

に関与する可能性が考えられたが、DLSTは施行された全例で陰性であった。ステロイド剤に対する反応は良好で、また、本剤中止のみでも改善が得られていた。したがって、予後は良好で、死亡例はなかった。また、本剤再投与にて1/3の症例に肺障害の再燃が認められたが、再治療に対する反応性も良好であった。

画像的には、HR patternが多く、ついでIP pattern、そして、PBVB pattern、COP patternの頻度であり、すりガラス影が主体のHRとPBVB patternで約半数を占めていた。Gefitinibの肺障害で約2割の症例に認められたDAD patternを呈する症例は1例もなかった。gefitinibと比較して本剤による肺障害が予後良好な理由として、予後不良の画像パターンであるDAD patternを示す症例がなく、すりガラス影が主体の画像所見が多いことが考えられた。

以上より、Imatinibによる肺障害は、同様に分子標的薬剤であるgefitinibの肺障害に比較すると予後が良好であることが特徴と考えられる。しかし、肺障害発症の危険因子などについては明らかになっておらず、今後、さらに症例を集積して解明すべきと考えられた。また、最新の本剤の副作用報告では肺障害による死亡例が報告されており、これらの死亡例の詳細な検討も必要と考えられる。

参考文献

- 1) Aono Y, Nishioka Y, Inayama M, Ugai M, Kishi J, Uehara H, Izumi K, Sone S. Imatinib as a Novel Anti-fibrotic Agent in Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis in Mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 (in press).
- 2) Daniels CE, Wilkes MC, Edens M, Kottom TJ, Murphy SJ, Limper AH, Leof EB. Imatinib mesylate inhibits the profibrogenic activity of TGF-beta and prevents bleomycin-mediated lung fibrosis. *J Clin Invest.* 2004 114:1308-16.
- 3) Isshiki I, Yamaguchi K, Okamoto S. Interstitial pneumonitis during imatinib therapy. *Br J Haematol.* 2004 125 (4) :420.
- 4) Yokoyama T, Miyazawa K, Kurakawa E, Nagate A, Shimamoto T, Iwaya K, Akata S, Aoshima M, Serizawa H, Ohyashiki K. Interstitial pneumonia induced by imatinib mesylate: pathologic study demonstrates alveolar destruction and fibrosis with eosinophilic infiltration. *Leukemia.* 2004 18 (3) : 645-6.
- 5) Ma CX, Hobday TJ, Jett JR. Imatinib mesylate-induced interstitial pneumonitis. *Mayo Clin Proc.* 2003 78 (12) :1578-9.
- 6) Rosado MF, Donna E, Ahn YS. Challenging problems in advanced malignancy: Case 3. Imatinib mesylate-induced interstitial pneumonitis. *J Clin Oncol.* 2003 21 (16) : 3171-3.
- 7) Bergeron A, Bergot E, Vilela G, Ades L, Devergie A, Esperou H, Socie G, Calvo F, Gluckman E, Ribaud P, Rousselot P, Tazi A. Hypersensitivity pneumonitis related to imatinib mesylate. *J Clin Oncol.* 2002 20 (20) : 4271-2.

間質性肺炎に対するシクロスポリン (CyA) 併用免疫抑制療法 — CyA の安全性について —

成田 淳一¹ 森山 寛史¹ 寺田 正樹¹ 高田 俊範¹
長谷川隆志¹ 塚田 弘樹¹ 吉澤 弘久¹ 下条 文武¹
鈴木 栄一²

当施設においてシクロスポリン(CyA)併用免疫抑制療法を行った間質性肺炎25症例の臨床像と有害事象について後ろ向きに調べた。特発性3例、膠原病関連22例で、全例でプレドニゾロン内服とCyAの同時あるいは追加併用が行われた。CyA併用後、有害事象が14例(56%)で認められ、サイトメガロウイルス(CMV)抗原陽性が11例と最も多かった。生存22例、死亡3例で、死亡例はすべて原疾患によるものだった。ステロイドとCyAの併用療法では、特に日和見感染症に十分な注意が必要だが、感染予防と定期的なモニタリングによりコントロール可能である。

Immunosuppressive therapy including cyclosporine (CyA) for interstitial pneumonia — Safety of CyA treatment —

Jun-ichi Narita¹, Hiroshi Moriyama¹, Masaki Terada¹, Toshinori Takada¹
Takashi Hasegawa¹, Hiroki Tsukada¹, Hirohisa Yoshizawa¹, Fumitaka Gejyo¹
and Eiichi Suzuki²

¹ Division of Respiratory Medicine, Graduate School of Medical and Dental Science, Niigata University
² Department of General Medicine, Niigata University Medical and Dental Hospital

We reported the clinical courses of twenty-five patients with interstitial pneumonia (IP) who underwent immunosuppressive therapy including CyA and its adverse effects. Three cases of idiopathic IP and twenty-two cases of IP associated with collagen-vascular diseases were reviewed. All cases were treated with oral prednisolone and CyA. Fourteen cases had side effects of the treatment (56%). The most frequent side effect was presence of cytomegalovirus (CMV) antigen in peripheral blood (n=11). Twenty-two cases survived, but three cases died of respiratory failure due to progression of IP. We should take special care in the combination therapy of corticosteroid and CyA for prevention and monitoring of opportunistic infection.

背景と目的

特発性間質性肺炎は現在7種類に分類されている¹⁾。このうち特発性肺線維症は予後不良の疾患で、有効な治療法は見い出されていない。一方、多発性筋炎/皮膚筋炎 (PM/DM) に伴う間質性肺炎には、時にステロイド抵抗性のものが存在し、これらに対する CyA の有効性が報告されている²⁾。当科では2001年以降、それらに対し、副腎皮質ステロイド (プレドニゾロン PSL) と高用量 CyA (トラフ 300ng/ml) の併用治療を行っている。しかし有害事象の出現には極めて注意を要する。特発性あるいは続発性間質性肺炎に対して、CyA 併用免疫抑制療法を施行するにあたり、CyA の安全性について検討する。

対象と方法

1997年から2004年の間に当施設で CyA 併用免疫抑制療法を行った間質性肺炎症例を対象とし、臨床像と有害事象について、後ろ向きに検討する。

結 果

対象背景を表に示す (表1)。対象は、初回治療14例、再発治療11例の計25症例で、平均年齢58歳、男女比は男性9例、女性16例だった。25症例の疾患内訳は、多発性筋炎 (PM) 4例、皮膚筋炎 (DM) 8例、amyopathic DM (ADM) 9例、混合性結合組織病1例、特発性3例であった。

治療は、全例でステロイド内服治療を行われ、CyA はステロイド開始と同時にあるいは追加併用された。

治療開始時のステロイド使用量は、初回治療14例中13例が PSL 60mg/日、1例が20mg/日であり、再発治療11例でも半数以上で高用量ステロイド治療がなされた (PSL 60mg/日6例、PSL 40mg/日1例、PSL 30mg/日1例、PSL 10mg/日3例)。ステロイドパルス療法は19例で行われた。

表1 対象背景

対象症例数	全25例 初回治療14例 再発治療11例		
年齢(平均±SD)	58±11.8歳		
性別(男/女)	9/16		
疾患内訳	PM	4	(16%)
	DM	8	(32%)
	Amyopathic DM	9	(36%)
	その他 MCTD	1	(4%)
	Idiopathic	3	(12%)

初回治療例での CyA の併用理由は、間質性肺炎がステロイド治療抵抗性であるためが8例 (58%) と最も多かった。他に、ADM と診断されたため早期より併用したが2例、筋炎がステロイド治療抵抗性であるためが1例、縦隔気腫を併発し PSL の減量を早めるためが2例、既存の骨粗鬆症で PSL の初期量を抑えるためが1例であった。

CyA の開始時目標トラフ値は、100～150ng/ml が17例 (68%) と最も多数を占めた。150～200ng/ml が2例、200～300ng/ml が6例であったが、これらはすべて PM/DM に伴うステロイド治療抵抗性間質性肺炎であった。

予後は、生存22例 (88%)、死亡3例 (12%) で、死亡例はすべて ADM であり、いずれも原疾患によるものと考えられた。

感染予防として、ST 合剤内服やペンタミジン吸入によるカリニ肺炎の予防が20例 (80%) に行われていた。ポビドンヨードや AMPH-B による口腔内ケアも適宜行われた。感染予防のモニタリングとして、週1回以上の検血、血清生化学検査、動脈血液ガス分析、胸部 X 線検査に加え、2週に1回はサイトメガロウイルス (CMV) 抗原、β-D グルカン、免疫グロブリンの検査を行った。

