

Labeling index (%)

$$= \text{陽性細胞数} / \text{総カウント細胞数} \times 100$$

結 果

プレオマイシンによる線維化とその抑制

EGF-RTKIである gefitinib は 200 mg/kg 単独投与では、有意な変化を来たさなかった。プレオマイシン投与によって著明な炎症細胞浸潤を伴う線維化形成を認めた。これに対して gefitinib は十分な有効血中濃度が得られると考えられる 20 mg/kg から subtoxic dose である 200 mg/kg, 中間量の 90 mg/kg のいずれの濃度でも線維化スコアの改善を認めた。AG1478 も

同様に線維化を抑制した (Fig. 1)。PDGF-RTKI である AG1296 もプレオマイシンによる線維化を抑制した (Fig. 2)。また、プレオマイシン投与による肺組織中のコラーゲン含量の増加もこれらの薬剤によって有意に抑制された (Fig. 3, 4)。

プレオマイシンによる EGFR 発現とそのリン酸化

プレオマイシン投与による肺線維化過程における肺組織での EGFR およびリン酸化 EGFR の発現変化と gefitinib 投与によって EGFR のリン酸化が抑制されていることを確認する目的で免疫組織学検討を行った。EGFR の発現は、コントロール群の肺組織では上皮細胞を中心に約 15% の細胞に陽性であった。プレオマイシン投与によってこの発現の増加は見ら

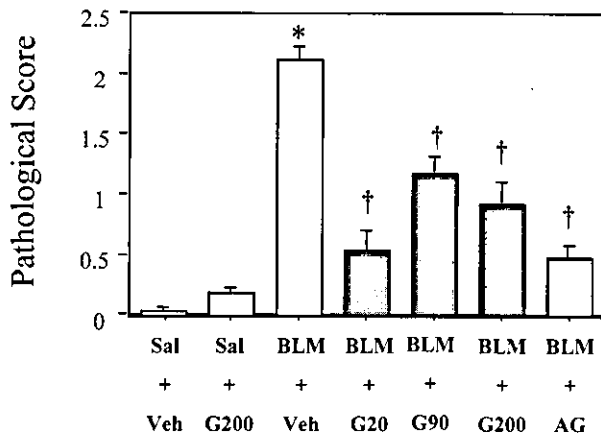


Fig. 1 Pathological fibrosis score. The fibrosis score of gefitinib 200 mg/kg without bleomycin showed no significant change. Gefitinib at any dose of 20, 90 or 200 mg/kg significantly prevented the bleomycin-induced lung fibrosis. AG1478 also prevented the fibrosis. * $p < 0.001$ vs Saline+Vehicle, † $p < 0.001$ vs BLM+Vehicle.

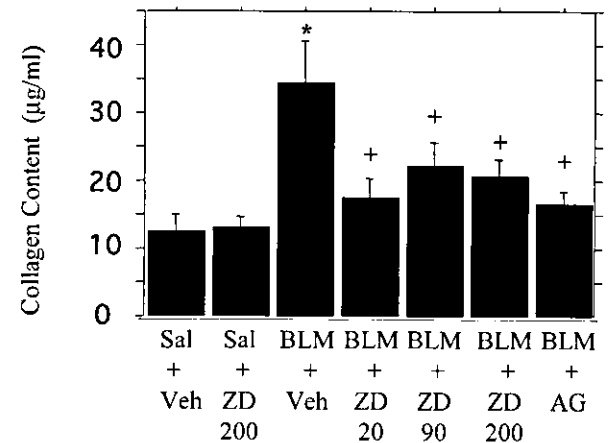


Fig. 3 Gefitinib at any dose of 20, 90 or 200 mg/kg significantly prevented the increased collagen content. AG1478 also prevented the content. * $p < 0.001$ vs Saline+Vehicle, † $p < 0.001$ vs BLM+Vehicle.

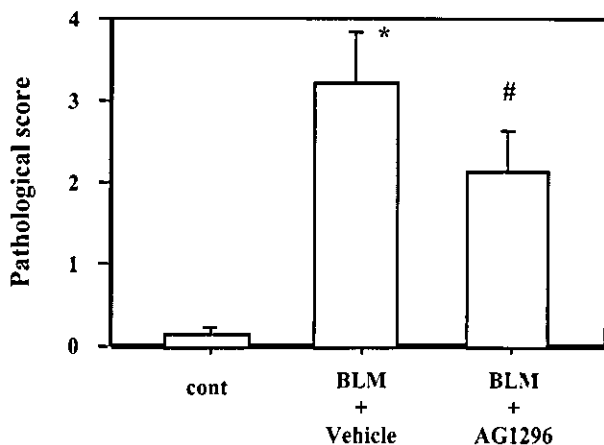


Fig. 2 Effects of AG1296 on BLM-induced lung fibrosis evaluated using a pathological fibrosis score. * $p < 0.001$, # $p < 0.01$.

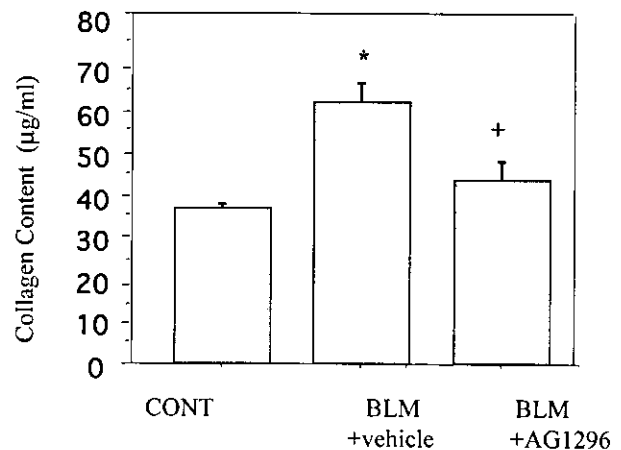
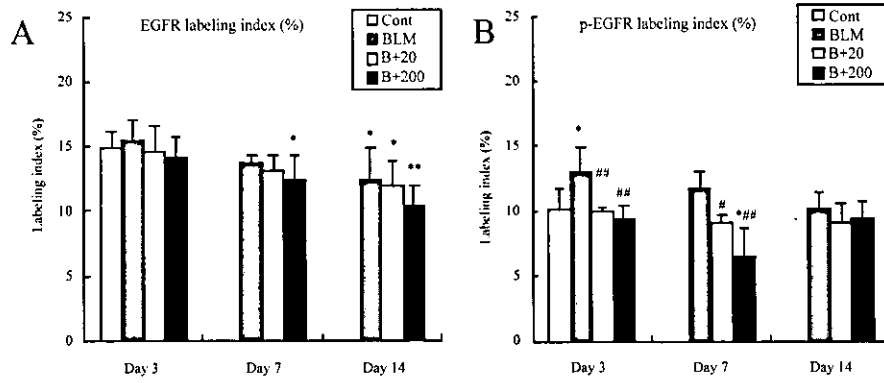


