

Fig. 8 IPF 急性増悪の治療と予後

A. 急性増悪の治療内容と生存期間。全例に mPSL パルス療法を行っており、反応不良例・重症例にはシクロフォスファミドや、シクロスポリン A や好中球エラストラーゼ阻害薬を併用した。B. 治療内容と予後。免疫抑制剤の併用が予後の改善をもたらしているとは結論できなかった。C. 急性増悪治療中にみられた合併症。41.7% にアスペルギルス感染を、29.2% に DIC を認め、合併により平均生存期間の有意な短縮を認めた。

ほとんどの症例が 1-2ヶ月以内に死亡し、発症後の平均生存期間は 1.93ヶ月であり、1例を除き 5ヶ月以内に死亡した (Fig. 5B)。さらに、免疫抑制剤を併用することが、著明な治療効果や生存率の改善をもたらしているとも結論できず (Fig. 8A, B)、現時点では、ことさら効果的な治療法とは結論できなかった。

IPF 急性増悪とアスペルギルス感染症

急性増悪死亡例 (24例) のうち 10例 (41.7%) にアスペルギルス感染を、7例 (29.2%) に DIC を認め、これらの合併により平均生存期間の有意な短縮を認め (Fig. 8C)、特にアスペルギルス感染例は全例死亡した。一方、サイトメガロウイルス感染症やカリニ肺炎、アスペルギルス以外の真菌症の合併については克服可能と考えられた。免疫抑制剤の併用は、致死的と考えられるアスペルギルス感染のリスクを高めると当初予測したが、実際の合併率は、mPSL パルス単独群: 5/12例 (41.7%)、エンドキササン併用群: 3/8例 (37.5%)、シクロスポリン A 併用群: 2/8例 (25.0%) であり、免疫抑制剤の併用が感染のリスクを高めているとは必ずしもいえず、むしろ、末梢血リンパ球比率の低下といった免疫能力の低下が感染成立に深く関与することがわかった。臨床経過を検討すると、急性増悪例の 2大死因は、(1) 急性期の病状の進行 (陰影の

進展や LDH などのマーカーの増加) をステロイドパルスや免疫抑制剤にてコントロールできなかったことに起因する急性呼吸不全の進行、(2) 仮になんとかコントロールできたとしてもその後起こるアスペルギルス感染症に伴う諸問題 (慢性呼吸不全の進行、喀血、膿気胸など)、と云えた。従って、アスペルギルス感染の予防は、可能かつ有効な補助手段と考えられ、免疫能低下状態 (特にリンパ球比率) の注意深い監視や、病室の室内換気口やエアコンの清拭、エアフィルターや場合によってはクリーンルームの使用などを今後検討する必要がある。但し、一度アスペルギルス感染が起ってしまうと現在の抗真菌薬では克服が極めて困難で、予後は極めて厳しいと云わざるを得ないのが現状であろう。

最後に

IPF の病態については従来「炎症論」で論じられてきた。すなわち、「繰り返す刺激や傷害が慢性の胞隔炎を惹起し、その過程で修復機転の障害や筋線維芽細胞の増殖とリモデリングを招き、線維化が進行する」という考え方である。これは、膠原病肺や慢性過敏性肺炎、プレオマイシンに代表される薬剤性肺炎には当てはまる考え方であり、ステロイド治療も有効性が期待できる。しかしながら、近年「炎症なき線維化」ある

いは「上皮障害論 (epitheliopathy)」が、(1) IPFにはステロイドが無効である¹⁶⁾、(2) 炎症がなくても線維化は惹起できる^{17,18)}、(3) IPFの初期像に炎症所見は見られない¹⁹⁾、(4) IPFの予後や病勢と炎症所見が必ずしも相関しない²⁰⁾、などの理由から注目されるようになった。これは「上皮の傷害・活性化がまず起こり、ここにTGF- β やPDGFといった増殖因子の過剰産生が加わり、筋線維芽細胞によるfibroblastic fociが形成され、再上皮化の失敗、筋線維芽細胞のアポトーシスの抑制、コラーゲンの過剰沈着などが起こり、線維化に至る」という考え方である²⁰⁾。いずれにせよIPF自体の病因・病態が解明されていない現在、「IPFの急性増悪」の病因・病態に迫ることは、甚だ困難であると云わざるを得ないが、本病態の治療抵抗性、とくにステロイドや免疫抑制剤に対するレスポンスが極めて低い事を考えると、やはり単なる急性炎症論のみでは語ることができない病態と考えられ、現在第III相治験中の抗線維化薬であるpirfenidoneや、今後発展が期待される再生医療といった、免疫抑制とは異なる観点からの新しい治療法の開発が強く望まれる。

参考文献

- 1) 特発性間質性肺炎 診断と治療の手引き, 日本呼吸器学会びまん性肺疾患 診断・治療ガイドライン作成委員会. 2004. 南江堂.
- 2) American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 277-304.
- 3) Nicholson AG, Colby TV, du Bois RM, et al. The prognostic significance of the histologic pattern of interstitial pneumonia in patients presenting with the clinical entity of cryptogenic fibrosing alveolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 2213-2217.
- 4) Bjoraker JA, Ryu JH, Edwin MK, et al. Prognostic significance of histopathologic subsets in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 199-203.
- 5) Travis WD, Matsui K, Moss J, et al. Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia: prognostic significance of cellular and fibrosing patterns: survival comparison with usual interstitial pneumonia and desquamative interstitial pneumonia. *Am J Surg Pathol* 2000; 24: 19-33.
- 6) Nagai S, Kitaichi M, Itoh H, et al. Idiopathic nonspecific interstitial pneumonia/fibrosis: comparison with idiopathic pulmonary fibrosis and BOOP. *Eur Respir J* 1998; 12: 1010-1019.
- 7) 吾妻安良太, 工藤翔二, 菅 守隆. 特発性間質性肺炎の診断基準改訂作業経過報告. 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13年度研究報告書2002; 99-105.
- 8) Kondoh Y, Taniguchi H, Kawabata Y, et al. Acute exacerbation in idiopathic pulmonary fibrosis. Analysis of clinical and pathologic findings in three cases. *Chest* 1993; 103: 1808-1812.
- 9) Akira M, Hamada H, Sakatani M, et al. CT findings during phase of accelerated deterioration in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *AJR Am J Roentgenol* 1997; 168: 79-83.
- 10) American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 646-664.
- 11) Stern JB, Mal H, Groussard O, et al. Prognosis of patients with advanced idiopathic pulmonary fibrosis requiring mechanical ventilation for acute respiratory failure. *Chest* 2001; 120: 213-219.
- 12) Saydain G, Islam A, Afessa B, et al. Outcome of patients with idiopathic pulmonary fibrosis admitted to the intensive care unit. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 166: 839-842.
- 13) Rice AJ, Wells AU, Bouros D, et al. Terminal diffuse alveolar damage in relation to interstitial pneumonias. An autopsy study. *Am J Clin Pathol* 2003; 119: 709-714.
- 14) Ambrosini V, Cancellieri A, Chilosi M, et al. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: report of a series. *Eur Respir J* 2003; 22: 821-826.
- 15) Al-Hameed FM, and Sharma S. Outcome of patients admitted to the intensive care unit for acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis. *Can*

