

図6 呼吸器病変の無い患者における *MUC5AC* の局在 (A), *MUC5AC* の染色は気管支上皮の goblet cell に限局していた。DPB 患者における *MUC5AC* の局在 (B), DPB 患者では goblet cell の数は増加しており、これらに *MUC5AC* の染色が認められた。(=; 上皮, gl; 粘膜下腺, lu; 気管支腔, go; goblet cell; goblet cell の代表的なものを矢印で示してある。Original magnifications are  $\times 200$  for A and B.)

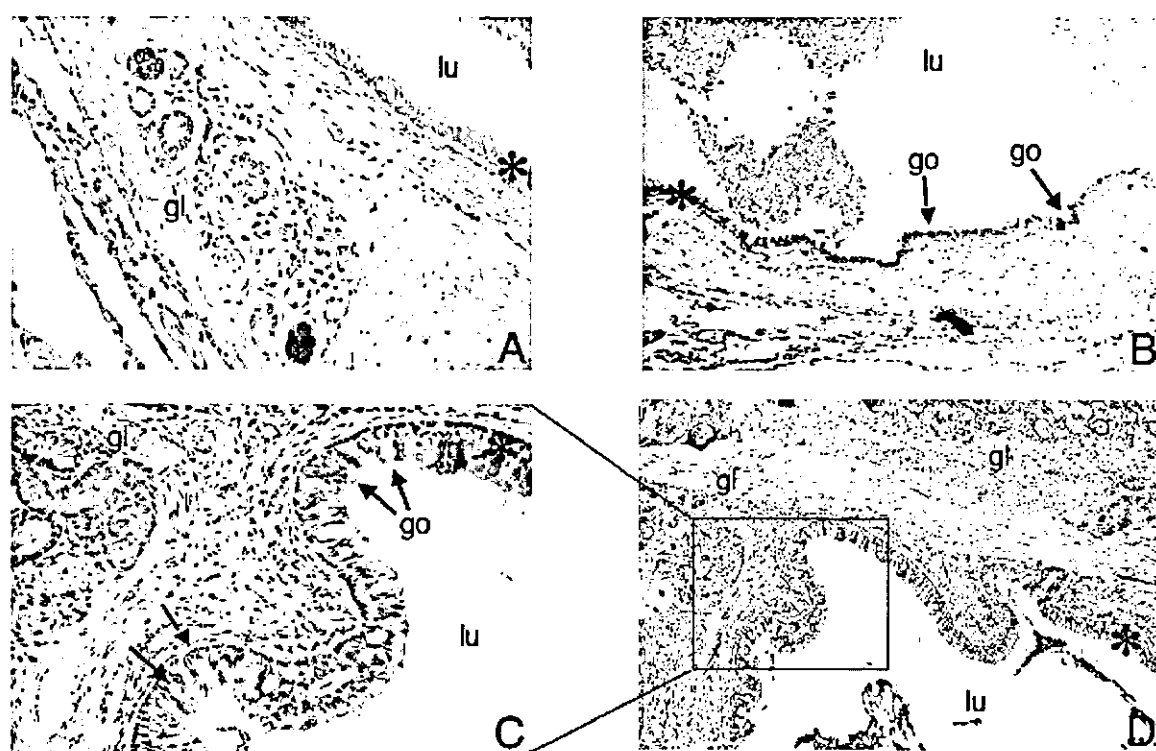


図7 肺病変の無い患者における *MUC5B* の局在と (A, B), DPB 患者における局在 (C, D), 肺病変の無い検体では *MUC5B* の染色は粘膜下腺に限局し、上皮の goblet cell には見られなかった (A), 同じ患者の他の部分には、少数の goblet cell が陽性に染色される箇所も認められた (B), DPB 患者では *MUC5B* の染色は粘膜下腺と上皮の goblet cell に強く認められた (C, D), 図 C は図 D の一部を拡大したものである。(=; 上皮, gl; 粘膜下腺, lu; 気管支腔, go; goblet cell; goblet cell の代表的なものを矢印で示してある。Original magnifications are  $\times 200$  for A and C,  $\times 50$  for B and D.)

cell は染色されなかった (図 7A), 同じ患者で、例外的にまばらに *MUC5B* 陽性の goblet cell が認められる部分もあった (図 7B), Lu-2 でも同様の結果であった。一方 DPB 患者では (DPB1-2), 粘膜下腺は肥大しており *MUC5B* によって強く染色され、上皮の goblet cell も強く陽性の所見が得られた (図 7C, D), 他の 3

例でも同じ所見が得られた (DPB2-1, DPB3-2, DPB4-1, DPB4-2)。

DPB 患者の呼吸細気管支で *MUC5AC* と *MUC5B* の免疫染色を行った。両者とも呼吸細気管支の上皮では陰性であった (図 8A, B), 間質には foamy macrophage とリンパ球の集積が認められ、内腔には

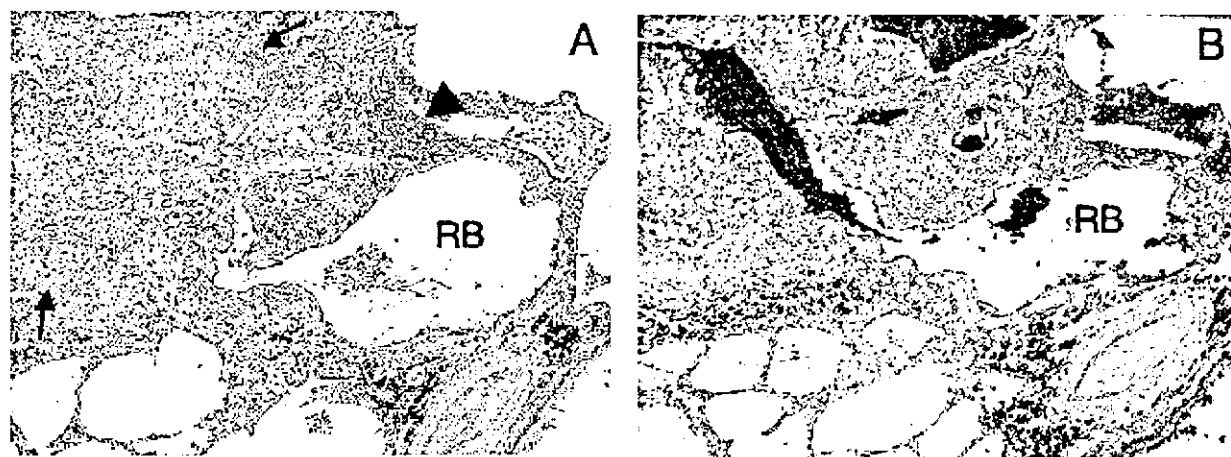


図8 DPB患者の呼吸細気管支における、*MUC5AC* (A) と *MUC5B* (B) の局在。呼吸細気管支の上皮では両者とも陰性であった。Foamy macrophage (矢印) とリンパ球 (矢頭) の集積が呼吸細気管支の間質に認められる。図7Bでは細気管支の内腔に *MUC5B* が分泌されている所見が得られた。(RB; 呼吸細気管支, Original magnifications are  $\times 100$  for A and B.)

*MUC5B* の分泌が観察された。

#### 考案・結論

今回のムチン遺伝子群の解析では、*MUC5B* の転写調節領域の複数の変異で疾患との関連が認められた。このうち最も強い関連を示した変異は2塩基CAのI/D多型であり、CAの欠失が  $p=0.0001$  でDPB群で有意に低下しており、疾患抵抗性に関与していることが考えられた。

ムチン遺伝子はコード領域のVNTR (variable numbers of tandem repeat) 多型を特徴とする<sup>23)</sup>。例えば *MUC1* では20残基のアミノ酸の繰り返しが見られ、これは制限酵素による解析で2.8 kbから8.0 kbの範囲に渡る事が報告されている<sup>24,25)</sup>。ムチンの個体間での大きさの違いは粘液の性状に影響を及ぼす事が考えられ、機能的な相違に関与していることが予想される。しかしながら *MUC5B* ではこのVNTR多型はほとんど見られない事が報告されている<sup>26)</sup>。一方今回の検討で *MUC5B* のプロモーター領域に他のムチンに比べて多数の変異が同定されたが、このことは *MUC5B* 遺伝子が発現レベルで個体間の相違を有している可能性を示唆している。

*MUC5B* プロモーター領域の3つの変異がDPBと関連を示し、またこれらを含む6つの変異は強い連鎖不平衡の状態にあるため、ハプロタイプ解析を行った。CAの欠失を含むハプロタイプH2はDPBと負の関連を示した。我々はCaucasianのサンプルも解析したがこの変異は認められず、さらに主要なハプロタイ

