

はじめに

特発性肺線維症 (IPF) は、線維芽細胞の増殖と細胞外マトリックスの沈着によって特徴づけられる予後不良の慢性進行性肺疾患である。ステロイド、免疫抑制剤等にて治療が試みられているが、未だ生命予後を延長する治療法が確立されていないのが現状である。Imatinib (Gleevec) は bcr-abl と c-kit に対する特異的なチロシンキナーゼインヒビターであり、CML、GIST に対する有効性が確立しているが、PDGF レセプターのリン酸化も特異的に阻害することが報告されている¹⁾。一方、PDGF は肺線維症の病態において重要な役割を果たしている増殖因子の 1 つであり²⁾、PDGF の阻害は肺線維症の治療のターゲットとしての可能性を秘めている。以上より我々はプレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスにおける imatinib の抗線維化効果について検討した。

方 法

肺線維症モデルは 8 週齢の C57BL/6 マウスにプレオマイシン (BLM) 125 mg/kg を 200 ul の生理食塩水に溶解し Alzet mini-osmotic pump を用いて約 7 日間かけて持続皮下投与することにより作成した。コントロール群として同様に 200 ul の生理食塩水を pump にて持続皮下投与を行った。Imatinib は、BLM 投与開始日から 25, 50 mg/kg/day を 200 ul の蒸留水に溶解し腹腔内投与した。コントロールとして 200 ul の蒸留水を腹腔内投与した。28 日後にマウスを sacrifice し、右肺を Sircol Collagen Assay Kit を用いて肺コラーゲン含量の定量し、左肺組織切片の HE 染色による組織学的な線維化の評価を Ashcroft score を用いて 2 人の病理医により行った。さらに day 7, 14, 28 にて sacrifice したマウスに対し BAL 施行し、総細胞数および細胞分画をカウントした。また、C57BL/6 マウス肺より樹立した線維芽細胞株を用いて、PDGF による増殖反応を imatinib が濃度依存性に抑制するか ³H-TdR 取り込み試験を用いて測定した。さらに immunoblot により PDGFR-β のチロシン自己リン酸化を imatinib が

濃度依存性に抑制するか検討した。

結 果

Imatinib は、PDGF-AA および PDGF-BB 刺激による肺線維芽細胞株の増殖反応を濃度依存性に抑制した (図 1)。その効果は 0.1 μM からみられた。また、肺線維芽細胞株において PDGF-BB 刺激による PDGF-β の自己リン酸化を増殖反応と同様に濃度依存性に抑制した (図 2)。

BLM 肺線維症モデルの Ashcroft score による組織学的検討から、imatinib の 50 mg/kg/day の投与は BLM により誘発される肺線維化を有意に抑制することが明らかとなったが、25 mg/kg/day の投与では有

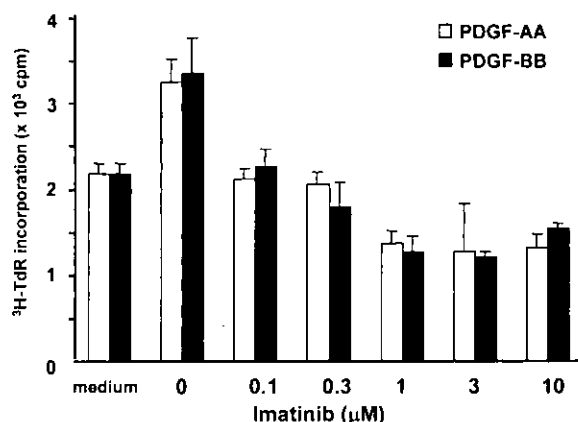


図 1 PDGF 刺激マウス肺線維芽細胞に対する imatinib の増殖抑制効果
C57BL/6 マウスより作成した肺線維芽細胞を用いて、PDGF-AA あるいは BB (10 ng/ml) で 72 時間刺激後 ³H-TdR (1 μCi/well) を 18 時間パルスし、増殖能を測定した。培養開始時より種々の濃度の imatinib を添加し抑制効果を検討した。

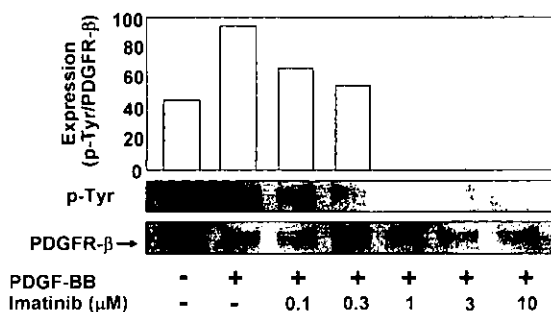


図 2 PDGF 刺激マウス肺線維芽細胞に対する imatinib の PDGFR-β リン酸化抑制効果
PDGF-BB (10 ng/ml) で 10 分間刺激したマウス肺線維芽細胞株より lysate を作成し、抗 PDGFR-β 抗体で免疫沈降後、抗 PDGFR-β 抗体および抗リン酸化チロシン抗体で western blotting を行った。PDGF-BB 刺激と同時に種々の濃度の imatinib を添加しリン酸化抑制効果を検討した。NIH image program にてリン酸化の程度を定量化した。

¹ 徳島大学医学部分子制御内科学
² 同 環境病理学
* びまん性肺疾患調査研究班 分担研究者

意な効果は得られなかった (図 3)。一方、コントロール群マウスに対する imatinib の単独投与では組織学的に著明な変化はみられなかった。また、BLM 投与後 28 日目の肺コラーゲン含有は、imatinib の 50 mg/kg/day 投与群で同様に有意に減少した (図 4)。肺コラーゲン定量では、その他の群も組織学的検討と同様の結果であった。Imatinib の前半 2 週間 (day 0~14) 投与群と後半 2 週間 (day 15~28) 投与群で検討したところ、前半 2 週間投与群は 4 週間連続投与群と同様に有

意に線維化を抑制した (図 5)。一方、後半 2 週間投与群においては有意な効果は得られなかった。

BLM による炎症細胞浸潤に対する imatinib の影響を検討するために BAL を行ったが、BLM の投与は day 7, 14, 28 において炎症細胞浸潤を誘発したが、day 7, 14 においては imatinib を投与しても炎症細胞浸潤の抑制はみられなかった。Day 28 においては imatinib 投与によりリンパ球数の減少がみられた。

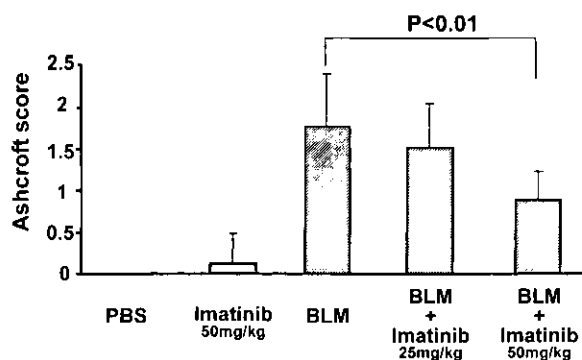


図 3 BLM 誘発肺線維症モデルにおける imatinib の抗線維化効果—組織学的検討—
C57BL/6 マウスに osmotic mini-pump を用いて 125 mg/kg の BLM を持続皮下投与した。同時に imatinib を連日腹腔内へ投与し、28 日後の左肺を組織学的な Ashcroft score により線維化の程度を定量化した。

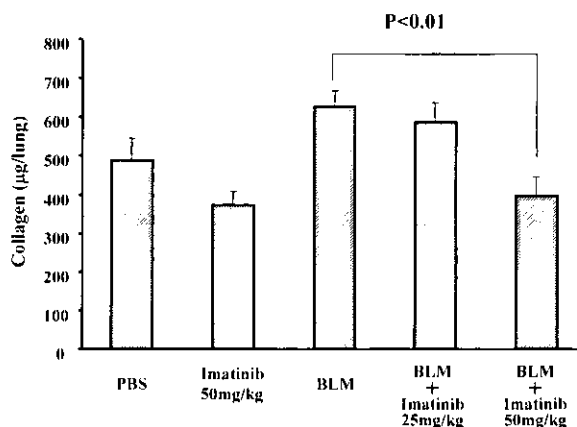


図 4 BLM 誘発肺線維症モデルにおける imatinib の抗線維化効果—肺コラーゲン量に及ぼす影響—
C57BL/6 マウスに osmotic mini-pump を用いて 125 mg/kg の BLM を持続皮下投与した。同時に imatinib を連日腹腔内へ投与し、28 日後の右肺を用いてコラーゲン量を Sircol assay kit により定量化した。