- Respir J 2004 ; 11 : 117-122.
- 16) Collard HR, King TE, Jr., Bartelson BB, et al. Changes in clinical and physiologic variables predict survival in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003 ; 168 : 538-542.
- 17) Hardie WD, Le Cras TD, Jiang K, et al. Conditional expression of transforming growth factor- α in adult mouse lung causes pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004 ; 286 : L741-749.
- 18) Xu YD, Hua J, Mui A, et al. Release of biologically active TGF- β 1 by alveolar epithelial cells results in pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003 ; 285 : L527-539.
- 19) Katzenstein AL, and Myers JL. Idiopathic pulmonary fibrosis: clinical relevance of pathologic classification. *Am J Respir Crit Care Med* 1998 ; 157 : 1301-1315.
- 20) Selman M, King TE, and Pardo A. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. *Ann Intern Med* 2001 ; 134 : 136-151.

肺の線維化におけるメカニカルストレスの関与

阿部 信二 齊藤 好信 根井 貴仁 平松久弥子
臼杵 二郎 吾妻安良太* 工藤 翔二

特発性肺線維症 IPF/UIP の重要な臨床病理学的特徴として加齢肺において肺底部胸膜直下背側から線維化がはじまることが挙げられる。この部位は重力による肺胞の虚脱が生じやすく、線維芽細胞や血管内皮細胞など支持組織による interdependence が作用する部位でもあり、シェアストレスやメカニカルストレスが重要な役割をはたしている。この観点から肺胞上皮細胞、肺線維芽細胞に一方向伸展のメカニカルストレッチを加えて形態学または機能的な検討を行った。伸展された肺胞上皮細胞は紡錘形様に形態変化が認められ、培養上清中の蛋白産生増加を認めた。また伸展された肺胞上皮細胞では TGF- β 1 の遺伝子発現が増強しておりメカニカルな伸展刺激が肺の線維化に重要な役割を果たしているものと考えられた。

Effect of Mechanical Stress on the Pathogenesis of Idiopathic Pulmonary Fibrosis

Shinji Abe, Yoshinobu Saito, Takahito Nei, Kumiko Hiramatsu,
Jiro Usuki, Arata Azuma, and Shoji Kudoh

The 4th Department of Internal Medicine, Nippon Medical School

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is characterized by the peripheral distribution of honeycombing in the elderly lung. Intrapleural pressure becomes less negative toward the bottom of the lung because of gravity and alveolar epithelial cells easily collapse. The interdependence by lung fibroblasts and endothelial cells plays an important role to support the alveolar cells. In this regard, we investigated the effect of mechanical stress on lung structural cells using the uni-cycle stretch machine. Stretched-lung alveolar cells became spindle shape. Proteins produced by stretched-cells were significantly increased in the supernatant of culture media. TGF- β 1 mRNA expressions were also increased in the stretched-cells. Mechanical stress may play an important role in the pathogenesis of lung fibrosis.

はじめに

特発性肺線維症 (IPF/UIP) の臨床病理学的特徴として (1) 肺底部胸膜直下からはじまる線維化, (2) 加齢肺に生じやすい, (3) びまん性肺胞障害 (DAD) を生じやすい, (4) 高率で肺癌を合併する (10-30%), (5) 糖尿病の関与が示唆されている, などが挙げられる。このうち我々は肺の線維化が胸膜直下肺底部からはじまることに着目した。この部位は肺のなかで最も重力の影響を受ける部位であり, 微小の無気肺が生じ, 虚血再灌流 (shear stress) を繰り返す部位でもある。特に肺胞の一群が虚脱すると pleats と呼ばれる肺胞の折り畳み現象が生じ, 周囲肺組織が拡張することによりその肺胞群を拡張させようと大きな力 (メカニカルストレス) が働く¹⁾。周囲肺組織が拡張した場合は虚脱肺部分に非常な大きな拡張力が働く。この周囲から肺単位へ与えられる支持力は相互依存力 (interdependence) とよばれ, 肺胞の安定性を維持するのに重要であると考えられている²⁾。以上のことから肺底部胸膜直下においては肺内の他の部位よりも大きなメカニカルストレスが働いていることになる。また吸気・呼気における肺尖部と肺底部の HRCT (high resolution CT) の CT 値解析³⁾ から「肺の伸び縮み」は肺内において均等ではないことが示唆されている。ヒトは生涯を通して 5 億回以上の呼吸を行っており, IPF が加齢肺に生じやすいことと合わせて考えてみても肺底部胸膜直下に加わるこれらのメカニカルストレスが肺の線維化に何らかの関与をしていると思われる。以上のことから肺細胞に対するメカニカルストレスの影響に関して一方向伸展刺激装置を用い *in vitro* の実験系にて検討を行った。

対象と方法

ヒト肺扁平上皮癌由来細胞株である A549 細胞, マウス肺由来肺線維芽細胞株である MLg2908 細胞, ヒト肺血管内皮細胞 HPAE 26 細胞, C57Bl/6 マウスの肺線維芽細胞を初代培養して主に実験に用いた。また IPF/UIP 患者の外科検体からも肺線維芽細胞を初代

培養を行った。メカニカルストレスとしてストレッチ社の細胞伸展装置 (ST-140 システム) を用い, シリコンチャンバー上で培養した各細胞に一軸方向の伸展刺激を加えた。伸展条件として 20% の伸展率で 20 回/分で刺激した。まず伸展による形態変化を倒立顕微鏡で観察した。培養上清中の蛋白について BCA アッセイを用いて測定し, 細胞増殖を cell counting kit を用いて検討した。また伸展細胞から RNA を抽出し real-time PCR 法を用いて TGF- β 1 を始めとする mediator 発現の検討を行った。

結 果

(1) 細胞伸展が細胞形態に与える影響 (図 1)

各細胞に伸展率 20%, 20 回/分で刺激を加えたところ, A549 細胞並びに HPAE26 細胞においては伸展方向とは垂直方向に細胞の扁平化が認められた。マウス肺線維芽細胞においては伸展方向と同方向に細胞の扁平化を認め, 特にヒト由来の肺線維芽細胞 (初代培養細胞) においてはその傾向が顕著であった。

(2) 培養上清中の蛋白産生への影響 (図 2)

A549 細胞を用いて上記と同様の条件で 3 時間の伸展刺激を加えたところ, 培養上清中の蛋白産生はコントロール群と変化なかったが, 24 時間刺激では有意差は認めなかったものの伸展群において蛋白産生が増加する傾向が認められた。

(3) 細胞増殖への影響 (図 3)

A549 細胞を用い, 同様の条件で 3, 6, 24 時間伸展刺激の検討ではいずれの伸展時間においてもコントロール群と比較して有意な細胞増加を認めた。これは肺線維芽細胞においても同様の傾向を認めていることから, 伸展刺激によって細胞増殖が促進されることが示唆された (図 3 は 24 時間伸展刺激の結果を示す)。