CyA 併用後の有害事象を表に示す (表2)。25例中14例 (56%) に何らかの有害事象が認められた。内訳では CMV 抗原陽性が11例と最も多く、ついで帯状疱疹、口腔内カンジダ症等の日和見感染が多くみられた。CMV 抗原は、高用量ステロイド治療中には比較的早期から認められることも多いが、原疾患での死亡例を除き、ガンシクロビルの使用で全例陰性化した (表3)。帯状疱疹、口腔内カン

1 新潟大学大学院医歯学総合研究科
内部環境医学講座 (第二内科)
2 同 医歯学総合病院 医科総合診療部

表2 CyA 併用後の有害事象

	全症例 (n=25)	初回治療 (n=14)	再発治療 (n=11)
出現症例数	14 (56%)	9 (64%)	5 (45%)
内訳(重複例あり)			
CMV抗原陽性	11 (79%)	7 (78%)	4 (80%)
带状疱疹	2 (14%)	2 (22%)	0 (0%)
口腔内カンジダ症	3 (21%)	2 (22%)	1 (20%)
真菌性眼内炎	1 (7%)	0 (0%)	1 (20%)
振戦	2 (14%)	2 (22%)	0 (0%)
腎障害	1 (7%)	0 (0%)	1 (20%)
肝障害	1 (7%)	1 (11%)	0 (0%)
顔面紅潮	1 (7%)	1 (11%)	0 (0%)

表3 CMV 抗原陽性症例

	年齢/性	出現時PSL (mg/日)	CyAトラフ (ng/ml)	出現時期 (CyA開始から)	対応	転帰
症例1	31/M	60	95	14日後	GCV	陰性化
2	60/F	60	167	14日後	GCV	陰性化
3	54/M	60	197	5週後	GCV	陰性化
4	56/F	50	322	17日後	GCV	原病で死亡
5	74/F	50	481	14日後	GCV	陰性化
6	75/M	37.5	90	14日後	GCV	陰性化
7	63/F	60	173	7日後	GCV	原病で死亡
8	60/F	60	347	3日後	GCV	原病で死亡
9	61/F	30	125	7週後	GCV	陰性化
10	65/M	60	140	3週後	GCV	陰性化
11	43/F	27.5	143	8週後	GCV	陰性化

ジダ症は治療により軽快したが、真菌性眼内炎の1例のみ失明に至った。振戦、腎障害、肝障害はCyAのトラフ値の高い時期に認められたが、減量により改善した(表4)。

有害事象と目標トラフ値との関連性をみると、トラフ値100~150ng/mlで治療を行った17例中8例(47%)、200~300ng/mlでは6例全例(100%)に何らかの有害事象を認めた。後者群ではCMV抗原が全例陽性という結果であったが、CMV抗原検査施行症例数が前者群では17例中6例と少なかった。

表4 その他の有害事象

	年齢/性	出現時PSL (mg/日)	CyAトラフ (ng/ml)	出現時期 (CyA開始から)	対応	転帰	
带状疱疹	症例1	46/M	25	105	3ヶ月後	ACV	軽快
	2	74/F	32.5	71	4ヶ月後	ACV	軽快
口腔内カンジダ症	症例1	31/M	60	31	10日後	FLCZ内服	軽快
	2	69/F	45	56	14日後	AMPH口腔液	軽快
	3	52/M	35	112	8週後	AMPH口腔液	軽快
振戦	症例1	31/M	60	283	4週後	経過観察	軽減
	2	74/F	50	481	4週後	CyA減量	消失
真菌性眼内炎	52/M	25	138	4ヶ月後	FLCZ点滴	失明	
腎障害	52/M	25	994	4ヶ月後	CyA減量 補液	改善	
肝障害	74/F	55	350	2週後	CyA減量	改善	
顔面紅潮	69/F	45	48	7日後	経過観察	消失	

考 察

副腎皮質ステロイド薬は、主にAP-1やNF-κBを阻害することによるサイトカイン産生抑制や接着分子発現抑制などの作用により、抗炎症作用、免疫抑制作用を発揮する³⁾。ステロイドの免疫抑制作用は、単球/マクロファージ、好中球、リンパ球など幅広く作用し、治療に伴い真菌感染やカリニ肺炎などを発症する可能性がある⁴⁾。またCyAは、カルシニューリンの活性化を阻害することでT細胞におけるIL-2産生を抑制し、T細胞機能を抑制する⁵⁾。マクロファージ⁶⁾や好中球機能⁷⁾にも影響するとの報告もある。したがって両者の併用に際しては、感染症の併発に一層の注意が必要である。

CyA併用後の有害事象ではCMV抗原陽性が最も多く、それに口腔内カンジダ症、带状疱疹などの日和見感染症が続き、従来からいわれる腎障害、肝障害は比較的少なかった。また、カリニ肺炎は予防により1例も認められなかった。当施設では、ステロイド治療抵抗性か否かを十分に判断した後にCyAを併用する症例が多いため、高用量PSL内服例やステロイドパルス施行例が大半を占めており、CyA追加併用に際しては、極めて厳しい免疫抑制状態におかれていたと考えられる。特にCMV抗原は、高用量PSL使用時には、CyA開始2週前後でも陽性化することが多いため、感染予防と定期的なモニタリングが重要と考えられた。真菌性眼内炎の1例のみ治療の効果なく失明に至った。これは再発治療で、CyA開始4ヶ月後の症状発見例であり、血清マーカーでのモニタリングは無効であった。今後は眼科の定期検査も徹底する必要があると考えられた。最後に、有害事象と目標トラフ値の関連性については、トラフ100~150ng/mlの低用量群と比較して、200~300ng/mlの高用量群では有害事象が多いという結果であったが、その差はCMV抗原陽性率に起因していた。この結果は、抗原検査施行症例数に差があるため、高用量CyA療法で日和見感染症の危険性が著しく増加することを単純に示すものではない。低用量CyA群での検査施行実施率が低かったことを反映した結果であると考えられた。

結 論

ステロイドと CyA 併用免疫抑制療法は, CMV 抗原陽性をはじめとして様々な日和見感染症を併発しうるが, 感染予防と定期的なモニタリングにより, コントロール可能と思われる。

参考文献

- 1) American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. This joint statement of the American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS) was adopted by the ATS board of directors, June 2001 and by the ERS Executive Committee, June 2001. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 277-304.
- 2) Nawata Y, Kurasawa K, Takabayashi K, Miike S, Watanabe N, Hiraguri M, Kita Y, Kawai M, Saito Y. Corticosteroid resistant interstitial pneumonitis in dermatomyositis/polymyositis: Prediction and treatment with cyclosporine. *J Rheumatol* 1999; 26: 1527-1533.
- 3) Karin M. New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: Is DNA binding dispensable? *Cell* 2003; 93: 487-490.
- 4) Michail SL, Dimitrios PK. Glucocorticoid and invasive fungal infections. *The Lancet* 2003; 362: 1828-1838.
- 5) Shevach EM. The effect of cyclosporin A on the immune system. *Annu Rev Immunol* 1985; 3: 397-423.
- 6) Svensson U, Holst E, Sundler R. Cyclosporin-sensitive expression of cytokine mRNA in mouse macrophages responding to bacteria. *Mol Immunol* 1995; 32: 157-165.
- 7) Carballo M, Marquez G, Conde M, Martin-Nieto J, Monteseirin J, Conde J, Pintado E, Sobrino F. Characterization of calcineurin in human neutrophils. Inhibitory effect of hydrogen peroxide on its enzyme activity and on NF-kappaB DNA binding. *J Biol Chem* 1999; 274: 93-100.