プの頻度も異なっており、DPB患者に多く認められたH1はCaucasianでは10%以下であった。またチンパンジーはヒトとは異なる変異を有しており、系統解析の結果では日本人とCaucasianに存在する主要なハプロタイプはヒトへの進化後に出現した事が考えられ、アジア人に特異的と考えられるH2はさらにその後出現した事が予想される。

ルシフェラーゼアッセイを用いた機能解析の結果では、日本人の主要な3つのハプロタイプ間では転写活性が有意に異なる事が確認され、H2が最も低く、H1が最も高く、H3がその中間を示した。この定常状態での転写活性の相違はそれぞれのハプロタイプの疾患への相関とパラレルな関係にあり、欠失変異は *MUC5B* の転写活性を低下させ、疾患抵抗性に働く可能性が考えられた。

*MUC5AC* の発現制御に関する報告は多く見られるが、*MUC5B* に関してはこれまでの所不明な部分が多い。転写因子の結合配列をコンピューター推定した所、I/D多型はVitamin D receptor/Retinoid X receptor heterodimer site, interferon-stimulated response element and STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6) siteに含まれる可能性が考えられた。Retinoid X receptorに関しては、RARsとRXRsが協調して *MUC2* と *MUC5AC* の発現を誘導するとの報告がある<sup>27)</sup>。またSTAT6についてはIL-4とIL-13のシグナルで *MUC2* の分泌を増加させると報告されている<sup>28)</sup>。

DPBにおける *MUC5B* の役割を更に明らかにするため、我々は免疫染色でその発現の分布を確認する事

を試みた。呼吸器病変の無い肺では MUC5AC は上皮の goblet cell に発現しており、MUC5B の発現は粘膜下腺が主体であり、一部少数の goblet cell にも認められた。これらの所見はこれまで報告されたものと一致していた<sup>29,30)</sup>。DPB では goblet cell の数が増大し、粘膜下腺の肥大が観察された。MUC5AC はこの増大した goblet cell のほとんどに発現していたが、粘膜下腺での発現は見られなかった。一方 MUC5B は粘膜下腺だけではなく上皮の goblet cell にも多く発現が見られ、DPB ではその発現の分布が本来の粘膜下腺だけではなく上皮の goblet cell にもシフトしている事が観察された。炎症性疾患で MUC5B の上皮での発現が増加することはこれまでも報告されているが、そのメカニズムは不明である<sup>29)</sup>。この発現の変化は DPB では比較的中枢の気道に見られたものであり、DPB で特徴的な呼吸細気管支での慢性炎症とどのように関連するものであるのかはこれからの解明を待たなければならない。

これまでの所 DPB と MUC5B の関連は明らかではなかったが、今回の検討で疾患と関連のある変異が同定され、機能解析ならびに免疫染色による発現分布の検討により、MUC5B と DPB との関連が示唆された。HLA class I の領域で新規のムチン遺伝子のクローニングが進行していることから、MUC5B を含めてムチンが DPB の病態形成に及ぼす役割は注目される。

#### 参考文献

- 1) 山中 晃ほか。慢性気管支閉塞性疾患の問題点 — とくにびまん性汎細気管支炎について —。内科 1969; 23: 422.
- 2) Kudoh S, Azuma A, Yamamoto M et al. Improvement of survival in patients with diffuse panbronchiolitis treated with low-dose erythromycin. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 157: 1829-1832.
- 3) Sugiyama Y, Kudoh S, Maeda H, Suzaki H, Takaku F. Analysis of HLA antigens in patients with diffuse panbronchiolitis. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: 1459-1462.
- 4) Keicho N, Tokunaga K, Nakata K, Taguchi Y, Azuma A, Bannai M, Emi M, Ohishi N, Yazaki Y, Kudoh S. Contribution of HLA genes to genetic predisposition in diffuse panbronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 846-850.
- 5) Park MH, Kim YW, Yoon HI, Yoo CG, Han SK, Shim YS, Kim WD. Association of HLA class I antigens with diffuse panbronchiolitis in Korean patients. *Am J Respir Crit Care Med* 1999; 159: 526-529.
- 6) Keicho N, Ohashi J, Tamiya G, Nakata K, Taguchi Y, Azuma A, Ohishi N, Emi M, Park MH, Inoko H, Tokunaga K, Kudoh S. Fine localization of a major disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. *Am J Hum Genet* 2000; 66: 501-507.
- 7) Wang L, Hirayasu K, Ishizawa M, Kobayashi Y. Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 1774-1775.
- 8) Copin MC, Devisme L, Buisine MP, Marquette CH, Wurtz A, Aubert JP, Gosselin B, Porchet N. From normal respiratory mucosa to epidermoid carcinoma: expression of human mucin genes. *Int. J. Cancer* 2000; 86: 162-168.
- 9) Kovarik A, Lu PJ, Peat N, Morris J, Taylor-Papadimitriou J. Two GC boxes (Sp1 sites) are involved in regulation of the activity of the epithelium-specific MUC1 promoter. *J Biol Chem* 1996; 271: 18140-18147.
- 10) Gum JR, Hicks JW, Kim YS. Identification and characterization of the MUC2 (human intestinal mucin) gene 5'-flanking region: promoter activity in cultured cells. *Biochem J* 1997; 325: 259-267.
- 11) Perrais M, Pigny P, Ducourouble MP, Petitprez D, Porchet N, Aubert JP, Van Seuning I. Characterization of human mucin gene MUC4 promoter: importance of growth factors and proinflammatory cytokines for its regulation in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 30923-30933.
- 12) Li D, Gallup M, Fan N, Szymkowski DE, Basbaum CB. Cloning of the amino-terminal and 5'-flanking region of the human MUC5AC mucin gene and transcriptional up-regulation by bacterial exoproducts. *J Biol Chem* 1998; 273: 6812-6820.
- 13) Chen Y, Zhao YH, Di YP, Wu R. Characteriza-

- tion of human mucin 5B gene expression in airway epithelial and genomic clone of the amino-terminal and 5'-flanking region. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001 ; 25 : 542-553.
- 14) Bobek LA, Liu J, Sait SN, Shows TB, Bobek YA, Levine MJ. Structure and chromosomal localization of the human salivary mucin gene, MUC7. *Genomics* 1996 ; 31 : 277-82.
- 15) Kudoh S, Keicho N. Diffuse panbronchiolitis. *Semin Respir Crit Care Med* 2003 ; 24 (5) : 607-617.
- 16) Kamio K, Matsushita I, Tanaka G, Ohashi J, Hijikata M, Nakata K, Tokunaga K, Azuma A, Kudoh S, Keicho N. Direct determination of MUC5B promoter haplotypes based on the method of single-strand conformation polymorphism and their statistical estimation. *Genomics* 2004 ; 84 : 613-622.
- 17) Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins DG, Gibson TJ. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* 1998 ; 23 : 403-405.
- 18) Felsenstein J. PHYLIP - Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 1989 ; 5 : 164-166.
- 19) Excoffier L, Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol* 1995 ; 12 : 921-927.
- 20) Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 2001 ; 68 : 978-989.
- 21) Stephens M, Donnelly P. A comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am J Hum Genet* 2003 ; 73 : 1162-1169.
- 22) Quandt K, Frech K, Karas H, Wingender E, Werner T. MatInd and MatInspector : new fast and versatile tools for detection of consensus matches in nucleotide sequence data. *Nucleic Acids Res* 1995 ; 23 : 4878-4884.
- 23) Fowler J, Vinall L, Swallow D. Polymorphism of the human MUC genes. *Front Biosci* 2001 ; 6 : D1207-1215.
- 24) Vinall L, Pratt WS, Swallow DM. Detection of mucin polymorphism. *Methods Mol Biol* 2000 ; 125 : 337-350.
- 25) Carvalho F, Seruca R, David L, Amorim A, Seixas M, Bennett E, Clausen H, Sobrinho-Simoes M. MUC1 gene polymorphism and gastric cancer—an epidemiological study. *Glycoconj J* 1997 ; 14 : 107-111.
- 26) Vinall LE, Hill AS, Pigny P, Pratt WS, Toribara N, Gum JR, Kim YS, Porchet N, Aubert JP, Swallow DM. Variable number tandem repeat polymorphism of the mucin genes located in the complex on 11p15.5. *Hum Genet* 1998 ; 102 : 357-366.
- 27) Koo JS, Jetten AM, Belloni P, Yoon JH, Kim YD, Nettesheim P. Role of retinoid receptors in the regulation of mucin gene expression by retinoic acid in human tracheobronchial epithelial cells. *Biochem J* 1999 ; 338 : 351-357.
- 28) Blanchard C, Durual S, Estienne M, Bouzakri K, Heim MH, Blin N, Cuber JC. IL-4 and IL-13 up-regulate intestinal trefoil factor expression : requirement for STAT6 and de novo protein synthesis. *J Immunol* 2004 ; 172 : 3775-3783.
- 29) Chen Y, Zhao YH, Di YP, Wu R. Characterization of human mucin 5B gene expression in airway epithelial and genomic clone of the amino-terminal and 5'-flanking region. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001 ; 25 : 542-553.
- 30) Wickström C, Davies JR, Eriksen GV, Veerman EC, Carlstedt I. MUC5B is a major gel-forming, oligomeric mucin from human salivary gland, respiratory tract and endocervix : identification of glycoforms and C-terminal cleavage. *Biochem J* 1998 ; 334 : 685-689.