Fig. 4 AG 1296 significantly attenuated bleomycin-induced increase in collagen content. ($p < 0.01$ vs control, † $p < 0.01$ vs BLM+vehicle)



Values are expressed by mean ± S.D.
 ***: Significant difference from Cont by LSD test ($p < 0.05/0.01$, respectively).
 ###: Significant difference from corresponding BLM by LSD test ($p < 0.05/0.02$, respectively).

Fig. 5 Labelling index of EGFR (A) and p-EGFR (B).

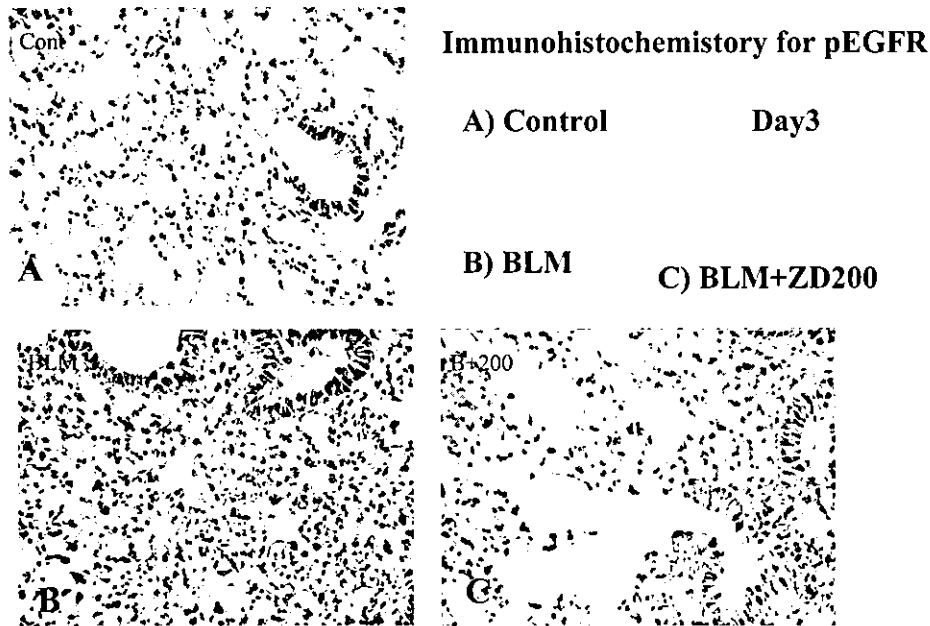
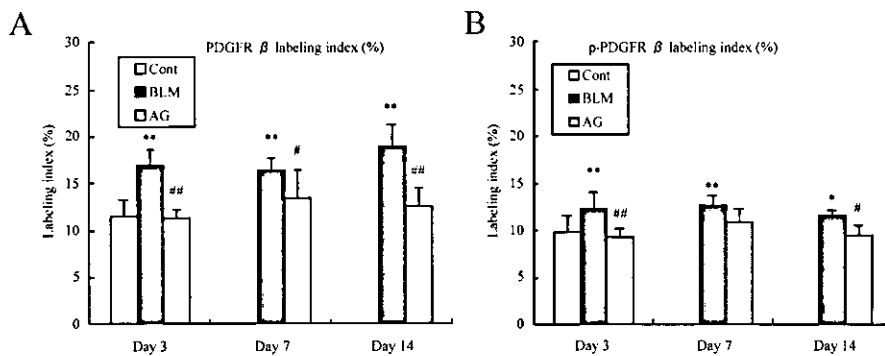


Fig. 6 Immunohistochemical stain for p-EGFR in bleomycin-induced fibrotic lung tissue at Day 3. A: control, B: bleomycin, C: bleomycin + gefitinib 200 mg/kg.



Values are expressed by mean ± S.D.
 ***: Significant difference from Cont by LSD test ($p < 0.05/0.01$, respectively).
 ###: Significant difference from corresponding BLM by LSD test ($p < 0.05/0.02$, respectively).

Fig. 7 Labelling index of PDGFR (A) and p-PDGFR (B).

Immunohistochemical stain for p-PDGFR in bleomycin-induced fibrotic lung tissue at Day 3. A: control, B: bleomycin, C: bleomycin + gefitinib 200 mg/kg.