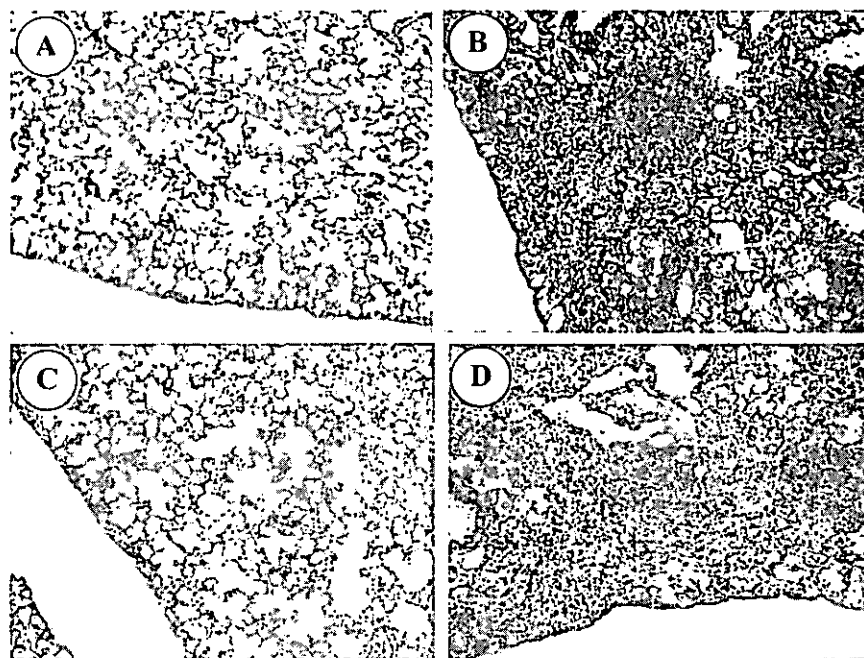


図 5 Imatinib の BLM 誘発肺線維症抑制効果に及ぼす imatinib 投与時期の検討
C57BL/6 マウスに osmotic mini-pump を用いて 125 mg/kg の BLM を持続皮下投与し、28 日後に組織学的 (ヘマトキシリン&エオジン染色) に肺線維化を評価した。
A: 生理食塩水投与群, B: BLM 投与群, C: BLM と imatinib (50 mg/kg/day) を 1~14 日に投与群, D: BLM と imatinib (50 mg/kg/day) を 14~28 日に投与群。

考 察

我々は、*in vitro* において imatinib が PDGFR の自己リン酸化を阻害することを介して肺線維芽細胞の増殖を抑制することを示した。さらにマウスにおける BLM 誘発肺線維化を imatinib が抑制することを示した。1999 年、Rice らは PDGFR の阻害剤を用いて、 V_2O_5 による肺線維症抑制効果を報告した³⁾。しかしながら、彼らの報告で用いられた薬剤は単に試薬としての PDGFR 抑制剤であり、薬剤の特異性も十分に検索されておらず、もちろん直ちに臨床で使用可能な薬剤ではない。また、肺線維症モデルとして用いた BLM 肺線維症は Rice らの用いたモデルに比較してより一般的なモデルであり、PDGFR 抑制効果の与えるインパクトは大きい。

Imatinib の作用メカニズムを検討するため、imatinib の投与を前半と後半に分けた場合、前半投与群では肺線維化を抑制したのに対し後半投与群では抑制しなかった。一方、BAL の結果を合わせて考えると、imatinib の抗線維化効果は前半の炎症細胞浸潤を抑制しているのではなく、day 0~14 において開始さ

れる肺線維芽細胞の増殖反応抑制によると考えられた。

今後、IPF に対する抗線維化薬として imatinib の臨床応用の可能性が示唆される。

参考文献

- 1) Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, and Lydon NB. 1996. Effects of a selective inhibitor of the abl tyrosine kinase on the growth of bcr-abl positive cells. *Nature Med.* 2: 561-566.
- 2) Selman M, King TE Jr, and Pardo A. 2001. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann. Intern. Med.* 134: 136-151.
- 3) Rice AB, Moomaw CR, Morgan DL, and Bonner JC. 1999. Specific inhibitors of platelet-derived growth factor or epidermal growth factor receptor tyrosine kinase reduce pulmonary fibrosis in rats. *Am. J. Pathol.* 55: 213-221.

EGF 受容体チロシンキナーゼ阻害薬 gefitinib のマウス ブレオマイシン誘発肺線維症に及ぼす効果

石井 芳樹* 藤本 栄 福田 健

我々は、前回、EGF 受容体チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) (AG1478) および PDGF 受容体チロシンキナーゼ阻害薬 (AG1296) がブレオマイシンによるマウス肺線維症を抑制すること報告した。しかし、すでに肺癌治療薬として臨床使用されている gefitinib には、副作用として約 2% に間質性肺炎などの肺傷害が認められ、死亡率も約 0.8% と報告されている。Gefitinib による肺傷害発症のメカニズムは明らかでなく、EGFR の阻害によるものか、本来の薬理作用とは別のメカニズムによるものかは不明である。マウスブレオマイシン肺臓炎モデルを用いた検討では、gefitinib が肺線維化を増悪したとの報告があるが、これは、我々の AG1478 を用いた成績とは正反対の結果となっている。そこで、今回、gefitinib の用量を 20, 90, 200 mg/kg の 3 用量でブレオマイシンによる肺線維化抑制効果を比較するとともに、同じ実験系において AG1478 の作用と比較した。Gefitinib はいずれの用量においてもブレオマイシンによる肺線維化を抑制し、同様に AG1478 も有効であった。少なくともマウスブレオマイシン誘発肺線維症モデルにおいて gefitinib は EGFR-TKI のリン酸化を抑制しうる 20 mg/kg の濃度で線維化を抑制し、subtoxic dose においても肺傷害を悪化させることはなく同等の抑制効果を示した。このことは、基本的に、EGFR の抑制は、線維化抑制に働くこと、また、臨床例で認められた gefitinib による間質性肺炎が EGFR の抑制に起因するものでない可能性を示唆するものと考えられる。しかし、これらの分子標的治療薬の作用は、種の違いや固体の感受性によって異なる反応を示す可能性もあり、さらに慎重な検討が必要であると考えられた。

Effect of gefitinib on bleomycin-induced lung fibrosis in mice

Yoshiki Ishii, Sakae Fujimoto, Takeshi Fukuda

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

We have previously reported that EGF receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI) (AG1478) attenuated the bleomycin-induced lung fibrosis in mice. However, another EGFR-TKI, gefitinib, which is already used clinically, has been reported to cause interstitial pneumonia and acute lung injury as a side effect. Whether the injury is caused by the inhibition of EGFR signaling or by other mechanism not related to EGFR is unclear. To investigate the effect of EGFR-TKI inhibition on lung fibrosis, we compared the effects of gefitinib (20, 90, 200 mg/kg) and AG1478 on bleomycin-induced lung fibrosis model. Gefitinib at any three doses prevented lung fibrosis. Even high dose of gefitinib did not worsen lung fibrosis. AG1478 also attenuated the lung fibrosis. These findings suggested that EGFR-TKI inhibition itself have protective effect on lung fibrosis induced by bleomycin. Since these molecular target drugs have the possibility to show different effects depending on species and individuals, more cautious examination was thought to be necessary.

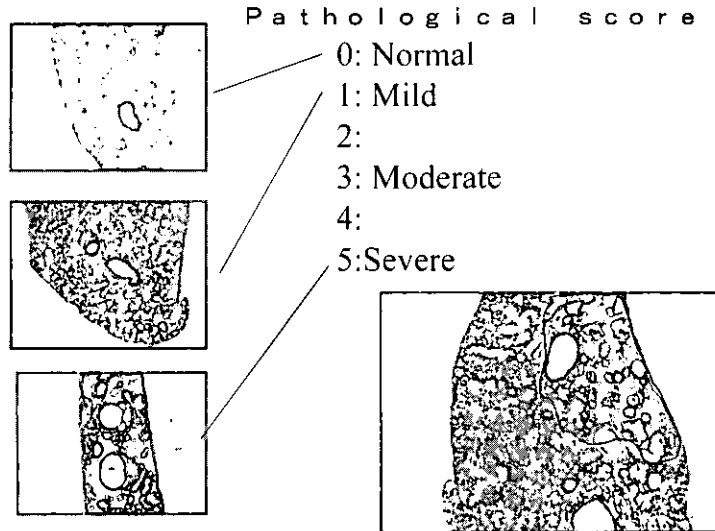


図2 線維化程度と占有面積を考慮した線維化スコア。病変の程度により0: 正常, 1: 軽度, 3: 中等度, 5: 高度, 2は1と3の中間, 4は3と5の中間とし grade 化し, その占める領域の比から切片全体のスコアを算出, 1個体から4切片とり平均値をその個体のスコアとした。

表1 実験グループ

- Groups;
- 1) saline it + solvent po
- 2) saline it + 200 mg/kg gefetinib po
- 3) BLM it + solvent po
- 4) BLM it + 20 mg/kg gefetinib po
- 5) BLM it + 90 mg/kg gefetinib po
- 6) BLM it + 200 mg/kg gefetinib po
- 7) BLM it + 12 mg/kg AG1478 ip

