

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

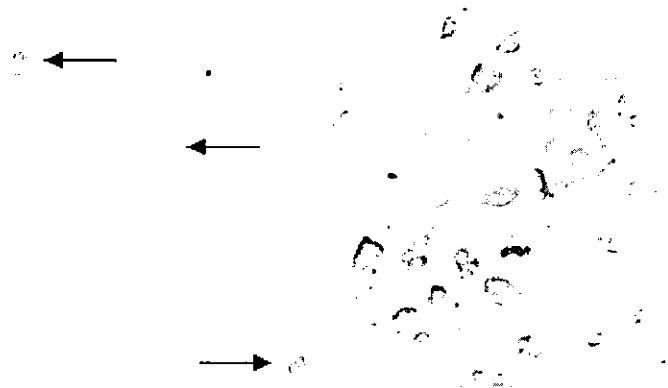


Figure 2 Characterization of lung SP cells. Sorted small/medium lymphocyte-like lung SP cells of bovines immunostained for cytokeratin 14 did not exhibit staining (left panel, arrows, original magnification $\times 200$). Sorted bovine lung SP cells were cultured on chamber slides with a 1:1 mixture of LHC9 and RPMI 1640 media. The cells spread and enlarged and were immunocytochemically positive for cytokeratin 14 at day 14 (right panel, original magnification $\times 200$)

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

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

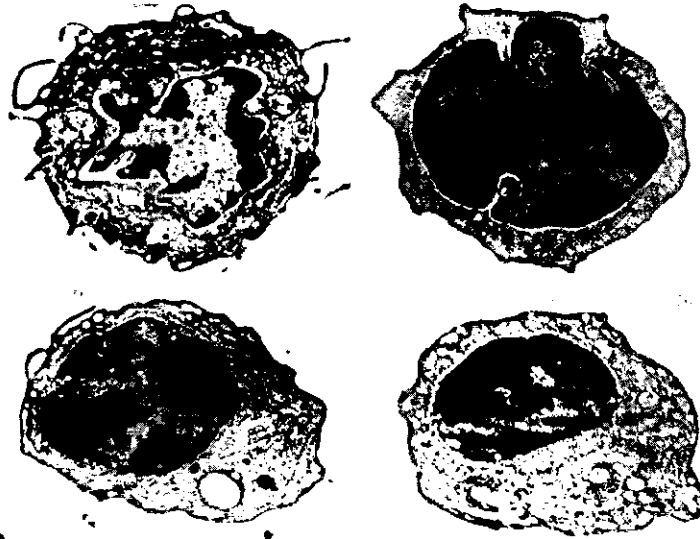


Figure 3 Electron microscopy of lung SP cells

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

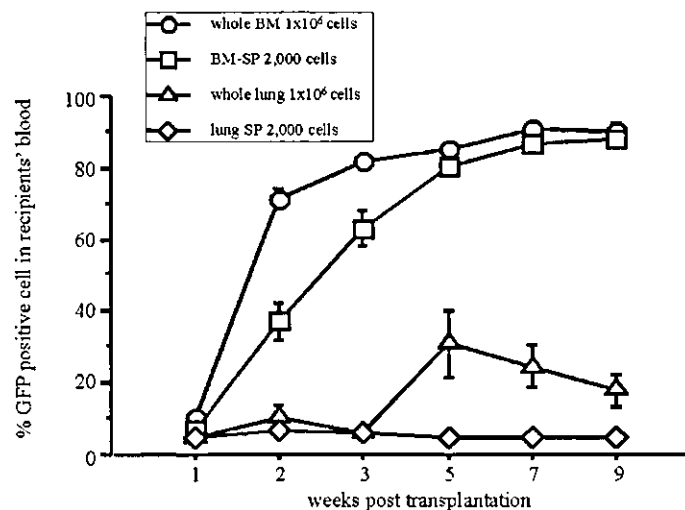


Figure 4 Detection of GFP positive cells in the blood post-transplantation to irradiated recipients.

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

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

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

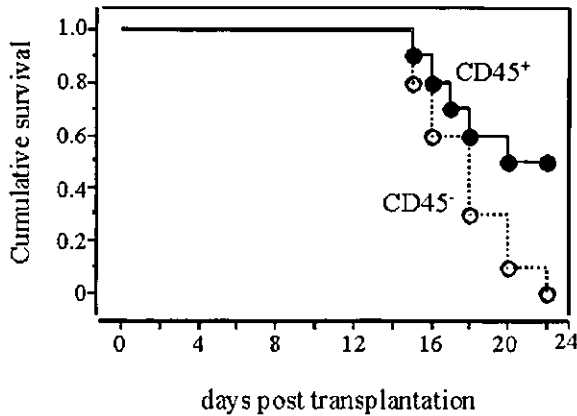


Figure 5 Survival by CD45+/- lung cells in irradiated recipients. CD45+lung cells (2.5×10^6) or CD45-lung cells (2.5×10^6) from EGFP mice were transplanted into irradiated (9.5 Gy) mice. Survival curves for CD45+/- lung cell transplanted mice ($n=10$, per group). Closed circles, CD45+ lung cell transplanted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

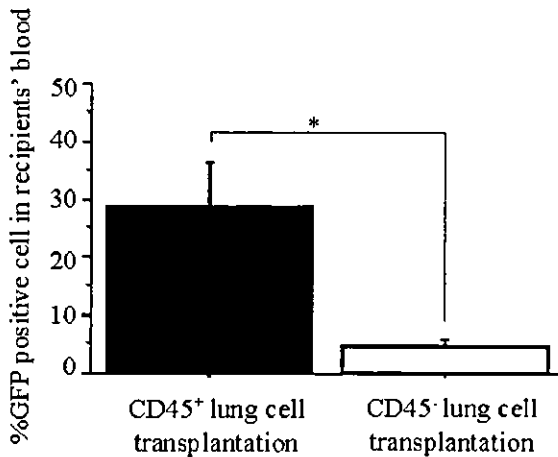


Figure 6 Lymphohematopoietic reconstitution by CD45+/- lung cells in irradiated recipients. At day 19 post-transplantation, the mice were bled retro-orbitally to assess engraftment in the blood. Data are expressed a percentage of the GFP positive cells in the recipients' blood. Each value represents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

参考文献

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

HGF による線維化肺組織修復における 骨髄由来幹細胞の役割

海老名雅仁 大河内眞也 太田 洋光 木村雄一郎
田澤 立之 貫和 敏博*

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

Respiratory Oncology and Molecular Medicine

Institute of Development, Aging and Cancer Tohoku University

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

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

背景

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

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

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

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

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

対象と方法

特発性肺線維症患者の生検肺の検討：

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

GFP マウス由来骨髄移植とプレオマイシン肺傷害：

Green fluorescent protein (GFP) マウス由来の骨髄細胞 (1 \times 10⁶ cells in 100 μ l) を採取し、あらかじめ 24 時間前に 8 Gy および 6 Gy を 3 時間間隔あけて照射して骨髄抑制をかけた C57BL/6 マウスに静脈注射を行った。骨髄移植後 4-6 週間後 C57BL/6 マウス (雌, 10-12 週齢) の気管内に 3 mg/kg のプレオマイシンを投与し、14 日後の肺の凍結切片を作成し、蛍光免疫染色にて観察した。蛍光免疫染色には抗 GFP モノクローナル抗体 (1/50, Clontech), 抗 CD34 モノクローナル抗体 (BD PharMingen), 抗 thrombomodulin ポリクローナル抗体 (1/20, Santa Cruz Biotechnology), および抗サイトケラチン 5&8 抗体 (Chemicaon) を用いた。

MAA-PEI+pCAG.HGF による HGF 遺伝子導入：

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

染のない MAA-PEI はベイラー大学 Orson 博士の提供を受けた。MAA-PEI+pCAG.HGF は $1\mu\text{g}$ の pCAG.HGF で作成し、day1, 4, 7 に C57BL/6 マウスの尾静脈より静脈注射を行った。

結果と考察

1. 特発性肺線維症肺における肺泡毛細血管構築変化

特発性肺線維症患者の外科的肺生検肺標本では CD34+/vWF- の肺泡毛細血管は線維化病変ではほとんど認められず、わずかに線維化病変の辺縁に分布しているのみであったのに対し、線維化病変周囲のあまり線維化すすんでいない領域では、血管の拡張と血管密度が増しているのが観察された (図 1A)。線維化病変では逆に CD34-/vWF+ の血管内皮細胞をもつ血管が線維化病変の中心部に分布している (図 1B)。トロンボモジュリンは、正常肺胞壁と異なり、線維症患者肺での発現は弱くなり、とくに線維化病変およびその近辺では発現を認めない (図 1C)。CD34/vWF の 2 重免疫染色に重ねて elastica-Masson 染色をおこない (図 1D)、さらに連続切片で CD34+/vWF- の肺泡毛細血管と CD34-/vWF+ の線維化病変内の血管を

観察すると、肺泡毛細血管が線維化内血管に連結しているのが観察される。連続切片で $12\mu\text{m}$ 毎の切片から、CD34+/vWF- および CD34-/vWF+ の血管内皮細胞を描出し、3次元画像解析装置を用いて肺胞壁の立体再構築をおこなった。その結果、線維化肺病変内の CD34-/vWF+ の血管内皮細胞をもつ血管は肺泡毛細血管と肺静脈をつなぐ血管であることが示された (図 2)⁹⁾。