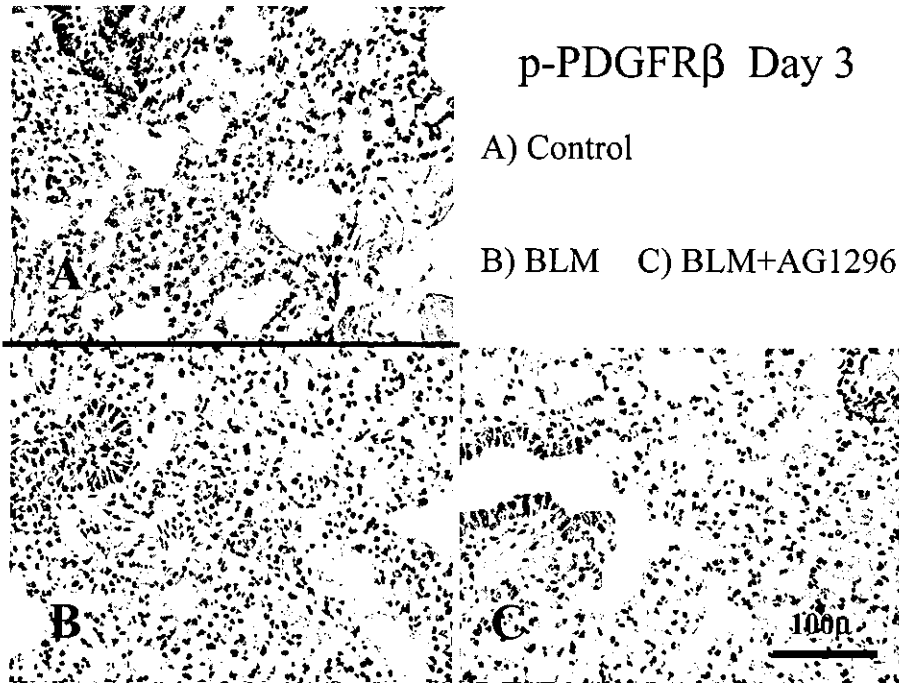


Fig. 8

れず, labelling index は 14 日後には, むしろわずかに減少した (Fig. 5A). 一方, リン酸化した EGFR (p-EGFR) の発現は, プレオマイシン投与 3 日後にコントロール (Fig. 6A) と比較して有意に増加し, 線維化肺組織の上皮細胞のほか間質に存在する線維芽細胞と考えられる細胞にも発現が認められた (Fig. 6B). gefitinib は, これを有意に抑制した (Fig. 6C). リン酸化 EGFR 発現は経時的に減少する傾向にあったが, day 7 においてもプレオマイシン群に比較し gefitinib は有意にリン酸化を抑制した (Fig. 5B).

プレオマイシンによる PDGFR 発現とそのリン酸化
プレオマイシン投与 3 日後より肺組織における PDGFR 発現はコントロールと比較し有意に増加し, 7 日目, 14 日目においても増加は持続した. これに対して AG1278 は, いずれの時点においても PDGFR 発現を有意に抑制した (Fig. 7A). リン酸化 PDGFR の発現も同様にプレオマイシンによって増加し, 3 日目, 14 日目では AG1278 による有意な抑制が認められた (Fig. 7B) (Fig. 8).

考 察

EGFR-TKI および PDGFR-TKI は, ともプレオマイシンによる肺線維化形成を有意に抑制した. EGF-

RTKI については, 線維化の病態においては, EGFR が肺組織に高発現するとともに, EGFR リガンドである EGF や TGF α の産生が亢進しておりこれらの経路を遮断することが線維化形成を抑制したものと考えられる. 今回の検討で, 線維化組織における EGFR の発現増強はみとめなかったが, EGFR のリン酸化を認め, これが gefitinib によって有意に抑制されたことが示された. したがって, gefitinib は, 線維芽細胞における EGFR のリン酸化を抑制することによってその増殖を阻止し, 肺線維化を抑制したものと考えられる. 一方で, EGFR-TKI である gefitinib が副作用として急性肺傷害や間質性肺炎を併発すること⁶⁾やマウスにおいても gefitinib がプレオマイシンによる線維化を増強したという報告もなされているが, 今回の結果では, EGFR-TKI による負の作用は認められなかった. レセプターシグナルの抑制によって普遍的に肺傷害や線維化が発症するものでないことと基本的には EGFR の阻害は線維化抑制に働くことが示された. EGF シグナルを阻害することで上皮の再生など組織傷害からの修復の過程が阻害される可能性も考えられるが, これよりもむしろ, 線維芽細胞遊走や増殖の阻止作用が大きく働き線維化病態を抑制したものと考えられる. これらの分子標的治療薬の作用は, 種の違いや固体の感受性によって異なる反応を示す可能性があり, さらに慎重な検討が必要であると考え

られた。

PDGF-RTKI についてもプレオマイシンによる線維化の抑制効果と PDGFR の発現増強および PDGFR リン酸化の増強が有意に抑制されることが示された。線維芽細胞増殖抑制を主たるターゲットとして使用できる薬剤であり、PDGF-RTKI 作用を有する imatinib はすでに白血病治療薬として臨床使用されており、肺線維症治療への応用が期待されるが、こちらも間質性肺炎の副作用が報告されており、メカニズムの解明が必要である。

分子標的治療薬は、増殖因子による肺線維化を抑制し、IPF の治療薬として有用である可能性が示唆された。

参考文献

- 1) de Larco JE, Todaro GJ: Growth factors from murine sarcoma virus transformed cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 4001-5, 1978.
- 2) Madtes DK, Busby HK, Strandjord TP, Clark JG: Expression of transforming growth factor- α and epidermal growth factor receptor is increased following bleomycin-induced lung injury in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11: 540-51, 1994.
- 3) Hardie WD, Le Cras TD, Jiang K, Tichelaar JW, Azhar M, Korfhagen TR: Conditional expression of transforming growth factor- α in adult mouse lung causes pulmonary fibrosis *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L741-L749, 2004.
- 4) Madtes DK, Elston AL, Hackman RC, Dunn AR, and Clark JG. Transforming growth factor-deficiency reduces pulmonary fibrosis in transgenic mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 20: 924-934, 1999
- 5) Walsh J, Absher M, Kelley J: Variable expression of platelet-derived growth factor family proteins in acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 9: 637-44, 1993.
- 6) *Biochem Biophys Res Commun.* 265: 503-8, 1999.
- 7) Brass DM, Tsai SY, Brody AR: Primary lung fibroblasts from the 129 mouse strain exhibit reduced growth factor responsiveness in vitro. *Exp Lung Res* 27: 639-53, 2001.
- 8) Rice AB, Moomaw CR, Morgan DL, Bonner JC: Specific inhibitors of platelet-derived growth factor or epidermal growth factor receptor tyrosine kinase reduce pulmonary fibrosis in rats. *Am J Pathol* 155: 213-21, 1999.
- 9) Inoue A, Saijo Y, Maemondo M, Gomi K, Tokue Y, Kimura Y, Ebina M, Kikuchi T, Moriya T, Nukiwa T. Severe acute interstitial pneumonia and gefitinib. *Lancet* 361 (9352): 137-9, 2003.
- 10) Suzuki H, Aoshiba K, Yokohori N, Nagai A., Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibition augments a murine model of pulmonary fibrosis. *Cancer Res* 63: 5054-9, 2003.