# エリスロマイシンの抗炎症作用：包括的遺伝子発現解析から (第三報)

滝澤 始<sup>1\*</sup> 月舘 利治<sup>2</sup> 中島 敏治<sup>2</sup> 斉藤 博久<sup>2</sup>

びまん性汎細気管支炎の特効薬である14員環マクロライド系抗生物質の抗炎症作用を包括的に検討するために、初年度はヒト気管支上皮細胞株を用いて、2年目はヒト正常末梢気管支上皮細胞の定常状態においてトランスクリプトーム解析を行った。最終年度となる本年度は、ヒト正常末梢気管支上皮細胞の炎症性刺激 ( $\text{TNF } \alpha$ ) 下で、エリスロマイシン (EM) 及びその抗菌作用のない類縁体 EM703 を前処置し、遺伝子発現への作用をジーンチップにより包括的に評価した。 $\text{TNF } \alpha$  で2倍以上遺伝子発現が上昇した420遺伝子のうち、EMで30%以上抑制された遺伝子は72個で、そのうちEM703でも同様に抑制されたものが45個 (62.5%) あった。さらにEM703で25%以上抑制されたものは55個 (76.4%) にのぼった。既知のもので気道炎症に関連性が推測されるものには、CCL5 (RANTES) や CXCL6 (granulocyte chemotactic protein-2) などのケモカイン、IFNAR2 (interferon 受容体)、RAB, RAPIA などの Ras 関連分子、mitogen-activated protein kinase 3 などのシグナル関連分子、TCF2 などの転写因子、tissue plasminogen activator や cell death activator CIDE-3 などがあった。

## Studies on the array analysis of mRNA transcripts in human bronchial epithelial cells: An approach to the anti-inflammatory actions of macrolide antibiotics

Hajime Takizawa<sup>1</sup>, Toshiharu Tsukidate<sup>2</sup>, Toshiharu Nakajima<sup>2</sup>, and Hirohisa Saito<sup>2</sup>

<sup>1</sup>The Department of Respiratory Medicine, University of Tokyo, Graduate School of Medicine, Tokyo, Japan

<sup>2</sup>National Research Institute for Child Health and Development, Tokyo, Japan

Macrolide antibiotics have an anti-inflammatory activity, which is believed to be one of the important mechanisms of therapeutic efficacy for the treatment of diffuse panbronchiolitis.

To investigate the molecular mechanisms of their actions, we explored to utilize the array analysis of mRNA transcripts in normal human peripheral airway epithelial cells. The normal human bronchial epithelial cells were treated with therapeutic dosage of erythromycin (EM,  $10^{-6}$  M) or its analogue EM703, or vehicle alone for 24 hrs.  $\text{TNF } \alpha$  ( $10^{-7}$  M) was added to the cells, and total cellular RNA were extracted and subjected to gene transcription analysis by Gene-Chip Human Genome U133 Plus 2.0 Array. EM showed modulatory effects on transcription of several genes. These genes included chemokines such as CCL5 (RANTES) and CXCL6 (granulocyte chemotactic protein-2), receptors such as IFNAR2 (interferon receptor), Ras-related molecules (RAB, RAPIA), mitogen-activated protein kinase 3, transcription factors such as TCF2, and other molecules (tissue plasminogen activator, cell death activator CIDE-3). This approach seemed to help elucidating the important genes involved in the therapeutic effectiveness of the macrolides.

はじめに

エリスロマイシン (EM) をはじめとする 14 員環マクロライド抗生物質の慢性気道炎症性疾患における有効性の機序について、これまでに気道上皮細胞のサイトカイン/ケモカイン、接着分子の発現ないし産生、遊離を抑制することを報告してきた<sup>1)2)3)</sup>。これらの多くに共通して重要な転写調節因子 (NF $\kappa$ B, AP-1) の活性化についてもゲルシフトアッセイにより検討し、薬剤と刺激の同時処置では明らかな抑制作用はないが<sup>4)</sup>、治療域濃度のエリスロマイシン (EM, 10<sup>-6</sup>M) およびクラリスロマイシン (CAM) を種々の条件で前添加した系においては 24 時間の前処置により、明らかな NF $\kappa$ B, AP-1 の活性化抑制作用を見出した<sup>5)</sup>。さらに、前年度には、マクロライドの抗菌作用を有しない各種誘導体が転写調節因子 (NF $\kappa$ B, AP-1) の活性化を抑制しうること、I $\kappa$ B のリン酸化には直接作用しないこと、を示した<sup>6)</sup>。マクロライドの作用点のひとつに核内結合過程が存在することを示唆する結果も得られた。

しかし、マクロライド抗生物質には、きわめて多彩

な作用があることも判明しており、従来の候補分子を選んだ研究では把握できない網羅的な遺伝子発現解析の必要性が指摘されていた。一昨年我々は、びまん性汎細気管支炎などに対するマクロライドの有効性を解明するため、エリスロマイシンを作用させた気道上皮細胞株 (BET-1A) における遺伝子発現をマイクロアレー (GeneChip) を用いて網羅的に検討した<sup>7)</sup>。そして昨年度は、より実際の上皮に近い実験系をめざして、ヒト正常末梢気道上皮細胞を用いて、検討を行った<sup>8)</sup>。

今年度は、さらに気道炎症の病態を考慮して、炎症性刺激下で正常ヒト細気管支上皮細胞にマクロライド添加を行い、遺伝子発現への影響を網羅的に検討した。

対象と方法

1) 既報のごとく<sup>8)</sup>、正常ヒト細気管支上皮細胞 (SAEC, Clonetics<sup>TM</sup>) 1 × 10<sup>6</sup> cells を、ホルモン・成長因子を添加した Small Airway Epithelial Cell Medium without hydrocortisone and BPE を用いて培養した。

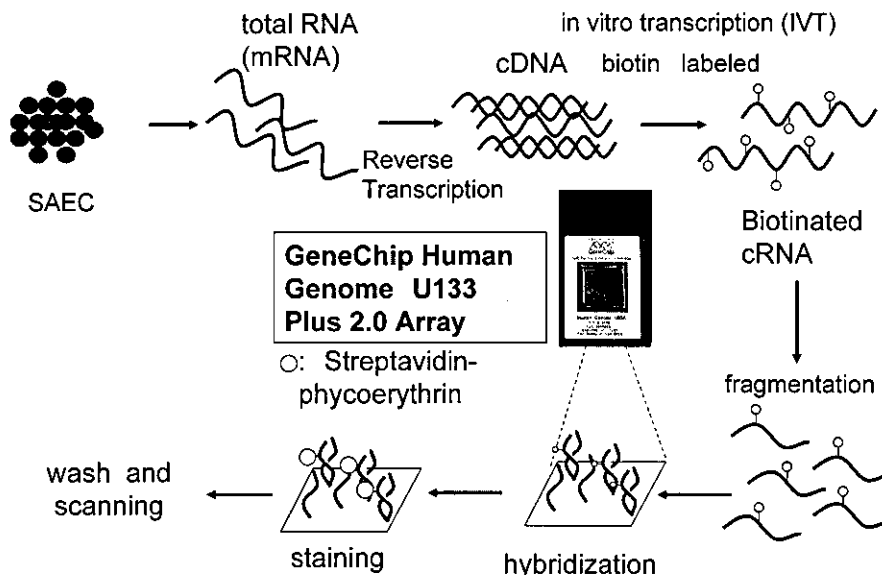


図1 GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array を用いた包括的遺伝子発現の検討方法。