2. 肺組織修復における骨髄由来幹細胞の役割

GFP トランスジェニックマウスの骨髄を移植してからプレオマイシンで肺障害をきたした後 14 日目の肺を、抗 GFP 抗体で染色して観察した (図 3)。その結果、肺泡マクロファージのほとんどが GFP 陽性であったのに加え、肺泡上皮細胞および肺泡毛細血管内皮細胞の一部が GFP 陽性である事を観察した。次に抗 CD34 抗体および抗トロンボモジュリン抗体を用いた蛍光免疫組織染色をおこない、GFP の発光との重なりを観察することで、GFP 陽性細胞の同定を試みた。また同様にして抗サイトケラチン抗体を用いて、GFP 陽性の上皮細胞の検出を試みた。またこれらの結果を、骨髄移植後に無処置の群を対照として、骨髄移植後にプレオマイシンで肺傷害をきたしたあと、

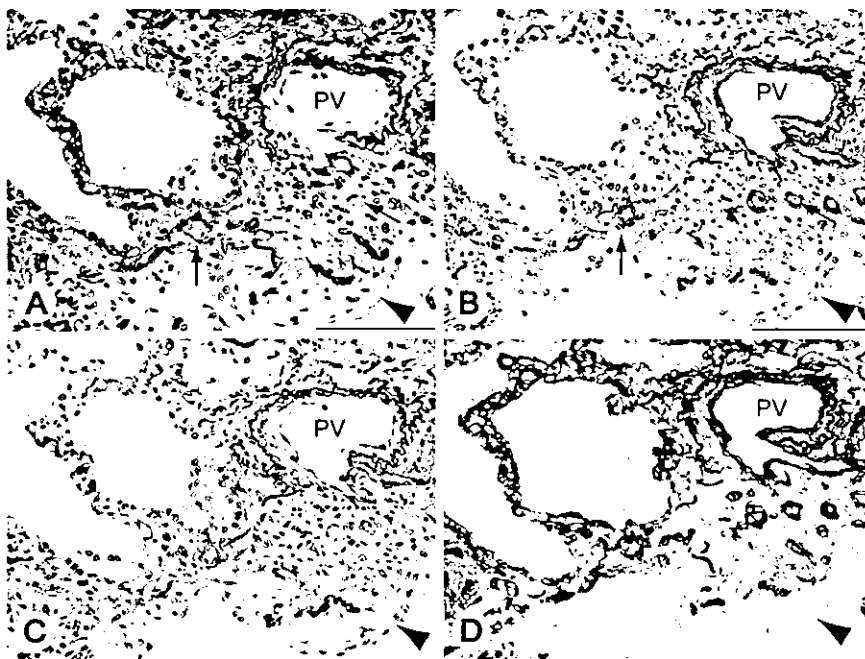


図 1 特発性肺線維症患者肺における毛細血管:

(A) 抗 CD34 抗体を用いた免疫染色に EM 染色を重ねた。CD34 陽性血管内皮細胞は、肺泡毛細血管によく認めるが、線維化病変では存在しない。(B) 抗 vWF 抗体による免疫染色に EM 染色。CD34 とは逆に線維化病変に vWF 陽性の内皮細胞をもつ血管が中心部にあることがわかる。(C) トロンボモジュリンは、正常肺では肺泡毛細血管に均質に産生されているが、炎症肺では全般に産生能が低下している。(D) CD34/vWF の 2 重免疫染色に EM 染色で、CD34 陽性内皮細胞と vWF 陽性内皮細胞は分布が異なることを確認した (A-D: 矢印は線維芽細胞巣、PV は肺動脈)。

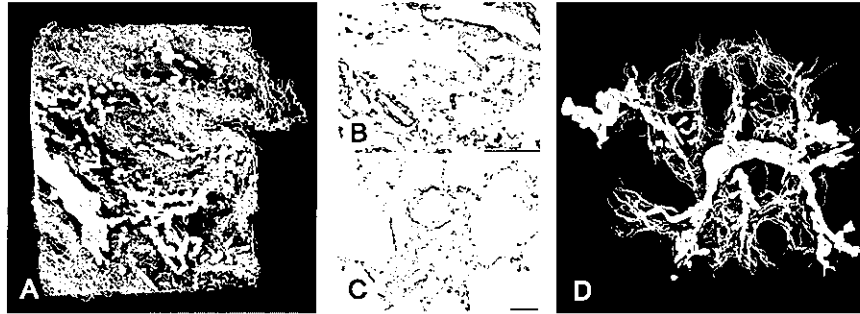


図2 肺胞壁の3次元再構築画像。
 (A-B): 特発性肺線維症患者肺標本の CD34/vWF の2重免疫染色に EM 染色を重ねた染色標本 (B) の連続的な画面を作成して立体再構築した。CD34 陽性内皮細胞をもつ肺胞毛細血管細胞は、線維化肺病変の中の vWF 陽性内皮細胞をもつ血管を介して、肺静脈に注ぐ。(C-D) 正常肺の肺胞壁 (C) も同様に立体画像再構築を行って、A と比較することにより、線維化肺では vWF 陽性内皮細胞をもつ血管が増加していることがわかる。

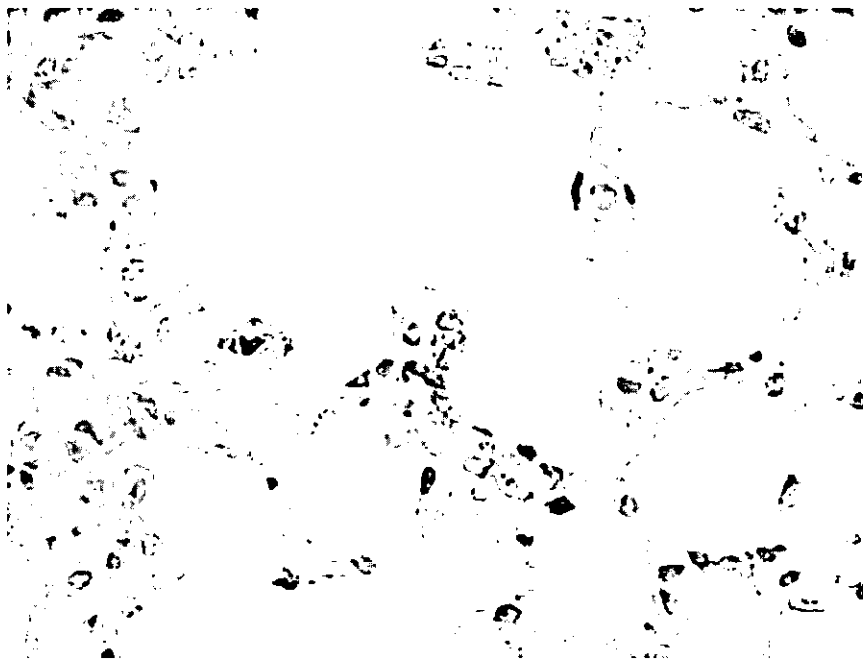


図3 プレオマイシン肺傷害後の GFP+骨髄幹細胞の分化
 GFP+マウスから骨髄移植をおこなったマウスにプレオマイシン肺傷害を起こしてから 14 日後の肺組織を、抗 GFP 抗体を用いた免疫染色で観察する。GFP 陽性の骨髄幹細胞は、肺胞上皮細胞や肺胞毛細血管細胞に分化している。

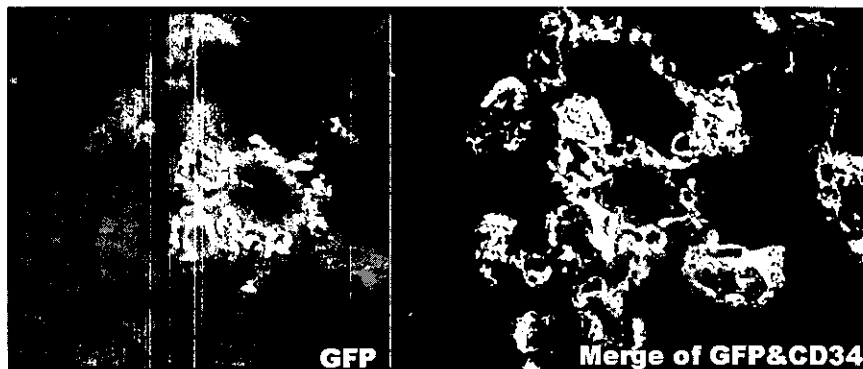


図4 プレオマイシン肺傷害後の CD34+/GFP+の毛細血管内皮細胞。
 プレオマイシン肺傷害後の CD34+/GFP+の毛細血管内皮細胞を蛍光免疫染色にて観察する。対照肺と比べ著しく増加している。HGF 遺伝子を導入するとこうした骨髄由来幹細胞から分化した毛細血管内皮細胞は減少する。