ブレオマイシン肺線維症モデルにおける **imatinib** の抗線維化効果： **α 1-acid glycoprotein** の重要性

西岡 安彦 東 桃代 青野 純典 稲山 真美
曾根 三郎

我々は昨年度に分子標的治療薬 **imatinib** (Gleevec) の肺線維化抑制効果について報告した。しかしながら、線維化後期 (ブレオマイシン投与後 14 日目以後) の投与では抗線維化効果が減弱したことから、そのメカニズムについて検討した。 **α 1-acid glycoprotein (AGP)** は **imatinib** に結合しその活性を抑制する作用を示すことが報告されている。ブレオマイシン投与後 7 日目ごろよりマウス血清中に AGP が上昇し、14 日目にピークに達し、その後も高値が持続することが明らかとなった。実際に AGP は *in vitro* で **imatinib** によるマウス肺線維芽細胞の増殖抑制効果を阻害した。一方、エリスロマイシンの併用は *in vitro*, *in vivo* において AGP の作用を解除し、**imatinib** によるマウス肺線維芽細胞増殖抑制効果、ブレオマイシン肺線維症抑制効果を増強した。IPF 患者血清中にも AGP が増加しており **imatinib** 投与時には AGP 濃度を考慮し投与法に工夫が必要であると思われた。

Anti-fibrotic effects of imatinib in bleomycin-induced pulmonary fibrosis: a critical role of α 1-acid glycoprotein

Yasuhiko Nishioka, Momoyo Azuma, Yoshinori Aono, Mami Inayama and Saburo Sone

Departments of Internal Medicine and Molecular Therapeutics, Institute of Health Biosciences, The University of Tokushima Graduate School, Japan

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive and lethal pulmonary disorder. We reported the anti-fibrotic effects of **imatinib** using a bleomycin-induced lung fibrosis model in mice. However, antifibrotic effect of **imatinib** was not observed when **imatinib** was administered in the late phase of fibrosis. To clarify this mechanism, we examined an **α 1-acid glycoprotein (AGP)** in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. The level of AGP was elevated in murine serum from 7 days after BLM treatment and reached the plateau on day 14. AGP (800 μ g/ml) completely abrogated the inhibitory effect of **imatinib** on the growth of lung fibroblasts in *in vitro*. The addition of erythromycin (EM) reversed the effects of AGP to restore the anti-proliferative effect of **imatinib**. The combined therapy of **imatinib** with EM showed the marked inhibition of BLM-induced pulmonary fibrosis even when these were administered in the late phase (day 14 to day 28). AGP in the serum of patients with IPF was significantly higher than that of healthy volunteers. These results suggest that AGP is a critical regulator in the anti-fibrotic effects of **imatinib** in bleomycin-induced pulmonary fibrosis, and that a co-administration of EM might be useful for enhancing the effect of **imatinib**.

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。既に、我々は PDGFR の阻害作用を有する imatinib (Gleevec) の抗線維化効果について報告した³⁾。しかしながら、線維化後期の投与では抗線維化効果が見られなかったことから、そのメカニズムについて検討した。特に、imatinib と結合し効果を抑制する⁴⁾ ことが報告されている α 1-acid glycoprotein (AGP) に注目し、その関与について検討した。

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) 125mg/kg を Alzet mini-osmotic pump を用いて持続皮下投与することにより作成した。経時的にマウス尾静脈より採血し、血清 AGP 濃度を radial immunodiffusion assay (Cardiotech Services, Inc.) により測定した。C57BL/6 マウス肺より樹立した線維芽細胞株を用いて、PDGF による増殖反応に対する imatinib と AGP, エリスロマイシン (EM) の効果を ³H-TdR 取り込み試験にて検討した。BLM 肺線維症モデルにおける肺線維化評価は Sircol Collagen Assay を用いた肺コラーゲン含量の定量にて行った。Imatinib による *in vivo* での肺線維芽細胞の増殖抑制効果を検討するため bromodeoxyuridine (BrdU) の免疫染色を行った。また、IPF 患者の血清 AGP 濃度についても検討した。

徳島大学大学院

ヘルスバイオサイエンス研究部分子制御内科学

結 果

BLM 投与後、マウス血清 AGP 濃度は 7 日後から上昇し、14 日目にピークとなりその後 42 日目においても高値であった (700-900 μ g/ml) (図 1)。AGP は *in vitro* において、imatinib の肺線維芽細胞増殖抑制効果を濃度依存性に阻害した。900 μ g/ml の AGP の添加は 1 μ M の imatinib の効果を完全に抑制した (図 2)。一方、EM の添加により AGP の効果は解除され、imatinib の肺線維芽細胞増殖抑制効果が回復した (図 3)。BLM 肺線維症モデルにおいて線維化後期 (day 14 以後) の投与スケジュールにおいても imatinib と EM の併用投与は、線維化をほぼ完全に抑制した (図 4)。

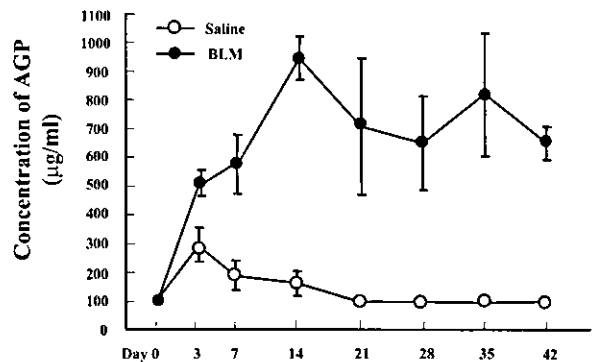


図 1 BLM 投与マウス血清中の AGP の推移
BLM125mg/kg あるいは生理食塩水を osmotic mini-pump により C57BL/6 マウスに投与した。経時的に尾静脈より採血し、AGP 濃度を測定した。BLM 投与後 7 日目より血清 AGP 濃度は上昇し、14 日目にピークとなりその後も高値が持続した。一方、整理食塩水投与では手技によると思われる一過性の上昇を 3 日目に認めたが、その後投与前のレベルに低下した。

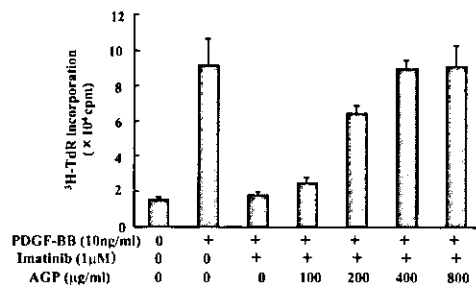


図 2 Imatinib によるマウス肺線維芽細胞の増殖抑制効果に及ぼす AGP の影響
C57BL/6 マウスより作成した肺線維芽細胞を用いて、PDGF-BB (10 ng/ml) で 72 時間刺激後 ³H-TdR (1 μ Ci/well) を 18 時間パルスし、増殖能を測定した。1 μ M の imatinib に対し AGP を 100 ~ 800 μ g/ml の濃度で添加しその効果を検討した。その結果、800 μ g/ml の AGP 添加により 1 μ M の imatinib の線維芽細胞増殖抑制効果は完全に消失した。

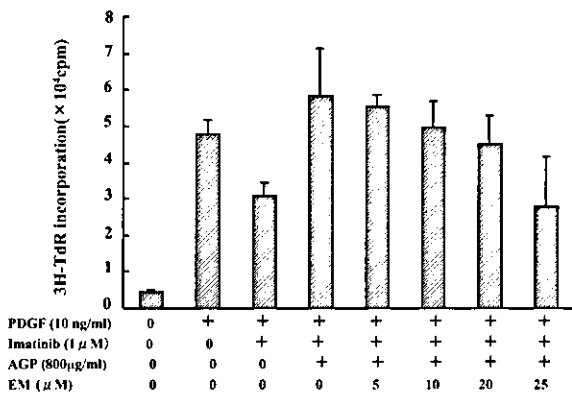


図3 ErythromycinによるAGPの作用抑制
C57BL/6マウスより作成した肺線維芽細胞を用いて、PDGF-BB (10 ng/ml)で72時間刺激後³H-TdR (1μCi/well)を18時間パルスし、増殖能を測定した。1μMのimatinibと800μg/mlのAGPに対し、EMを5~25μMの濃度で添加しその効果について検討した。その結果、800μg/mlのAGPの効果は25μMのEMの添加で完全に解除された。

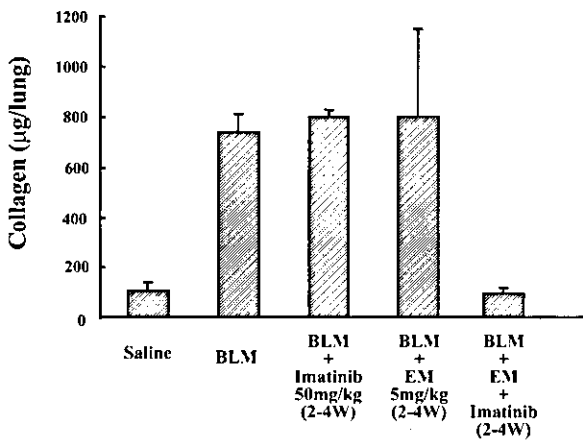


図4 BLM誘発肺線維症モデルにおけるimatinibとEMの併用効果
C57BL/6マウスにosmotic mini-pumpを用いて125mg/kgのBLMを持続皮下投与した。BLM投与開始14日目から、imatinib (50mg/kg)単独投与、EM (5mg/kg)単独投与、imatinibとEMの併用投与を行った。28日後の右肺を用いてコラーゲン量をSircol assay kitにより定量化した。14日目からの後期の投与では、imatinibあるいはEM単独投与では、コラーゲン産生を抑制しなかったが、併用投与において有意にコラーゲン産生が抑制された。