1 東京大学医学部呼吸器内科  
 2 国立成育医療センター研究所 免疫アレルギー研究部  
 \* びまん性肺疾患調査研究班 分担研究者

2) コントロール (TNF  $\alpha$   $10^{-7}$ Mのみ), および Erythromycin (EM)  $10^{-6}$ M か EM の抗菌作用をもたない類縁体である EM703  $10^{-6}$ M を 24 時間前処理して, 37°C 24 時間インキュベートしたのち, total RNA を精製し (RNeasy キット), 引き続き包括的な遺伝子発現解析を行った。用いたキットは昨年までの Human Genome U133A (Affymetrix 社) より多くの遺伝子発現解析が可能な, GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array である。これにより, 35,500 の既知遺伝子を含む約 47,000 遺伝子を解析できる (図 1)。

3) それぞれの遺伝子発現で発現強度の平均値の差が 100 を超えているものを検討の対象とした。

## 結 果

- (1) Control, EM, EM703, TNF, TNF+EM, TNF+EM703 の 6 群で,  $\beta$ -actin, GAPDH に差はなかったため, 遺伝子発現の補正は行わなかった (図 2)。
- (2) TNF で 2 倍以上上昇したもの: 420 個
- (3) TNF と比較して, TNF+EM で低下したもの (抑制率 > 30%): 72 個

- (4) そのうち, EM703 も抑制したもの: 45 個 (62.5% が一致)
- (5) さらに, EM703 の抑制率が 25% 以上のものを含めると: 55 個 (76.4% が一致) であった。
- (6) 気道炎症に関連の深いサイトカイン・ケモカインについての結果を図 3 に示す。このうち, CCL5 (RANTES) や CXCL6 (granulocyte chemotactic protein-2) においては, EM の処理により, 30% 以上の減弱を示した。
- (7) 受容体, シグナル分子に関しては, 図 4 に示す 9 個の遺伝子発現が 30% 以上抑制された。
- (8) その他の分子で強い抑制を認めたのは, 図 5 にように Fanconi anemia complementation group C/FANCC を始めとして 6 種が 30% 以上の抑制を認めた。

## 考 案

びまん性汎細気管支炎に対する特効的な効果を示す 14 員環マクロライド療法 (15 員環も有効) は, 最近では従来からの慢性副鼻腔炎, 副鼻腔気管支症候

Gene Title	cont	EM	EM703	cont +TNF	EM +TNF	EM703 +TNF
actin, beta / ACTB	9831P	9515P	9535P	9346 P	9829 P	9173 P
glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase / GAPDH	9197P	9044P	9057 P	8786 P	8929 P	8552 P

図 2  $\beta$ -actin, GAPDH の遺伝子発現強度の比較。Control, EM, EM703, TNF, TNF+EM, TNF+EM703 の 6 群で, 有意な差はなかった。

Gene Title	cont +TNF	EM +TNF	EM703 +TNF (%)	inhibition by EM (%)	inhibition by EM703
RANTES/CCL5	639 P	330 P	316 P	48.4	50.4
GCP-2/CXCL6	408 P	251 P	233 P	38.5	42.7
interleukin 1 family, member 9 / IL1F9	879 P	642 P	554 P	27.0	36.9
interleukin 24 / IL24	113 P	89 P	92 P	21.2	18.0
CXCL3 /GRO $\gamma$	238 P	194 P	197 P	18.4	17.4
interleukin 8 / IL-8	3676 P	3064 P	2398 P	16.6	34.8
platelet-derived growth factor beta / PDGFBeta	349 P	311 P	346 P	10.9	0.8

図 3 気道炎症に関連の深いサイトカイン・ケモカインについての結果。

Gene Title	cont +TNF	EM +TNF	EM703 +TNF	inhibition (%) by EM	inhibition (%) by EM703
mitogen-activated protein kinase 3/MAPK3	285 P	118 A	172 A	58.7	39.8
inhibin, beta A (activin A 926P		506 P	614P	45.4	33.7
RAB40B, member RAS oncogene family/RAB40B	169P	94 P	105 M	44.7	37.8
interferon (alpha, beta and omega) receptor 2/IFNAR2	118P	68P	77P	42.4	34.3
transcription factor 2, hepatic/ TCF2	239P	141A	116A	40.9	51.7
cell death activator CIDE-3	107P	66P	67P	38.4	37.7
guanylate binding protein 2, interferon-inducible /GBP2	205 P	128P	163P	37.8	20.4
tumor protein p53 inducible protein 5 / TP53I5	226P	145A	178A	36.0	21.2
RAP1A, member of RAS oncogene family		114P	80P 78P	30.0	31.5

図4 受容体, シグナル分子で影響を認めたもの。

Gene Title	cont +TNF	EM +TNF	EM703 +TNF	inhibition (%) by EM	inhibition (%) by EM703
Fanconi anemia, complementation group C/FANCC	263 P	91 P	172 P	65.6	34.7
plasminogen activator, 216 P tissue / PLAT		130 P	129 P	39.8	40.2
Calpastatin/CAST	150 P	97 P	135P	35.8	10.2
angiopoietin-like 4/ 1066 P		692 P	745 P	35.1	30.1
contactin 3 (plasmacytoma associated)/CNTN3	188 P	123P	85 P	34.8	55.0
neuronal cell adhesion molecule /NRCAM	127 P	87 P	107 P	31.4	15.8

図5 その他の分子で抑制を認めたもの。

群, 気管支拡張症への応用に加え, 欧米ではのう胞線維症の標準的治療選択になり, またわが国では COPD の急性増悪を減少するなど, さらに広範囲かつ重要な治療法として注目されつつある。一方で, 肺炎球菌をはじめとする呼吸器感染症起炎菌のマクロライド抗生物質への耐性も問題となっており, 本療法の標的分子の解明, さらに抗菌作用のない誘導体のスクリーニングに期待が集まっている。

これまでの研究により, 14 員環マクロライド抗生物質が, 炎症の局面で重要な各種の分子, すなわち IL-8, IL-1 $\beta$ , IL-6 などの炎症性サイトカイン, ケモカイン, や接着分子の発現を遺伝子レベルで抑制ないし正常化することがあきらかにされてきた。さらに, これら炎症性サイトカインなどの発現に重要な転写調節因子 (NF $\kappa$ B, AP-1) の活性化を抑制することが明らかになり, びまん性汎細気管支炎の気道炎症を改善する 1 機序として推定されるに到っている。この作用

は, 気道上皮細胞のみならずマクロファージ, リンパ球, 線維芽細胞においても認められ<sup>9-12)</sup>, 生体に対するかなり普遍的な作用である可能性がある。一方, マクロライドには, 気道分泌抑制作用, 細胞のアポトーシスへの作用, リンパ球の増殖抑制作用など, きわめて多面的な作用も示されており, 以上述べた機構だけで薬効を説明しきることはできない。

そこで近年応用が行われているマイクロアレー法により, マクロライド療法の標的遺伝子の抽出を試みた。初年度は, ヒト気管支上皮細胞株である BET-1A 細胞を用いて, さまざまな条件で検討を行い, Affymetrix 社のジーンチップを用いて, 約 2 万以上の遺伝子についてその発現への影響を検討できた。このうち, ヒト気道上皮細胞において検出可能であったのは, 約半分の 1 万個であった。第 2 年度は, 細胞株よりも一層病態的意義付けが可能な正常ヒト末梢気管支上皮細胞を用いて, EM の処理をより長時間とし



た。予備的な実験により、細胞の生存率に影響を与えない最長時間として72時間のインキュベーションを行った。この処理により、72時間後のIL-8遺伝子発現レベルは減弱傾向を示した。他の炎症性サイトカイン・ケモカインでははっきりしたものは認めなかった。この系では、既報の報告同様炎症性サイトカインによる刺激をせず、EMを添加したためか、細胞の生存率は比較的長時間保たれたが、72時間を越えると明らかに生存率や細胞数の減少を認めた。また、EMの処理により、発現が増強する遺伝子が11個みられ、一方減弱する遺伝子が12個存在した。どちらもBET-1Aで行った昨年度の結果よりも大幅に少ない数であった。この原因は不明であるが、従来からマクロライドの炎症病態での効果は抑制作用というよりも正常レベル(baseline)への回復作用である(つまりsuppressionではなくmodulation)と考えられており、非刺激下の検討では限界があると思われる。

そこで、最終年度の今回は、炎症性刺激としてTNF $\alpha$ を用いて、マクロライドの前処理での検討を行った。さらに、従来の検討で抗炎症作用が認められ、かつ抗菌作用やモチリン様作用をもたない誘導体EM703も同様に検討を行った。そして、解析にあたっては、昨年度までのものより多数の遺伝子について解析可能なGeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Arrayを用いた。