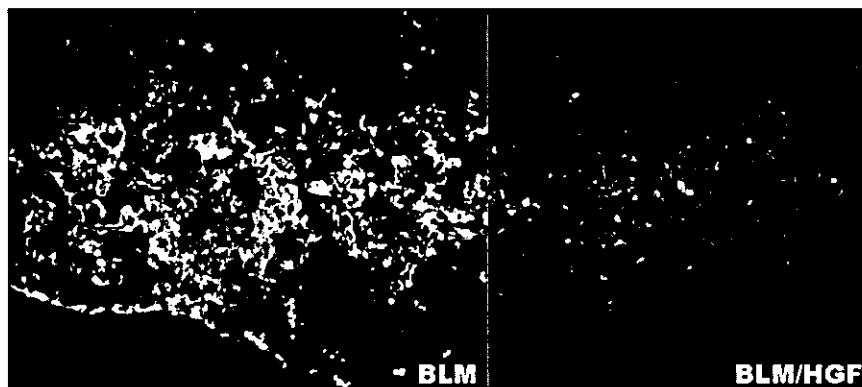


図5 プレオマイシン肺傷害後のCK+/GFP+の肺胞上皮細胞。

プレオマイシン肺傷害後のCK+/GFP+の肺胞上皮細胞を蛍光免疫染色にて観察する。対照肺と比べ著しく増加している。HGF遺伝子を導入すると肺胞毛細血管と同様に骨髄由来幹細胞から分化した肺胞上皮細胞は減少する。

day 1, 4, 7にHGFを導入した群とを比較した。GFP陽性骨髄移植のみではCD34やトロンボモジュリンを発現するGFP陽性内皮細胞はほとんど認めず、またサイトケラチンを発現するGFP陽性上皮細胞も稀であった。これに対し、プレオマイシン傷害後14日目の肺内にはCD34陽性内皮細胞(図4)やトロンボモジュリン陽性内皮細胞に加え、サイトケラチン陽性上皮細胞(図5)とも、対照肺と比較して有意に増加していた。また、プレオマイシン肺傷害後にHGF遺伝子を導入した群では、これらのGFP陽性の上皮細胞および内皮細胞は、対照肺よりはわずかに多いものの、プレオマイシン肺傷害のみの群よりは有意に減少していた。

結 論

特発性肺線維症患者肺の肺胞毛細血管は、線維化病変では減少し、その周囲の線維化していない領域では拡張し増殖している。MAA-PEI+pCAG.HGFによって導入されるHGF遺伝子も、このような肺胞毛細血管が循環している領域を対象としていることから、線維化抑制よりはむしろ抗アポトーシスによる損傷予防効果であることが示された。以前私どもが試みた、アデノウイルスベクターを介したデコリン遺伝子の気道内注入方が、線維化抑制するとともに炎症が遅延したこと⁴⁾、MAA-PEI+pCAG.HGFによる

HGF遺伝子導入はより臨床応用に適していることが推察された。

引用論文

- 1) Ebina M, Yaegashi H, Chiba R, Takahashi T, Motomiya M, Tanemura M. Hyperreactive site in the airway tree of asthmatic patients revealed by thickening of bronchial muscles. A morphometric study. *Am Rev Respir Dis.* 1990, 141: 1327-32.
- 2) Ebina M, Yaegashi H, Takahashi T, Motomiya M, Tanemura M. Distribution of smooth muscles along the bronchial tree. A morphometric study of ordinary autopsy lungs. *Am Rev Respir Dis.* 1990; 141: 1322-6.
- 3) 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.* 2004 Jan 30 [Epub ahead of print]
- 4) Shimizukawa M, Ebina M, Narumi K, Kikuchi T, Munakata H, Nukiwa T. Intratracheal gene transfer of decorin reduces subpleural fibroproliferation induced by bleomycin. *Am J Physiol* 284: L526-L532. 2003.

肺線維芽細胞における Fas 感受性の制御に関する検討

萩本 直樹 桑野 和善 吉見 通洋 前山 隆茂
中島 信隆 濱田 直樹 山田 瑞穂 中西 洋一*

肺傷害に続く肺線維化の過程において、肺線維芽細胞の肺胞腔内、間質での増殖は必要不可欠である。また、肺傷害後の正常な修復過程においては、肺胞腔内に滲出した肺線維芽細胞や炎症細胞の制御された細胞死とその吸収が必要と考えられる。従って、肺線維症の進展過程において、肺線維芽細胞の増殖と細胞死の機構を解明し、制御することは重要だと考えられる。我々は Fas を介する肺上皮細胞のアポトーシスが肺線維症の発症において重要であることを報告してきた。肺上皮細胞は Fas のアポトーシスシグナルに感受性を示し、肺線維症の病態においては肺上皮細胞の過剰なアポトーシスが観察される。このとき肺線維芽細胞は Fas のアポトーシスシグナルに対し抵抗性を示し、増殖を続けると考えられる。肺上皮細胞と肺線維芽細胞の Fas に対する感受性の差異とその制御機構の解明は重要と考えられる。

Regulatory mechanisms of the susceptibility to Fas on lung fibroblasts

Naoki Hagimoto, Kazuyoshi Kuwano, Michihiro Yoshimi, Takashige Maeyama
Nobutaka Nakashima, Naoki Hamada, Mizuho Yamada, and Yoichi Nakanishi

Research Institute for Diseases of the Chest, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

We have demonstrated previously that lung epithelial cell apoptosis induced by Fas ligation might be involved in fibrosing lung diseases. Fas is also constitutively expressed on lung fibroblasts, but in contrast to lung epithelial cells, fibroblasts are highly resistant to Fas-mediated apoptosis and may replace damaged epithelial cells. In this study, we examined the role of the extracellular-signal regulated kinase (ERK) in controlling the sensitivity of lung fibroblasts to Fas-mediated apoptosis. The treatment with agonistic anti-Fas antibody or recombinant Fas ligand did not induce apoptosis on primary cultured lung fibroblasts. Co-treatment with MEK inhibitor U0126 induced apoptosis dramatically, whereas co-treatment with the phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase) inhibitors LY294002 had no effect. Thus, suppression of ERK signaling sensitized lung fibroblasts to Fas-mediated apoptosis. Fas engagement to lung fibroblasts induced rapid activation of p44 (ERK1) and p42 (ERK2) without significant activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 MAPK, subsequently increased FLIP expression. Under conditions of suppressed ERK signaling by the treatment with U0126, Fas engagement could not increase the FLIP expression, and restoration of FLIP expression reversed the induced sensitivity of lung fibroblasts to Fas-mediated apoptosis. These data suggest that inhibition of Fas-mediated apoptosis via promotion of FLIP expression is a mechanism through which ERK signaling can promote lung fibroblasts survival. Finally we demonstrated collagen synthesis by Fas ligation on lung fibroblasts. This mechanism leading to the overgrowth of lung fibroblasts and collagen synthesis may participate in the pathogenesis of fibrosing lung diseases.

はじめに

肺線維症の発生過程において、肺胞上皮細胞傷害は普遍的に観察される。上皮細胞傷害に続いて基底膜の傷害、断裂が起こり、最終的に間質の線維芽細胞、炎症細胞が活性化され肺胞腔内に侵入し、肺胞腔内線維化が形成される。我々は肺線維症の発生機序における Fas system の重要性につき報告してきた。肺上皮細胞は Fas のシグナルに対し強い感受性を示し、アポトーシスに誘導され、epithelial drop 現象に強く関与しているが、肺線維芽細胞は Fas シグナルによるアポトーシス誘導には抵抗性を示し増殖を続ける。この際、FLICE-like inhibitor protein long form (FLIPL) が関与していることを以前報告した¹⁾。肺線維芽細胞は Fas の刺激に対して通常のカスパーゼカスケードを活性化せず、FLIPL を発現しアポトーシス抵抗性を獲得すると考えられる。

今回、我々は肺線維芽細胞の Fas 刺激による FLIPL 発現のメカニズムにおいて、MAP キナーゼの関与について検討した。さらに、Fas 刺激と MAP キナーゼ活性化を介したコラーゲン産生の関与についても検討した。

対象と方法

初代培養肺線維芽細胞 (Cryo NHLF)、細気管支上皮細胞 (Cryo SAEC) を用いフローサイトメトリーを用いて Fas の発現を検討した。次にアポトーシス誘導性の抗 Fas 抗体 (CH-11) を両細胞に処理し、アポトーシスに誘導されるか否かを同様にフローサイトメトリーにて比較検討した。このとき MEK インヒビター (U0126)、Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) のインヒビター (LY294002) の同時処理の効果につき検討した。細胞に CH-11 を処理し、経時的に MAP キナーゼファミリーの extracellular-signal regulated kinase (ERK)、c-Jun N-terminal kinase (JNK)、p38 MAPK、また Akt の発現動態につきウェスタンブロットを用いて解析した。また、FLIPL については、経時的発現と LY294002 と U0126 の同時処理における発現をウェスタンブロットを用いて解析した。肺線

維芽細胞に CH-11 と U0126 を同時処理した際のアポトーシス誘導に対して、アデノウィルスベクターを用いて FLIPL を遺伝子導入し、その抑制効果を確認した。Type I collagen の産生は、Cryo NHLF に CH-11 を 50 ng/ml, 100 ng/ml, 500 ng/ml で処理したもの、リコンビナント Fas ligand を 1 μ g/ml で処理したもの、これに TGF- β の中和抗体、Fas の中和抗体を同時処理したものを作製し、72 時間後に蛋白を抽出し、ウェスタンブロットを用いて解析した。