【平成 16 年度】

マウスの肺線維症モデルを用いた肺線維化の メカニズムの研究

中野 純一 中島 幹夫 足立 哲也
長瀬 洋之 大田 健*

今回、マウスの肺線維症モデルを用いて、照射による線維化および、その線維化に対する、ストレイインによる感受性の相違、さらに HCV のトランスジェニック [HCV-Tg (+)] の及ぼす影響について検討した。15 Gy の照射後による強い肺の線維化は 12 週以降に生じ、また遺伝的には Balb/C が B57BL/6 より高感受性であることが示された。さらに HCV-Tg (+) マウスを用いた検討により、照射による肺線維化は HCV-Tg (+) において、早期に、かつ高度に生じることが示された。すなわち、従来我々がシリカモデルで示してきた結果と同様に、照射後の肺線維化においても HCV が関与し得ることが示された。さらにその線維化を促進する因子としてサイトカインの中では、線維芽細胞も活性化作用を有する IL-4 の関与が示唆された。

Mechanisms of pulmonary fibrosis with irradiation in murine models

Junichi Nakano, Mikio Nakajima, Tutsuya Adachi,
Hiroyuki Nagase, and Ken Ohta

Teikyo University school of Medicine, Department of Medicine

We have been reported that period of more than 12 weeks might be necessary for lung fibrosis in mice by the irradiation in our previous studies. We have been also reported that in HCV-transgenic system, significant pulmonary fibrosis was demonstrated by measuring lung dry weight and hydroxyproline content in HCV-transgenic mouse with treatment of 8 mg silica, which is the half dose being used conventionally in murine model of lung fibrosis. Here, we studied the process of lung fibrosis in response to irradiation in two strains of mice (Balb/C and C57BL/6) firstly. Secondly, we investigated if the HCV transgenic may influence the processes of these inflammatory changes and lung fibrosis induced by irradiation. As results, Balb/C was significantly sensitive to irradiation as compared to C57BL/6. These fibrous changes were demonstrated significantly after 12 weeks from irradiation with decreasing body weight of mice. Moreover, significant pulmonary fibrosis was produced by irradiation, in early time point and with higher magnitude in HCV transgenic mouse in response to irradiation. Furthermore, participation of IL-4 was shown as an important factor promoting the lung fibrosis in HCV transgenic system, which is agree with the results of pulmonary fibrosis of mouse in response to silica particulate. We concluded that Balb/C is sensitive to irradiation compared to B57BL6 and HCV is one of important and promoting factors in the process of these pulmonary fibrosis.

研究目的

特発性肺線維症は、その原因が未だに不明である。肺線維化の原因については、ウイルスをはじめ種々の因子が考えられている。我々は従来からシリカあるいは放射線を用いた線維症マウスモデルで検討している¹⁾。また疫学的な研究で HCV が線維化に関与していることを報告している。今回、放射線による肺線維症と、その過程における HCV の関与について検討した。

研究方法

(1) まずマウスモデルとして放射線による肺線維化の成立について検討した。平成 14 年度の検討では 15 Gy 照射後 3ヶ月の観察でも十分な線維化は惹起されないことを報告した。今回さらに長期の経過を追い、その線維化の過程を検討した。さらにその線維化に対して遺伝的な素因が関与するかを、2種のマウスストレインを用いて検討した。

具体的には従来よりシリカの肺線維症モデルで使用する Balb/C と C57BL/6 マウス 6 週齢の雄を用いて照射を行い、マウスが生存しうるのか、また肺での急性期およびその後の線維性変化について検討した。照射部位を胸部に限定するために放医研の器具に鉛によるスリットも加え照射した。文献的にはマウス一匹あたりの照射が 10-15 Gy であること、また本研究班プロジェクトで報告したが、15 Gy の設定で 12 週までに炎症性変化と生化学的な線維化指標の変化が認められるため、今回の実験は 15 Gy 照射で施行した。

BalbC または C57BL/6 の 6 週齢(雄)を使用する。
15 Gy を 250 kVp (15 mA), 全肺野に照射する。
照射後に病理, BALF, ハイドロキシプロリン
について検討する。

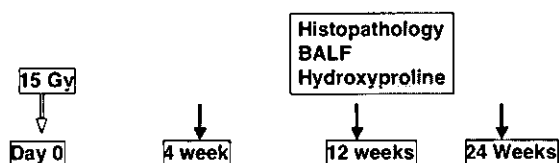


図 1 方法

帝京大学医学部内科

* びまん性肺疾患調査研究班 研究協力者

長期の観察では個々のマウスの体重変化を検討し、さらに組織の線維化を評価する目的で、肺組織の病理 (Ashcroft score) について検討した。また、炎症を評価する目的で気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid; BALF) の評価を行い、さらに肺の線維化の生化学的な指標として用いられるハイドロキシプロリン (Hydroxyproline: HOP) について検討した。サイトカインについては肺組織および BALF について検討した (図 1)。

(2) さらに、HCV が肺の線維化を促進するか否かを解明する目的で、引き続き HCV-トランスジェニック (Tg(+)) を用いてさらに照射後の線維化について検討を行った。この実験系においても、長期の観察では個々のマウスの体重変化を検討し、組織の線維化を評価するために肺組織の病理 (Ashcroft score) を、また炎症を評価するために BALF の評価を、さらに肺の線維化の生化学的な指標として HOP について検討した。サイトカインについては肺組織および BALF について検討した。実験に際し、総細胞数および細胞分画については各群を n=5、肺組織および BALF の mRNA の発現については n=3、ハイドロキシプロリンについては n=5 で行った。

研究結果

(1) まず照射後 12 週までの経過をみると、BAL での炎症反応はすでに照射後 2-4 週でみとめ (図 2)、さらに線維化の生化学的な指標である HOP はすでに照射後 6-12 週で上昇を示したが (図 3)、ただしここには表示をしていないが、病理学的には対照群と有意差を認めなかった。