その結果、TNF $\alpha$ で2倍以上遺伝子発現が上昇した420遺伝子のうち、EMで30%以上抑制された遺伝子は72個で、そのうちEM703でも同様に抑制されたものが45個(62.5%)あった。さらにEM703で25%以上抑制されたものは55個(76.4%)にのぼった。EMと抗菌作用のない誘導体EM703に共通する遺伝子は特に有望と思われる。既知のもので気道炎症に関連性が推測されるものには、CCL5 (RANTES)やCXCL6 (granulocyte chemotactic protein-2)などのケモカイン、IFNAR2 (interferon受容体), RAB, RAPIAなどのRas関連分子, mitogen-activated protein kinase 3などのシグナル関連分子, TCF2などの転写因子, tissue plasminogen activatorやcell death activator CIDE-3などがあった。現在、そのいくつかについて定量的RT-PCRなどにより確認中である。

マクロライドの作用機構を解明する上で、今回のアプローチは、同時にほぼ全部の遺伝子発現への影響を網羅的に検出できる点が最大の利点と思われる。しか

し、一方で、細胞内でリン酸化されるシグナル分子の動きなどはとらえられないことなど、限界もまた存在する。さらに、マクロライドの効果発現には少量で長期の投与が必要であることを考慮するとマクロライドの試験管内での作用時間にも工夫が必要である。我々は、以上の点にも留意しながら、マクロライドの作用する遺伝子群の検索を推進する予定である。

## 結 論

マクロライドの抗炎症作用解明のために、ヒト正常末梢気道上皮細胞を用いてジーンチップによる包括的遺伝子発現の検討を行い、いくつかの候補遺伝子がピックアップされた。

## 謝 辞

共同研究者として本研究の遂行にご協力いただいた北里研究所 大村 智先生、砂塚敏明先生に深謝いたします。

## 参考文献

- 1) Takizawa H, Desaki M, Ohtoshi T, et al.: Erythromycin suppresses interleukin 6 expression by human bronchial epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 210: 781-786, 1995.
- 2) Takizawa H, Desaki M, Ohtoshi T, et al.: Erythromycin modulates IL-8 expression in human bronchial epithelial cells: Studies with normal and inflamed airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 266-271, 1997.
- 3) Kawasaki S, Takizawa H, Ohtoshi T, et al.: Roxithromycin inhibits cytokine production and neutrophil attachment with human bronchial epithelial cells in vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1499-1502, 1998.
- 4) 滝沢 始, 出崎真志, 河崎 伸, 他: エリスロマイシン療法の機序解明: ヒト気道上皮細胞の転写調節に対するマクロライド抗生物質の作用. 厚生省特定疾患呼吸器系疾患調査研究班びまん性肺疾患分科会平成10年度研究報告書, 124-127.
- 5) Desaki M, Takizawa H, Ohtoshi T, et al.: Eryth-

- romycin suppresses nuclear factor- $\kappa$ B and activator protein-1 activation in human bronchial epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 267: 124-128, 2000.
- 6) Desaki M, Okazaki H, Sunazuka T, Omura S, Yamamoto K, Takizawa H: Molecular mechanisms of an anti-inflammatory action of erythromycin in human bronchial epithelial cells: a possible role in the signaling pathway that regulates nuclear factor- $\kappa$ B activation. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1581-5, 2004.
- 7) 滝澤 始, 中島敏治, 斎藤博久, 梅田 啓: エリスロマイシンの抗炎症作用: 包括的遺伝子発現解析から (第一報). 厚生労働科学研究 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, 203-206.
- 8) 月館利治, 中島敏治, 斎藤博久, 滝澤 始: エリスロマイシンの抗炎症作用: 包括的遺伝子発現解析から (第二報). 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 びまん性肺疾患調査研究班 平成 15 年度研究報告書, 193-196.
- 9) Ichiyama T, Nishikawa M, Yoshitomi T, et al.: Clarithromycin inhibits NF- $\kappa$ B activation in human peripheral blood mononuclear cells and pulmonary epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 44-47, 2001.
- 10) Miyahara T, Ushikai M, Matsune S, et al.: Effects of clarithromycin on cultured human nasal epithelial cells and fibroblasts. *Laryngoscope* 110: 126-131, 2000.
- 11) Aoki Y, Kao PN: Erythromycin inhibits transcriptional activation of NF- $\kappa$ B, but not NFAT, through calcineurin-independent signaling in T cells. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2678-2684, 1999.
- 12) Kikuchi T, Hagiwara K, Honda Y, et al.: Clarithromycin suppresses lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production by human monocytes through AP-1 and NF- $\kappa$ B transcription factors. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 49(5): 745-55, 2002.

# 狭窄性細気管支炎

# ラット移植肺への IL-10 遺伝子経気道的導入による 拒絶反応抑制の試み

岡田 克典<sup>1</sup> 大石 久<sup>1</sup> 菊地 利明<sup>2</sup> 佐渡 哲<sup>1</sup>  
松村 輔二<sup>1</sup> 田畑 俊治<sup>1</sup> 星川 康<sup>1</sup> 鈴木 聡<sup>1</sup>  
貫和 敏博<sup>2\*</sup> 近藤 丘<sup>1\*\*</sup>

【背景】免疫抑制作用を持つ物質の遺伝子を臓器に発現させることで、臓器移植後の拒絶反応を抑制できる可能性がある。今回我々は、IL-10 遺伝子をラット移植肺に導入することで、移植肺の拒絶反応が抑制できるか否かについて検討した。【方法】まず、アデノウイルスベクターを用いて、 $\beta$ -galactosidase 遺伝子 (adv- $\beta$ -gal) の経気道的導入を行い、肺胞上皮細胞への導入を染色で確認した。次いで、ラット肺移植モデルを用い、IL-10 遺伝子 (adv-vIL-10) の経気道的導入が、移植肺拒絶反応を抑制するか否かについて検討した。BN ラットをドナー、Lew ラットをレシピエントとして同所性肺移植を行った。移植 3 日前に、ドナー肺に  $3 \times 10^8$  pfu/0.3 mL の adv-vIL-10 または adv- $\beta$ -gal (コントロール) を経気道的に注入した。移植後 6 日目に移植肺を摘出し、拒絶反応の程度のグレーディング (1~4) を行った。また、移植肺の炎症所見のパラメーター (浮腫、血管炎、肺胞内出血、壊死) につき、スコアリング (0~4) を行った。【結果】拒絶反応の程度は、adv-vIL-10 群で  $3.75 \pm 0.5$ 、adv- $\beta$ -gal 群で  $4.0 \pm 0$  で、両群間に統計学的な有意差を認めなかった。炎症所見のパラメーターのスコアにも、両群間に有意差を認めなかった (浮腫:  $3.5 \pm 0.6$  vs.  $4 \pm 0$ , 血管炎:  $1.5 \pm 0.6$  vs.  $1.5 \pm 0.6$ , 肺胞内出血:  $2.3 \pm 1.0$  vs.  $2.5 \pm 0.6$ , 壊死:  $1.5 \pm 0.5$  vs.  $1.75 \pm 1.3$ )。【考察・結論】我々は、adv-vIL-10 の遺伝子導入が、ラット移植肺の拒絶反応を抑制することを報告したが、今回の実験結果はそれと相反するものとなった。アデノウイルスベクターの抗原性が実験結果の相違に関与するものの一つである可能性がある。現在、liposome をベクターとした IL-10 遺伝子導入の効果について検討中である。

## Interleukin-10 Gene Transfer to The Airway of Rat Lungs for Prevention of Lung Allograft Rejection

Yoshinori Okada<sup>1</sup>, Hisashi Oishi<sup>1</sup>, Toshiaki Kikuchi<sup>2</sup>, Tetsu Sado<sup>1</sup>,  
Yuji Matsumura<sup>1</sup>, Toshiharu Tabata<sup>1</sup>, Yasushi Hoshikawa<sup>1</sup>, Satoshi Suzuki<sup>1</sup>,  
Toshihiro Nukiwa<sup>2</sup>, and Takashi Kondo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Thoracic Surgery and <sup>2</sup>Department of Respiratory Oncology and Molecular Medicine, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, Sendai, Japan

**Background :** The ability to express genes with potential immunoregulatory capacity could reduce allograft rejection (AR). We examined the feasibility of transferring the vIL-10 gene into rat lungs by intra-bronchial instillation and the subsequent effects of delivered vIL-10 on acute lung AR. **Methods :** First, the adenoviral  $\beta$ -galactosidase vector (adv- $\beta$ -gal) particles were instilled into the rat lung and protein synthesis of  $\beta$ -gal was confirmed by histochemical staining. Next, the ability of the adenoviral vIL-10 vector (adv-vIL-10) transfection to modify AR was examined in a highly histoincompatible rat lung transplant model (BN  $\rightarrow$  Lew). Donor left lungs were transfected with  $3 \times 10^8$  pfu/0.3 mL of adv-vIL-10 or adv- $\beta$ -gal 3 days before transplantation. On day 6 post-transplant, AR was graded histologically (stage 0-4). Several pathological categories of inflammation were also scored on a scale of 0-4. **Results :** The stage of AR was  $3.75 \pm 0.5$  in the adv-vIL-10 group and  $4.0 \pm 0$  in the adv- $\beta$ -gal group, and the difference did not reach a statistically significant difference. There were no significant differences either in the degree of edema ( $3.5 \pm 0.6$  vs.  $4 \pm 0$ ), vasculitis ( $1.5 \pm 0.6$  vs.  $1.5 \pm 0.6$ ), necrosis ( $1.5 \pm 0.5$  vs.  $1.75 \pm 1.3$ ), and hemorrhage ( $2.3 \pm 1.0$  vs.  $2.5 \pm 0.6$ ). **Conclusion :** This preliminary study showed that transfection of adv-vIL-10 did not seem to reduce lung AR significantly, as opposed to the results of our previous experiments in a rat cardiac allograft model. This discrepancy might be explained by the immunogenicity of the adenoviral vector, and the ability of liposome mediated IL-10 delivery to reduce lung AR is currently under investigation.