IPF/UIP患者血清中のAGPは、健常人に比較して高値を示した(図5)。

BrdUの取り込み試験の結果から、imatinibはBLM投与マウス肺の間質細胞の増殖を抑制していることが明らかとなった。一方、上皮細胞の増殖は抑制しなかった。(図6)

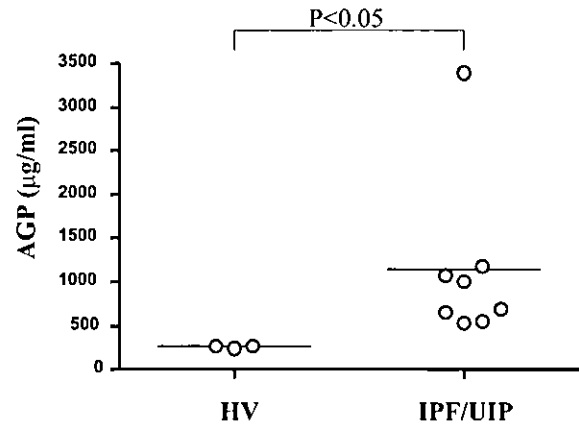


図5 IPF/UIP患者血清中のAGP濃度
IPF/UIP患者(8人)と健常人(3人)の血清中AGP濃度を測定した。IPF/UIPでは有意にAGP濃度が高値であった。

考 察

BrdUの免疫染色の結果からimatinibは、上皮細胞の増殖すなわち上皮の再生を阻害することなく、間質細胞すなわち線維芽細胞の増殖を抑制する可能性が示唆される。一方、BLM肺線維症モデル後期にはマウス血清中にAGPが増加していた。AGPはimatinibの肺線維芽細胞増殖抑制効果を阻害したことから、線維化後期にはAGP上昇によりimatinibの効果が減弱していることが推測された。IPF患者においてもAGPは高値を示しており、臨床応用の際には注意が必要である。EMの併用は、*in vitro*のみならず*in vivo*においてもimatinibの効果を増強したことから、臨床的に併用療法の有効性が示唆された。以上から、現在米国ではIPFに対するimatinibの臨床試験が展開されているが、IPF患者に対する抗線維化薬としてimatinibを投与する際には、血清AGP濃度の考慮が必要であり、EMとの併用療法がより効果的である可能性が示唆された。

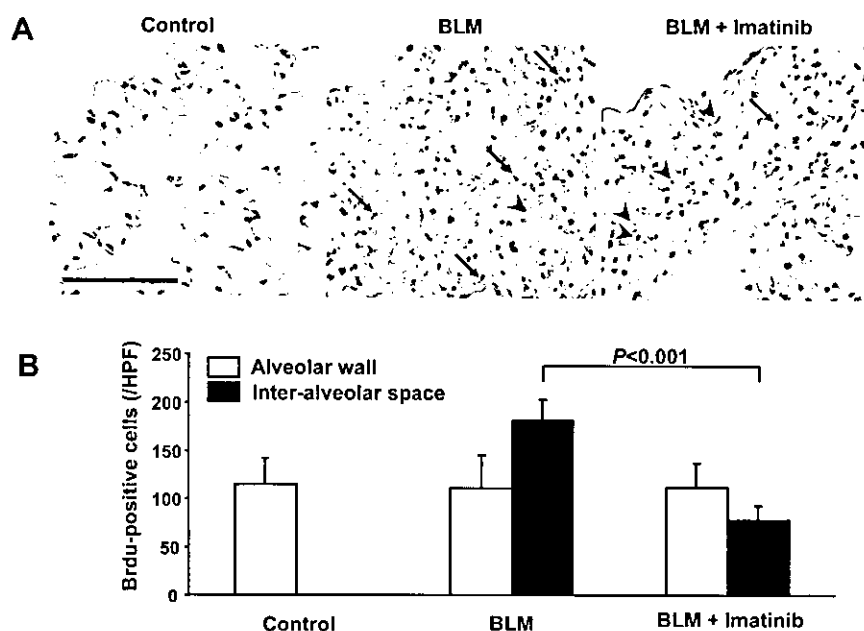


図6 BLM誘発肺線維症における imatinib の *in vivo* 細胞増殖抑制効果

C57BL/6 マウスに osmotic mini-pump を用いて 125mg/kg の BLM を持続皮下投与し、14 日目に bromodeoxyuridine (BrdU) の免疫染色により *in vivo* の増殖細胞数を検討した。その結果、imatinib は、上皮細胞の増殖抑制効果は示さず間質細胞の増殖を有意に抑制した(文献3より引用)

参考文献

- 1) Druker B J, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal G M, Fanning S, Zimmermann J and Lydon N B. 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 T E 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) Aono Y, Nishioka Y, Inayama M, Kishi J, Ugai M, Uehara H, Izumi K, Sone S. 2005. Imatinib is a novel anti-fibrotic agent in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 171:1279-1285.
- 4) Gambacorti-Passerini C, Barni R, le Coutre P, Zucchetti M, Cabrita G, Cleris L, Rossi F, Gianazza E, Brueggen J, Cozens R, Pioltelli P, Pogliani E, Corneo G, Formelli F, D'Incalci M. 2000. Role of alpha 1 acid glycoprotein in the *in vivo* resistance of human BCR-ABL (+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571. *J Natl Cancer Ins.* 92(20): 1641-1650.

特発性間質性肺炎におけるステロイド単独と免疫抑制薬併用治療との比較：臨床指標の計測による評価

滝澤 始¹ 河井 誠¹ 菊地 和彦¹ 出崎 真志¹
幸山 正¹ 大石 展也¹ 永田 泰自¹ 高見 和孝¹
城 大祐¹ 村山 芳武¹ 水口 英彦¹ 長瀬 隆英¹
石井 彰²

特発性間質性肺炎，特に特発性肺線維症は予後不良であり，いまだ効果的な治療法のない疾患である．今年度は，当科における特発性肺線維症の治療効果について後ろ向き調査を行い，治療効果の客観的な評価を各種臨床指標の計測に基づいて検討した．厚生省臨床診断基準第4次改定による特発性肺線維症臨床診断例21例（男性 19例，平均年齢：68.6歳）を解析対象とした．治療効果の客観的指標として，呼吸機能検査値（%VC，%TLC，%DLco），血液ガス検査（PaO₂，SaO₂），血清KL-6，画像所見（画像スコア），自覚症状（呼吸困難感）のスコアをそれぞれ算出し，最終的にはATSの基準を参考に，有効，有用，無効，の3群に分類した．重症度はII度2例，III度4例，IV度12例，分類不能3例で，比較的重症例が多かった．治療効果判定において，治療後の呼吸機能検査が行われていない例が多かった．一方血液ガスやCTスコアは治療効果のあった例で行われる傾向があり，前後で有意に改善した．ステロイド単独群と免疫抑制薬併用群との比較では，重症度に両者に差がなかったにもかかわらず，全体的効果判定でも差が見られなかった．

Studies on the treatment for idiopathic pulmonary fibrosis

Hajime Takizawa, Makoto Kawai, Kazuhiko Kikuchi, Masashi Desaki
Tadashi Kohyama, Naoya Ohishi, Taiji Nagata, Kazutaka Takami
Daisuke Jo, Yoshitake Murayama, Hidehiko Mizuguchi, Takahide Nagase
Akira Ishii

The Department of Respiratory Medicine and Laboratory Medicine, University of Tokyo, Graduate School of Medicine, Tokyo, Japan

Anti-inflammatory therapy with corticosteroids do not result in marked clinical benefits for patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF).

We performed a retrospective analysis about the treatment and its outcomes for IPF in our department.

Among 21 patients who were clinically diagnosed to have IPF, 16 cases were treated with corticosteroids alone, and 5 patients with corticosteroids and immunosuppressive agents such as cyclophosphamide, azathiopurine and cyclosporin. We evaluated several parameters for clinical efficacy, and there was no difference between the two treatment groups.