結 果

Cryo SAEC, Cryo NHLF ともに細胞表面には同程度の Fas を発現していたが (Fig. 1a), CH-11 によって、SAEC は NHLF に比し有意にアポトーシスに誘導された (Fig. 1b)。同様に、NHLF を CH-11 500 ng/ml で 12 時間処理しても有意なアポトーシスは誘導されなかったが、MEK inhibitor (U0126) 20 μ M を同時処理すると有意にアポトーシスが誘導された。PI3K inhibitor (LY294002) 単独、U0126 単独ではアポトーシスは誘導されなかった (Fig. 2)。NHLF に CH-11 500 ng/ml を処理し経時的に蛋白を抽出しウェスタンブロットを用いて MAPK, Akt の動態を観察すると、リン酸化 ERK は CH-11 処理 30 分から発現が増強し、2 時間まで持続した。すなわち、ERK は Fas ligation によって即時に活性化された (Fig. 3)。JNK, p38MAPK, Akt の活性化は認めなかった。次に同様に FLIPL の発現を解析すると、p-ERK の発現増強にやや遅れて 2 時間から発現が増強し、6 時間後では強い発現増強を認めた (Fig. 4a)。この発現増強は LY294002 の同時処理では抑制されず、U0126 の同時処理にて有意に抑制された (Fig. 4b)。アデノウィルスベクターを用いてあらかじめ FLIPL を遺伝子導入し、過剰発現させておくと CH-11, U0126 の同時処理によるアポトーシスは有意に抑制された (Fig. 5)。最後に、NHLF の Fas 刺激に対する Type I collagen 産生能を検討した。Type I collagen は CH-11 の濃度依存性に発現が増強され、U0126 の同時処理によって抑制された。また、Type I collagen 産生はリコンビナント Fas ligand 処理によっても発現が増強し、これは TGF- β の中和抗体によっては抑制されず、Fas の中和抗体によって抑制された。

九州大学大学院胸部疾患研究施設

* びまん性肺疾患調査研究班 研究協力者

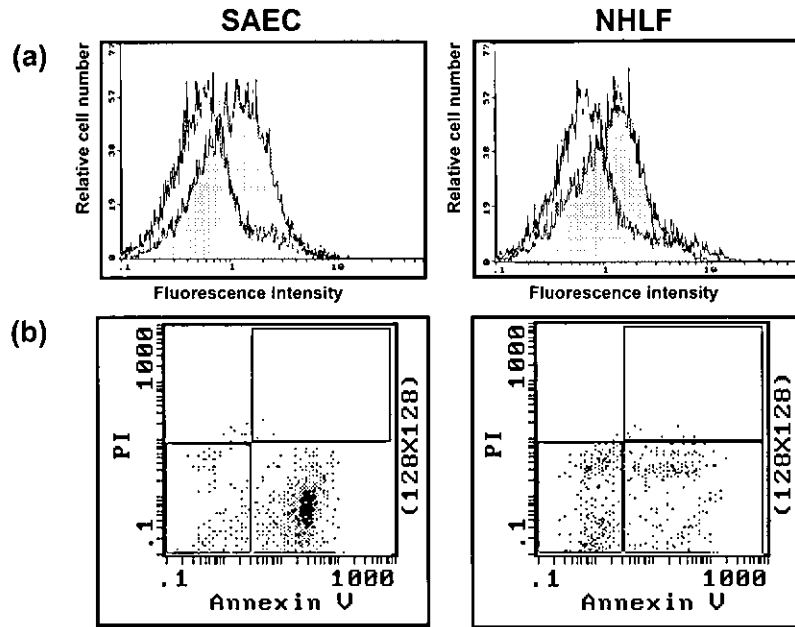


Fig. 1 Fas expression and the susceptibility to Fas-mediated apoptosis on SAEC or NHLF.
 (a) Flow cytometric analysis shows the Fas expression on SAEC and NHLF. Almost same amount of Fas is expressed on both SAEC and NHLF.
 (b) SAEC or NHLF was incubated with 500 ng/ml of CH-11 for 24 hr and then both of cells were stained by Annexin V-PI. The apoptosis rate was simultaneously measured with flow cytometry. 86% of SAEC was induced to apoptosis, but only a small proportion (8%) of NHLF was induced to apoptosis.

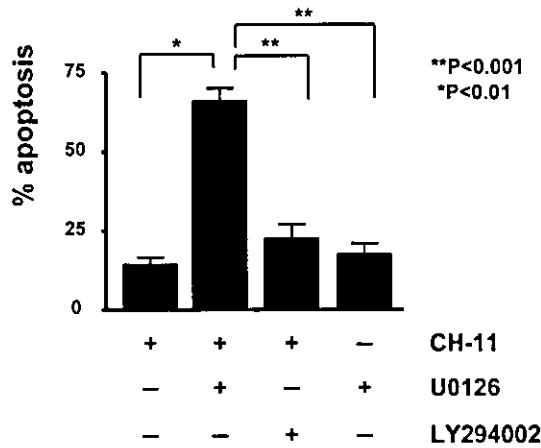


Fig. 2 Effect of MEK inhibitor on Fas-mediated apoptosis on NHLF. NHLF was incubated with CH-11 (500 ng/ml) with or without U0126 (20 μM) and LY294002 (20 μM), and then stained with Annexin V-PI. Co-incubation with CH-11 and U0126, but not LY294002, significantly induced apoptosis on NHLF. Results are shown as mean+SD of three experiments. **, $P < 0.01$, *, $P < 0.05$.

考 案

今回、我々は肺線維芽細胞における Fas engagement によるアポトーシスシグナルへの抵抗性獲得機構を中心に検討し、またその機構を介する異所性蛋白、特に線維化にとって重要な collagen 産生への関与につき検討した。初代培養肺線維芽細胞は以前報告したよ

うに¹⁾, Fas によるアポトーシスシグナルに対して抵抗性を示したが, ERK を阻害するとアポトーシスに対して感受性を獲得する。肺線維芽細胞では ERK は Fas engagement に対して 30 分から活性化し, さらに 6 時間後には FLIPL の発現増強を認めた。FLIPL の発現増強は ERK を阻害すると認められず, ERK シグナルを介した現象と考えられる。実際, ある種の細胞では Fas engagement により ERK 活性化を介して増殖することが報告されているし^{2),3)}, 血管内皮細胞では ERK 活性化を介した FLIPL の発現増強も報告されている⁴⁾。また, あらかじめ FLIPL を高発現させた細気管支上皮細胞では抗 Fas 抗体と MEK inhibitor を同時投与してもアポトーシスは誘導されず, このアポトーシス感受性獲得は抑制された。我々は以前に特発性肺線維症の患者において, 病巣の肺線維芽細胞に ERK⁵⁾, FLIPL¹⁾ の発現が増強していることを報告している。最後に Fas engagement による ERK 活性化を介する異所性蛋白産生に関して, 我々は collagen に着目した。Fas ligand と同じ Family である Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) は肺線維芽細胞に collagen 産生を誘導すること⁶⁾が報告されており, また collagen 産生に関しては ERK 活性化を介したシグナル経路が報告されてい

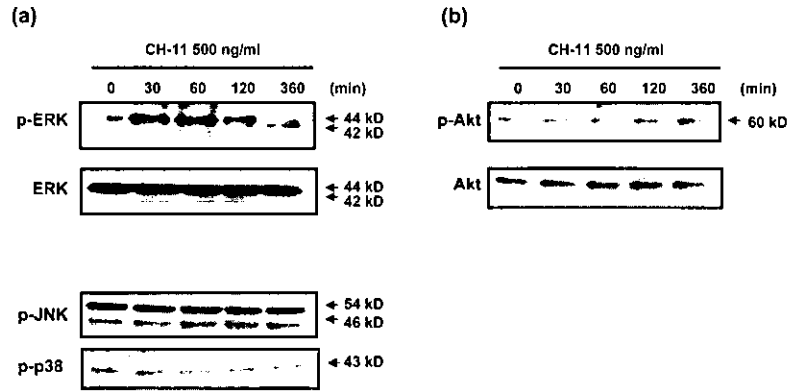


Fig. 3 The kinetics of the expression of MAPK and Akt induced by Fas engagement on NHLF. Western blot analysis shows that ERK was rapidly activated by CH-11 (500 ng/ml) treatment from 30 min to 120 min on NHLF. JNK, p38 MAPK or Akt were not activated by Fas-engagement.

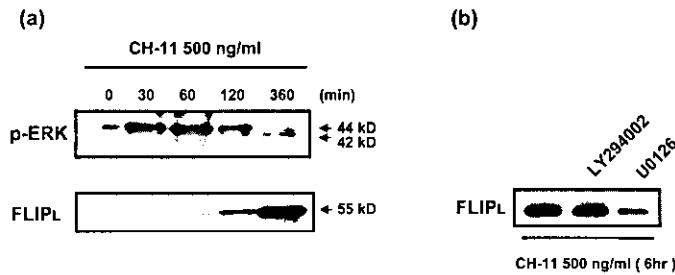


Fig. 4 FLIPL expression induced by Fas engagement on NHLF. (a) Western blot analysis shows that FLIPL expression was increased after ERK activation from 120 min on NHLF. (b) The increasing of FLIPL expression was significantly inhibited by the co-incubation with U0126, but not with LY294002.