---

<sup>1</sup> 東北大学加齢医学研究所呼吸器再建研究分野

<sup>2</sup> 東北大学加齢医学研究所呼吸器腫瘍研究分野

\* びまん性肺疾患調査研究班 主任研究者

肺移植は終末期肺疾患患者に対する有効な治療法として確立しているが<sup>1)</sup>、術後5年生存率は今日でも50%にとどまっております、未だ満足すべきものではない。国際心・肺移植学会の報告によると、術後死因の多くを感染症と慢性拒絶反応が占めていることから<sup>2)</sup>、免疫抑制法の改良が肺移植の成績向上に必要な不可欠な課題である。

臓器移植における理想的な免疫抑制は、ドナー特異的な免疫応答の制御、つまりトレランスの導入である。近年、様々な実験モデルを用いた研究結果から、トレランス導入のメカニズムの一つとして、Th1/Th2パラダイムが提唱されている<sup>3)</sup>。これは、同種移植における拒絶反応において主要な役割を果たすヘルパーT細胞が、主としてIL-2や $\gamma$ -IFNを産生するTh1細胞と、主としてIL-4やIL-10を産生するTh2細胞との2つのサブセットに分類され、移植臓器におけるTh1細胞とTh2細胞の機能的なバランスによって拒絶反応が制御されるという考え方である。Th2細胞が産生するIL-10などのサイトカインは、Th1細胞の活性を抑制し、さらに細胞傷害性T細胞のエフェクター作用をも抑制する活性を持つことが報告されていることから、移植臓器にIL-10などの免疫抑制性サイトカインを人為的に発現させることで拒絶反応を制御し、さらにトレランスを誘導しようとする実験的研究が、近年報告されるようになった<sup>4)</sup>。

今回我々は、遺伝子導入が難しい臓器の一つである肺に対し、IL-10の遺伝子導入を試み、これにより拒絶反応の抑制が可能であるか否かについて実験的に検討したので報告する。

## 方 法

ベクター作成：HCMV IE1プロモーターを有する不活化アデノウイルスベクターをアデノウイルス5から作成し、免疫抑制作用が確認されているウイルス由来のIL-10 (vIL-10) のcDNAをベクターに組み込んだ (ad-vIL-10)。大腸菌由来のLac Z遺伝子を同様にベクターに組み込み (ad- $\beta$ -gal)、これをreporter geneさらにcontrol geneとして用いた。

In vitro, in vivoにおける遺伝子導入：ad- $\beta$ -galならびにad-vIL-10を、まず培養Cos 7細胞へ導入し、ad- $\beta$ -galの場合はX-gal溶液を用いた染色で、ad-vIL-10の場合はELISA法で培養液上清中のvIL-10濃度を測定することで、それぞれ目的とする蛋白の産生を確認した。さらに、ラット左肺へ経気道的なad- $\beta$ -galの導入を試み、ベクターの気道注入後3日目にラットを犠牲死させて肺を摘出し、X-gal溶液を用いて染色を行い、肺胞上皮細胞への遺伝子導入を確認した (図1)。

肺移植：ラット肺移植モデルを用い、adv-vIL-10の経気道的導入が、移植肺拒絶反応を抑制するか否かについて検討した。BNラットをドナー、LewラットをレシピエントとするMHC incompatibleの組み合わせで同所性左片肺移植を行った<sup>5)</sup>。移植3日前に、ドナー肺に $3 \times 10^8$  pfu/0.3 mLのadv-vIL-10またはadv- $\beta$ -gal (コントロール) を経気道的に注入した。移植後6日目に移植肺を摘出し、拒絶反応のstageを病理学的にグレーディング (stage1~4) した<sup>5)</sup>。また、移植肺の炎症所見の病理学的パラメーター (血管周囲単核球浸潤、気管支周囲単核球浸潤、細気管支周囲単核球浸潤、浮腫、血管炎、肺胞内出血、壊死) を設定し、病変がみられる部分が全体のどの程度の割合を占める

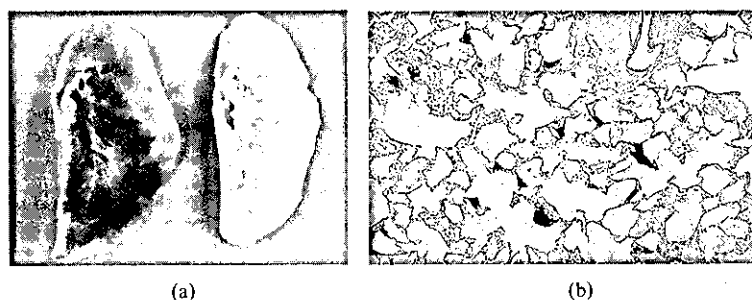


図1. ラット左肺に、 $3 \times 10^8$  pfu/0.3 mLのadv- $\beta$ -galを経気道的に投与し、3日後にラットを犠牲死させて左肺を摘出し、X-gal溶液を用いた染色で $\beta$ -galactosidaseの発現を検索した。(a) 摘出肺の肉眼所見。写真左は、adv- $\beta$ -galを経気道的に注入した肺、写真右はadv-vIL-10を同様に注入した肺。(b) adv- $\beta$ -galを経気道的に注入した肺の組織像 (100倍)。肺胞上皮細胞に $\beta$ -galactosidaseの活性が見られる。

肺移植は終末期肺疾患患者に対する有効な治療法として確立しているが<sup>1)</sup>、術後5年生存率は今日でも50%にとどまっております、未だ満足すべきものではない。国際心・肺移植学会の報告によると、術後死因の多くを感染症と慢性拒絶反応が占めていることから<sup>2)</sup>、免疫抑制法の改良が肺移植の成績向上に必要不可欠な課題である。

臓器移植における理想的な免疫抑制は、ドナー特異的な免疫応答の制御、つまりトレランスの導入である。近年、様々な実験モデルを用いた研究結果から、トレランス導入のメカニズムの一つとして、Th1/Th2パラダイムが提唱されている<sup>3)</sup>。これは、同種移植における拒絶反応において主要な役割を果たすヘルパーT細胞が、主としてIL-2や $\gamma$ -IFNを産生するTh1細胞と、主としてIL-4やIL-10を産生するTh2細胞との2つのサブセットに分類され、移植臓器におけるTh1細胞とTh2細胞の機能的なバランスによって拒絶反応が制御されるという考え方である。Th2細胞が産生するIL-10などのサイトカインは、Th1細胞の活性を抑制し、さらに細胞傷害性T細胞のエフェクター作用をも抑制する活性を持つことが報告されていることから、移植臓器にIL-10などの免疫抑制性サイトカインを人為的に発現させることで拒絶反応を制御し、さらにトレランスを誘導しようとする実験的研究が、近年報告されるようになった<sup>4)</sup>。

今回我々は、遺伝子導入が難しい臓器の一つである肺に対し、IL-10の遺伝子導入を試み、これにより拒絶反応の抑制が可能であるか否かについて実験的に検討したので報告する。

## 方 法

ベクター作成：HCMV IE1プロモーターを有する不活化アデノウイルスベクターをアデノウイルス5から作成し、免疫抑制作用が確認されているウイルス由来のIL-10 (vIL-10) のcDNAをベクターに組み込んだ (ad-vIL-10)。大腸菌由来のLacZ遺伝子を同様にベクターに組み込み (ad- $\beta$ -gal)、これをreporter geneさらにcontrol geneとして用いた。