はじめに

特発性間質性肺炎，特に特発性肺線維症は予後不良であり，いまだ効果的な治療法のない疾患である¹⁾．期待される治療法として，pirfenidone, interferon-gamma, cyclosporine A (CyA), N-acetylcysteine (NAC) などがあるが²⁾，その評価には前向き無作為試験が必要である．また，本症が慢性進行性疾患である事から，適切な評価指標，期間などの設定が重要である．

昨年度は，新しい治療薬剤の開発に必要な，臨床現場での治療実態に関するデータを収集するため，当科における特発性間質性肺炎の治療の実態調査を行い，治療法の開発に必要な諸条件を検討した．

今年度は，当科における特発性肺線維症の治療効果について後ろ向きの調査を行い，治療効果の客観的な評価を各種臨床指標の計測に基づいて行うとともに，ステロイド単独群と免疫抑制薬併用群との間で比較しその差を検討した．

対象と方法

1996年以降に当科初診し，臨床的情報が十分に得られた特発性肺線維症(IPF)例を対象とした．診断は厚生省臨床診断基準第4次改定に基づいた³⁾．明らかな膠原病に伴うものなどは除外した．解析対象となったのは，21例(男性 19例，平均年齢:68.6歳)である．治療効果の客観的指標として，呼吸機能検査値(%VC, %TLC, %DLco)，血液ガス検査値(PaO₂, SaO₂)，血清KL-6，画像所見(画像スコア)，自覚症状(呼吸困難感)のスコアをそれぞれ算出し，最終的にはATSの基準を参考に，有効，有用，無効，の3群に分類した⁴⁾．評価は原則として治療開始直前，3ヵ月後，6ヵ月後に行った．倫理面の配慮として後ろ向きの観察研究で，患者特定が出来ないようにコード化して行った．これは，画像所見の評価を客観的に実施するうえでも有用であった．

- 1 東京大学医学部呼吸器内科
- 2 同 検査部

結 果

1. 患者背景：重症度はII度2例，III度4例，IV度12例，分類不能3例で，比較的重症例が多かった．
2. 治療効果判定において，治療後の呼吸機能検査，とくにDLcoが行われていない例が多かった．これは，患者の状態を考慮して施行されなかった例も少なくないと思われた(図1)．一方血液ガス(図2)やCTスコア(図3)は治療効果のあった例で行われる傾向があり，前後で有意に改善した．
3. 全体的効果判定：慢性進行例及び急性増悪例でステロイド単独からアザチオプリン，シクロホスファミド，シクロスポリンなどの併用が行われていた．ステロイド単独群と免疫抑制薬併用

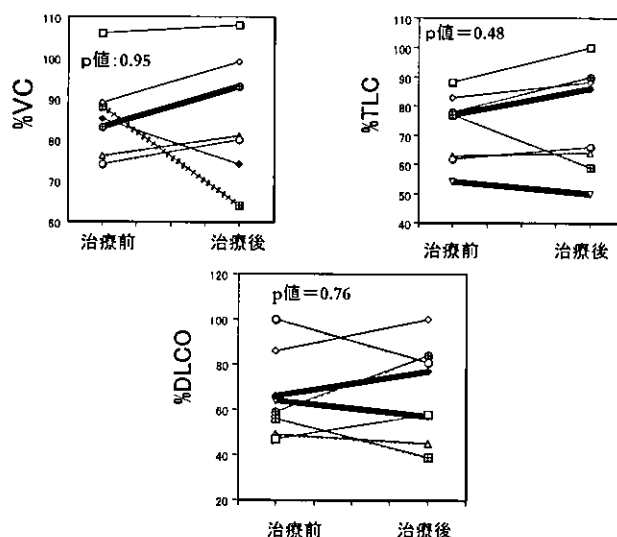


図1 呼吸機能検査の変化(%VC, %TLC, %DLco)

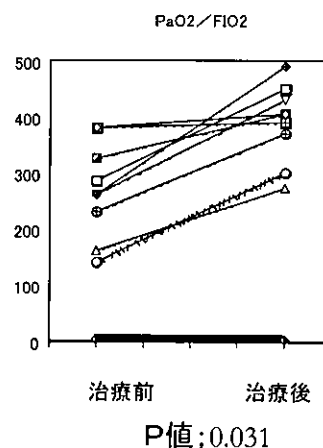


図2 治療前後における PaO₂ / FIO₂ の比較

群との比較では、重症度に両者に差がなかったにもかかわらず、全体的効果判定でも差が見られなかった(表1)。

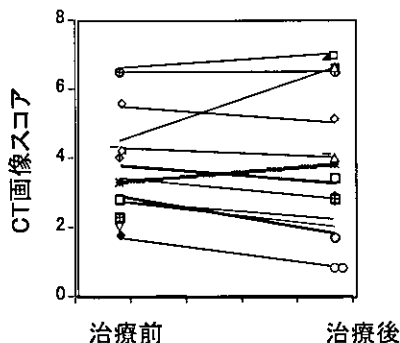


図3 画像スコア治療前後比較。画像比較できた症例13例のうち10例が生存例であった。
治療前後で画像スコアは有意に低下した。
P値: 0.0039

表1

ステロイド単独群と免疫抑制薬併用群の比較

治療群	重症度	有効例	有効率
ステロイド単独群	I度:0 II度:1 III度:2 IV度:10 判定不能:2	8 / 16	50 %
免疫抑制薬併用群	I度:0 III度:2 IV度:2 判定不能:1	2 / 5	40 %

考案

今年度は、当科における特発性肺線維症の治療効果について後ろ向きの調査を行い、治療効果の客観的な評価を各種臨床指標の計測に基づいて行うとともに、ステロイド単独群と免疫抑制薬併用群との間で比較しその差を検討した。

各種臨床指標のうち、治療後の呼吸機能検査、とくにDLcoが行われていない例が多かった。一方、血液ガスやCTスコアは治療効果のあった例で行われる傾向があり、前後で有意に改善した。予想外だったのは、自覚症状の評価の困難さである。後ろ向き調査の限界でもあるが、病歴に基づいても客観的な判定が困難で、WattersらのCRP scoreは現実には困難という印象であった⁴⁾。

また、全体的な治療効果判定であるが、ATSの基準では、3～6ヶ月で2回以上評価をして、有効、

有用、無効、と判定するが、このうち、「標準的な心肺の運動負荷テスト中の、酸素飽和度の改善または正常化(4%以上の増加)、またはPaO₂の改善または正常化(前回に比し4mmHgの増加)改善を認める」の実施方法は明確でなく、また、実際問題として、①悪化時初回の呼吸機能検査は現実的には(特に急性増悪時には)実施が難しい、②DLcoについて、貧血などの肺以外の因子の影響はどうするか、③室内気下での血液ガス測定は難しいことが多い。ゆえに酸素投与下での基準も必要と思われる、④運動負荷テストが施行できない患者はどうするか、なども課題となる。

また少数例の検討であるが、重症度に差がなかったにもかかわらず、ステロイド単独群と免疫抑制薬併用群での治療効果には差が認められなかった。

結 論

特発性間質性肺炎の臨床治療の実態調査を通じて、今後の薬剤開発において留意すべきポイントを明らかにすることが出来た。

参考文献

- 1) Idiopathic Pulmonary Fibrosis: Diagnosis and Treatment. International Consensus Statement Am. J. Respir. Crit. Care Med. 161: 646-664. 2000
- 2) 吾妻安良太:特発性肺線維症(IPF):最近の治療法開発の現状.呼吸器科 1:496-508, 2002.
- 3) 工藤翔二:特発性間質性肺炎(IIP)の第4次臨床診断基準改訂について.厚生科学研究特定疾患対策事業びまん性肺疾患調査研究班,平成12年度研究報告書,83-83, 2001.
- 4) Watters LC, King TE, Schwarz MI, Waldron JA, Stanford RE, Cherniack RM. A clinical, radiographic, and physiologic scoring system for the longitudinal assessment of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Am Rev Respir Dis. 1986 Jan;133 (1) :97-103.