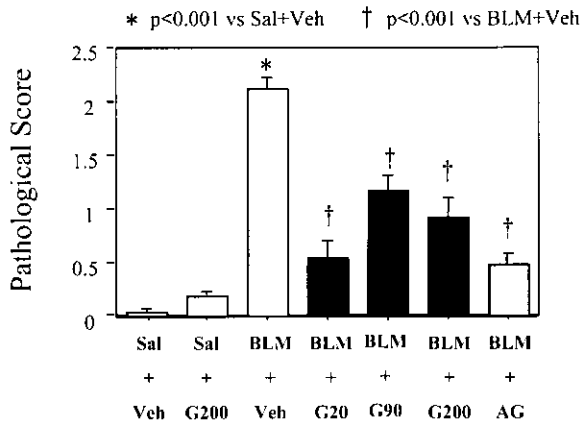


図3 病理学的線維化スコア。 gefitinib 200 mg/kg 単独投与では, 有意な変化はなかった。プレオマイシン群における線維化を gefitinib は 20, 90, 200 mg/kg のいずれの濃度でも有意に抑制した。 AG1478 も同様に抑制した。

gefitinib 200 mg/kg 単独投与では, 有意な変化はなかった。プレオマイシン群線維化を gefitinib は 20, 90, 200 mg/kg のいずれの濃度でも有意に抑制した。

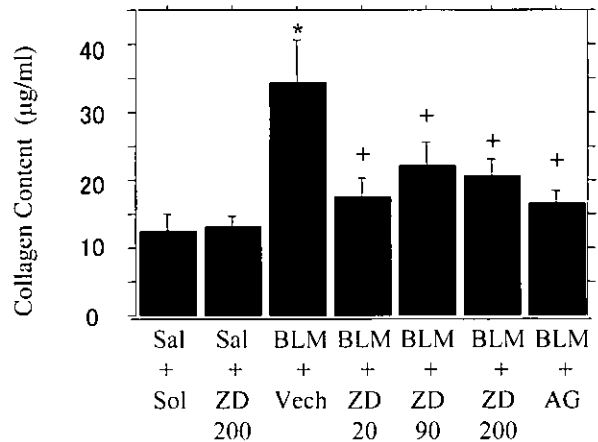


図4 肺組織中のコラーゲン含量もプレオマイシン群で増加したが, gefitinib は 20, 90, 200 mg/kg のいずれの濃度でも有意に抑制した。 AG1478 も同様に抑制した。

AG1478 も同様に抑制した (図3)。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 (図4)。

考 察

gefitinib 単独では 200 mg/kg の高濃度においても単独では肺に変化を起さなかった。プレオマイシン気管内投与により形成された線維化を, gefitinib は 20, 90, 200 mg/kg のいずれの濃度でも有意に抑制した。線維化抑制は, ノードマウスの移植腫瘍の増殖を抑制しうる濃度である 12.5 mg/kg の約2倍量の 20 mg/kg で十分な効果が見られた。さらに, その10倍量の 200 mg/kg においても抑制効果は同等であり, 線維化を悪

化させることはなかった。もう一つの EGFR-TKI である AG1478 を用いても線維化は有意に抑制されており、マウスブレオマイシン肺臓炎モデルにおいては、EGFR-TK の抑制は線維化抑制に働くことが明らかとなった。線維化の病態においては、EGFR 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、EGFR-TKI 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⁶⁾、今回の結果では、EGFR-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。今回の結果は、基本的に、EGFR の抑制は線維化抑制に働くこと、また、臨床例で認められた gefitinib による間質性肺炎が EGFR の抑制に起因するものでない可能性を示唆するものと考えられる。しかし、これらの分子標的治療薬の作用は、種の違いや固体の感受性によって異なる反応を示す可能性もあり、さらに慎重な検討が必要であると考えられた。

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) 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.
- 4) 石井芳樹, 才麗平, 降旗友恵, 三好祐顕, 福田健. 分子標的治療薬による肺線維症治療の可能性. 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 14 年度研究報告書 (主任研究者貫和敏博) pp. 73-76, 2003.
- 5) Suzuki H, Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition augments a murine model of pulmonary fibrosis. Cancer Res. 63(16): 5054-9, 2003.
- 6) Inoue A, Saijo Y, Maemondo M, Gomi K, Tokue Y, Kimura Y, Ebina M, Kikuchi T, Moriya T, Nukiwa T. Severe acute interstitial pneumonia and gefitinib. Lancet. Jan 11; 361(9352): 137-9. 2003.
- 7) 工藤翔二, 吉村明修, 弦間昭彦. 上皮成長因子受容体阻害薬と重篤有害事象. 日内会誌, 92: 1291-1295, 2003.

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
—— シリカによる肺線維化に対する、
分子病態的な側面からの検討 ——

大田 健* 中野 純一

今回の HCV-Tg (+) マウスを用いた検討により、従来使用していた量の半分の 8mg のシリカにより HCV-Tg (+) では HCV-Tg (-) と比較し、肺乾燥重量およびヒドロキシプロリンを指標として、有意な線維化を認めた。このことは HCV の強発現を背景とする環境で、少量のシリカによる線維化の促進因子が加わることで、実際に肺に線維化病変が生じることを示している。さらにその線維化を促進する因子として IL-4、INF- γ の関与が示された。

**A study of the mechanism of pulmonary fibrosis using the
murine model with HCV transgenic system.
(molecular research)**

Ken Ohta, Junichi Nakano

Teikyo University School of Medicine

In this study with our HCV-transgenic system, significant pulmonary fibrosis was demonstrated by measuring lung dry weight and hydroxyproline content in the HCV-transgenic mouse with treatment of 8mg silica, which is the half dose of conventional use for our murine model of lung fibrosis, as compared with the HCV-non-transgenic mouse. These results in which pulmonary fibrosis was induced by less amount of silica may indicate that a background of HCV positivity is one of the promoting factors for inflammatory and fibrotic changes in the lung. Furthermore, participation of IL-4 and INF-gamma was shown as important factors to promote the lung fibrosis in HCV transgenic system.

1. 研究目的

肺線維症を来たす代表的な疾患である特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis; IPF) は、その原因が未だに不明であり、現在もなお有効な治療法は確立されておらず経過は予後不良であり、その病態の解明が必要である。肺線維症の発症には急性、慢性の肺傷害が惹起され、最終的な病態の経過として肺の線維化を形成すると考えられている。

現在までに肺の線維化の原因については、種々のウイルスをはじめ様々な因子が考えられている。その一つとしてヒトにおける C 型肝炎ウイルス (HCV) 抗体陽性率、reverse transcription-PCR (RT-PCR) による血清 HCV の疫学的検討において IPF で有意に高率であり、IPF の原因として HCV が重要であることを我々は報告した¹⁾。

また現在までに、肺の線維化に関与するものとして種々の炎症性細胞および炎症性サイトカインなどがあげられている。炎症性細胞としては、好中球、マクロファージ、リンパ球、マスト細胞、線維芽細胞などが報告されている。関与しうる炎症性サイトカインとしては、IL-1, IL-6, IL-8, GM-CSF, PDGF, TGF- β , IGF-1, TNF- α , IFN- γ などが報告されているが²⁾、これらと HCV の線維化に関与するサイトカインとの関連性についても十分な検討はなされていない。

HCV が肺の線維化を促進する機序を解明する目的で、今回実験を行った。

2. 方法

実験動物: BALB/c マウスを背景とする系統を用いて、HCV の envelope protein を強発現するトランスジェニック (transgenic: Tg) [HCV-Tg (+)] マウスを実験群とし、対照群としてワイルドタイプ [HCV-Tg (-)] マウスを使用した。

シリカの投与: 生後 6~8 週の HCV-Tg (+) および HCV-Tg (-) マウスを用いて、8 mg (0.1 mg/ μ l in normal saline), 16 mg (0.2 mg/ μ l in normal saline) を経気道的に 40 μ l を 2 回に分けて投与した³⁾。また、シリカを投与しない無処置のマウスをそれぞれの control

群として用いた。

気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid: BALF): 細胞数が $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cell/ml になるように BALF を希釈し、その希釈した BALF 80 μ l に Fetal Bovine Serum (FBS) 20 μ l を加え、room-temperature (R-T), 640 r.p.m, 2 分の条件でサイトスピン標本の作成を行った。標本は Diff Quik を用いて核染色を行い、細胞分画を調べた。残りの細胞成分については mRNA の定量に用いた。

RNA 抽出および cDNA 合成: マウスから摘出した肺組織は、直ちに液体窒素で凍結保存し、RNA 抽出に用いた。抽出した total RNA は分光光度計用 DNA 純度計算プログラムを用いて total RNA 量の測定を行った。測定後、5 μ g の total RNA を使用し GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem) を用いて cDNA の合成を行った。