In vitro, in vivoにおける遺伝子導入：ad- $\beta$ -galならびにad-vIL-10を、まず培養Cos7細胞へ導入し、ad- $\beta$ -galの場合はX-gal溶液を用いた染色で、ad-vIL-10の場合はELISA法で培養液上清中のvIL-10濃度を測定することで、それぞれ目的とする蛋白の産生を確認した。さらに、ラット左肺へ経気道的なad- $\beta$ -galの導入を試み、ベクターの気道注入後3日目にラットを犠牲死させて肺を摘出し、X-gal溶液を用いて染色を行い、肺胞上皮細胞への遺伝子導入を確認した (図1)。

肺移植：ラット肺移植モデルを用い、adv-vIL-10の経気道的導入が、移植肺拒絶反応を抑制するか否かについて検討した。BNラットをドナー、LewラットをレシピエントとするMHC incompatibleの組み合わせで同所性左片肺移植を行った<sup>5)</sup>。移植3日前に、ドナー肺に $3 \times 10^8$  pfu/0.3 mLのadv-vIL-10またはadv- $\beta$ -gal (コントロール) を経気道的に注入した。移植後6日目に移植肺を摘出し、拒絶反応のstageを病理学的にグレーディング (stage1~4) した<sup>5)</sup>。また、移植肺の炎症所見の病理学的パラメーター (血管周囲単核球浸潤、気管支周囲単核球浸潤、細気管支周囲単核球浸潤、浮腫、血管炎、肺胞内出血、壊死) を設定し、病変がみられる部分が全体のどの程度の割合を占める

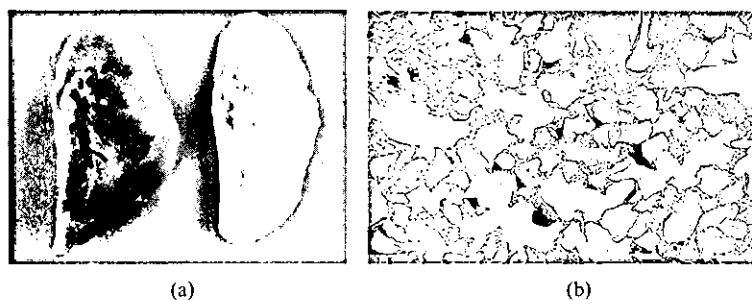


図1. ラット左肺に、 $3 \times 10^8$  pfu/0.3 mLのadv- $\beta$ -galを経気道的に投与し、3日後にラットを犠牲死させて左肺を摘出し、X-gal溶液を用いた染色で $\beta$ -galactosidaseの発現を検索した。(a) 摘出肺の肉眼所見。写真左は、adv- $\beta$ -galを経気道的に注入した肺、写真右はadv-vIL-10を同様に注入した肺。(b) adv- $\beta$ -galを経気道的に注入した肺の組織像 (100倍)。肺胞上皮細胞に $\beta$ -galactosidaseの活性が見られる。

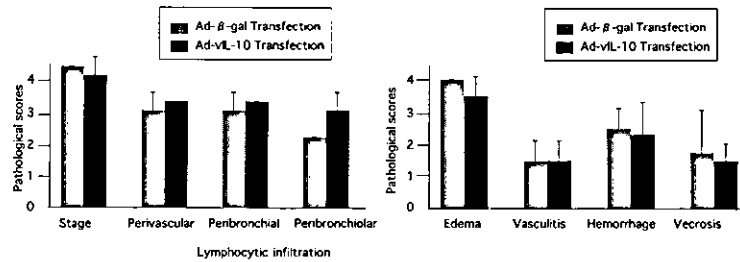


図2. vIL-10 遺伝子導入の移植肺拒絶反応に対する効果。移植3日前にドナーラット左肺に adv-vIL-10 または adv-β-gal (コントロール) を経気道的に注入し, BN → Lew の組み合わせで同所性左片肺移植を行った。移植後6日目に移植肺を摘出し, 病理学的に拒絶反応の程度を評価した。縦軸は, 拒絶反応の病理学的 stage または炎症を表すパラメーターの病理学的スコア, 横軸は, 各病理学的パラメータを表す。

かによって, 以下のようにスコア化した<sup>6)</sup>。0=所見なし, 1=1~25% に所見あり, 2=26~50% に所見あり, 3=51~75% に所見あり, 4=76~100% に所見あり。

## 結 果

拒絶反応の stage は, adv-vIL-10 群で  $3.75 \pm 0.5$ , adv-β-gal 群で  $4.0 \pm 0$  で, adv-vIL-10 群でやや軽度であったが, 両群間に統計学的な有意差を認めなかった。炎症所見のパラメーターのスコアにも, 両群間に有意差を認めなかった (血管周囲単核球浸潤:  $3.0 \pm 0$  vs.  $2.75 \pm 0.5$ , 気管支周囲単核球浸潤:  $3.0 \pm 0$  vs.  $2.75 \pm 0.5$ , 細気管支周囲単核球浸潤:  $2.75 \pm 0.5$  vs.  $2.0 \pm 0$ , 浮腫:  $3.5 \pm 0.6$  vs.  $4 \pm 0$ , 血管炎:  $1.5 \pm 0.6$  vs.  $1.5 \pm 0.6$ , 肺胞内出血:  $2.3 \pm 1.0$  vs.  $2.5 \pm 0.6$ , 壊死:  $1.5 \pm 0.5$  vs.  $1.75 \pm 1.3$ ) (図2)。

## 考 察

Th1/Th2 パラダイムは, 多くの動物実験モデルでトレランス誘導のメカニズムとして注目されており<sup>3)</sup>, 我々もラット肺移植モデルにおいて, トレランスの誘導に移植肺における Th1/Th2 バランスが重要であることを報告してきた<sup>7-9)</sup>。また, ラット心移植モデルを用いた検討では, グラフトへの vIL-10 遺伝子導入によって移植心の生着期間が延長し, この生着延長効果はシクロスポリン投与と相互作用を持つ事が明らかになった<sup>4)</sup>。

今回は, 遺伝子導入が難しい臓器の一つである肺において, アデノウイルスベクターの経気道的投与で肺胞上皮への遺伝子導入に成功した。今回は, ベクター溶液の気管支内への直接注入により経気道的な遺伝子導入を行ったが, 臨床応用に用いる場合には,

ネブライゼーションなどの方法が, ベクターの肺全体への均一な導入を行う上で, より妥当な方法であろう。また, 拒絶反応が, 血管周囲へのリンパ球浸潤で始まることを考えれば, ベクターの肺血管内皮細胞への投与が拒絶反応を抑制する目的ではより適している可能性があるが, 同量の ad-β-gal の肺動脈内投与では, 肺血管内皮細胞に β-galactosidase の発現は確認できなかった (未発表データ)。

今回の検討では, ad-vIL-10 の経気道的な遺伝子導入は, 移植肺の拒絶反応を有意に抑制するには至らなかった。拒絶反応の stage と, 浮腫, 細胞内出血, 壊死といった所見が ad-vIL-10 群でコントロール群に比べわずかに軽度で, 逆に単核球浸潤が ad-vIL-10 群でわずかに高度であったことは, ad-vIL-10 群における拒絶反応の進行がコントロール群に比べ遅れた可能性を示唆する。しかし, 両群間の差は, どの因子についても統計学的有意差に至らず, ad-vIL-10 の遺伝子導入が拒絶反応を抑制したとは言えない結果となった。心移植モデルにおける結果と本研究の結果で相違が生じた理由としては, 1. 投与経路の問題: 心移植モデルでは冠動脈から遺伝子導入を行い心筋細胞に目標遺伝子が発現させることが可能であったのに対し, 今回の実験では遺伝子導入が経気道的に行われ, 目標遺伝子が主として肺胞上皮細胞に発現していること, 2. アデノウイルスベクター自体が抗原性を有するため, リンパ組織に富み炎症が起こりやすい臓器である肺では, ベクターに対する炎症反応が心におけるそれよりも強く起こり, 結果として急性拒絶反応の抑制をマスクしてしまったこと, などが考えられる。このようなことから, 今後は, 投与経路の変更や, アデノウイルスベクターを用いない遺伝子導入, 例えば liposome を用いた遺伝子導入などを考慮しながら研究を進めていく必要があるものと考えら