正常ヒト肺線維芽細胞を用いた肺線維症における
Pirfenidone の作用機序についての検討
—特に **HSP47** 発現に及ぼす効果について—

中山 聖子¹ 迎 寛¹ 杉山 奏子¹ 井手美桜子¹
角川 智之¹ 石本 裕士¹ 久富 恵子¹ 石井 寛¹
近藤 宇史² 河野 茂¹

Heat shock protein (HSP) 47 は線維化進展に密接に関与している蛋白である。今回われわれは, *in vitro* において Pirfenidone が肺線維芽細胞における HSP47 および I 型コラーゲンの mRNA 発現を抑制することを明らかにした。

**Pirfenidone inhibits expression of heat shock protein 47 (HSP47)
on TGF β 1- stimulated cultured normal human lung fibroblasts**

Seiko Nakayama¹, Hiroshi Mukae¹, Kanako Sugiyama¹, Mioko Ide¹
Tomoyuki Kakugawa¹, Hiroshi Ishimoto¹, Keiko Hisatomi¹, Hiroshi Isii¹
Takahito Kondo² and Shigeru Kohno¹

¹ Second Dept of Internal Medicine, Nagasaki University School of Medicine

² Department of Biochemistry and Molecular Biology in Disease, Atomic Bomb Disease Institute, Nagasaki University Graduate School of Medicine

Heat shock protein (HSP) 47, a collagen-specific molecular chaperone, is involved in the processing and/or secretion of procollagen. We examined the effects of pirfenidone, an antifibrotic agent, on HSP47 and collagen expression in cultured normal human lung fibroblasts. Expression of HSP47 and collagen type I mRNA was assessed by Northern blotting. The elevated expression of HSP47 and collagen type I mRNA by TGF β 1 was significantly inhibited by pirfenidone in a dose- dependent. We conclude that the anti- fibrotic effect of pirfenidone may be partly mediated through inhibition of HSP47 expression, that may lead to reduction of collagen synthesis.

はじめに

Heat shock protein 47 (HSP47) は小胞体に局在するストレス蛋白として 1986 年に発見され、その後の研究によってコラーゲン特異的分子シャペロンであることが明らかとなった。すなわち、小胞体内でのプロコラーゲンの生合成とゴルジ装置への輸送過程において、フォールディング、凝集および分解阻止、品質管理、輸送の各所で働いていると考えられている¹⁾。コラーゲンの異常な蓄積を特徴とする肝硬変²⁾、腎硬化症³⁾、腹膜硬化症⁴⁾、肺線維症⁵⁾など種々の線維化疾患において、HSP47 もその合成が異常に亢進していることが報告されている。またわれわれが以前に行った特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) 患者の肺組織による免疫染色の検討においても、fibroblastic foci に一致して I 型プロコラーゲンおよび HSP47 の発現が亢進していることが確認されており⁶⁾、HSP47 は IPF の病態においても重要な役割を担っていると思われる。これらのことから HSP47 はコラーゲンの組織への沈着にとって必須の因子であり、線維化の進展に密接に関与していると考えられる。

Pirfenidone は抗線維化作用を有することが知られており、各種線維化疾患動物モデルにおいて線維化を抑制することが報告されてきた⁷⁾。また、特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) 患者を対象とした臨床試験においてもその有効性が示されているが^{8,9)}、その作用機序については未だ十分に明らかにされたとは言い難い。われわれが以前行ったマウスのブレオマイシン肺臓炎モデルを用いた検討では、ブレオマイシン肺臓炎群で肺線維化の進展とともに HSP47 陽性細胞数の増加を認めたが、これらは pirfenidone 治療により有意に抑制された¹⁰⁾。このことから pirfenidone が HSP47 の発現を抑制することにより抗線維化作用を示す可能性が示唆された。そこで今回われわれは、pirfenidone が肺線維芽細胞のコラーゲン産生に与える直接的な影響を明らかにするために、正常ヒト肺線維芽細胞を用いて *in vitro* において HSP47 お

よび I 型コラーゲンの発現に対する pirfenidone の作用を検討した。

方 法

60mm ディッシュにヒト肺線維芽細胞を 90、confluence の状態まで培養し、TGF-β1 (0, 5ng/ml) と pirfenidone (0, 100, 500, 1000μg/ml) を同時に添加した後 24 時間培養し、回収した細胞における HSP47 および I 型コラーゲンの mRNA の発現を Northern blotting 法により検討した。また上清を回収し I 型コラーゲン合成の指標である I 型コラーゲン C 末端テロペプチドの発現について ELISA 法にて検討を行った。

結 果

TGF-β1 5ng/ml の刺激によって HSP47mRNA の発現はコントロールのおよそ 3.5 倍に亢進したが、pirfenidone 添加によりその発現は濃度依存性に抑制された(図 1)。また TGF-β1 刺激によって I 型コラーゲン mRNA の発現はコントロールのおよそ 5 倍に亢進したが、HSP47 同様に pirfenidone 添加によりその発現は濃度依存性に抑制された。上清中の I 型コラーゲン C 末端テロペプチド濃度を ELISA 法にて測定したところ、有意差はみられなかったものの、TGF-β1 で増加した値が、pirfenidone 添加により濃度依存性に低下する傾向が認められた。

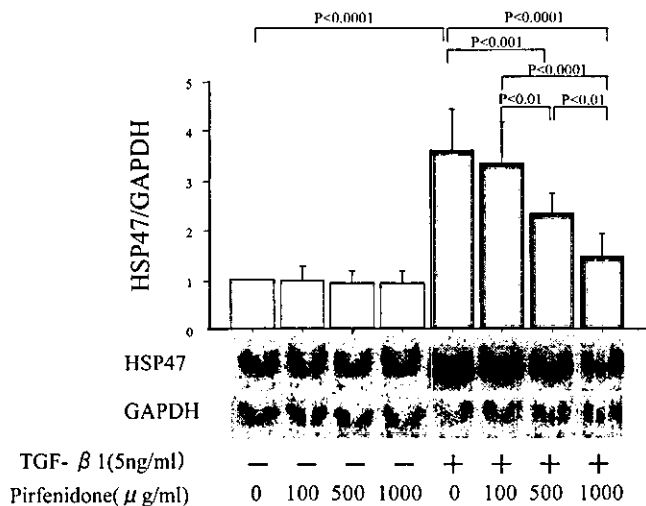


図 1 HSP47mRNA 発現の検討

1 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科感染分子病態学 (長崎大学医学部・歯学部附属病院第二内科)
 2 長崎大学医学部原研生化

考 察

HSP47 はコラーゲン合成に必須の分子シャペロンであり、HSP47 の発現を抑制することによりコラーゲン産生を抑制する可能性がある。実際に HSP47 に対する antisense を用いた検討で、HSP47 の発現抑制によりコラーゲンの合成を抑制することが報告されている¹⁰⁾。

今回の検討において、pirfenidone は *in vitro* において TGF- β 1 刺激によるヒト肺線維芽細胞における HSP47 および I 型コラーゲンの mRNA 発現亢進を濃度依存性に抑制した。また TGF- β 1 刺激によるヒト肺線維芽細胞培養上清において、I 型コラーゲン合成の指標である I 型コラーゲン C 末端テロペプチド発現の亢進を濃度依存性に抑制する傾向がみられた。これらの結果は、既に述べたわれわれの *in vivo* の実験結果を裏付けるものであり、pirfenidone の肺線維症における抗線維化作用の一つとして、肺線維芽細胞における I 型コラーゲンの発現を mRNA レベルで抑制するだけでなく、HSP47 の発現を mRNA レベルで抑制することにより、引き続き起こるコラーゲンの合成を抑制し、細胞外基質の過剰沈着を抑制する機序が考えられた。

参考文献

- 1) Sauk JJ, *et al.* Hsp47 and the translation-translocation machinery cooperate in the production of alpha 1 (I) chains of type I procollagen. *J Biol Chem* 1994; 269: 3941-6.
- 2) Masuda H, *et al.* Coexpression of the collagen-binding stress protein HSP47 gene and the alpha 1 (I) and alpha 1 (III) collagen genes in carbon tetrachloride-induced rat liver fibrosis. *J Clin Invest* 1994; 94: 2481-8.
- 3) Abe K, *et al.* Interstitial expression of heat shock protein 47 and alpha-smooth muscle actin in renal allograft failure. *Nephrol Dial Transplant* 2000; 15: 529-35.
- 4) Shiohita K, *et al.* Expression of heat shock proteins 47 and 70 in the peritoneum of patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Kidney Int* 2000; 57: 619-31.
- 5) Razzaque MS, *et al.* Immunolocalization of collagen and collagen-binding heat shock protein 47 in fibrotic lung diseases. *Mod Pathol* 1998; 12: 1183-8.
- 6) Iwashita T, *et al.* Involvement of collagen-binding heat shock protein 47 and procollagen type I synthesis in idiopathic pulmonary fibrosis: contribution of type II pneumocytes to fibrosis. *Hum Pathol* 2000; 31: 1498-505.
- 7) Iyer SN, *et al.* Effects of pirfenidone on procollagen gene expression at the transcriptional level in bleomycin hamster model of lung fibrosis. *J Pharmacol Exp Ther* 1999; 289: 211-8.
- 8) Raghu G, *et al.* Treatment of idiopathic pulmonary fibrosis with a new antifibrotic agent, pirfenidone: results of a prospective, open-label Phase II study. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 1061-9.
- 9) Azuma A, *et al.* Double Blind, Placebo-Controlled Trial of Pirfenidone in Patients with Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2005.
- 10) Kakugawa T, *et al.* Pirfenidone attenuates expression of HSP47 in murine bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Eur Respir J* 2004; 24: 57-65.
- 11) Sunamoto M, *et al.* Antisense oligonucleotides against collagen-binding stress protein HSP47 suppress collagen accumulation in experimental glomerulonephritis. *Lab Invest* 1998; 78:967-72.