各種サイトカインの mRNA の定量: 合成した cDNA は Light cycler-fast start DNA master SYBR Green I (Roche Daiagnostics, Mannheim, Germany) キットを用いて real-time PCR を行い、各種サイトカイン mRNA の発現量を測定した。各種サイトカインと β -actin について同様に定量化を行い、それぞれについて比 ($1/\beta$ -actin $\times 1000$) で表した。

病理学的検討: 病理標本の作製は、20% 中性緩衝ホルマリン液を用いて固定を開始し、10 cmH₂O の圧力下で一晩伸展させ固定した。固定した肺組織はパラフィン包埋し、その後、脱パラフィンした切片を Hematoxylin Eosin (HE) 染色をした。

ハイドロキシプロリンの測定: 定量化を行うにあたり、L-hydroxyproline を段階希釈したものを用いて検量線を作成し、定量化を行った。

統計学的処理: 統計学的処理は Student *t*-検定および ANOVA 検定を用いて行い、危険率 5% 未満を有意差ありとした。

3. 結果

BALF 中の総細胞数および細胞分画: シリカ投与から 2 週間後の BALF 中の総細胞数および細胞分画を検討した。総細胞数はシリカの投与量に依存して増加を認めた。また、HCV-Tg (+) と HCV-Tg (-) のいずれの群においても、シリカ 16 mg の投与によりコントロール群より有意な増加を認めた ($p < 0.01$)。さ

らに BALF 中の細胞分画として好中球, リンパ球, 単球の細胞数についても検討を行った。その結果, それぞれの分画においてシリカの投与量に依存して細胞数が増加することが認められた。さらに HCV-Tg (+) ではリンパ球が, シリカ 8 mg 投与群においてコントロール群より有意な増加を認めた ($p < 0.01$)。

mRNA 発現の検討: シリカ投与から 2 週間後の肺組織および BALF について, mRNA の発現を real-time PCR を用いて検討した。

TGF- β は肺組織および BALF いずれにおいても, シリカ投与による発現の変化を認めなかった。肺組織および BALF いずれにおいても, HCV-Tg (+) と HCV-Tg (-) の間で有意な差は認められなかった。

IGF-1 は, HCV-Tg (+) のコントロール群とシリカ 8 mg 投与群で, また, HCV-Tg (-) についてはシリカ 8 mg 投与群と 16 mg 投与群の間で BALF において変化を認めた。その他の条件では HCV-Tg (+)

と HCV-Tg (-) いずれの群においても, 肺組織および BALF ともにシリカの投与量に依存して IGF-1 の発現の有意な増加を認めた。しかし HCV-Tg (+) と HCV-Tg (-) との比較では肺組織および BALF いずれにおいても IGF-1 の発現に有意な差は認められなかった (Fig. 1)。

IFN- γ について肺組織では, HCV-Tg (+) が HCV-Tg (-) と比較して発現量が亢進している傾向を示したが, 統計学的には有意な差は認められなかった。しかし BALF の検討では, シリカ 8 mg 投与群において HCV-Tg (+) は HCV-Tg (-) と比較して, IFN- γ の発現の有意な増加を認めた ($p < 0.05$) (Fig. 2)。

IL-4 について肺組織では, シリカ投与に伴う有意な値の変動, あるいは HCV-Tg (+) と HCV-Tg (-) の間における有意な差は認められなかった。しかし BALF においてはシリカの投与量に依存して増加を

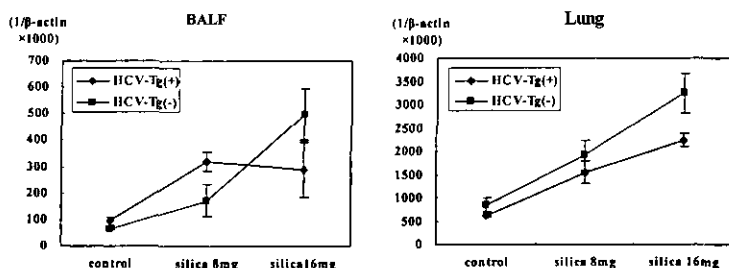


Fig. 1 IGF-1 mRNA expression examined by real-time PCR

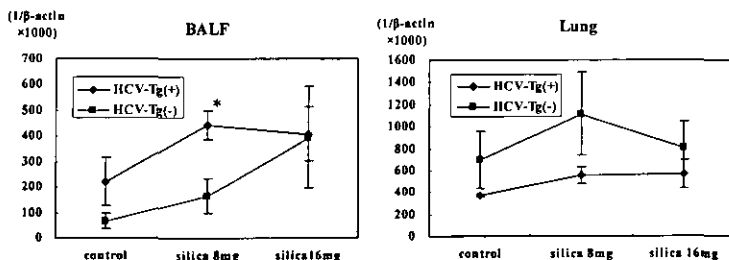
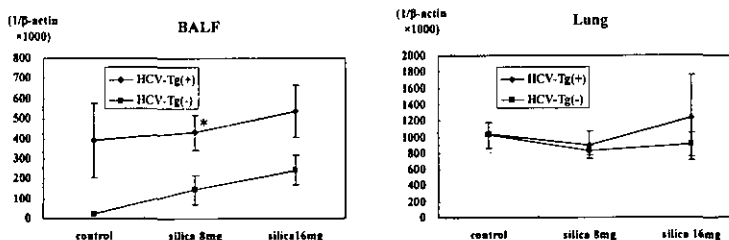


Fig. 2 IFN- γ mRNA expression examined by real-time PCR



* : HCV-Tg(+) vs HCV-Tg (-) ($p < 0.05$)

Fig. 3 IL-4 mRNA expression examined by real-time PCR

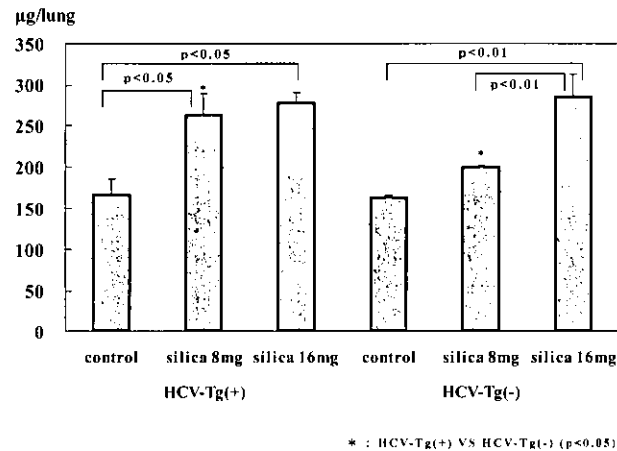


Fig. 4 Hydroxyproline

認め、さらにシリカ 8mg 投与群で HCV-Tg (+) は HCV-Tg (-) と比較して、有意に IL-4 の発現が亢進していることが認められた ($p < 0.05$) (Fig. 3).

ハイドロキシプロリンの検討

シリカ投与から 2 週間後の肺組織を処理し、ハイドロキシプロリンを測定した。ハイドロキシプロリンは肺乾燥重量と同様にシリカの投与量に依存して有意に増加し、さらにシリカ 8 mg 投与群において HCV-Tg (+) は HCV-Tg (-) と比較して、有意にハイドロキシプロリンが増加していた ($p < 0.05$) (Fig. 4).

4. 考 察

従来、我々は十分に炎症と線維化を形成できるシリカ 16 mg の投与にて、マウスの肺線維症モデルを作製し、検討していた。しかし、今回の HCV-Tg (+) マウスを用いた検討により、従来使用していた量の半分の 8 mg のシリカにより HCV-Tg (+) では HCV-Tg (-) と比較して、肺乾燥重量およびハイドロキシプロリンを指標として、有意な線維化を認めた。このことはトランスジェニック単独では線維化を生じなくても、その HCV の強発現を背景とする環境で、シリカといった線維化の促進因子が加わることで、実際に肺に線維化病変が生じることを示しているものと考えられ、疫学的に IPF の患者に HCV の陽性率が高いことと強い関連があると考えられる。

さらにその線維化を促進する因子として種々のサイトカインを検討した。TGF- β の添加で IPF 患者由来の肺線維芽細胞においてコラーゲン産生の増強が認められている⁵⁾。PDGF は線維芽細胞に対し、強い遊

走・増殖活性を有し、BALF 中の PDGF の上昇や^{6,7)}、肺の局所での PDGF の産生の亢進が報告されている⁸⁻¹⁰⁾。IGF-1 についても PDGF と同様に、IPF 患者の肺組織およびプレオマイシン投与モデルでの発現の亢進が報告されている¹¹⁾。