(4) 遺伝子発現への検討 (図 4)

A549 細胞を用いて同様の条件で 3, 24 時間伸展刺激を加えた後, それぞれの細胞から RNA を抽出して TGF- β 1 mRNA 発現を real-time PCR (Gene Amp 5700) 法にて検討したところ, 3 時間伸展刺激におい

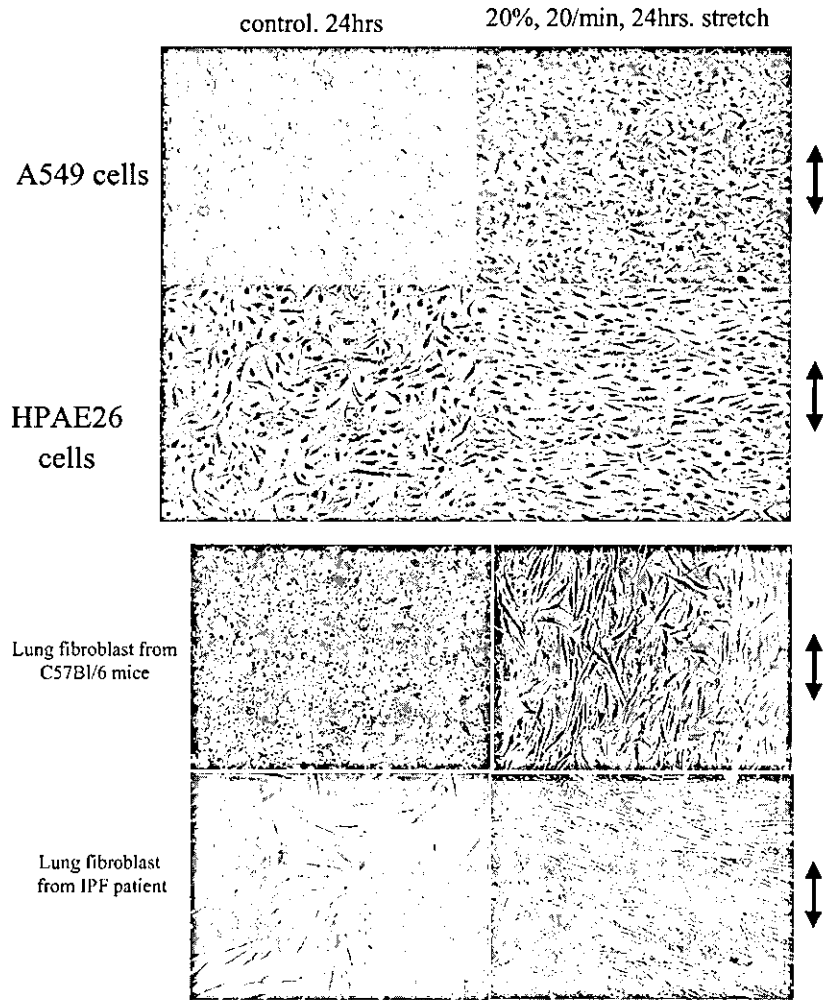


図1 一方向伸展刺激による肺細胞への形態学的影響

伸展率 20%, 20 回/分で 24 時間の伸展刺激を加えたところ, A549 (ヒト肺胞上皮) 細胞並びに HPAE26 (ヒト肺血管内皮) 細胞においては伸展方向とは垂直方向に細胞の扁平化が認められた。マウス肺線維芽細胞 (初代培養細胞) においては伸展方向と同方向に細胞の扁平化を認め、特にヒト由来の肺線維芽細胞 (初代培養細胞) においてはその傾向が顕著であった。

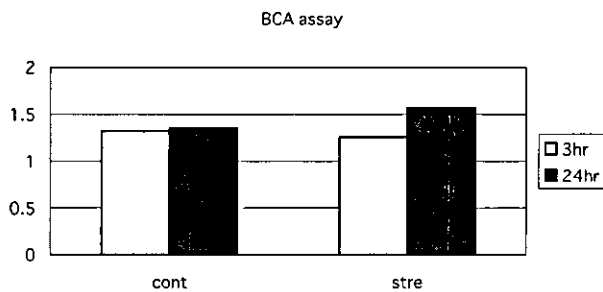


図2 一方向伸展刺激による肺細胞の蛋白産生に及ぼす影響

A549 細胞を用いて伸展率 20%, 20 回/分の条件で 3 時間の伸展刺激を加えたところ, 培養上清中の蛋白産生はコントロール群と変化なかったが, 24 時間の伸展刺激では有意差は認めなかったものの伸展群において蛋白産生が増加する傾向が認められた。

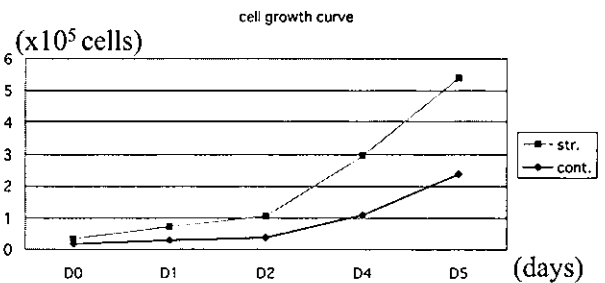


図3 一方向伸展刺激が肺細胞の増殖に及ぼす影響

A549 細胞を用いて伸展率 20%, 20 回/分の条件で 24 時間伸展刺激を加えた細胞はコントロール群と比較して有意な細胞増加を認めた。

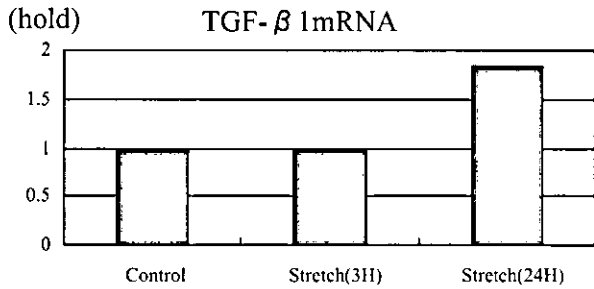


図4 一方向伸展刺激が肺細胞の遺伝子発現に及ぼす影響
A549細胞を用いて伸展率20%、20回/分の条件で3、24時間伸展刺激を加えた後、それぞれの細胞からRNAを抽出してTGF-β1mRNA発現をreal-time PCR (Gene Amp 5700)法にて検討したところ、3時間伸展刺激においてはTGF-β1mRNA発現に有意な変化を認めなかったものの、24時間刺激においてはTGF-β1mRNAの有意な発現増加を認めた。