特発性間質性肺炎のエピジェネティクス —特発性間質性肺炎 (IIPs) 亜型解析および治療反応性への応用— (Preliminary Study)

棟方 充¹ 大塚 義紀¹ 大島 謙吾¹ 王 新涛¹
鎌滝 章央² 本間 好²

特発性間質性肺炎 (IIPs) の中で、非特異的間質性肺炎 (NSIP) はステロイド治療反応性であり、特発性肺線維症 (IPF) は非反応性とされる。しかし、この判定には外科的生検組織の病理学的診断が必要である。臨床的には治療反応性の非侵襲的判定法確立が期待されている。近年、細胞機能制御におけるエピジェネティックコントロールが注目され、特に DNA メチル化による遺伝子発現コントロールは、加齢に伴う機能変化や悪性腫瘍発生などにも重要な関与をすることが明らかになっている。今回は、特発性間質性肺炎患者 14 名 (男 11 名, 女 3 名) を対象とし、ホメオボックス転写因子関連 300 遺伝子プロモーター CpG 領域のメチル化解析が可能なオリジナルアレーを作成し、抹消血白血球より抽出した DNA のメチル化解析を行った。IIPs の亜型やステロイド治療反応性の有無による差異に関する検討を行った。

Epigenetics of Idiopathic Interstitial Pneumonias — Application for the analysis of subtype and therapeutic responses —

Mitsuru Munakata¹, Yoshinori Ohtsuka¹, Kengo Ohsima¹, Xintao Wang¹,
Akio Kamataki², Yoshimi Homma²

¹ Department of Pulmonary Medicine, Fukushima Medical University

² Department of Biomolecular Sciences, Fukushima Medical University

Interstitial pneumonias included in idiopathic interstitial pneumonias (IIPs) have different therapeutic responses. Non-specific interstitial pneumonia (NSIP) responds well to gluco-corticosteroid therapy. On the other hand, in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF), gluco-corticosteroid does not have beneficial effect. To differentiate NSIP and IPF, invasive and risky procedure, such as surgical biopsy, has been required. For this reason, non-invasive method to know the responsiveness to steroid therapy has been awaited in clinical setting. Recently, the importance of epigenetic control of gene expression for the regulation of cell function has been elucidated. Gene expression control by DNA methylation is one of such epigenetic control mechanisms and has been known to play important roles in neoplastic diseases and ageing.

We recently made micro-array system to detect methylation status of large number of genes at the same time. In this study, we applied this micro-array system to compare the DNA methylation status of the patients with IIP and analyzed the difference among each subtypes of IIP.

研究目的

特発性間質性肺炎 (IIPs) には数種の原因不明の間質性肺疾患が含まれている。この中で、非特異的間質性肺炎 (NSIP) はステロイド治療反応性であり、特発性肺線維症 (IPF) は非反応性とされる。現在、この判定には外科的生検組織の病理学的診断が必要である。しかし、臨床的には治療反応性有無を非侵襲的に判定できる方法の確立が待たれている。

一方、近年、細胞機能制御におけるエピジェネティックコントロールが注目されている。とりわけ、DNA メチル化による制御は、DNA 配列の一次遺伝情報を変えずに遺伝子の形質発現の多様性を生み出すメカニズムとして、ヒトの発生や加齢現象などと密接に関連すると考えられている。更に、近年では、悪性腫瘍、生活習慣病、慢性炎症性疾患などの病態形成にも重要な関与をすることが明らかになっている。方法論的には、これまで特定遺伝子のプロモーター領域に限定したメチル化解析が行われてきたが、近年、多数の遺伝子プロモーター領域のメチル化を網羅的に解析するマイクロアレーが開発されつつある。

本研究の目的は、IIPs 患者の末梢血 DNA のメチル化を網羅的に解析し、IIPs の病型、病態ならびに治療反応性などとの関連性を解析することである。

研究方法

1. 対象

特発性間質性肺炎 (IIPs) 患者 14 名 (男 11 名, 女 3 名) を対象とした。特発性肺線維症の診断については、日本呼吸器学会の特発性間質性肺炎の診断と治療の手引き (ガイドライン) (2004) での臨床診断基準を用いた。慢性型 IIPs のうち、IPF に属さず臨床的には NSIP が疑われる症例については Non-IPF とした。ステロイドならびに免疫抑制薬による治療への反応性について呼吸器学会ガイドライン (2004) の治療効果判定基準により判定した。

2. 方法

DNA は末梢血白血球より通常の方法で抽出した。メチル化解析は目的とする遺伝子のプロモーター CpG アイランドのみを集積したゲノムチップを用いて解析した。今回は、約 300 の転写因子やシグナル分子の遺伝子プロモーターをクローニングし、それらを搭載した独自のアレーを作成した。プローブは MAD 法を一部改変した方法でメチル化ゲノム断片を調整し、これを鋳型に蛍光ラベル化しパイプリード用プローブとした。正常人 30 人の白血球から調整した DNA サンプルを等量ずつ混合したもの (正常ゲノムプール) をコントロールとして用いた。

3. 比較対象

IIPs の末梢血 DNA メチル化に関しては以下の 3 つの比較検討を行った。

- ① IPF 群と Non-IPF 群
- ② 膠原病関連自己抗体陽性群と陰性群
- ③ ステロイド治療で改善ないし不変群と悪化群

(なお、DNA 採取ならびに解析は、福島県立医科大学倫理委員会での承認を得、すべての患者から同意書を頂いた後に行った。)

研究結果

1. IIPs における DNA メチル化解析

14 例の IIPs 患者 DNA と 30 名の健常者からの正常ゲノムプールを用いて DNA メチル化アレー解析を行った。IIP 患者では、正常者と比較し、プロモーター CpG 領域のメチル化がより亢進している遺伝子と逆に正常よりもメチル化が少ない遺伝子が検出された。IIPs 全体でみた場合、共通してメチル化に異常のある特定の遺伝子は認められなかったが、一定のメチル化亢進遺伝子群を持つ患者集団が認められた。

2. 特発性間質性肺炎 (IPF) と非 IPF (Non-IPF) 症例の比較

臨床診断基準によって、IIPs 14 例は IPF : 8 例, Non-IPF : 6 例に分類された。各群での DNA メチル化を比較すると、いくつかの遺伝子でメチル化が亢進ないし減少する傾向は認められたが、両群で完全にメチル化状態が異なった遺伝子は認められなかった。

1 福島県立医科大学医学部呼吸器科学講座

2 同 生体情報伝達研究所生体物質研究部門

3. 膠原病関連自己抗体陽性例と陰性例の比較

すべての症例で、ANA, RF, 抗 DNA 抗体, 抗 RNP 抗体を含む各種膠原病関連自己抗体が測定されていた。その結果から、少なくとも1つ以上の自己抗体陽性を持つ患者:自己抗体陽性群 (6例), すべてが陰性であった患者:自己抗体陰性群 (8例), を選別し比較した。いくつかの遺伝子で比較的共通してメチル化が亢進ないし減少する傾向が認められた。

4. ステロイド治療反応群, 非反応群の比較

14例のうち, 5例でステロイド治療が行われた。呼吸器学会の判定基準を基に, 治療効果を有効, 不変, 悪化に分類し, 有効・不変群 (2例) と無効群 (3例) での比較を行った。今回は症例数が少なく, プレリミナリーな結果ではあるが, 治療効果を判別できるような異常メチル化を示す遺伝子は明確でなかった。

考 察

今回は, ホメオボックス転写因子関連 300 遺伝子のプロモーター領域のメチル化解析を行った。IIPs 全体では正常プール DNA と比較し, 比較的高頻度にメチル化の亢進ないし抑制を受けている遺伝子が認められた。また, IPF/Non-IPF, 自己抗体陽性 IIP/陰性 IIP などメチル化パターンに違いが認められた。これら結果から, DNA メチル化が IIPs の病態と関連している可能性を示している。治療反応性との関連については, さらに症例数を増やして検討する必要がある。

結 論

ホメオボックス転写因子関連 300 遺伝子プロモーター CpG 領域のメチル化解析オリジナルアレーを用いて, IIPs 患者 14 例の末梢血 DNA のメチル化解析を行った。病型, 病態などにより特徴のあるメチル化パターンが存在している可能性がある。

研究発表

1. 論文発表

- 1) Saito J, *et al.*, Exhaled nitric oxide as a marker of airway inflammation for an epidemiologic study in school children. *J Allergy Clin Immunol* 114:512-6, 2004.
- 2) Inoue K, *et al.*, A kendo player with haemoptysis. *Lancet* 364:814, 2004.
- 3) Takahashi K, *et al.*, Diagnostic usefulness of bronchoalveolar lavage in Hermansky-Pudlak syndrome: A case with double lung cancers. *Int Med* 43:972-6, 2004.
- 4) Munakata M, *et al.*, Molecular-based haplotype analysis of the β 2-adrenergic receptor gene (ADRB2) in Japanese asthmatics and non-asthmatic subjects (submitted for publication, 2005).