本研究においては、これらサイトカインの中の IGF-1 および TGF- β について検討を行った。IGF-1、TGF- β についての検討で IGF-1 は線維化の程度に相関して上昇を認めたが、TGF- β には認められなかった。また、このサイトカインいずれについても両群間で有意な差は認められなかった。これらの結果より、まず TGF- β は今回、我々が用いたシリカによるマウスの肺線維モデルでは有意な変動がないことより、この実験系では鍵となるサイトカインではない可能性がある。その一つの理由として、肺線維症といった疾患自体が単一の疾患ではなく、多因子による、多様性を有した病態であることが考えられる。すなわち、病理学的に同じ線維化を起こしていても、今回我々の使用したシリカ以外の刺激、例えばプレオマイシンや放射線といった異なる刺激による線維化では、サイトカインプロファイルも異なる可能性がある。またマウスの系統による相違の可能性も考慮すべきと考えられる。

さらに IGF-1 に関しては、シリカの投与により、用量依存的にサイトカインレベルの亢進と線維化の増強を認めたことより、このサイトカインが我々の用いたマウスモデルにおいて、重要な働きをしていることが示された。しかし、HCV-Tg (+) と HCV-Tg (-) との間で IGF-1 の有意な差を認めなかったことは、このサイトカインは HCV が関連した線維化の促進に

は関与していないものと考えられた。そこで、HCVに関連するサイトカインをさらに検討することとした。

サイトカインとしてTh1細胞、Th2細胞と分類し¹²⁾、Th1サイトカインとしてはIL-2やIFN- γ 、Th2サイトカインとしてはIL-4、IL-5、IL-13などがあり、この分類を用いて、各種の疾患においてはTh1あるいはTh2サイトカイン優位な病態が関与していることが示されており¹³⁾、HCVにおけるサイトカインパターンでは、Th1サイトカインが優位な状態であるとの報告がある¹⁴⁾。またTh2サイトカインであるIL-4については、HCVエンベロープの受容体であるCD81を介してリンパ球が活性化され、IL-4の産生が亢進するとの報告がある¹⁵⁾。

本研究においては、以上の報告をもとにHCVにおける線維化に関連するサイトカインとして、IL-4およびIFN- γ について検討した。

まず今回の実験では、肺組織とBALFのmRNA発現を同時に検討したが、これらのサイトカインの変動については、肺組織(肺全体)の測定よりBALFにおいて有意な変化を認める傾向があった。BALFに関する報告では、BALFに存在する炎症細胞は、肺実質に存在するものであるが、間質性肺炎においては、その炎症状態をよく反映しているとされている¹⁶⁾。すなわち、線維化を起こす過程で肺局所に集積し、炎症およびそれに引き続く線維化に関与する炎症性変化をBALFがより良く反映している可能性があると考えられた。

今回の検討により、IL-4がHCVの線維化の過程において重要な役割を果たしていることが示された。この結果はHCVエンベロープがCD81の活性化を介してIL-4の産生が亢進するとのin vitroの実験結果とも合致する結果と考えられる¹⁵⁾。

IFN- γ についてはTh1サイトカインに分類されており、HCV患者の肝臓でIFN- γ が亢進しているとの報告がある。今回の検討では、肺組織ではシリカ8mg投与群においてHCV-Tg(+)で亢進傾向を認め、さらにBALFにおいてもシリカ8mg投与群においてHCV-Tg(+)で有意にその発現が増強していることが確認された。すなわち、我々の用いた動物モデルにおいてもヒトと同様にHCVの存在下ではIFN- γ が亢進すると考えられた。

5. 結 語

今回の検討により、IPFに関して、線維化の促進因子であるIGF-Iが一つの主要なサイトカインであることが示唆された。またHCVの存在下では、線維化を促進する因子の他にIL-4、INF- γ の亢進が惹起され、肺の線維化がより強く促進することも示唆された。

参考文献

- 1) Ueda T, Ohta K, Suzuki N, Yamaguchi M, Hirai K, Horiuchi T, Watanabe J, Miyamoto T, Ito K. *Am Rev Respir Dis* 146, 266-268. (1992)
- 2) Vaillant P, Menard O, Vignard J.M, Martinet N, Martinet Y. *Monaldi Arch Chest Dis* 51, 145-152. (1996)
- 3) Suzuki N, Ohta K, Horiuchi T, Takizawa H, Ueda T, Kuwabara M, Shiga J, Ito K. *Thorax* 51, 1036-42. (1996)
- 4) Robinson DS, Ying S, Bentley AM, Meng Q, North J, Durham SR, Kay AB, and Hamid Q. *J Allergy Clin Immunol* 92, 397-403. (1993)
- 5) Huang M, Sharma S, Zhu LX, Keane MP, Luo J, Zhang L, Burdick MD, Lin YQ, Dohadwala M, Gardner B, Batra RK, Strieter RM. *J Clin Invest* 109(7), 931-937. (2002)
- 6) Harmon KR, Witkop CJ, White JG, King RA, Peterson M, Moore D, Tashjian J, Marinelli WA, Bitterman PB. *J Lab Clin Med* 123(4), 617-627. (1994)
- 7) Vignaud J. M, Allam M, Martinet N, Pech M, Plenat F, Martinet Y. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5, 531-538. (1991)
- 8) Nagaoka I, Trapnell BC, Crystal RG. *J Clin Invest* 85, 2023-2027. (1990)
- 9) Shaw RJ, Benedict SH, Clark RA, King TE. Jr. *Am Rev Respir Dis* 143, 167-173. (1991)
- 10) Antoniadou HN, Bravo MA, Avila RE, Galanopoulos T, Neville-Golden J, Maxwell M, Selman M. *J Clin Invest* 86, 1055-1064. (1990)
- 11) Aston C, Jagirdar J, Lee TC, Hur T, Hintz RL, Rom WN. *Am J Respir Crit Care Med* 151(5),

- 1597-1603. (1995)
- 12) Mosmann, TR, Cherwinski, H, Bond, MW, Giedlin, MA, and Coffman, RL. J Immunol 136, 2348-2357. (1986)
- 13) Mosmann TR, Coffman RL. Ann Rev Immunol 7, 145-173. (1987)
- 14) Napoli J, Bishop GA, McGuinness PH, Painter DM, McCaughan GW. Hepatology 24(4), 759-765. (1996)
- 15) Mæcker HT, Do M.S, Levy S. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 95(5), 2458-2462. (1998)
- 16) Fireman E, Shahar I, Shoval S, Messer G, Dvash S, Grief J. Lung 179, 105-117. (2001)

肺細胞による骨髄再建能の検討

阿部 信二¹ 吾妻安良太^{1*} 榎本 達治¹ 臼杵 二郎¹
JG Sharp² SI Rennard² 工藤 翔二¹

骨髄および骨髄幹細胞が肺を含む様々な臓器の細胞に分化することが報告されている。一方、脳、筋肉といった非造血性臓器の細胞が骨髄再建能を有していることが報告されている。肺細胞の多分化能を検討する目的で、雄の EGFP (enhanced green fluorescent protein expressing) マウスから採取した、肺細胞 (whole lung cell), SP (side population) 肺細胞, CD45+/-肺細胞を放射線照射した雌マウスに投与した。末梢血に GFP 陽性細胞を認め、各マーカー (CD3, CD4, CD8, B220, Gr-1, Mac-1) の発現を認めた。肺の SP 細胞はヘテロな細胞分画であり、骨髄の SP 細胞と比較すると骨髄再建能は低かった。骨髄再建能を持つのは CD45 陽性肺細胞であった。

Lung cells transplanted to irradiated recipients generate lymphohematopoietic progeny

Shinji Abe¹, Arata Azuma¹, Tatsuji Enomoto¹, Jiro Usuki¹, JG Sharp²
SI Rennard² and Shoji Kudoh¹

¹The 4th department of internal medicine, Nippon Medical School

²University of Nebraska Medical Center

Bone marrow (stem) cells can differentiate into cells in multiple tissues, including lung. Conversely there are reports that cells of non-hematopoietic tissues (brain, muscle) can give rise to lymphohematopoietic cells. Here we show lung contains cells capable of giving rise to lymphohematopoietic cells when transplanted to irradiated recipients. Whole lung cell suspensions, lung side population (SP) cells and CD45+/- lung cells obtained from male transgenic enhanced green fluorescent protein expressing (EGFP)-mice were transplanted intravenously to total body irradiated (TBI) female mice. Green fluorescent cells were recovered from the circulation and phenotyped for their expression of lymphohematopoietic markers (CD3, CD4, CD8, B220, Gr-1 and Mac-1). Lung SP cells were composed of heterogeneous populations and had less ability to give rise to lymphohematopoietic cells than did bone marrow SP cells. Furthermore, the ability of cells from the lung of aged mice to generate lymphohematopoietic progeny was equivalent to that of cells from young mice. Cells from lung with radioprotective and lymphohematopoietic reconstituting abilities were CD45+. CD45+ cells in the lung cells have lymphohematopoietic stem/progenitor cell characteristics and this has implications for cell or gene therapy applications.