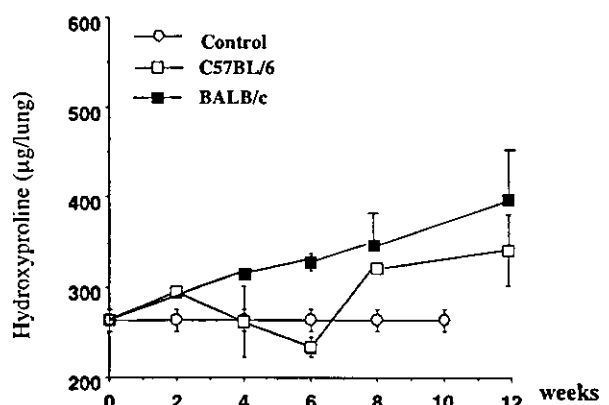


図 2 Hydroxyproline value after irradiation with 15 Gy

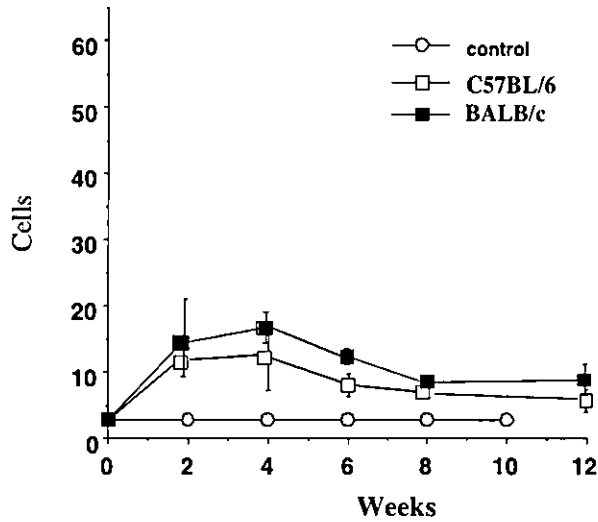


図3 BALF after irradiation with 15 Gy

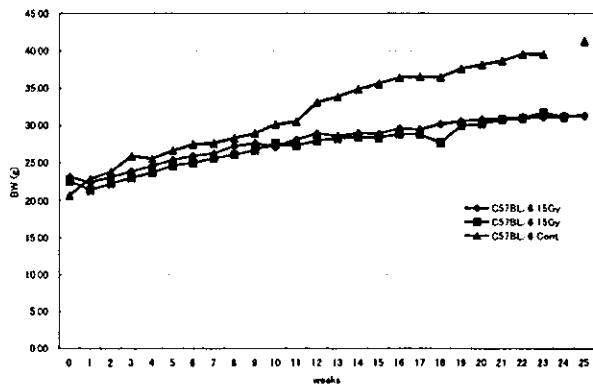


図4 C57BL/6 BW

照射後の体重の変化も観察した。その結果、まず C57BL/6 では 12 週間を超えた時点から明らかに体重の増加率が低下した (図 4)。さらに今回、さらに検討を加えたマウス種である Balb/C では、C57BL/6 と比較して、その変化が著明であり、後者では 20-22 週には死亡することが観察された (図 5)。すなわち、すでに我々はマウスの放射線による肺線維化には 12 週以上の経過観察が必要であることを報告していたが、今回の体重変化をみても、その結果を裏付けることができた。

また線維化の経過としては、HOP はすでに照射後 6-12 週で上昇を示したが (図 6)、病理学的には対照群と有意差を認めなかった。しかし、18 週の時点では病理スコアも有意に高値を示し、照射後 12 週以後に強い線維化を呈することが示された、また放射線感受性は Balb/C のほうが高いことも示された (図 7)。すな

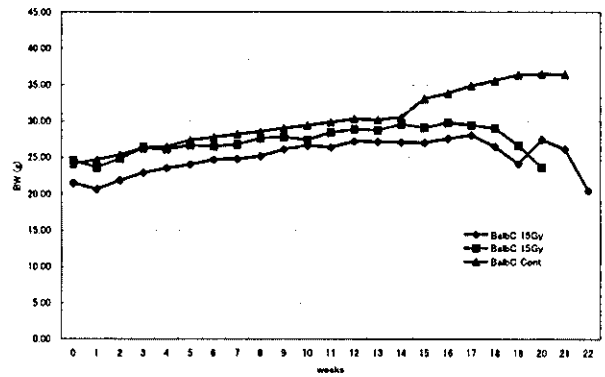


図5 Balb/C BW

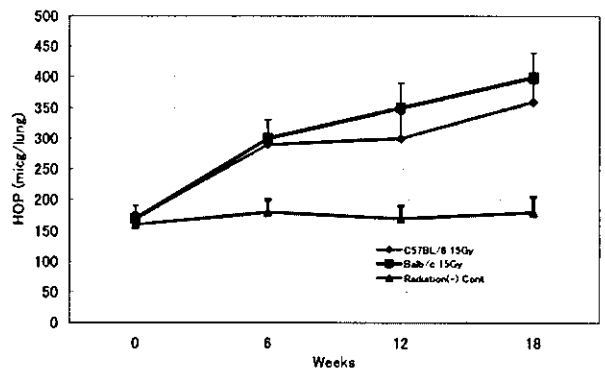


図6 Hydroxyproline in response to Radiation

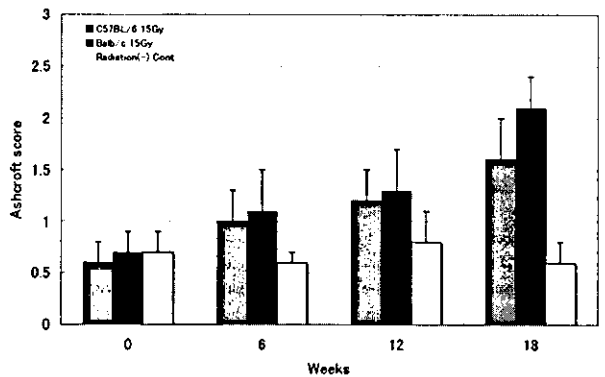


図7 Pathological Score in response to Radiation

わち、体重の変化にも見られた、照射による線維化の変化は、特にその 12 週以降に強く表れることが示された。しかも、遺伝的には Balb/C を背景とすると、その変化がより強く惹起されることが示された。

(2) さらに放射線に高感受性と判明した Balb/C を背景とするトラスジェニック HCV-Tg (+) で検討することとした。まず、この背景として、従来より我々が肺線維症のモデルとして使用しているシリカ