ではTGF-β1mRNA発現に有意な変化を認めなかったものの、24時間刺激においてはTGF-β1mRNAの有意な発現増加を認めた。

考 察

IPF/UIPの病態に関しては何らかの繰り返される刺激によって肺胞上皮細胞の障害が持続し、その修復過程において線維化が進行するという概念が受け入れられている⁴⁾。一方、最近では肺線維化における線維芽細胞が肺外由来、特に骨髓前駆細胞や末梢血由来の可能性が示唆されて^{5,6)}おり未だ不明な点が多い。IPF患者の発症前の画像所見を検討すると、すでに肺底部胸膜直下に網状陰影やすりガラス陰影を認められることが多く、無症状の段階で肺の線維化が始まっているものと思われる。今回、我々はこの線維化がスタートする肺底部胸膜直下という部位に着目し、この部位に特有のメカニカルストレスが肺の構成細胞に及ぼす影響を検討した。実際には3次元的な様々なストレスが加わっていると考えられるが、今回は単純な一方向伸展刺激の実験系で行った。肺胞上皮細胞が伸展方向と垂直の向きに紡錘形様に形態変化することを認めた。腎臓の線維化においてはEpithelial mesenchymal transition (EMT)⁷⁾が報告されており、肺の線維化における検討も必要と思われる。現在、伸展させた肺胞上皮細胞を用いてE-cadherin、 α -smooth muscle actinの発現の検討を行っている。

TGF-β1ならびにそのレセプターは肺を構成する全ての細胞、炎症細胞に発現することは知られており、IPF/UIPにおいては特にfibrotic fociや線維化病

変部位に高頻度に発現し、肺の線維化や修復過程において最も中心的な働きをしている因子である⁸⁾。またIPF/UIP肺においては肺胞上皮細胞で発現していることが知られており⁹⁾、今回、伸展刺激によってTGF-β1mRNA発現が有意に増加を認めたことから慢性的な伸展刺激が線維化において何らかの働きをしているものと推測される。伸展率や伸展時間など条件の違いによるTGF-β1の発現ならびに蛋白産生について現在、検討を行っている。

実際の生体の肺においては様々な細胞が相互に作用することで障害、炎症、修復、線維化、再生などを担っており、個々の細胞を一方向のみの伸展刺激での検討では不十分である。今後、マウス肺全体に伸展刺激を加えて細胞の形態変化、遺伝子発現など検討を行っていく予定である。

参考文献

- 1) Gil H, Bachofen H, Gehr P, and Weibel ER. Alveolar volume-surface area relation in air- and saline-filled lungs fixed by vascular perfusion. *J App Physiol* 47: 990-1001, 1979.
- 2) Mead J, Takishima T, and Leith D. Stress distribution in lungs: a model of pulmonary elasticity. *J App Physiol* 28: 596-608, 1970.
- 3) Stern EJ, and Webb WR. Dynamic imaging of lung morphology with ultrafast high-resolution computed tomography. *Thorac Imag* 8: 273-282, 1993.
- 4) Gross TJ, and Hunninghake GW. Idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 345: 517-525, 2001.
- 5) Hashimoto N, Jin H, Liu T, Chensue SW, and Phan SH. Bone-marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis 113: 243-252, 2004.
- 6) Abe S, Boyer C, Liu X, Wen FQ, Kobayashi T, Fang Q, Wang X, Hashimoto M, Sharp JG, and Rennard SI. Cells derived from the circulation contribute to the repair of lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 170: 1158-1163, 2004.
- 7) Kalluri R, and Neilson EG. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 112: 1776-1784, 2003.

8) Broekelmann TJ, Limper AH, Colby TV, and McDonald JA. Transforming growth factor beta 1 is present at the sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 88 : 6642-6646, 1991.

9) Khalil N, O'Connor RN, Unruh HW, Warren PW, Flanders KC, Kemp A, Berezney OH, and Greeberg AH. Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 5 : 155-162, 1991.

肺線維症における Epithelial mesenchymal transition (EMT)

山田 瑞穂¹ 吉見 通洋¹ 浜田 直樹¹ 前山 隆茂¹
福元重太郎¹ 石津 美輪¹ 日浅 謙一² 江頭 健輔²
桑野 和善¹ 中西 洋一^{1*}

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) は、臓器の線維化において重要な役割を果たしていることがわかってきた。今回我々は、IPF およびマウスプレオマイシン肺臓炎モデルにおいて、その関与を検討した。E-cadherin と α -smooth muscle actin 両方の発現が、EMT を意味すると考え、IPF で蛍光免疫2重染色を行った。IPF においては、特に fibroblastic foci に接する上皮で両方が陽性の細胞を認めた。同様に、マウスプレオマイシン肺臓炎モデルにおいては、bronchiolar-alveolar junction で両方が陽性の細胞を認めた。両陽性の細胞はプレオマイシン投与7日後に多く認められ、14日後には自然に減少する。本モデルにおいて、可溶性 TGF- β receptor II の遺伝子導入により、EMT、線維化、アポトーシスが抑制された。

EMT は肺の線維化に重要な役割を担っており、IPF の治療戦略を考える上でも重要であると思われた。

Involvement of epithelial-mesenchymal transition in pulmonary fibrosis

Mizuho Yamada¹, Kazuyoshi Kuwano¹, Michihiro Yoshimi¹, Takashige Maeyama¹,
Naoki Hamada¹, Kensuke Egashira², Kenichi Hiasa², Kentaro Watanabe³,
and Yoichi Nakanishi¹

¹Research Institute for Diseases of the Chest

²Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

³Fourth Department of Internal Medicine, Fukuoka University, Fukuoka, Japan

Epithelial-mesenchymal transition has been proved to be an important process in organ fibrogenesis. Therefore, we tried to verify the involvement of this process in the development of pulmonary fibrosis in human diseases and an animal model. Since the co-expressions of E-cadherin and α -smooth muscle actin are thought to be a marker of epithelial-mesenchymal transition, we performed fluorescent dual immunohistochemistry to assess the co-expressions of these proteins in lung tissues from idiopathic pulmonary fibrosis. Double positive cells were remarkably prevalent in cells overlaying fibroblastic foci compared with other lung fields in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. In bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice, double positive cells were prevalent in bronchiolo-alveolar junction. The number of double positive cells in bronchiolo-alveolar junction was maximal at 7 days, and subsequently decreased at 14 days after bleomycin instillation. There were no double positive cells in normal lung parenchyma. In vivo gene transfer of soluble TGF- β receptor II significantly attenuated epithelial-mesenchymal transition, fibrosis, and apoptosis in this model. We conclude that epithelial-mesenchymal transition may be involved in the progression of pulmonary fibrosis and may be a promising strategy against idiopathic pulmonary fibrosis.