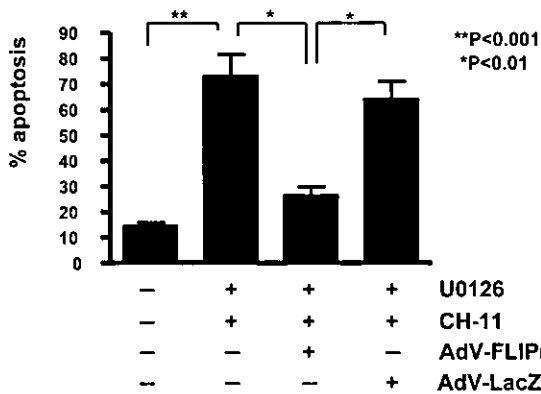


Fig. 5 Effect of AdV-FLIPL transfection on the MEK inhibitor-induced sensitivity to Fas on NHLF. For infection, 5×10^5 cells were grown to log phase and infected with adenoviruses at 10 pfu/cell. Forty-eight hours post-infection, the cells were treated with CH-11 (500 ng/ml) and U0126 (20 μ M) for 12 hr and analyzed by flow cytometry to quantify apoptosis. Restoration of FLIPL expression reversed the induced sensitivity of lung fibroblasts to Fas-mediated apoptosis. **, $P < 0.01$, *, $P < 0.05$.

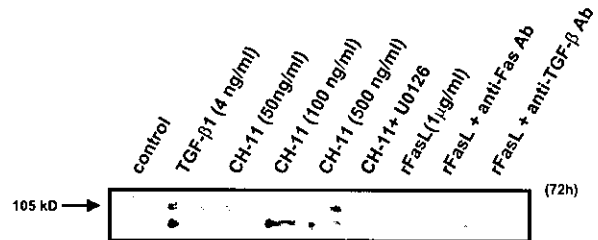


Fig. 6 Type I collagen expression induced by the treatment of CH-11 or recombinant Fas ligand. The identity of collagen bands was confirmed by sensitivity to pepsin digestion. The combined density bands indicate α -1 and α -2 band of collagen. Samples were loaded as follows: lane 1, control non-stimulated NHLF; lane 2, NHLF activated with 4 ng/ml TGF- β 1; lane 3-5, NHLF activated with 50, 100, 500 ng/ml CH-11, respectively; lane 6, NHLF co-incubated with CH-11 (500 ng/ml) and U0126 (20 μ M); lane 7, activated with recombinant Fas ligand (rFasL) (1 μ g/ml); lane 8, same as sample 7 incubated with anti-TGF- β neutralizing Ab; lane 9, same as sample 8 incubated with anti-Fas neutralizing Ab. Results shown are from one representative experiment from a total of 3 performed.

る⁷⁾。細気管支上皮細胞に抗 Fas 抗体あるいはリコンビナント Fas ligand を処理し 72 時間培養すると肺線維芽細胞に用量依存的に Type I collagen の産生が誘導され、これは MEK inhibitor により有意に阻害され

た。

これらのことより肺線維芽細胞は Fas engagement によって ERK シグナルを介し FLIP を発現することで Fas 抵抗性を獲得していると考えられる。また、一方で ERK 活性化を介して Type I collagen を産生し、

より線維化の足場固めをしていると考えられる。このことは肺上皮細胞が Fas によるアポトーシスシグナルに強感受性であることを考慮すると肺線維症の発生機序を考える上で非常に興味深い。

参考文献

- 1) Tanaka, T., M. Yoshimi, T. Maeyama, N. Hagimoto, K. Kuwano, and N. Hara. Resistance to Fas-mediated apoptosis in human lung fibroblast. *Eur Respir J* 20(2): 359-68, 2002.
- 2) Desbarats, J., R.B. Birge, M. Mimouni-Rongy, D. E. Weinstein, J.S. Palerme, and M.K. Newell. Fas engagement induces neurite growth through ERK activation and p35 upregulation. *Nat Cell Biol* 5(2): 118-25, 2003.
- 3) Shinohara, H., H. Yagita, Y. Ikawa, and N. Oyaizu. Fas drives cell cycle progression in glioma cells via extracellular signal-regulated kinase activation. *Cancer Res* 60(6): 1766-72, 2000.
- 4) Wang, W., C.Z. Prince, Y. Mou, and M.J. Pollman. Notch3 signaling in vascular smooth muscle cells induces c-FLIP expression via ERK/MAPK activation. Resistance to Fas ligand-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277(24): 21723-9, 2002.
- 5) Yoshida, K., K. Kuwano, N. Hagimoto, K. Watanabe, T. Matsuba, M. Fujita, I. Inoshima, and N. Hara. MAP kinase activation and apoptosis in lung tissues from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Pathol* 198(3): 388-96, 2002.
- 6) Yurovsky, V.V. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand enhances collagen production by human lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol* 28(2): 225-31, 2003.
- 7) Lim, I.J., T.T. Phan, E.K. Tan, T.T. Nguyen, E. Tran, M.T. Longaker, C. Song, S.T. Lee, and H.T. Huynh. Synchronous activation of ERK and phosphatidylinositol 3-kinase pathways is required for collagen and extracellular matrix production in keloids. *J Biol Chem* 278(42): 40851-8, 2003.

アロ免疫反応に伴う閉塞性気道病変形成に対する レシピエントマクロファージ除去の効果 —— ラット異所性気管移植モデルを用いて ——

小柳津 毅 岡田 克典 松村 輔二 島田 和佳
佐渡 哲 近藤 丘*

【研究背景】 肺移植は終末期呼吸器疾患患者に対する有効な治療法として確立されているが、国際統計による術後 5 年生存率は未だ 50% に満たず、長期成績の改善のためには解決すべき問題も多い。現在、肺移植患者の長期生存を妨げる最も大きな因子とされているのが、移植肺に発生する閉塞性細気管支炎 (Obliterative bronchiolitis; OB) であり、肺移植後の死因の約 1/3 を占めることが知られている。OB は、移植肺細気管支への炎症性細胞浸潤と細気管支内腔での線維性肉芽組織形成を特徴とする病態であり、近年、肉芽組織形成の過程に種々の Growth factor が関与すること、さらにその主要な産生細胞の一つがマクロファージであることが種々の臨床的・実験的研究から示唆されている。しかし、これまで、マクロファージの除去や機能抑制が、OB の発症を抑制するか否かについて検討した報告はなかった。【研究目的】 レシピエントのマクロファージを除去することで、OB の発生が抑制されるか否かについて、ラット異所性気管移植モデルを用いて検討する。【研究方法】 Brown Norway (BN) ラットをドナー、Lewis (LEW) ラットをレシピエントとする MHC incompatible の組み合わせで、異所性気管移植を行った。レシピエントラットに、マクロファージに特異的な機能抑制物質である塩化ガドリニウム (GdCl₃) を移植当日、移植後 7 日目、14 日目に静脈内投与した。コントロール群のレシピエントに対しては生理食塩水のみを投与した。気管グラフトの免疫染色で、ED2 陽性マクロファージ数が、移植後 17 日目には著明に減少していることが確認された。移植後 7 日目、14 日目、17 日目、および 21 日目で気管グラフトを採取し、組織学的検討を行った。GdCl₃ 投与群とコントロール群の組織像を半定量的に比較検討するために、(1) 単核球細胞浸潤、(2) 気道上皮の脱落、(3) 線維性肉芽組織によるグラフト内腔の閉塞、の 3 つのカテゴリーについて、それぞれ 0-4 の 5 段階にスコア化し評価した。また、グラフト内の Growth factor (PDGF-A, PDGF-B, bFGF, TGF- β 1) の発現を RT-PCR 法を用いて検索した。【研究結果】 GdCl₃ 投与の有無にかかわらず、グラフトへの単核球浸潤は、移植後 7 日目から 14 日目で顕著となり、以後減少した。グラフトの気道上皮は、移植後 7 日目では、ほぼ保たれていたが、14 日目には完全に脱落していた。単核球浸潤のスコアと気道上皮脱落のスコアには、どの時期においても GdCl₃ 投与群とコントロール群の間に差はみられなかった。これに対し、線維性肉芽組織による気管グラフト内腔の閉塞は、コントロール群で移植後 14 日目から次第に出現し、21 日目には顕著となったのに対し、GdCl₃ 投与群では閉塞の程度は軽度であった。移植後 21 日目における気管グラフトの閉塞スコアは、コントロール群 3.00 \pm 0.49 に対し、GdCl₃ 投与群 1.43 \pm 0.30 で両群間に有意差を認めた。気管グラフトにおける Growth factor の発現は、移植後 17 日目にコントロール群に比して GdCl₃ 投与群で PDGF-A および PDGF-B の発現が低下していた。【結論】 以上の結果から、本モデルにおける線維性肉芽組織による閉塞性気道病変の形成にマクロファージが関与しており、レシピエントにマクロファージの除去と機能抑制をもたらす GdCl₃ を投与することで、閉塞性気道病変の形成が抑制されることが明らかになった。GdCl₃ 投与群では、PDGF の mRNA の発現がコントロール群に比べ低下しており、PDGF が、GdCl₃ 投与群とコントロール群との間の組織学的な相違の形成に関与した可能性がある。本研究の結果から、T リンパ球の機能制御を主体とする現在の免疫抑制療法にマクロファージをターゲットとした免疫抑制を組み合わせたことが、肺移植後閉塞性細気管支炎の予防と治療における端緒となり得る可能性が示された。

Depletion of Recipient Macrophages by Gadolinium Chloride Prevents Development of Obliterative Airway Disease in a Rat Model of Heterotopic Tracheal Transplantation