ブレオマイシン肺線維症モデルに対するアンジオテンシン受容体拮抗薬による抑制効果と SP-A の変動に関する検討

高橋 弘毅 白鳥 正典 大塚 満雄 千葉 弘文
阿部 庄作

我々はこれまで、ラット bleomycin (BLM) 誘導肺線維化モデルを用いて、肺における angiotensin II type 1 receptor (AT1) の発現と AT1 拮抗薬 (angiotensin receptor blocker : ARB) の効果を報告した。本モデルにおける肺障害の炎症期におけるサーファクタント蛋白質 A (SP-A) の量的変化を観察し ARB の作用と機序を検討した。BLM 肺障害群 (BLM 群) の肺洗浄液中の総細胞数と好中球数は BLM 投与 3 日および 7 日後に有意に増加していたが、ARB 投与群 (ARB+BLM 群) ではこの増加は抑制された。組織学的に BLM 群では 3 日後に著明な炎症細胞浸潤を、7 日後には肺胞 II 型上皮細胞の過形成が認められた。これに対して ARB+BLM 群では炎症は抑えられ肺胞 II 型上皮細胞の過形成は認められなかった。肺組織中の SP-A は BLM 群では 3 日後より有意に増加したが、ARB+BLM 群では有意な変化を認めなかった。これらの結果から ARB は肺の線維化のみならず早期の炎症過程をも抑制することが示唆された。

Effects of an angiotensin receptor blocker for an animal model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis and changes of surfactant protein A (SP-A)

H. Takahashi, M. Shiratori, M. Otsuka, H. Chiba
S. Abe

Third Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine

We reported an expression of angiotensin II type 1 receptor (AT1) and effects of angiotensin receptor blocker (ARB) in lungs of a rat model of bleomycin (BLM)-induced pulmonary fibrosis. We examined changes in amount of surfactant protein A (SP-A) and investigated the effects of ARB and their mechanisms during an inflammatory process in this model. Although total cell numbers and neutrophils in lung lavage fluids from a rat group with BLM injury (BLM group) were significantly increased on day 3 through 7, the increments were suppressed from a rat group pretreated with ARB (ARB+BLM group). Histologically, marked inflammatory infiltrate and hyperplasia of alveolar type II epithelial cells were observed in BLM group on day 3 and 7, respectively. On the other hand, the finding of inflammation was inhibited and hyperplasia of alveolar type II cells was not observed in ARB+BLM group. Amount of SP-A in lung tissue homogenate was significantly increased on and after day 3 in BLM group but not in ARB+BLM group. These results suggest ARB inhibited not only fibrosis of the lungs but also early inflammatory process.

はじめに

レニン・アンジオテンシン系は全身に作用し、循環動態の安定に重要な役割を有する。Angiotensin II (ANG-II) は ANG-II type 1 受容体 (AT1) を介してカテコールアミンやアルドステロンの分泌や血圧上昇に関与することは知られているところであるが¹⁾、線維芽細胞や血管平滑筋細胞の増殖による心肥大や線維化²⁾、アポトーシスの誘導³⁾、好中球誘導⁴⁾を生ずることが報告されている。我々はブレオマイシン (BLM) 肺線維化モデルを作成し、肺洗浄液細胞および肺組織における AT1 の増加とアンジオテンシン受容体拮抗薬 (angiotensin receptor blocker : ARB) による肺線維化の抑制効果を報告した⁵⁾。今回、BLM 肺線維化モデルの血清、肺組織、肺洗浄液中の SP-A を定量し、BLM 肺障害による SP-A への影響と ARB による治療効果を検討した。

研究方法

雄 Sprague-Dawley ラット (生後 6 週) の気管内にブレオマイシン 0.3 mg/kg を投与し肺線維症モデルを作成した (BLM 群)。ブレオマイシン投与の 2 日前から ARB である candesartan cilexetil を飲水中に 10 mg/kg/day になるように調整し投与した (ARB+BLM 群)⁵⁾。

ブレオマイシン投与日を day 0 とし、day 1, 3, 7, 14, 21 に深麻酔下に屠殺し検体を得た。下大静脈より採血し血清を採取した後、生理食塩水を 7ml ずつ 5 回、両肺を洗浄、回収液を遠心分離し細胞数と細胞分画を計測後、上清を肺洗浄液として保存した。洗浄後の肺をホモジナイズし、残渣を遠心除去して肺組織のホモジネート分画とした。肺組織は気管内に 10%ホルマリンを 20 cmH₂O の圧で注入固定後、パラフィン包埋し、hematoxylin-eosin 染色で形態学的変化を観察した。

血清、肺洗浄液および肺組織ホモジネート中の SP-A は ELISA 法で測定した⁶⁾。

研究成果

肺洗浄液中の総細胞数、好中球数は BLM 投与 3 日後と 7 日後に有意に増加したが、ARB+BLM 群では有意な増加が認められず、増加のピークである day 7 では BLM による増加が有意に抑制された (図 1)。組織学的には肺洗浄液中の細胞数を反映して、BLM 群で投与 3 日後に肺胞および胞隔の好中球主体の炎症細胞浸潤を認め、7 日後には炎症の進展とともに肺胞 II 型上皮細胞の過形成を認めた (図 2-A, B)。一方、ARB+BLM 群では炎症細胞浸潤は軽度であり、肺胞 II 型細胞の過形成も認めなかった (図 2-C, D)。

血清 SP-A は両群ともに day 7, day 14 で有意に増加し、肺障害のマーカーとしての有用性が示唆された (図 3-A)。肺組織中の SP-A 量は BLM 群で day 3 以降、約 3 倍に有意に増加したが、BLM+ARB 群では変化を認めなかった (図 3-B)。肺洗浄液中の SP-A は BLM 群では day 7 にピークを認めたが、これに対して BLM+ARB 群は day 3 にピークを認めた (図 3-C)。

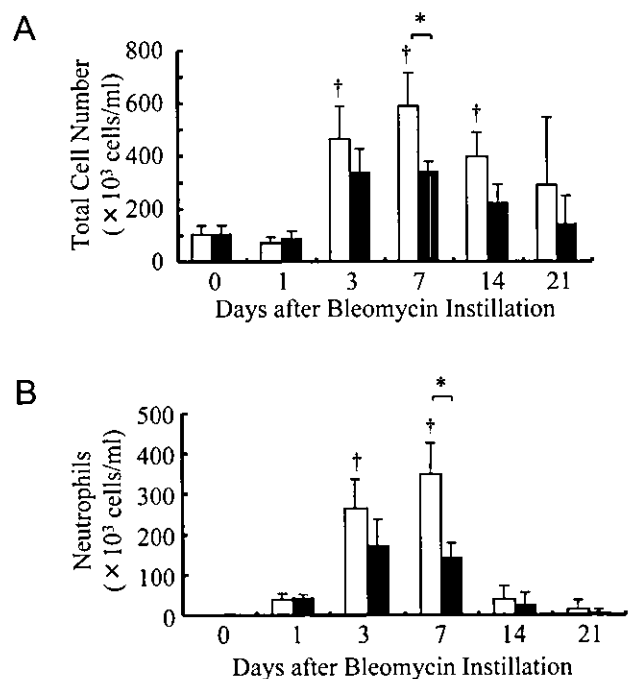


図 1 BLM 群 (open column) および ARB+BLM 群 (closed column) の肺洗浄液中の総細胞数 (A)、好中球数 (B) の変化。† p<0.05 vs day 0, * p<0.05.