はじめに

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) とは上皮細胞が線維芽細胞など間葉系の細胞に変化する現象である。EMT は発生、臓器傷害後の再構築、がん転移などの場合に重要な役割を果たしている。EMT をおこした上皮細胞は、細胞間結合や極性などの上皮細胞の性質を消失し、遊走能などの間葉系細胞の性質を持つようになる¹⁾。腎間質線維化においても、EMT の重要性が報告されている²⁻⁵⁾。腎間質線維化において、線維芽細胞の 36% が EMT により上皮から発生しているという報告がある²⁾。また、筋線維芽細胞は肺線維化におけるコラーゲンの沈着に寄与しているが、TGF- β は *in vitro* で肺胞上皮細胞に、筋線維芽細胞への EMT を誘導するという報告がある⁶⁾。今回、*in vivo* で TGF- β と EMT の検討と、IPF における EMT の検討を行った。

対象と方法

C57BL6 マウスの大腿筋に soluble TGF- β receptor II (sTGF- β RII) 発現プラスミドベクターを筋肉注射後 *in vivo* electroporation で遺伝子導入し、血中濃度を測定した。遺伝子導入 3 日後から 10 日後にかけて sTGF- β RII の血中濃度が上昇していると思われ、これを基に実験計画を立てた。

1 群目はマウスにプレオマイシン 1.5 U/kg を気管内投与し、プレオマイシン投与 3 日前に sTGF- β RII を遺伝子導入し、プレオマイシン投与 7 日後のプレオマイシン肺臓炎の抑制効果を組織学的に評価した。プレオマイシン投与日から 7 日後にかけて、sTGF- β RII の血中濃度の上昇があると思われた。また、免疫 2 重染色により EMT を評価した。上皮のマーカーである E-cadherin を赤で、筋線維芽細胞のマーカーである α -smooth muscle actin を緑で染色した。EMT が認められる細胞は両方のマーカーが染まり、黄色に見えた。2 群目も同様にプレオマイシン投与 4 日後に sTGF- β RII を投与し、14 日後に評価した。プレオマイシン投与 7 日後から 14 日後にかけて sTGF- β RII

の血中濃度上昇があると思われた。

IPF においても、同様の方法で EMT を検討した。

結 果

プレオマイシン投与 3 日前に sTGF- β RII を投与した群では、病理組織所見上、プレオマイシン投与 7 日後の肺臓炎が、コントロール群に比べ有意に抑制されていた。プレオマイシン投与 4 日後に sTGF- β RII を投与した群でも、病理組織所見上、プレオマイシン投与 14 日後の線維化が、コントロール群に比べ有意に抑制されていた。同様にプレオマイシン投与 7 日後の TUNEL 陽性細胞が、コントロール群に比べて有意に減少していた。プレオマイシン投与 14 日後の TUNEL 陽性細胞も、コントロール群に比べて有意に減少していた。また、全体を見たところ、主に bronchiolar-alveolar junction 近傍の末梢の細気管支で EMT を認めた (Fig 1)。プレオマイシン投与 3 日前に sTGF- β RII を投与した群では、プレオマイシン投与 7 日後の EMT の黄色い細胞が、コントロール群に比べて有意に減少していた。プレオマイシン投与 14 日後では、EMT の黄色い細胞が、プレオマイシン投与 7 日後に比べて有意に減少していた (Table 1)。

IPF の線維化巣で、再生 2 型肺胞上皮に EMT を認めた (Fig 1)。定量化すると、fibroblastic foci に接する上皮で、fibroblastic foci 以外の線維化巣に比べて有意に EMT の黄色い細胞を認めた (Table 2)。

考 察

今回、我々はマウスプレオマイシン肺臓炎モデルにおける TGF- β と EMT の関与を明らかにした。プレオマイシン投与 3 日前および 4 日後に sTGF- β RII 遺伝子を導入した群において、7 日後および 14 日後にそれぞれ、病理組織学的傷害の程度・アポトーシスが抑制された。また、プレオマイシン投与 7 日後に EMT は増加するが、14 日後には自然消退し、プレオマイシン投与 3 日前に sTGF- β RII 遺伝子を導入した群において、7 日後に EMT が抑制された。これらの結果は、プレオマイシン投与 14 日後には肺組織内の TGF- β 量が減少する⁷⁾ ことに関与していると思われる。Mitchell らは、 α -smooth muscle actin を発現している細胞の肥大や過形成が、マウスプレオマイシン肺

¹ 九州大学大学院附属胸部疾患研究施設

² 同循環器内科

* びまん性肺疾患調査研究班 研究協力者

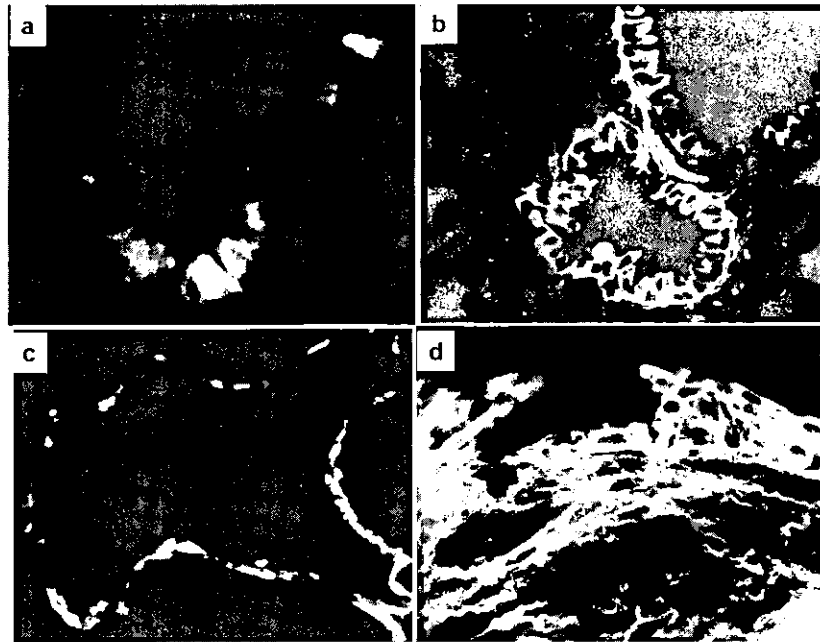


Fig 1. Representative results of dual immunohistochemistry for E-cadherin (red) and α -smooth muscle actin (green). (a) Bronchiolar alveolar junction of untreated mouse, (b) bronchiolar-alveolar junction at 7 days after bleomycin instillation, (c) human normal parenchyma, (d) cells overlying fibroblastic foci. Original magnification, $\times 400$.