れた。

## 文 献

- 1) Trulock EP. Lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 789-818.
- 2) ISHLT home page on the Internet, <http://www.isHLT.org/>
- 3) Piccotti JR, Chan SY, VanBuskirk AM, Eichwald EJ, Bishop DK. Are Th2 helper T lymphocytes beneficial, deleterious, or irrelevant in promoting allograft survival? *Transplantation* 1997; 63: 619-624.
- 4) Zuo X-J, Wang Charles, Carpenter D, Okada Y, Nicolaidou E, Toyoda M, Trento A, Jordan SC. Prolongation of allograft survival with viral IL-10 transfection in a highly histocompatible model of rat heart allograft rejection. *Transplantation* 2001; 71: 686-691.
- 5) Kondo T, Marchevsky AM, Jordan SC, Koerner SK, Matloff JM, Waters PF. Vascular rejection and graft eosinophilia in rat lung allografts. *J Surg Res* 1991; 51: 310-315.
- 6) Okada Y, Xuo X-J, Marchevsky AM, Nicolaidou E, Toyoda M, Matloff JM, Jordan SC. Antithrombin III treatment improves parameters of acute inflammation in a highly histoincompatible model of rat lung allograft rejection. *Transplantation* 1999; 67: 526-528.
- 7) Kondo T, Marchevsky AM, Jordan SC, Koerner SK, Matloff JM, Waters PF. Evidence of complete tolerance in a model of rat lung allograft. *Transplantation* 1991; 52: 928-930.
- 8) Zuo XJ, Matsumura Y, Prehn J, Marchevsky A, Matloff J, Jordan SC. Cytokine gene expression in rejection vs tolerant rat lung allograft models: analysis by RT-PCR. *Transplant Immunol* 1995; 3: 151-157.
- 9) Okada Y, Xuo X-J, Marchevsky AM, Toyoda M, Pass JA, Matloff JM, Jordan SC. Pre-transplant donor-specific transfusions induced allograft rejection and IL-2 gene expression in the WKY → F344 functional tolerance model of rat lung transplantation. *Transplant Immunol* 1998; 6: 137-146.

# 研究成果の刊行に関する一覧表

## 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
Watanabe M, Ebina M, Orson FM, Nakamura A, Koinuma D, Akiyama K, Maemondo M, Okouchi S, Ota H, Kubota K, Matsumoto K, Nakamura T, and Nukiwa T	Hepatocyte growth factor gene transfer to alveolar septa efficiently prevents lung injury by bleomycin	Molecular Therapy			2005 (in press)
Tazawa R, Hamano E, Ohta H, Arai T, Ishimoto O, Uchida K, Watanabe M, Saito J, Takeshita M, Hirabayashi Y, Ishige I, Eishi Y, Hagiwara K, Ebina M, Inoue Y, Nakata K, Nukiwa T	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor and lung immunity in pulmonary alveolar proteinosis	Am. J. Respir. Crit. Care Med.			2005 (in press)
Kanemi O, Zhang X, Sakamoto Y, Ebina M, Nagatomi R	Acute stress reduces intraparenchymal lung natural killer cells via beta-adrenergic stimulation	Clin Exp Immunol.	139	25-34	2005
Camus P, Kudoh S, Ebina M	Interstitial lung disease associated with drug therapy	Br J Cancer.	91	S18-23	2004
Ebina M, Shimizukawa M, Shibata N, Kimura Y, Suzuki T, Endo M, Sasano H, Kondo T, Nukiwa T	Heterogeneous Increase of CD34-positive Alveolar Capillaries in Idiopathic Pulmonary Fibrosis	Am J Respir Crit Care Med.	169	1203-8	2004
Suzuki S, Hao B, Sugawara T, Matsuda Y, Tabata T, Hoshikawa Y, Saijo Y, Kondo T	Paclitaxel Prevents Loss of Pulmonary Endothelial Barrier Integrity During Cold Preservation	Transplantation	78	524-529	2004
Okada Y, Hoshikawa Y, Ejima Y, Matsumura Y, Sado T, Shimada K, Aikawa H, Sugawara T, Matsuda Y, Takahashi T, Sato M, Kondo T	$\beta$ -Blocker Prevented Repeated Pulmonary Hypertension Episodes After Bilateral Lung Transplantation in a Patient With Primary Pulmonary Hypertension	J Thorac Cardiovasc Surg	128	793-794	2004
Okada Y, Matsumura Y, Shimada K, Sado T, Oyaizu T, Sugawara T, Matsuda Y, Hoshikawa Y, Takahashi H, Sato M, Kondo T	Anti-Allergic Agent Tranilast Decreases Development of Obliterative Airway Disease in Rat Model of Heterotopic Tracheal Transplantation	J Heart Lung Transplant	23	1392-1395	2004
Eishi Y	Propionibacteria as a cause of sarcoidosis	In "Sarcoidosis", ed. by Baughman R. Marcel Dekker, New York			2005 (in press)
Hagiwara S, Ohi H, Eishi Y, Kodama F, Tashiro K, Makita Y, Suzuki Y, Maeda K, Fukui M, Horikoshi S, Tomino Y	A case of renal sarcoidosis with complement activation via the lectin pathway	Am J Kid Dis			2005 (in press)
Ishige I, Eishi Y, Takemura T, Kobayashi I, Nakata K, Tanaka I, Nagaoka S, Iwai K, Watanabe K, Takizawa T, Koike M	<i>Propionibacterium acnes</i> as the most common bacterium commensal in peripheral lung tissue and mediastinal lymph nodes from subjects without sarcoidosis	Sarcoidosis Vasc Diffuse Lung Dis		22	2005 (in press)

発表者氏名	論文タイトル名	発表雑誌	巻名	ページ	出版年
Nishiwaki T, Yoneyama H, Eishi Y, Matsuo N, Tatsumi K, Kimura H, Kuriyama T, Matsushima K	Indigenous pulmonary Propionibacterium acnes primes the host in the development of sarcoid-like pulmonary granulomatosis in mice	Am J Pathol	165	631-639	2004
Uchida K, Nakata K, Trapnell BC, Terakawa T, Hamano E, Mikami A, Matsushita I, Seymour JF, Oh-Eda M, Ishige I, Eishi Y, Kitamura T, Yamada Y, Hanaoka K, Keicho N	High affinity autoantibodies specifically eliminate granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activity in the lungs of patients with idiopathic pulmonary alveolar proteinosis	Blood	103	1089-1098	2004
Inase N, Sakashita H, Ohtani Y, Sogou Y, Sumi Y, Umino T, Usui Y, Yoshizawa Y	Chronic bird fancier's lung presenting with acute exacerbation due to use of a feather duvet	Internal Medicine	43(9)	835-7	2004
Nishiwaki T, Yoneyama H, Eishi Y, Matsuo N, Tatsumi K, Kimura H, Kuriyama T, Matsushima K	Indigenous Pulmonary Propionibacterium acnes Primes the Host in the Development of Sarcoid-like Pulmonary Granulomatosis in Mice	Am J Pathol.	165	631-9	2004
Hashimoto S, Suzuki Y, Kasai Y, Morohoshi K, Yamada T, Sese J, Morishita S, Sugano S, Matsushima K	5'-end SAGE for the analysis of transcriptional start sites	Nat Biotechnol.	22	1146-9	2004
Takizawa H	Anti-inflammatory effects- Cytokines	Ruce K. Rubin and Jun Tamaoki, editors "Antibiotics as Anti-inflammatory and Immunomodulatory Agents" Birkhaeuser Verlag, Basel		77-86	2004
Desaki M, Okazaki H, Sunazuka T, Omura S, Yamamoto K, Takizawa H.	Molecular Mechanisms of Anti-Inflammatory Action of Erythromycin in Human Bronchial Epithelial Cells: Possible Role in the Signaling Pathway That Regulates Nuclear Factor-kappaB Activation.	Antimicrob Agents Chemother.	48(5)	1581-5	2004
Saito A, Takizawa H, Sato M, Suzuki K, Miyata T, Tazawa T, Nukiwa T, Morita Y.	Alpha-1 antitrypsin deficiency with severe pulmonary emphysema.	Intern Med.	43(3)	223-6	2004
Yamauchi Y, Okazaki H, Desaki M, Kohyama T, Kawasaki S, Yamamoto K, Takizawa H	Methotrexate induces interleukin-8 production by human bronchial and alveolar epithelial cells.	Clin Sci (Lond).	106(6)	619-25	2004
Jo T, Nagata T, Iida H, Imuta H, Iwasawa K, Ma J, Hara K, Omata M, Nagai R, Takizawa H, Nagase T, Nakajima T	Voltage-gated sodium channel expressed in cultured human smooth muscle cells: involvement of SCN9A.	FEBS Lett.	567 (2-3)	339-43	2004
Takahashi H, Hattori S, Iwamatsu A, Takizawa H, Shibuya M	A novel snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF) predominantly induces vascular permeability through preferential signaling via VEGF receptor-1	J Biol Chem.	279(44)	46304-14	2004