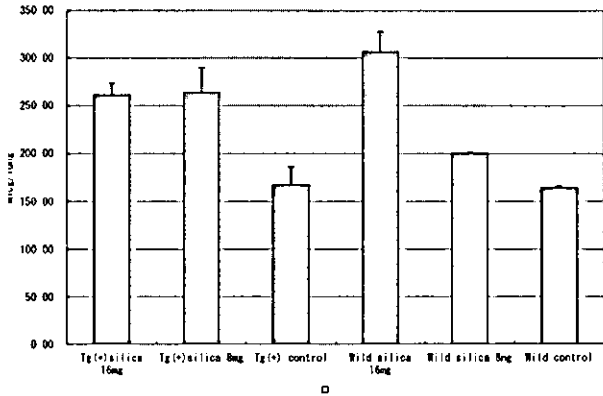


図 8-A Hydroxyproline

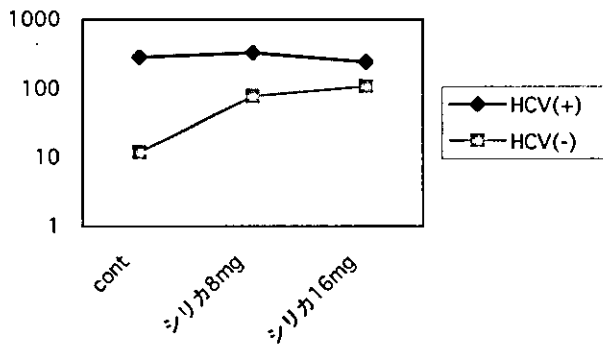


図 8-B IFN-g LC BAL

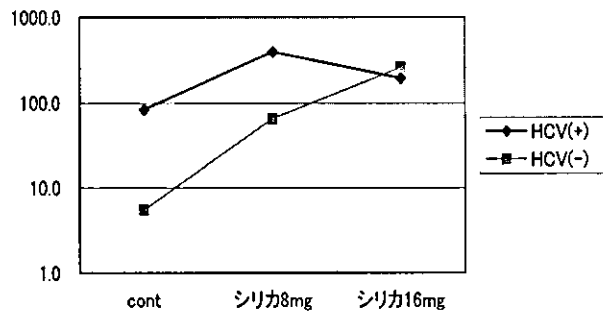


図 8-C IL-4

により、その少量投与で HCV-Tg (+) ではワイルドタイプ (Tg (-)) と比較して、有意に線維化を起こし (図 8-A), しかもその過程でサイトカインとして $\text{interferon-}\gamma$ (IFN- γ) や interleukin-4 (IL-4) が関与しうることを、すでに検討している (図 8-B) (図 8-C).

今回の放射線による肺の線維化をみると、すでに 12 週の時点で病理スコア (図 9) および HOP ともに (図 10), HCV-Tg (+) では有意な増加を示すことが確認された。すなわち、通常では、まだ十分に線維化が惹起されない、照射後 12 週の時点で、HCV を背景に有する場合には線維化が明らかとなっており、HCV が肺における線維化促進の要因となりうることが示された。

さらにサイトカインの測定では IGF-1, TGF- β に関しては Tg (+) と Tg (-) 間に有意差を認めなかったが、IL-4 に関しては HCV-Tg (+) で有意に mRNA が強発現していることが判明した (図 11)。これは図 8-C で示した、シリカモデルと同様に HCV における線維化促進の過程でサイトカインでは IL-4 が