はじめに

骨髄および骨髄幹細胞が気道上皮細胞, I 型および II 型肺胞上皮細胞, 肺血管内皮細胞, 肺線維芽細胞などの肺を構成する細胞に分化することが報告されている^{1),2),3)}。一方, 脳, 筋肉といった非造血性臓器の細胞が骨髄再建能を有していることが報告されている^{4),5)}。本研究は肺細胞の多分化能を検討する目的でマウスの肺細胞並びに肺の side population (SP) 細胞を用い, これらの細胞を放射線照射したマウスに投与して骨髄再建能を調べた。近年, 骨髄の SP 細胞が幹細胞の性質を有していることが報告されている^{6),7)}が, 肺における SP 細胞については, その存在は報告されているものの, 幹/前駆細胞としての性質を持つか否かは明確な報告はない。

研究方法

マウスは C57Bl/6 マウス (6-8 週令, 雌) と Green Fluorescent Protein (GFP) マウス (6-8 週令) を用いた。また, 加齢による影響を検討する目的で 2ヶ月令と 25ヶ月令の雄の C57Bl/6 マウスも用いた。これらのマウスより骨髄細胞と肺細胞を取り出し, ヘキスト 33,342 による染色を行ってフローサイトメトリー (FACS) によって SP 細胞を得た。骨髄細胞 (1×10^6 個), 骨髄 SP 細胞 (2,000 個), 肺細胞 (1×10^6 個), 骨髄 SP 細胞 (2,000 個) を全身照射 (7 Gy) したマウスに経静脈的に投与し, 末梢血中の GFP 陽性細胞を経時的に観察した。マウス肺 SP 細胞を電子顕微鏡にて形態学的観察を行い, また, 雌牛の肺 SP 細胞を LHC-9/RPMI1640 液にて培養を行った。さらに肺細胞を CD45+/- の fraction で分けて放射線照射マウスに投与して生存曲線による解析を行った。

結 果

これまでの報告されていたように, マウス肺には骨髄と同様に SP 細胞が存在していた (Fig 1)。肺 SP 細胞は骨髄 SP 細胞と同様, ベラパミルの添加によって

濃度依存性にその比率の低下が認められ, Bcrp1 (ABCG2) 等の ATP-binding cassette transporter protein の関与が示唆された。雌牛の肺においてもマウスの場合とほぼ同等 (~0.3%) の SP 細胞が存在していた (Fig. 1)。これらの雌牛肺 SP 細胞は顕微鏡レベルでは小型リンパ球の形態を有していたが, LHC-9/RPMI1640 液にて 14 日間培養すると, サイトケラチン陽性の上皮細胞様の細胞に変化することが観察されたことから肺 SP 細胞には上皮細胞の成分が含まれていることが示唆された (Fig. 2)。マウス肺 SP 細胞を電子顕微鏡にて検討すると, 上皮細胞, マクロファージ, 小型リンパ球, リンパ芽球などが認められ肺 SP 細胞が heterogeneous な細胞成分であることが判明した (Fig. 3)。この肺 SP 細胞 (2,000 個) を全身放射線照射したマウスに投与し, 経時的に末梢血中の GFP 陽性細胞の陽性率を FACS にて測定したが, GFP 陽性細胞はほとんどなく, 骨髄 SP 細胞と比較すると肺 SP 細胞による骨髄再建能は認められなかった (Fig. 4)。しかしながら, 肺細胞全体 (1×10^6 個) を投与すると末梢血中に GFP 陽性細胞を認めることから肺細胞の中に骨髄を再建できる細胞が含まれていると考えられる。そこで GFP マウス肺細胞の CD45+/- の fraction についての検討を行ったが, 全身放射線照射 (9.5 Gy) したマウスに CD45+ 肺細胞を投与した群は CD45- 肺細胞を投与した群に比べて有為に生存率の増加を認め (Fig. 5), さらに末梢血中の GFP 陽性細胞率も有意な増加を認めたこと (Fig. 6) から肺細胞のうちの CD45 の fraction に骨髄を再建させる細胞, すなわち造血幹/前駆細胞が含まれていることが示された。

考 察

SP 細胞は元来は種々の動物において骨髄における幹細胞活性の大部分を占める細胞成分として報告された。マウス骨髄 SP 細胞は heterogenous な細胞群であり, その幹細胞活性は CD34 の発現と逆相関することが知られている。マウス肺においても SP 細胞の存在は報告されていたが, その生物活性は明らかでなかった。我々はマウスおよび雌牛から肺 SP 細胞を抽出して, 形態学的並びに機能学的な解析を行った。マウス肺 SP 細胞は骨髄 SP 細胞同様, ベラパミルに感受性のある細胞成分であったが, 放射線照射した同系

¹ 日本医科大学第四内科

² University of Nebraska Medical Center

* びまん性肺疾患調査研究班 分担研究者

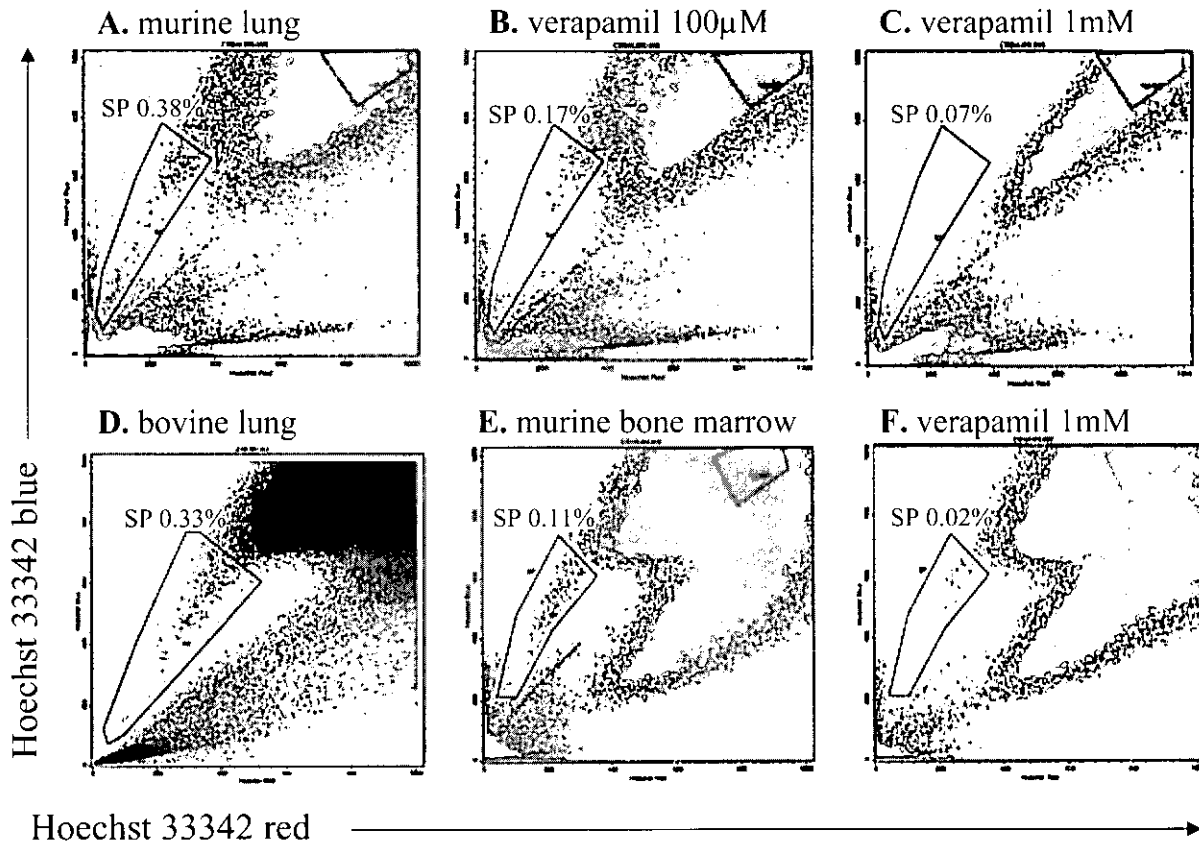


Figure 1 Isolation and characterization of side population (SP) cells from lung and bone marrow.

The presence of SP cells in murine lung, bovine lung and murine bone marrow cells was evaluated by staining with the DNA-binding dye Hoechst 33342. The SP cells in murine lung (A), bovine lung (D) and murine bone marrow (E) are indicated in the boxed areas. The indicated region of bovine lung cells contained about 0.3% of SP cells similar to murine cells (D). Both lung and bone marrow SP cells were sensitive to verapamil (B: 100 μ M, and C: 1 mM for lung, F: 1 mM for bone marrow). The data are representative of at least 3 experiments.

