限定する新しいガイドラインによって、さらに予後の悪い疾患であることが示されている。症状を呈する以前の段階での診断、早期治療に必要性とその基礎研究が求められている。

線維化肺は、以下に示すような、多様な原因や病態の結果生じる、一つの共通した肺の終末像である。病理学的には、肺の間質における炎症、およびその後の細胞性、線維性増殖により引き起こされる肺胞構造の再構築を特徴とする。線維化肺を生じる多様な原因には、既知のものとしてアスベストなどの無機粉塵や有機粉塵、また最近、報告が散見されているナイロン屑の様な職業性のものから¹⁾、抗癌剤や抗癌薬などの薬剤によるもの、放射線照射、等多数ある²⁾。一方、原因が未知なものとしては膠原病に伴うものや、肉芽腫形成性のものなどがあり、これらに分類されない原因が未知なものとして、特発性間質性肺炎といわれる疾患群がある。

病理学的には肺に限らず組織の線維化過程は、initial event の結果、組織に炎症が生じ、その後の創傷治癒過程において、本来正常な生体反応が起こるべき所に病理的变化が起きることで説明できるが、その発症機序は未だ不明である。そのため、ステロイドをはじめとする線維化肺の現行治療法は疾患特異的とは言えず、且つ特効性も持たないことから、限界があると考えられる³⁾。

我々は、これまで肺線維症患者肺の線維化早期段階の肺胞壁では活発な毛細血管新生がおきているものの、線維化が亢進した病巣では肺胞毛細血管が消失することを示した（投稿中）。またマウスブレオマイシン肺に対して血管新生抑制剤および血流阻害剤を投与すると、ともに線維化を著しく

悪化されることも示した（投稿中）。毛細血管内皮細胞は肺胞上皮細胞の増殖・分化にもかかわり、ガス交換能を有する肺胞構造を保つ上で重要な働きをしていることが示されている。傷害肺が呼吸能を保つためには単に線維化を抑制するのみではなく毛細血管内皮細胞の再生が必要である。

本研究では、肺炎症後の肺組織修復過程における肺胞毛細血管再生のメカニズムを解明することを目標とした。その指標として、今回我々は、GFP 産生マウスの内皮細胞の幹細胞を含む骨髄細胞を用いることで、GFP 発現肺毛細血管内皮細胞の検討を行うことにした。具体的には、ブレオマイシンによる肺線維症モデルマウスに対して GFP 発現マウスの骨髄細胞を静注することによって、肺胞毛細血管内皮細胞の血管新生を確認し、また、血管内皮細胞以外にも肺胞上皮細胞、間葉系細胞、炎症細胞の再生に際してどのような組織内分布を行うのかを顕微鏡下に観察することとした。

研究方法

対象：

肺の炎症モデルとしては C57BL/6 マウス（雌、10-12 秋冷）の気管内に 3mg/kg の bleomycin (BLM) を投与し、投与 14 日後に肺内の線維化及び血管新生の評価を行った。

骨髄移植モデル：

Green fluorescent protein (GFP) マウス由来の骨髄細胞を採取し、あらかじめ 24 時間前に 6 ~ 10Gy の放射線を照射し、骨髄抑制をかけた C57BL/6 マウスに静脈注射した。4 ~ 6 週目に移植されたマウスの末梢血リンパ球または、肺胞マクロファージを FACS に流し、GFP マウス由来の骨髄細胞の生着率を検討した。

組織の検討：

凍結肺切片を作成し、抗 CD34 抗体 (RAM34, PharMingen), 抗 CD31 抗体 (MEC13.3, PharMingen), 抗 thrombomodulin 抗体 (H-300, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) を用いて蛍光免疫染色を行った。蛍光標識には Texas Red Sulfonil chloride (TRSC) を用いた。