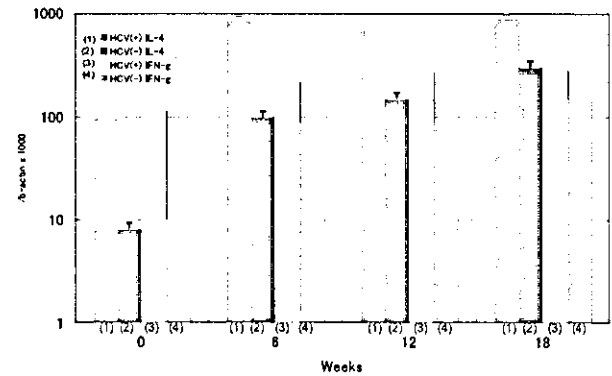


図 10 Hydroxyproline in response to Radiation

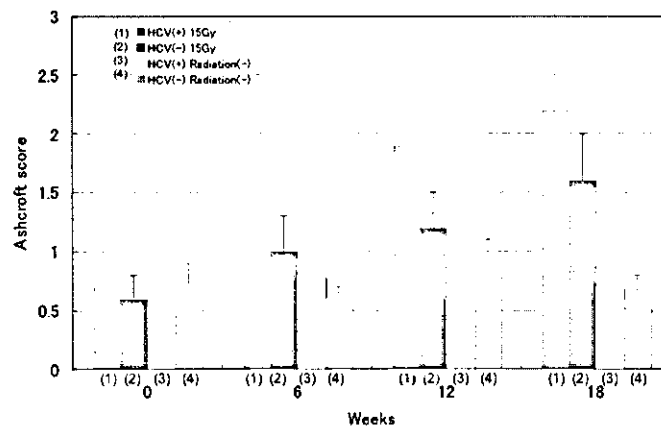


図 9 Pathological score in response to Radiation

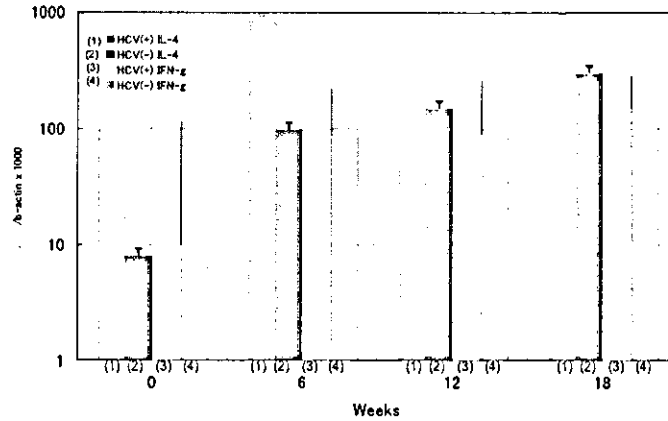


図 11 IL-4 IFN-g in response to Radiation

関与する可能性を、肺照射モデルでも示している結果であると考えられる。

考 察

マウスの照射モデルでは 12 週以降に強い線維化を生じ、照射に対しては BalbC が高感受性であることより、遺伝的な背景により線維化の程度がことなることが示された。この遺伝的な検討に関して放射線に対する感受性については、古くは Franko AJ ら²⁾で C57L/J vs CBA/J を比較して少なくとも 2 つの遺伝子の関与を示唆し、さらに Haston CK, Travis EL ら³⁾は放射線やプレオマシンに付いても同様に 2 つ以上の遺伝子の関与が考えられ、特に染色体 11 と 17 に注目した報告をしている。最近ではプレオマイシンに関連する遺伝的背景に IL-2 領域の可能性を示す報告や⁴⁾、H2-Ea の欠損を示唆する報告もある⁵⁾。一方で我々がシリカで線維化の促進があり、今回の照射による肺の線維化についても促進していたストレインである Balb/C に関して、線維化を抑制する可能性について検討している報告もある⁶⁾。すなわち線維化の形成における遺伝的な背景については、遺伝的な要因と、線維化の惹起する原因 (後天的要因) との相互の要因で、その線維化の過程が修飾される可能性があり、さらなる検討が必要であろう。さらに HCV-Tg (+) マウスを用いた検討により、照射後早期に線維化がおこることより、この線維化過程において HCV が促進的な要因となることが示され、従来の疫学調査やシリカモデルでの結果と合致すると考えられた⁷⁾。さらにその線維化の過程で IL-4 の関与が示された。HCV におけるサイトカインパターンでは、Th1 サイトカインが優位な状

態であるとの報告がある⁷⁾。また Th2 サイトカインである IL-4 については、HCV エンベロープの受容体である CD81 を介してリンパ球が活性化され、IL-4 の産生が亢進するとの報告がある⁸⁾。今回の検討により、IL-4 が HCV の線維化の過程において重要な役割を果たしていることが示された。この結果は HCV エンベロープが CD81 の活性化を介して IL-4 の産生が亢進するとの *in vitro* の実験結果とも合致する結果と考えられる。

結 論

遺伝的には Balb/C が B57BL/6 より高感受性であることが示された。さらに HCV-Tg (+) マウスを用いた検討により、照射による肺線維化は HCV-Tg (+) において、早期に、かつ高度に生じることが示された。すなわち、照射後の肺線維化において HCV が関与し得ることが示された。さらにその線維化を促進する因子としてサイトカインの中では、線維芽細胞も活性化作用を有する IL-4 の関与が示唆された。

参考文献

- 1) Ueda T, Ohta K, Suzuki N, Yamaguchi M, Hirai K, Horiuchi T, Watanabe J, Miyamoto T, Ito K. Idiopathic pulmonary fibrosis and high prevalence of serum antibodies to hepatitis C virus. *Am Rev Respir Dis.* 1992 Jul; 146(1): 266-8.
- 2) Franko AJ, Sharplin J, Ward WF, Taylor JM. Evidence for two patterns of inheritance of sensitivity to induction of lung fibrosis in mice by radiation, one

- of which involves two genes. *Radiat Res.* 1996 Jul; 146(1): 68-74.
- 3) Haston CK, Travis EL. Murine susceptibility to radiation-induced pulmonary fibrosis is influenced by a genetic factor implicated in susceptibility to bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Cancer Res.* 1997; 57(23): 5286-91.
- 4) Beller TC, Maekawa A, Friend DS, Austen KF, Kanaoka Y. Targeted gene disruption reveals the role of the cysteinyl leukotriene 2 receptor in increased vascular permeability and in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Biol Chem.* 2004; 279(44): 46129-34.
- 5) Du M, Irani RA, Stivers DN, Lee SJ, Travis EL. H2-Ea deficiency is a risk factor for bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *Cancer Res.* 2004; 64(19): 6835-9.
- 6) Bonniaud P, Martin G, Margetts PJ, Ask K, Robertson J, Gauldie J, Kolb M. Connective tissue growth factor is crucial to inducing a profibrotic environment in "fibrosis-resistant" BALB/c mouse lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004; 31(5): 510-6.
- 7) Napoli J, Bishop GA, McGuinness PH, Painter DM, McCaughan GW. Progressive liver injury in chronic hepatitis C infection correlates with increased intrahepatic expression of Th1-associated cytokines. *Hepatology.* 1996; 24(4): 759-65.
- 8) Maecker HT, Do MS, Levy S. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1998; 95(5): 2458-62.

サルコイドーシス

抗原繫留によらないマウス肺肉芽腫症モデルの解析

西脇 徹¹ 米山 博之¹ 江石 義信^{2*} 松島 網治^{1*}

肺肉芽腫症は、その遷延により線維化が容易に誘導され、ガス交換が障害される。しかし、肺臨床における多くの肉芽腫性疾患は、病態形成機序に不明な点が多く、肺線維症の治療も視野に入れた解析が強く望まれている。

今回我々は、*P. acnes* の反復免疫により誘導される Th1 型マウス肺肉芽腫症モデルの発症機構を解明するべく、1) 正常マウス肺での *P. acnes* の存在、2) 正常肺所属リンパ節で成立している *P. acnes* に対する免疫応答、3) 肺外増殖した *P. acnes* 感作リンパ球が循環血流由来を経て肺肉芽腫を誘導し得ることを、免疫学的手法を用いて示した。

このマウス肺肉芽腫モデルは、肺内に抗原繫留せずに病変を誘導する点で従来動物モデルとは大きく異なり、原因不明間質性肺疾患の病態解明に向けた新たな糸口となることが期待される。

Investigation of a murine pulmonary granuloma model without anchoring antigens

Tetsu Nishiwaki¹, Hiroyuki Yoneyama¹, Yoshinobu Eishi², Kouji Matsushima¹

¹ Department of Molecular Preventive Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

² Department of Human Pathology, Faculty of Medicine, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

Although granulomatous lung disease can induce fibrosis and gas exchange disturbance, the etiological factors remain still obscure. Therefore, a vigorous investigation aiming at therapy of lung fibrosis is strongly desired.