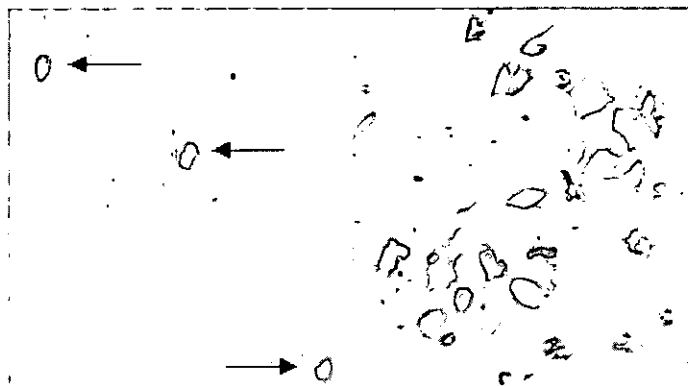


Figure 2 Characterization of lung SP cells.

Sorted small/medium lymphocyte-like lung SP cells of bovines immunostained for cytokeratin 14 did not exhibit staining (left panel, arrows, original magnification $\times 200$). Sorted bovine lung SP cells were cultured on chamber slides with a 1:1 mixture of LHC9 and RPMI 1640 media. The cells spread and enlarged and were immunocytochemically positive for cytokeratin 14 at day 14 (right panel, original magnification $\times 200$).

のマウスに静脈内投与しても骨髄再建はみられなかった。また、肺の構成細胞を再建することもなかった。ただし、肺細胞全体を投与した群では骨髄ならびに肺の再生を認めたことから、肺細胞の他の細胞成分

の中に幹/前駆細胞の性質を持つ細胞が存在すると推定された。雌牛肺 SP 細胞は光顕レベルでは小型リンパ球様であったが、電顕レベルでは上皮細胞やマクロファージ等を含む heterogeneous な細胞成分であつ

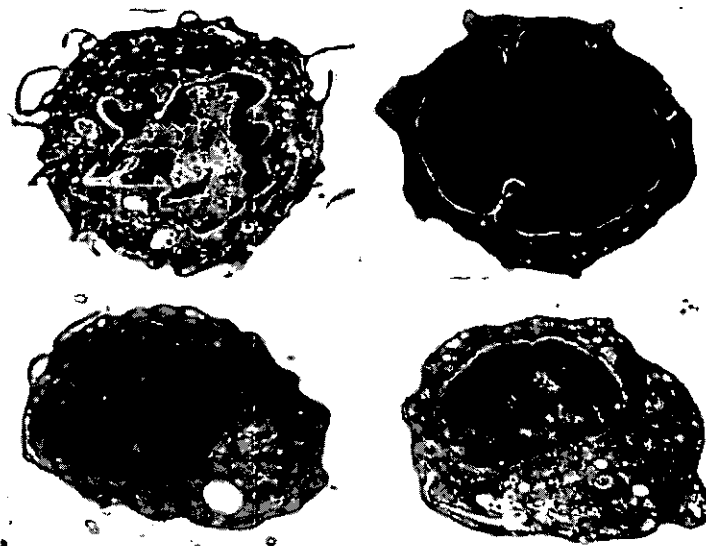


Figure 3 Electron microscopy of lung SP cells

Analysis by electron microscopy showed bovine lung SP cells were a heterogeneous population, containing small epithelial cells (top left panel, original magnification $\times 10,000$) and macrophages (top right panel, original magnification $\times 10,000$), plasmablasts (bottom left panel, original magnification $\times 10,000$) and lymphocyte-like cells (bottom right panel, original magnification $\times 10,000$)

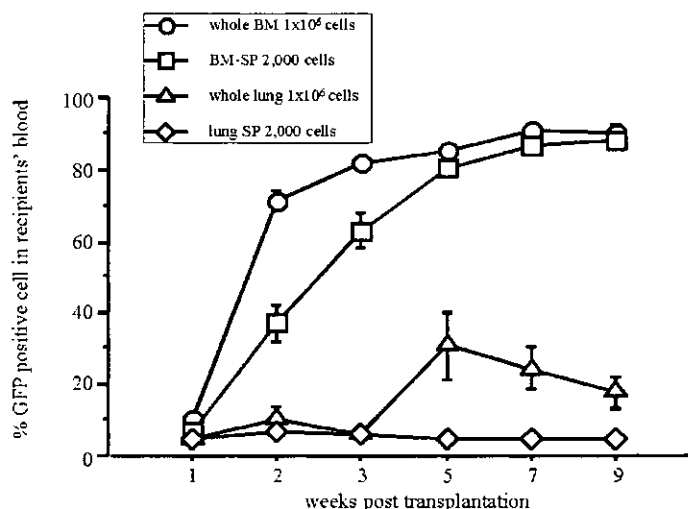


Figure 4 Detection of GFP positive cells in the blood post-transplantation to irradiated recipients.

From 1 to 9 weeks after transplantation of whole bone marrow cells (1×10^6 cells), bone marrow SP cells (2,000 cells), whole lung cells (1×10^6 cells) or lung SP cells (2,000 cells), the mice were bled retro-orbitally to assess the percent of donor cell engraftment in the blood. Data are expressed a percentage of the GFP positive cells in the recipient' blood. Each value represents the mean \pm SE of at least three mice.

た、LHC-9/RPMI1640 液にて培養すると、サイトケラチン陽性の気道上皮細胞様の細胞に変化したが、これは SP 細胞の中に上皮細胞及び上皮細胞の前駆細胞が含まれていると考えられた。GFP マウスの肺細胞を CD45+/- のフラクションで分けて放射線照射したマウスに投与すると、CD45+ 投与群において生存曲線において有意な差を認め、また末梢血中の GFP 陽性細胞比率に有意な上昇を認めたことから肺 CD45+ 細胞に骨髄を再建させる幹/前駆細胞が含まれている

と考えられた。また、この細胞群は Sca-1, c-kit といった幹細胞マーカーを発現しており、幹/前駆細胞の性質を有しているが示された。CD45+ 細胞が肺自身を再生させるかどうかの検討は行っていないが、最近の論文では筋肉の CD45+ 細胞が筋肉の局所の傷害において筋細胞を再生させることが報告されている⁸⁾。今後、肺 CD45+ 細胞による肺細胞の再生について検討を行っていく予定である。

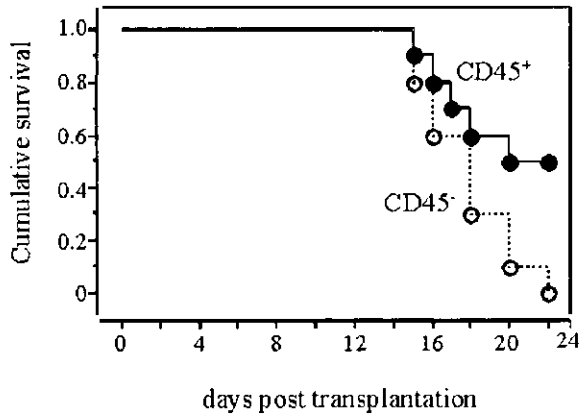


Figure 5 Survival by CD45+/- lung cells in irradiated recipients. CD45+lung cells (2.5×10^6) or CD45-lung cells (2.5×10^6) from EGFP mice were transplanted into irradiated (9.5 Gy) mice. Survival curves for CD45+/- lung cell transplanted mice ($n=10$, per group). Closed circles, CD45+ lung cell transplanted mice; open circles, CD45- lung cell transplanted mice.

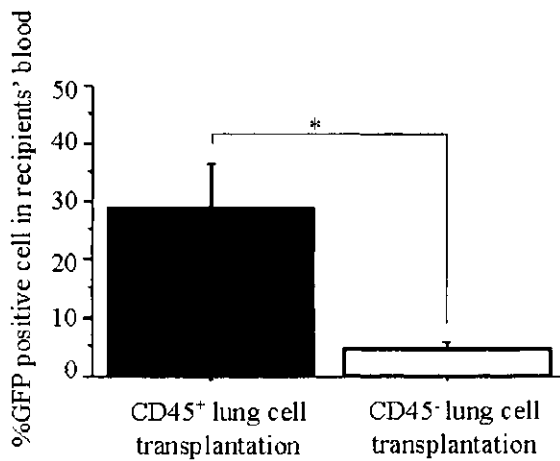


Figure 6 Lymphohematopoietic reconstitution by CD45+/- lung cells in irradiated recipients. At day 19 post-transplantation, the mice were bled retro-orbitally to assess engraftment in the blood. Data are expressed as a percentage of the GFP positive cells in the recipients' blood. Each value represents the mean \pm SE of at least three mice.