Takeshi Oyaizu, Yoshinori Okada, Yuji Matsumura, Kazuyoshi Shimada,
Tetsu Sado, and Takashi Kondo

Department of Thoracic Surgery, Institute of Development, Aging, and Cancer, Tohoku University

Background : Obliterative bronchiolitis (OB) is one of the major obstacles to long-term survival of lung transplant recipients. Although detailed pathogenesis of OB remains unclear, substantial evidences suggest that OB is the result of tissue repair and remodeling in response to airway injury which was primarily caused by alloimmune response. Recent studies have shown the possible role of growth factors such as PDGF and bFGF in this process and the involvement of macrophages as one of the sources of these growth factors. **Objective :** We intended to determine whether depletion of recipient macrophages by gadolinium chloride ($GdCl_3$) resulted in decreased obliterative airway disease in a rat model of heterotopic tracheal transplantation. **Methods :** A tracheal segment of donors was transplanted into a subcutaneous pouch of recipients between a fully MHC incompatible combination of rats (BN → LEW). Recipient animals were intra-venously injected with 80 mg/kg of $GdCl_3 \cdot 6H_2O$ on day 0, 7, 14 post-transplant. Control animals received saline instead of $GdCl_3$. Allografts were harvested on day 7, 14, 17, 21 and the degree of (1) mononuclear cell infiltration, (2) airway lining epithelial loss and (3) luminal obliteration due to fibroproliferative tissue was pathologically examined and scored on a scale of 0-4 as previously described. A portion of allografts was submitted to RT-PCR analysis to examine mRNA levels for PDGF, bFGF and TGF- β 1. **Results :** Immunohistochemical studies of allografts confirmed significantly reduced ED2 positive macrophages in tracheal allografts in the $GdCl_3$ -treated animals compared to the controls. $GdCl_3$ injection did not change the time course of lymphocytic infiltration and epithelial loss, however, significantly decreased the degree of luminal obliteration of allografts by fibroproliferative tissue, with histological score of 1.4 ± 0.3 in the treated animals compared with 3.0 ± 0.5 in the controls (mean \pm SE, $p < 0.05$). mRNA expression of PDGF-A and PDGF-B was significantly decreased in the $GdCl_3$ group. **Conclusion :** Treatment of recipients with $GdCl_3$ significantly reduced macrophage infiltrates in the allografts, and this was accompanied by significantly reduced fibroproliferative airway changes and by significantly decreased PDGF mRNA levels in the tracheal allografts. This suggests the possible role of macrophages in the pathogenesis of OB after lung transplantation. **Key Words :** Lung transplantation, Obliterative bronchiolitis, Macrophage, Growth factor, Platelet-derived growth factor (PDGF)

東北大学加齢医学研究所呼吸器再建研究分野

* びまん性肺疾患調査研究班 分担研究者

緒 言

肺移植は終末期呼吸器疾患に対する有効な治療法として欧米を中心に広く普及しており^{1,2)}、本邦でも脳死肺移植・生体肺移植ともに臨床例が次第に増加しつつある³⁾。しかし、肺移植が適応症例の多くに予後とQOLの改善をもたらす治療法であることは一般に認められているものの、国際登録データによる移植後の5年生存率は約50%に留まっており³⁾、長期成績の向上を目指す上では未だ解決すべき問題も多い。

現在、肺移植患者の長期生存を妨げる最も大きな因子とされているのが、移植肺に発生する閉塞性細気管支炎 (obliterative bronchiolitis; OB) である^{1,2,4)}。OBは、通常移植後3ヶ月以降に見られる病態で、肺移植患者の約半数に発症し、その死因の約1/3を占める。生理学的には閉塞性呼吸機能障害として表れ、病理学的には移植肺細気管支への炎症性細胞浸潤と細気管支内腔での線維性肉芽組織形成を特徴とする⁵⁾。

OBの発生機序として、現在、最も有力視されているのは、いわゆる“response to injury theory”である。これは、何らかの原因による移植肺気道上皮の傷害、脱落とこれに対する過剰反応として発生する細気管支内腔への線維性肉芽組織形成が、その病態の本質であるとするものである¹⁾。このうちモ injury モに関与する因子としては、アロ免疫反応が最も有力視されており、この観点から、OBは移植肺における慢性拒絶反応と考えられている。一方、“response”の過程に関与すると考えられているものの中には、platelet-derived growth factor (PDGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), transforming growth factor (TGF- β) 等の growth factor がある¹⁾。これは、これら growth factor がOBを発症した患者群の気管支肺胞洗浄液中で非発症群に比べ増加している所見や^{6,7)}、動物モデルにおいて、PDGFやbFGFの局所投与によって、OBに類似した閉塞性気道病変が形成される実験的な知見に基づくものである⁸⁾。

これらの growth factor は、様々な細胞から産生されることが in vitro, in vivo で確認されている。OB発生の過程でこれらの growth factor の産生に主たる役割を果たしていると推測されているのものの一つにマクロファージがある。Hertz ら⁹⁾は、OBを発症した患者の生検あるいは剖検標本を用いて PDGF の局在を免疫染色と in situ hybridization で、その主要な産生細

胞はマクロファージであったとしている。また、Magnan ら⁹⁾は、OBを発症した患者においては、肺胞マクロファージからの TGF- β の分泌がOBを発症していない患者に比べ有意に亢進していることを示している。しかし、これら間接的な知見が多数あるにもかかわらず、これまで、マクロファージの除去や機能抑制が、OBの発症を抑制するか否かについて直接検討した報告はない。

そこで、本研究では、マクロファージの除去がOBの発生抑制につながる可能性があるか否かにつき、動物実験モデルを用いて検討した。実験には、ラット異所性気管移植モデルを用いた。これはアロ免疫反応に伴い再現性をもってOBに類似した閉塞性気道病変を形成するモデルであり、現在OBの実験モデルとして最も多用されている^{10,11)}。マクロファージ除去には、選択的に種々の組織のマクロファージを除去し、生体にマクロファージ機能不全の状態をもたらすことが知られている、塩化ガドリニウム (GdCl₃) を使用した^{12,13)}。併せて、気管グラフトにおける growth factor の mRNA の発現を reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) 法を用いて検索し、GdCl₃投与群とコントロール群で比較検討した。

方 法

1. 実験動物

8~10週齢の雄性 Brown Norway (BN) ラット (RT¹⁾) ならびに Lewis (LEW) ラット (RT¹⁾) を使用した。ラットは全て Japan SLC, Inc. (Shizuoka, Japan) より購入し、東北大学加齢医学研究所動物実験施設で飼育・管理した。動物の取り扱い「東北大学における動物実験に関する指針 (平成6年9月13日一部改訂)」によった。

2. 実験モデル

BNラットをドナー、LEWラットをレシピエントとするMHC不適合の組み合わせで、異所性気管移植を行った。前述の如く、マクロファージの除去にはGdCl₃を用いた。予備実験の結果から、無処置LEWラットにGdCl₃・6H₂Oを80mg/kg静脈内投与することで、投与後7日目の脾臓におけるED1陽性細胞が58%、ED2陽性細胞が61%減少することが確認されたことから、本実験では、80mg/kgを7日毎に静脈内投与することとした。なお、ED1はラットマクロファ

ジ細胞質抗原, ED2 はラットマクロファージ細胞膜抗原である。

3. 実験群

実験群は、レシピエントに対し気管移植直後、移植後7日および14日目に80 mg/kgのGdCl₃・6H₂Oの静脈内投与を行ったGdCl₃投与群と、生理食塩水のみを投与したコントロール群の2群とした。本実験で用いたラット異所性気管移植モデルにおいては、閉塞性気道病変が移植後21日目でほぼ完成することが報告されていることから¹¹⁾、両群のレシピエントを、移植後7日、14日、17日および21日目で犠牲死させ、気管グラフトを採取して、以下に記載する方法で、グラフトの組織学的所見、免疫組織学的所見、ならびにgrowth factorのmRNAの発現について検討した。7日、14日および17日目でのご検討は両群それぞれn=4～6、21日目の検討は両群n=7で行った。

4. ドナー手術

ドナーラットをpentobarbital sodium, (50 mg/kg)の腹腔内投与により麻酔し、仰臥位に固定した。正中線上に頸部から前胸部に至る皮切を加え、気管上部を露出した。さらに胸骨縦切開を加え、気管を心臓・肺とともに摘出した。気管を全長にわたり切離し、二等分して気管グラフトを作製した。

5. レシピエント手術

レシピエントラットをドナーラットと同様に麻酔し、腹臥位に固定した。後頸部から背部にかけて剃毛と消毒を行った後、後頸部の正中線をはさんだ左右にそれぞれ5 mm程度の皮切を加えて、長径10 mm、短径5 mm程度の皮下ポケットを一つずつ作製した。二等分したグラフトが屈曲しないように左右の皮下ポケットにそれぞれ一つずつ挿入した。ポケット入口部は、4-0絹糸で縫合閉鎖した。