Table 1. The effect of sTGF- β RII gene transfer on the number of EMT in bronchiolar-alveolar junction in bleomycin-induced pneumopathy in mice.

fibrotic grade	double positive cells (%) *
control	0 \pm 0
day 7 bleo	36.0 \pm 6.4
day 7 Bleo + sTGF-bRII	9.6 \pm 2.5 **
day 14 Bleo	4.7 \pm 1.3 ***
day 14 Bleo + sTGF-bRII	7.5 \pm 1.7

* number of double positive cells / total epithelial cells counted

** P<0.01 compared with day7 Bleo

*** P<0.001 compared with day7 Bleo

Table2. The number or EMT in fibroblastic foci vs. non-fibroblastic foci.

fibrotic grade	% of double positive cells / field
0	0 \pm 0
1	0 \pm 0
2	0.56 \pm 0.56
3	1.9 \pm 1.3
4	2.9 \pm 2.9
5	1.6 \pm 1.1
fibroblastic foci	67 \pm 9.9*

* P<0.05 compared with fibrotic grade 0-5

臓炎モデルにおける肺線維化の主要因であることを報告している⁹⁾。Zhangらは、本モデルにおいて筋線維芽細胞はプレオマイシン投与7日後から14日後にかけて増加し、それは気管支周囲、血管周囲の炎症、線維化病変部およびfibroblastic fociで起きていると報告している⁹⁾。TGF- β は本モデルにおいて、以前からよく知られている上皮のアポトーシスを誘導する作用、線維芽細胞を増殖する作用、コラーゲンの産生を誘導する作用に加えて、EMTの誘導において重要な役割を担っていると思われた。

本モデルにおける筋線維芽細胞の由来については議論のあるところであるが、気管支周囲や血管周囲にある線維芽細胞が由来であると考えられてきた¹⁰⁾。今回、主に bronchiolar-alveolar junction 近傍の末梢の細気管支で EMT を認めたことより、この場所が、本モデルにおいて少なくとも7日後までの筋線維芽細胞の増殖に重要な役割を果たしていると思われた。

今回我々は、IPFの線維化巣の bronchiolar-alveolar junction 近傍で再生2型肺胞上皮に EMT を認め、それが特に fibroblastic foci に接する場所で顕著だったことも明らかにした。fibroblastic foci は筋線維芽細胞などの線維芽細胞で構成されている。筋線維芽細胞は、増殖やコラーゲン産生により線維化を促進するだけでなく、angiotensin II を産生して、上皮細胞のアポ

トーシスを誘導する¹¹⁾。Fibroblastic foci に接する上皮細胞には、増殖するものと死ぬものが含まれている¹²⁾。そういった上皮の内 EMT を起こしたものは、アポトーシスに抵抗性があると思われる。そして、そのような細胞が、fibroblastic foci 内の筋線維芽細胞となる可能性がある。IPF において、bronchiolar-alveolar junction における上皮傷害が、異常な組織再生につながっているという報告がある¹³⁻¹⁶⁾。また、再生 2 型肺胞上皮で、TGF- β と TNF- α の強い発現が認められている¹⁷⁾。TGF- β の発現は fibroblastic foci でも認められており、特にそれに接する上皮に強い¹⁸⁾。IPF においても EMT が線維化、特に fibroblastic foci の形成に重要な働きをしていると思われた。

参考文献

- 1) Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol.* 2003 Dec; 15(6): 740-6.
- 2) Iwano M, Plieth D, Danoff TM, Xue C, Okada H, Neilson EG. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest.* 2002 Aug; 110(3): 341-50.
- 3) Yang J, Liu Y. Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. *Am J Pathol.* 2001 Oct; 159(4): 1465-75.
- 4) Li Y, Yang J, Dai C, Wu C, Liu Y. Role for integrin-linked kinase in mediating tubular epithelial to mesenchymal transition and renal interstitial fibrogenesis. *J Clin Invest.* 2003 Aug; 112(4): 503-16.
- 5) Sato M, Muragaki Y, Saika S, Roberts AB, Ooshima A. Targeted disruption of TGF-beta1/Smad3 signaling protects against renal tubulointerstitial fibrosis induced by unilateral ureteral obstruction. *J Clin Invest.* 2003 Nov; 112(10): 1486-94.
- 6) Yao HW, Xie QM, Chen JQ, Deng YM, Tang HF. TGF-beta1 induces alveolar epithelial to mesenchymal transition in vitro. *Life Sci.* 2004 Nov 19; 76(1): 29-37.
- 7) Zhang K, Flanders KC, Phan SH. Cellular localization of transforming growth factor-beta expression in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* 1995; 147: 352-61.
- 8) Mitchell J, Woodcock-Mitchell J, Reynolds S, Low R, Leslie K, Adler K, Gabbiani G, Skalli O. Alpha-smooth muscle actin in parenchymal cells of bleomycin-injured rat lung. *Lab Invest.* 1989; 60: 643-50.
- 9) Zhang K, Rekhter MD, Gordon D, Phan SH. Myofibroblasts and their role in lung collagen gene expression during pulmonary fibrosis. A combined immunohistochemical and in situ hybridization study. *Am J Pathol.* 1994; 145: 114-25.
- 10) Phan SH. The myofibroblast in pulmonary fibrosis. *Chest.* 2002; 122: 286S-9S.
- 11) Uhal BD, Joshi I, Hughes WF, Ramos C, Pardo A, Selman M. Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung. *Am J Physiol.* 1998; 275: L1192-9.
- 12) Wang R, Ramos C, Joshi I, Zagariya A, Pardo A, Selman M, Uhal BD. Human lung myofibroblast-derived inducers of alveolar epithelial apoptosis identified as angiotensin peptides. *Am J Physiol.* 1999; 277: L1158-64.
- 13) Kuwano K, Kunitake R, Kawasaki M, Nomoto Y, Hagimoto N, Nakanishi Y, Hara N. P21Waf1/Cip1/Sd1 and p53 expression in association with DNA strand breaks in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154: 477-83.
- 14) Uhal BD, Joshi I, Hughes WF, Ramos C, Pardo A, Selman M. Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung. *Am J Physiol.* 1998; 275: L1192-99.
- 15) Barbas-Filho JV, Ferreira MA, Sesso A, Kairalla RA, Carvalho CR, Capelozzi VL. Evidence of type II pneumocyte apoptosis in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)/usual interstitial pneumonia (UIP). *J Clin Pathol.* 2001; 54: 132-8.
- 16) Chilosi M, Poletti V, Murer B, Lestani M, Cancellieri A, Montagna L, Piccoli P, Cangi G, Semenzato G, Doglioni C. Abnormal re-epithelialization and lung remodeling in idiopathic pulmonary fibrosis: the role of deltaN-p63. *Lab Invest.* 2002; 82: 1335-45.

- 17) Kapanci Y, Desmouliere A, Pache JC, Redard M, Gabbiani G. Cytoskeletal protein modulation in pulmonary alveolar myofibroblasts during idiopathic pulmonary fibrosis. Possible role of transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha. *Am J Respir Crit Care Med.* 1995 ; 152 : 2163-69.
- 18) Cosgrove GP, Brown KK, Schiemann WP, Serls AE, Parr JE, Geraci MW, Schwarz MI, Cool CD, Worthen GS. Pigment epithelium-derived factor in idiopathic pulmonary fibrosis: a role in aberrant angiogenesis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004 ; 170 : 242-51.