参考文献

- 1) Krause D.S., N.D. Theise, M.I. Collector, O. Henegariu, S. Hwang, R. Gardner, S. Neutzel, and S.J. Sharkis. 2001. Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*. 105 : 369-377.
- 2) Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, Sanderson EA, Summer RS, Williams MC, Fine A. 2001. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development*. 128 : 5181-5188.
- 3) Abe S, Lauby G, Boyer C, Rennard SI, Sharp JG. 2003. Transplanted BM and BM side population cells contribute progeny to the lung and liver in irradiated mice. *Cytotherapy*. 5 : 523-533.
- 4) Bjornson C.R.R., R.L. Rietze, B.A. Reynolds, M.C. Magli, and A.L. Vescovi. 1999. Turning brain into blood : A hematopoietic fate adopted by adult neural stem cells in vivo. *Science*. 283 : 534-537.
- 5) Jackson K.A., T. Mi, and M.A. Goodell. 1999. Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96 : 14482-14486.
- 6) Goodell M.A., K. Brouse, G. Paradis, A.S. Conner, and R.C. Mulligan. 1996. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J. Exp. Med*. 183 : 1797-1806.
- 7) Goodell M.A., M. Rosenzweig, H. Kim, D.F. Marks, M. Demaria, G. Paradis, S.A. Grupp, C.A. Siefel, R.C. Mulligan, and R.P. Johnson. 1997. Dye efflux studies suggest the existence of CD34-negative/low hematopoietic stem cells in multiple species. *Nat. Med*. 3 : 1337-1345.
- 8) Poleskaya A., P. Seale, and M.A. Rudnicki. 2003. Wnt signaling induces the myogenic specification of resident CD45+ adult stem cells during muscle regeneration. *Cell*. 113 : 841-852.

HGFによる線維化肺組織修復における 骨髄由来幹細胞の役割

海老名雅仁 大河内真也 太田 洋光 木村雄一郎
田澤 立之 貫和 敏博*

特発性肺線維症患者肺に特徴的な病変分布にともなう肺泡毛細血管の構築変化を連続切片と3次元画像解析装置を用いて観察した。CD34陽性血管内皮細胞は、線維化病変においては消失するが、その周囲の線維化が進行していない領域ではむしろ肺泡壁内の血管密度は増加する。これらの結果は、肺線維症患者の治療として肺泡毛細血管を薬剤の投与ルートとして用いる場合は、線維化が亢進していない肺泡壁に対する予防効果が期待できることを示している。私たちが開発してきた巨大アルブミン(MAA)とポリエチルエニミンを利用したHGF遺伝子導入法は、MAAが肺泡毛細血管に捕捉される間に、プラスミド遺伝子は内皮細胞を介して肺泡上皮細胞・肺泡マクロファージに取り込まれることによってHGF遺伝子をこれらの細胞に導入する方法である。この方法を用いてプレオマイシン肺傷害に対してHGF遺伝子導入をすると、傷害後に生ずる線維化が効果的に抑制されたが、プレオマイシン傷害後の肺組織再生に関わる骨髄由来幹細胞は、HGF遺伝子導入によってむしろ減少することが観察された。この結果は、この実験系においてHGFの主効果がアポトーシス抑制であり、その結果として炎症そして線維化を抑制することによって、骨髄由来幹細胞による肺組織修復に至らないためである、と考えられた。

Respiratory Oncology and Molecular Medicine

Institute of Development, Aging and Cancer Tohoku University

Masahito Ebina, Shinya Ohkouchi, Hiromitsu Ohta, Yuichiro Kimura, Ryu Tazawa, and Toshihiro Nukiwa

We found that the CD34-positive alveolar capillaries in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis were increased beside the fibrous lesions but decreased within the fibrotic area. We also found the venules with CD34-negative but vWF-positive endothelial cells localized in the center of the fibrotic lesions were identified as post-capillary venules by three-dimensional reconstructed images. These results indicate preventive effects of the treatment through alveolar circulation for patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Our new gene delivery system using macroaggregated albumin-polyethylenimine complex (MAA-PEI) induces lung specific gene expression without causing inflammation. Since regeneration of alveolar epithelial cells and capillary endothelial cells by bone-marrow derived stem cells after bleomycin-induced injury was unaffected by HGF, the primary anti-inflammatory and anti-fibrotic mechanism of HGF after lung injury is likely to be inhibition of apoptosis.

背景

特発性肺線維症は進行性の慢性肺疾患ではあり、種々の間質性肺疾患のなかにあって際立って予後の悪い疾患として知られている。ステロイドを中心とした免疫抑制剤の効果も限られており、新しい効果的な治療法の確立が望まれている。

特発性肺線維症の肺病変は、通常型間質性肺炎 (usual interstitial pneumonia, UIP) と呼ばれる特徴的な不均一病変分布を示す。病変部位はしかし肺内にランダムに生じているわけではなく、小葉間隔壁を中心とした線維化病変の分布である。この線維化病変には肺胞壁を構成する弾性繊維が集属していることから、肺胞が虚脱していることが示される。線維化の活動性を示す線維芽細胞もこの小葉間隔壁に多く分布する。肺線維症の発症原因として肺胞上皮細胞のアポトーシスが考えられているが、これらの病変は、小葉間隔壁付近の肺胞上皮細胞が何らかの原因でアポトーシスに陥り、肺胞構造が保たれなくなって虚脱したと考えられる。

線維化病変に伴う肺胞毛細血管の構築変化に関しては、相反する報告がある。私たちはほぼ全ての肺胞毛細血管内皮細胞が CD34 を産生し、またトロンボモジュリンのように炎症・線維化病変で産生が変化しないことを利用して、線維化肺内の肺胞毛細血管の構築変化を調べた。その結果、線維化病変では肺胞毛細血管は消失するが、肺胞構造を保っているその周囲の肺胞壁内の毛細血管密度は上昇していることが示された。一方、線維化病変内には CD34⁻/vWF⁺の血管内皮細胞がある。CD34⁺/vWF⁻の血管内皮細胞をもつ肺胞毛細血管と CD34⁻/vWF⁺の血管内皮細胞をもつ線維化病変の内部の血管との関係を調べるために、線維症患者の外科的肺生検の連続切片を CD34/vWF の免疫2重染色を施した後 elastica-Masson 染色を行い、3次元画像解析を行った。

肺胞壁のこうした構造改変は肺傷害後の組織修復過程によるものと考えられる。肺の組織修復に関与する骨髄由来幹細胞は、プレオマイシン肺傷害後にどのような細胞に分化しているのか。また、私たちが開発してきた巨大アルブミン (MAA) とポリエチルエニ

ミンを利用した HGF 遺伝子導入法は、この骨髄由来幹細胞による肺の組織修復にどのように影響するかを調べた。

対象と方法

特発性肺線維症患者の生検肺の検討：

東北大学加齢医学研究所附属病院で外科的肺生検となった肺標本を 10% 緩衝ホルマリンにて固定、パラフィンに封理し、厚さ 3 μ m の薄切切片を作成した。研究内容に関してはあらかじめ東北大学病院の倫理委員会承諾と患者のインフォームドコンセントを得た。免疫染色に用いた抗体は抗 CD34 モノクローナル抗体 (clone 4A1, 1/100, Nichirei Co.), 抗トロンボモジュリン抗体 (TM1009, 1/100, DAKO Company Ltd.), および抗 vWF ポリクローナル抗体 (1/2,000, DAKO) である。コンピュータを用いた肺胞壁の立体画像再構築法に関しては以前の研究に基づいて行った^{1,2)}。すなわち、CD34/vWF の免疫二重染色をおこなった標本 (3 μ m) を 3 枚おきに作成し、CD34+血管内皮細胞と vWF+血管内皮細胞をデジタルライザー (UD-1218-RE; Wacom Company Ltd.) に入力し、3-D 画像を立体再構築用ソフト (OZ95; Rise Company Ltd.) を用いて作成した。

GFP マウス由来骨髄移植とプレオマイシン肺傷害：

Green fluorescent protein (GFP) マウス由来の骨髄細胞 (1×10^6 cells in 100 μ l) を採取し、あらかじめ 24 時間前に 8 Gy および 6 Gy を 3 時間間隔あけて照射して骨髄抑制をかけた C57BL/6 マウスに静脈注射を行った。骨髄移植後 4-6 週間後 C57BL/6 マウス (雌, 10-12 週齢) の気管内に 3 mg/kg のプレオマイシンを投与し、14 日後の肺の凍結切片を作成し、蛍光免疫染色にて観察した。蛍光免疫染色には抗 GFP モノクローナル抗体 (1/50, Clontech), 抗 CD34 モノクローナル抗体 (BD PharMingen), 抗 thrombomodulin ポリクローナル抗体 (1/20, Santa Cruz Biotechnology), および抗サイトケラチン 5&8 抗体 (Chemicaon) を用いた。

MAA-PEI+pCAG.HGF による HGF 遺伝子導入：

導入遺伝子には大阪大学宮崎教授から提供された CAG プロモーター支配下発現ベクトル pCAGGS に、大阪大学中村教授から提供されたヒト HGFcDNA を組み込んだ pCAG.HGF を用いた。ウイルス感