6. 気管グラフトの拒絶反応ならびに内腔閉塞に関する組織学的検索

ラットを犠牲死させ採取した左右の気管グラフトの一方を組織学的検索に用いた。取り出したグラフトは、ホルマリンで2日間固定した後、グラフトの中心で長軸と垂直に半切した。これをパラフィンに包埋後、断面から薄切しhematoxylin-eosin染色およびelastica-Masson染色を行った。グラフトの拒絶反応ならびに気道内腔の線維性肉芽組織形成の程度に関し、Boehlerら¹¹⁾の報告に準じて、以下の(1)～(3)の所見について、それぞれ0～4段階にスコア化した。スコア

化は、2人の研究者がそれぞれブラインドで行い、スコアが一致しない検体については、その平均をその検体のスコアとした。(1) 単核球浸潤: 0=細胞浸潤なし、1=いくつかの血管におけるわずかな血管周囲への細胞浸潤、2=ほとんど全ての血管における血管周囲と周囲結合織への細胞浸潤、3=気管グラフト壁全体へのびまん性の軽度ないし中等度の細胞浸潤、4=気管グラフト壁全体へのびまん性の高度な細胞浸潤。(2) 気道上皮の脱落: 0=脱落なし、1=全周の25%以下の脱落、2=全周の26～50%の脱落、3=全周の51～75%の脱落、4=全周の76%以上の脱落。(3) 線維性肉芽組織によるグラフト内腔の閉塞: 0=閉塞なし、1=内腔の面積の25%以下の閉塞、2=内腔の面積の26～50%の閉塞、3=内腔の面積の51～75%の閉塞、4=内腔の面積の76%以上の閉塞。

7. 免疫組織学的検索

グラフト浸潤細胞中のマクロファージ数ならびにT細胞数の経時的変化を両群間で比較検討するために、免疫組織学的検索を行った。染色には、マウス抗ラットED1, ED2, CD4, CD8モノクローナルIgG抗体(Serotec; Oxford, UK)を用いた。抗体の希釈倍率は、予備実験の結果からED1: 200倍、ED2: 100倍、CD4: 100倍、CD8: 200倍とした。negative controlとして、マウスIgG(Serotec; Oxford, UK)を用い、染色がないことを確認した。

ホルマリン固定後パラフィン包埋した標本から、2.5 μm厚の切片を切り出し、各切片の脱パラフィン後、オートクレーブ処理またはマイクロウェーブ処理で抗原の賦活化を行った。免疫染色は、ヒストファイブキット(SAB-(M), Nichirei; Tokyo)を用いて行い、hematoxylinで核染色を行った。

各プレパラートを400倍で検鏡し、ED1, ED2, CD4およびCD8陽性細胞を、それぞれランダムに選択した10視野でカウントし、その合計を結果として表示した。

8. 気管グラフトにおけるgrowth factorのmRNA発現

採取したグラフトの他方は液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。mRNAの発現はPDGF-A, PDGF-B, bFGFおよびTGF-β1について検索した。RNAの抽出は、RN easy Mini Kit(Qiagen; Hilden, Germany)を用い、吸光度測定と1.5%アガロースゲル泳動により収量を評価した。cDNAは、抽出RNA 3

μgより Superscript Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis (Life Technologies; Carlsbad, CA) を用いて作製した。PCRは各サンプル毎に cDNA 1 μl と AmpliTaq, 10×PCR Buffer (Perkin-Elmer; Wellesley, MA), dNTP (TOYOBO; Osaka) を使用し, Gene Amp PCR System 9600 (Perkin-Elmer; Wellesley, MA) を用いて行った。95°C, 60秒の加熱後, Cyclophilin; 95°C, 30秒-60°C, 30秒-72°C, 60秒, PDGF-A; 94°C, 30秒-55°C, 30秒-72°C, 60秒, PDGF-B; 94°C, 30秒-55°C, 30秒-72°C, 30秒, bFGF; 94°C, 60秒-64°C, 90秒-72°C, 120秒, TGF-β1; 95°C, 30秒-60°C, 30秒-72°C, 60秒をそれぞれ1サイクルとし, それぞれについて PCR 産物が飽和しないサイクル数を確認した。その結果, Cyclophilin; 25サイクル, PDGF-A; 25サイクル, PDGF-B; 25サイクル, bFGF; 25サイクル, TGF-β1; 30サイクルで PCR を行うこととした。各サイトカインのプライマーは以下のように設定した。Cyclophilin; Sense 5' GTG-ACT-TCA-CAC-GCC-ATA-ATG-GC, Anti-sense 5' GGT-GCT-CTC-CTG-AGC-TAC-AGA-AGG, PDGF-A; Sense 5' AGA-AGT-ATT-GAG-GAA-GCC-ATT-CC, Anti-sense 5' TCA-CCT-GGA-CCT-CTT-TCA-ATT-T, PDGF-B; Sense 5' CTG-AGC-TGG-ACT-TGA-ACA-TGA-C, Anti-sense 5' CAC-TAC-TGT-CTC-ACA-CTT-GCA-GG, TGF-β1; Sense 5' CCA-ACT-ACT-GCT-TCA-GCT-CC, Anti-sense 5' AGC-TGC-ACT-TGC-AGG-AGC, bFGF; Sense 5' TCA-CTT-CGC-TTC-CCG-CAC-TG, Anti-sense 5' CCA-GCA-GCC-GTC-CAT-CTT, PCR 生成物はサイズマーカー (1 Kb Plus DNA Ladder, Life Technologies; Carlsbad, CA) とともに 1%アガロースゲル泳動後, エチジウムブロマイド溶液 (1 μg/ml) で 20分間染色を行った。染色後のゲルを CCD イメージアナライザー (FAS (企), TOYOBO; Osaka) で観察し, Digital 画像として保存した後 NIH Image 1.62 の Gel Plotting Macros を用いて各バンドの density を定量化した。サンプルごとの各 growth factor の発現は内部コントロールである cyclophilin との比で補正した。

9. 統計処理

組織学的スコア, グラフト浸潤細胞各分画の細胞数, グラフトにおける growth factor の mRNA 発現

は全て平均±SE で表した。GdCl₃ 投与群とコントロール群との差の検定には Mann-Whitney の U 検定を用い, 危険率 5% 以下を有意差ありとした。

結 果

1. GdCl₃ 投与に伴う気管グラフト内の ED1, ED2, CD4, CD8 陽性細胞数の変化

ED1 陽性細胞数は, 両群において移植後 7 日目に最も多く, 14 日目以降は減少した。21 日目でコントロール群に比べ GdCl₃ 投与群で ED1 陽性細胞数が有意に (p=0.02) 増加していた。ED2 陽性細胞数は, 両群において移植後 7 日, 14 日, 17 日目と次第に増加し, 21 日目では著明に減少した。両群を比較すると, 移植後 14 日, 17 日目において, GdCl₃ 投与群ではコントロール群の値に比し, ED2 陽性細胞数がそれぞれ 75%, 70% 減少しているのが観察され, 17 日目で両群間に統計学的に有意差 (p=0.02) が認められた (図 1)。

CD4 陽性細胞数は, 移植後 7 日, 14 日, 17 日目と次第に増加し, 21 日目には再び減少していた。CD8 陽性細胞数は, 移植後 7 日から 14 日目にかけて増加し, 17 日, 21 日目で著明に減少した。CD4 および CD8 陽性細胞はどの時期においても, コントロール群と GdCl₃ 投与群との間で有意差を認めなかった (図 2)。

2. 気管グラフトの組織学的検索

グラフトへの単核球浸潤は, 移植後 7 日目が最も顕著であり, 以後次第に減少した。単核球浸潤のスコアには, コントロール群と GdCl₃ 投与群の間で, いずれの時期においても有意差はなかった (図 3, A)。また, グラフト気道上皮の脱落は, 移植後 7 日目ではほとんどみられないのに対し, 14 日目では, 全周にわたり脱落していた。気道上皮脱落のスコアには, コントロー

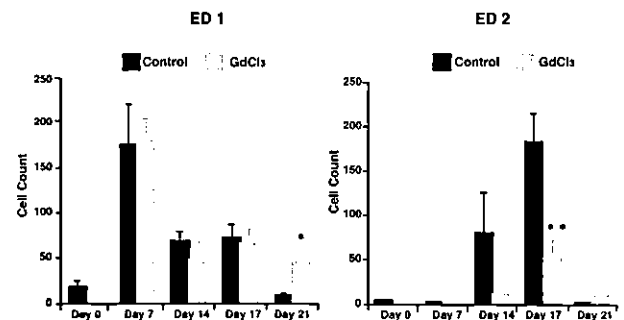


図 1 GdCl₃ 投与群およびコントロール群における気管グラフトの ED1, ED2 陽性細胞数の経時的変化。* および ** は, 2 群間での統計学的有意差 (ともに p=0.02) を表す。