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, anti-fibrotic 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 vitro*. The addition of erythromycin (EM) reversed the effects of AGP to restore the anti-proliferative effects 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) の肺線維化抑制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 と結合しその効果を抑制する⁴⁾ことが報告されている $\alpha 1$ -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) 125 mg/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。

結 果

BLM 投与後、マウス血清 AGP 濃度は 7 日目から上昇し、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。800 μ g/ml の AGP の添加

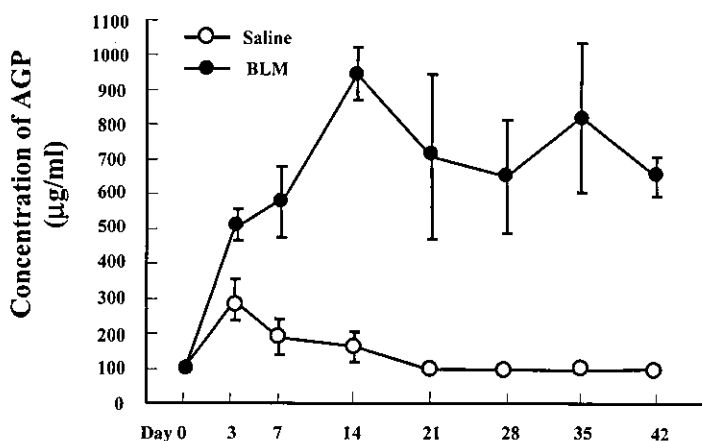


図 1 BLM 投与マウス血清中の AGP の推移

BLM 125 mg/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、生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。

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

* びまん性肺疾患調査研究班 分担研究者

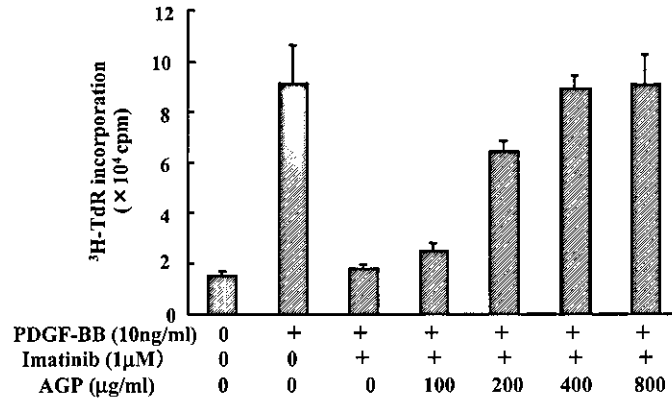


図2 Imatinib によるマウス肺線維芽細胞の増殖抑制効果に及ぼす AGP の影響
 C57BL/6 マウスより作成した肺線維芽細胞を用いて、PDGF-BB (10 ng/ml) で 72 時間刺激後 ³H-TdR (1 μCi/well) を 18 時間パルスし、増殖能を測定した。1 μM の imatinib に対し AGP を 100~800 μg/ml の濃度で添加しその効果を検討した。その結果、800 μg/ml の AGP 添加により 1 μM の imatinib の線維芽細胞増殖抑制効果は完全に消失した。

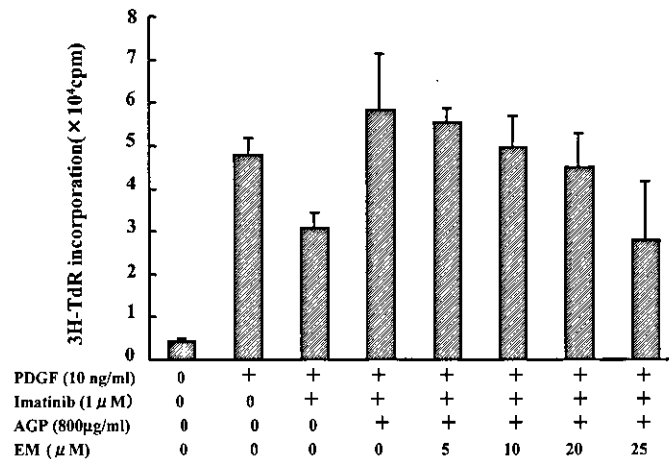


図3 Erythromycin による AGP の作用抑制
 C57BL/6 マウスより作成した肺線維芽細胞を用いて、PDGF-BB (10 μg/ml) で 72 時間刺激後 ³H-TdR (1 μCi/well) を 18 時間パルスし、増殖能を測定した。1 μM の imatinib と 800 μg/ml の AGP に対し、EM を 5~25 μM の濃度で添加しその効果について検討した。その結果、800 μg/ml の AGP の効果は 25 μM の EM の添加で完全に解除された。

は 1 μM 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)。

IPF/UIP 患者血清中の AGP は、健康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)。

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た。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

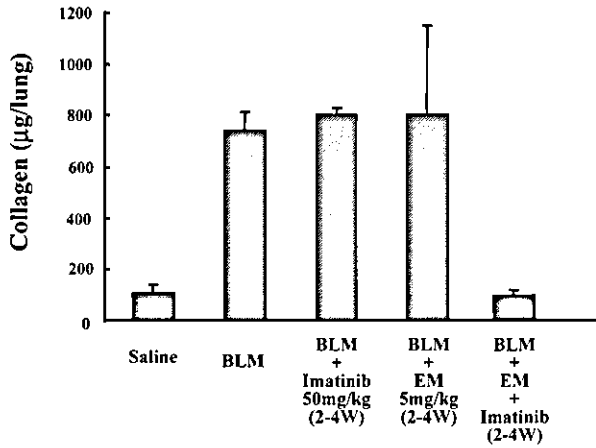


図4 BLM誘発肺線維症モデルにおける imatinib と EM の併用効果 C57BL/6 マウスに osmotic mini-pump を用いて 125 mg/kg の BLM を持続皮下投与した。BLM 投与開始 14 日目から, imatinib (50 mg/kg) 単独投与, EM (5 mg/kg) 単独投与, imatinib と EM の併用投与を行った。28 日後の右肺を用いてコラーゲン量を Sircol assay kit により定量化した。14 日目からの後期の投与では, imatinib あるいは EM 単独投与では, コラーゲン産生を抑制しなかったが, 併用投与に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

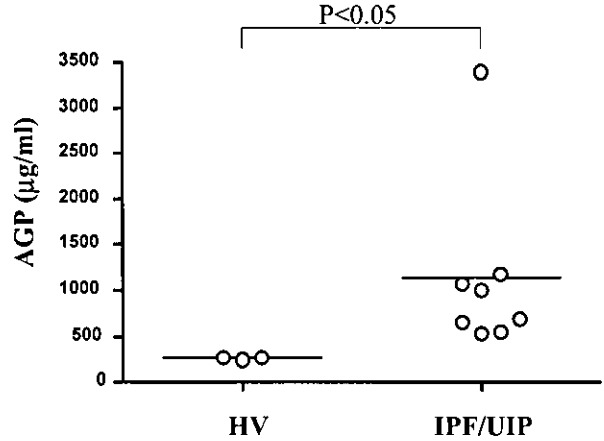


図5 IPF/UIP 患者血清中の AGP 濃度 IPF/UIP 患者 (8 人) と健常人 (3 人) の血清中 AGP 濃度を測定した。IPF/UIP では有意に AGP 濃度が高値であった。

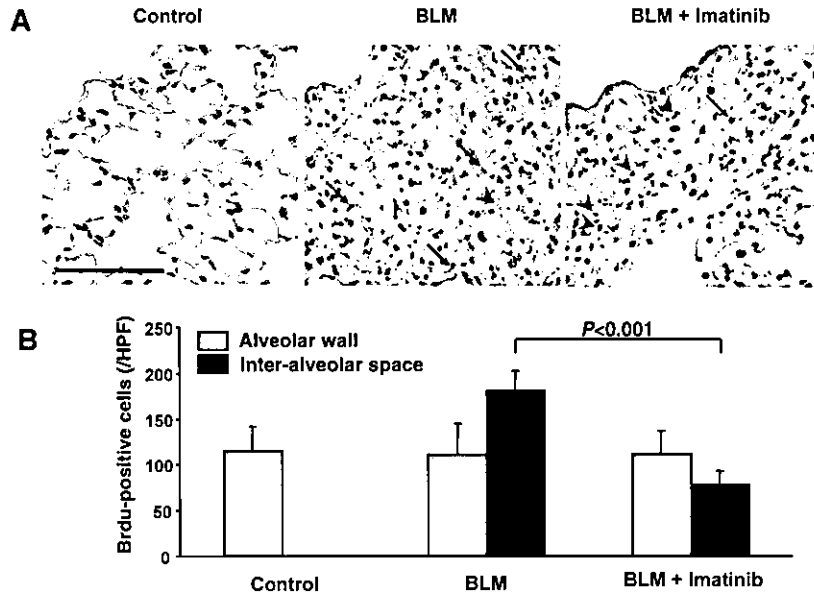


図6 BLM誘発肺線維症における imatinib の *in vivo* 細胞増殖抑制効果 C57BL/6 マウスに osmotic mini-pump を用いて 125 mg/kg の BLM を持続皮下投与し, 14 日目に bromodeoxyuridine (BrdU) の免疫染色により *in vivo* の増殖細胞数を検討した。その結果, imatinib は, 上皮細胞の増殖抑制効果は示さず間質細胞の増殖を有意に抑制した (文献 3 より引用)

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。

参考文献

1) Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, Ohno S, Segal GM, Fanning S, Zimmermann J, 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., 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. Imatinib is a novel anti-fibrotic agent in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Crit Care Med* (in press).
- 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 alpha1 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.

分子標的治療薬による肺線維症治療の可能性 ——ブレオマイシン肺線維症モデルにおける EGF および PDGF 受容体チロシンキナーゼ阻害薬の効果——

石井 芳樹* 藤本 栄 福田 健

EGF 受容体チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) である gefitinib, AG1478 および PDGFR-TKI である AG1296 のブレオマイシン誘発肺線維化に対する抑制効果を検討した。これらの薬剤は、いずれもブレオマイシンによる肺線維化を抑制した。免疫組織染色による検討で、肺組織の上皮細胞や間質細胞におけるブレオマイシンによる PDGFR および EGFR のリン酸化がこれらの薬剤によって抑制されることが確認された。以上より基本的に、PDGFR や EGFR のシグナル抑制は、線維芽細胞増殖抑制によって肺線維化抑制に働くことが明らかになった。また、臨床例で認められる gefitinib や PDGFR-TKI による間質性肺炎がレセプターシグナルの抑制により普遍的に発症するものではなく、おそらく種の違いや固体の感受性などの他の要因が関与して発症するものと考えられた。

Treatment of Pulmonary Fibrosis by EGFR tyrosine kinase inhibitors and PDGFR tyrosine kinase inhibitor

Yoshiki Ishii, Sakae Fujimoto, and 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 inhibitors (RTKI), gefitinib and AG1478, and PDGF-RTKI AG1296 attenuated pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice. Immunohistochemistry revealed that gefitinib inhibited phosphorylation of EGFR in the lungs. AG1296 inhibited both PDGFR expression and phosphorylation of the receptor induced by bleomycin. 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 gefitinib and imatinib 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 (EGFR) 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化モデルにおいてTGF- α とEGFRのmRNA発現が亢進している²⁾。TGF α のトランスジェニックマウスでは、肺線維化が認められる³⁾一方でノックアウトマウスでは、線維化が抑制される⁴⁾。同様にPDGFも肺線維化の病態に重要な役割を演じている⁵⁻⁷⁾。Ratのvanadium pentoxideを用いた肺線維化モデルにおいて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⁸⁾。EGFR-TKIとしてgefitinibがすでに肺癌の治療薬として臨床使用されているが、その副作用として急性肺傷害の発症が報告されている⁹⁾。また、マウスプレオマイシン肺臓炎モデルにおいて高用量のgefitinibが線維化を悪化させたという報告もなされている¹⁰⁾。本研究では、EGFRおよびPDGFR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プレオマイシン肺線維化モデルを用いてPDGFR-TKI、及びEGFR-TKIの効果を検討した。さらに、肺組織における各レセプターのリン酸化が薬剤によって抑制されているか否かを検討した。

方 法

プレオマイシンによる肺線維化モデルの作成と線維化の評価

C57BL/6マウスの気管内にプレオマイシン (3 mg/kg) を生理食塩水 60 μ l に溶解して投与し肺線維化モデルを作成した。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 (Ascroft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。Gefitinib群は、生理食塩水を気管内注入し vehicle の1% Tween 80溶液を連日経口投与したコントロール群、生理食塩水を気管内注入し gefitinib 200 mg/kg を連日経口投与した gefitinib alone 群のほかプレオマイシンを気管内注入し vehicle 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 gefitinib 20, 90, 200 mg/kg を連日経口投与した群、別のEGFR-TKIであるAG1478 12 mg/kg を連日腹腔内投与した群に分けて解析した。別の実験ではプレオマイシンを気管内注入しPDGFR TKI (AG1296) を連日腹腔内投与し比較検討した。

免疫組織染色による受容体発現とリン酸化の解析

肺組織を-20°Cでアセトン固定したのちAmex法でパラフィン包埋した。連続切片を用いてEGFR、p-EGFRおよびPDGFR、p-PDGFRをLSAB法にて染色した。一次抗体はpolyclonal anti-EGFR antibody 1005 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) と goat affinity purified polyclonal anti-p-EGFR antibody Tyr 1092m (Santa Cruz Biotechnology) および polyclonal anti-PDGFR β (958, Santa Cruz Biotechnology) 及び goat affinity purified polyclonal anti-p-PDGFR β (Tyr 1009, Santa Cruz Biotechnology) を100倍希釈で用いた。二次抗体であるbiotinylated anti-rabbit, anti-mouse and anti-goat immunoglobulins (Dako) で処理したのちstreptavidin-horseradish peroxidase conjugate (Dako) と反応させ3,3'-diaminobenzidineをクロモゲンとして発色させた。陰性コントロールとしてrabbit nonspecific immunoglobulinを使用した。受容体発現の半定量的評価として抗体を用いた免疫組織化学染色標本について、500個以上の細胞をカウントし、下式によりlabeling index (%) を算定した。