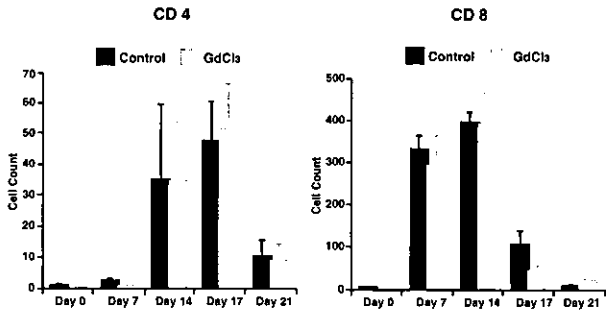


図2 GdCl₃ 投与群およびコントロール群における気管グラフトの CD4, CD8 陽性細胞数の経時的変化。

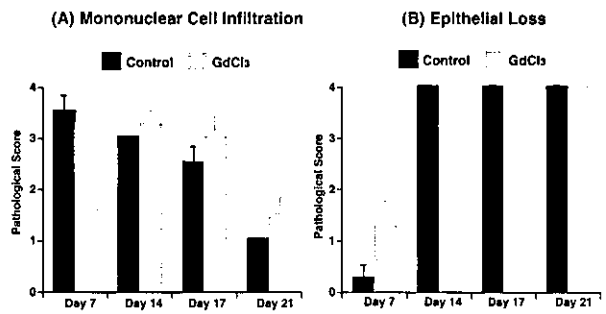


図3 気管グラフトの組織学的スコアの変化 (A: 単核球浸潤, B: 気管上皮の脱落)。

ル群と GdCl₃ 投与群との間で、いずれの時期においても有意差はなかった (図 3, B)。一方、線維性肉芽組織によるグラフト内腔の閉塞は、コントロール群では移植後 14 日目から出現し 17 日, 21 日目と次第に顕著になったのに対して、GdCl₃ 投与群では、内腔閉塞の進展がコントロール群に比べ軽度で、閉塞の程度を表すスコアは移植後どの時期においてもコントロール群に比べ低い値を示した。移植後 21 日目における、内腔閉塞のスコアは、コントロール群が 3.00±0.49 に対し GdCl₃ 投与群では 1.43±0.30 で、両群間に有意差 (p=0.02) を認めた (図 4)。

3. 気管グラフトにおける growth factor の mRNA 発現

GdCl₃ 投与により気管グラフトの ED2 陽性細胞数が著明に減少した移植後 17 日目における PDGF-A, PDGF-B, bFGF, TGF-β1 の発現を RT-PCR 法で検索した。PDGF-A および PDGF-B の mRNA の発現は、GdCl₃ 投与群でコントロール群に比べ有意に (p=0.04 および p<0.05) 低下していた (図 5)。bFGF の mRNA 発現も、GdCl₃ 投与群でコントロール群に比べ density は低い値を示したが、有意差には至らなかった (p=0.08)。TGF-β1 の発現には両群間で有意差を認めなかった。

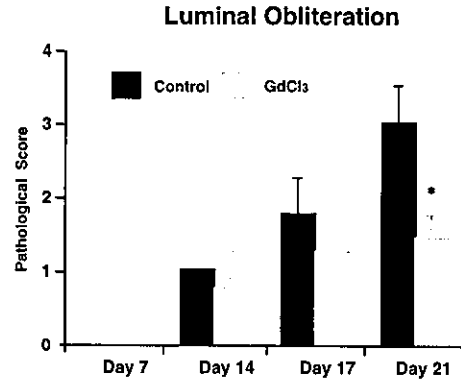


図4 気管グラフトの組織学的スコアの変化 (線維性肉芽組織によるグラフト内腔の閉塞)。* は、2 群間での統計学的有意差 (p=0.02) を表す。

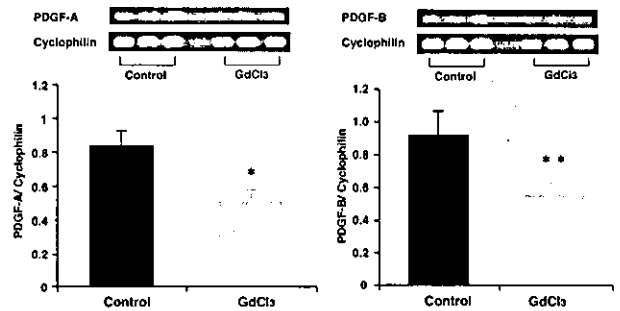


図5 気管グラフトにおける、PDGF-A および PDGF-B の mRNA の発現 (RT-PCR 法)。下段は、バンドの density を定量化し、内部コントロール cyclophilin の mRNA 発現との比で表示したもの。* および ** は 2 群間での統計学的有意差 (*: p=0.04, **: p<0.05) を表す。

考 察

本実験の結果から、異所性気管移植モデルにおいて、レシピエントへ GdCl₃ を投与することにより、閉塞性気道病変の形成がコントロール群に比べ有意に抑制されることが明らかになった。このことは、アロ免疫反応に伴う気道上皮傷害に引き続いて発生する線維性肉芽組織の形成にマクロファージが関与する可能性を示している。マクロファージ除去に伴い OB の発症が抑制されたという報告はこれまで見られないが、Fahrni ら¹²⁾ は、新しい免疫抑制薬である rapamycin がマウス異所性気管移植モデルにおける閉塞性気道病変の発症を抑制し、これに先立ってグラフトへのマクロファージの浸潤が減少していたことを報告している。Azuma ら¹³⁾ は、Gamma lactone 投与によるマクロファージ除去によって、ラット腎移植モデルにおける慢性拒絶反応の発症が完全に抑制されることを報告している。

上記の結果におけるマクロファージ由来の growth factor の関与を検索するために、RT-PCR 法を用いて、気管グラフトにおける PDGF-A, PDGF-B, bFGF, TGF- β 1 の mRNA の発現をコントロール群と GdCl₃ 投与群とで比較検討した。実験結果から、移植後 17 日目においては、PDGF-A ならびに PDGF-B の mRNA の発現が、コントロール群に比べ GdCl₃ 投与群で有意に低下していることが明らかになった。有意差には至らなかったが、bFGF の mRNA の density も、GdCl₃ 投与群でコントロール群に比較し低い値を示した。これらの結果からは、GdCl₃ の投与により気管グラフトへのマクロファージの浸潤が抑制され、これが直接マクロファージ由来の growth factor の mRNA の発現低下につながった可能性が第一に考えられる。一方、PDGF 等の growth factor は、線維芽細胞に働きかけ、線維芽細胞由来の growth factor の産生・分泌をも促すことが知られていることから¹⁴⁾、GdCl₃ 投与群における growth factor の mRNA 発現抑制は、マクロファージのみならず、線維芽細胞における発現抑制も含む結果全体を反映している可能性もある。Kouwenhoven ら¹⁵⁾ は、ラット小腸移植慢性拒絶反応モデルにおいて、慢性拒絶反応が出現する時期にグラフトに bFGF の発現が亢進することを示し、bFGF の主要な産生細胞は ED2 陽性マクロファージであったとしている。この実験で検索されたのは bFGF のみで、PDGF や TGF- β の発現に関しては検討されていないが、移植臓器の慢性拒絶反応におけるマクロファージ由来の growth factor の関与を示した点で、我々の研究結果と一致する。なお、TGF- β 1 の mRNA 発現には両群間で差がみられず、本モデルにおける閉塞性気道病変形成の過程には重要な役割を果たしていないものと推測された。

まとめ

ラット異所性気管移植モデルを用いて、肺移植後に発生する閉塞性細気管支炎におけるマクロファージの関与について検討した。本研究の結果から、レシピエントへの GdCl₃ 投与によるマクロファージの除去によって、アロ免疫反応に関連して発生する線維性肉芽組織による閉塞性気道病変の形成が著しく抑制されることが明らかとなった。以上の研究結果から、肺移植後閉塞性細気管支炎発生にマクロファージが関

与する可能性が示唆されるとともに、T リンパ球の機能制御を主体とする現在の免疫抑制療法にマクロファージをターゲットとした免疫抑制療法を組み合わせることが、肺移植後閉塞性細気管支炎の予防と治療における端緒となり得る可能性が示唆された。

文 献

- 1) Trulock EP. Lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 155: 789-818.
- 2) Hosenpud JD, Bennett LE, Keck BM, Boucek MM, Novick RJ. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: seventeenth official report-2000. *J Heart Lung Transplant.* 2000; 19: 909-931.
- 3) 岡田克典, 松村輔二, 近藤 丘. 肺移植の動向. 末栴恵一, 原澤道美, 人見滋樹編. 呼吸器疾患. 東京: 先端医療技術研究所, 2001: 237-242.
- 4) Reichenspurner H, Girgis RE, Robbins RC, Conte JV, Nair RV, Valentine V, Berry GJ, Morris RE, Theodore J, Reitz BA. Obliterative bronchiolitis after lung and heart-lung transplantation. *Ann Thorac Surg.* 1995; 60: 1845-1853.
- 5) Burke CM, Glanville AR, Theodore J, Robin ED. Lung immunogenicity, rejection, and obliterative bronchiolitis. *Chest.* 1987; 92: 547-549.
- 6) Hertz MI, Henke CA, Nakhleh RE, Harmon KR, Marinelli WA, Fox JM, Kubo SH, Shumway SJ, Bolman RM 3rd, Bitterman PB. Obliterative bronchiolitis after lung transplantation: A fibroproliferative disorder associated with platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992; 89: 10385-10389.
- 7) Henke C, Hertz M, Peterson M, Bolman RM, Harmon K, Marinelli W, Bitterman P. The role of angiogenesis factors in the pathogenesis of obliterative bronchiolitis following heart-lung transplantation. *Am Rev Respir Dis.* 1991; 143: A 601.
- 8) Al-Dossari GA, Jessurun J, Bolman RM 3rd, Kshetty VR, King MB, Murray JJ, Hertz MI. Pathogenesis of obliterative bronchiolitis. Possible roles of platelet-derived growth factor and basic fibroblast growth factor. *Transplantation.* 1995; 59: 143-145.