We have studied the mechanisms of Th1 type pulmonary granuloma formation in a murine model of repeated *P. acnes* immunization. We demonstrated that: 1) *P. acnes* exists in normal murine lung, 2) Immunoresponses against *P. acnes* is already established in pulmonary regional lymph nodes even in steady state, 3) Circulating *P. acnes*-sensitized lymphocytes expanding at extrapulmonary site can induce pulmonary granulomas.

This newly animal model differs from previously reported ones at the point of forming pulmonary lesions without anchoring antigens in the lung, and is expected to be a clue for resolving interstitial lung disease of unknown origin.

はじめに

肉芽腫性病変が単なる炎症の「なれの果て」ではなく、局所炎症の行く末を左右する「司令塔」の役割を担っているという概念は、近年、当教室米山らのマウス肝肉芽腫モデルの仕事^{1,2)}をはじめとする諸報告によって市民権を得つつある。一方、肺肉芽腫症はその遷延により容易に線維化を惹起しガス交換を障害するので、発症機序の解析とそれに基づく治療戦略の検討は、肺臨床における重要な課題である。

従来の肺肉芽腫症の基礎研究では、抗原をコーティングしたビーズや寄生虫卵を経静脈的に投与し、肺血管に塞栓・繫留させることで局所免疫応答を誘導するといった動物モデルを使用して病態解析を行っている^{3,4)}。しかし、実地臨床で遭遇する多くの原因不明の肺肉芽腫性疾患は、病変分布や病像が従来の動物モデルと様相を異にしており、発症機序の更なる探究には、より臨床に即した動物モデルが必要である。

このような新規の動物モデルを作製するため、我々は、肉芽腫を誘導しやすくサルコイドーシス原因抗原の候補と考えられている *Propionibacterium acnes* (以下 *P. acnes*) を抗原として用い、様々な投与方法と投与量の組み合わせの中から、*P. acnes* の反復免疫が臨床像に近い肺病変を誘導することを見出した。そして、この病変マウスの発症機構について、1) 従来無菌であると言われていた下気道肺には *P. acnes* が常在している、2) 肺所属リンパ節では定常状態より *P. acnes* に対する免疫応答が成立している、3) 従って、肺外で刺激を受けて増殖した *P. acnes* 感作リンパ球であっても、循環血流を介して肺内に流入することで肺肉芽腫を誘導することができる、という仮説をたてた(図1)。

本稿では、この仮説の傍証となるべき実験結果を、若干の考察を加えて報告する。

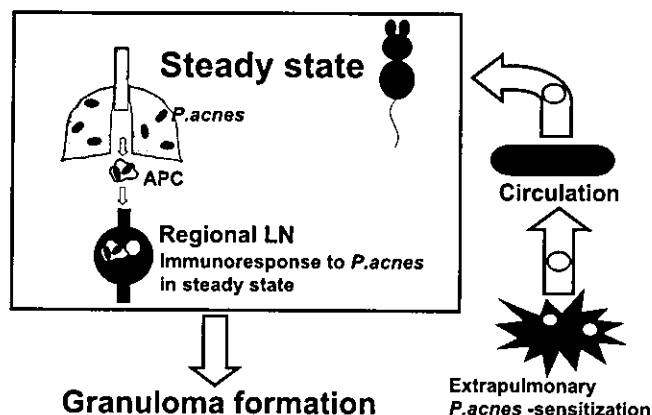


図1 仮説

対象と方法

マウスは SPF で管理された C57BL/6J (雌, 6 ~ 8 週) を使用。抗原として用いた *P. acnes* (ATCC11828) は嫌気条件下で培養し、表 1 に示す実験以外は全て 60 度で 30 分間過熱し、死菌化した。

免疫染色は間接的免疫アルカリフォスファターゼ (以下 ALP) ・ペルオキシダーゼ (以下 HRP) 法で行った⁵⁾。免疫染色に一次抗体として用いた抗マウスモノクローナル抗体は CD4 (クローン RM4-5), CD8 α (53-6.7), IL-4 (BVD6-24G2), IFN- γ (XMG1.2) :BD Pharmingen 製, F4/80 (Cl: A3-1), CD11c (N418) :Serotec 製, DEC205 (NLDC-145) :BMA Biomedicals 製で、*P. acnes* のリボテイコ酸を認識する抗体⁶⁾ は研究協力者である江石氏より御提供頂いた。また二次抗体は、HRP 標識抗ラット免疫グロブリン抗体 :Biosource International 製, HRP 標識抗マウス免疫グロブリン抗体 :DAKO 製, ALP 標識抗ハムスター免疫グロブリン抗体 :Cedarlane 製, ビオチン化 ALP: ニチレイ製, Alexa Fluor 488 抗ラット免疫グロブリン, ストレプトアビジン Alexa Fluor 594: Molecular Probes 製を使用した。

リンパ球増殖アッセイは、無刺激の正常マウスから諸臓器の所属リンパ節を摘出し、1 ウェル 1 \times 10⁵ 個の調整細胞に、抗原および対照抗原 (*P. acnes*・OVA: 10 μ g/100 μ l, PBS) のみを加えたプレートを 3 日間培養した後、WST-1 細胞増殖アッセイシステム (Takara Biomedicals 製) により解析した。

細胞移入実験に使用した *P. acnes* 感作 CD4 陽性細胞の単離は、磁気ビーズ吸着法 (MACSsystem: Miltenyi Biotech 製) により行った。実験では、マウス一匹に対し 2 \times 10⁵ 個の細胞を経尾静注した。

1 東京大学大学院医学系研究科分子予防医学教室
 2 東京医科歯科大学病理部
 * びまん性肺疾患研究班 分担研究者

結 果

最初に *P. acnes* の反復免疫により誘導したマウス肺の肉芽腫形成像を示す。400 μ g の *P. acnes* を完全フロイントアジュバント (DIFCO 製と共に 2 週間間隔で下肢足底に皮下注射すると、2 回以上の免疫から 2 週後のマウス肺では、胸膜直下を中心に類上皮細胞・多核巨細胞の集簇を核とした単核球の集積が認められた (図 2)。また、これらの病変内細胞構成は、抗原提示細胞であるマクローファージや樹状細胞の代表的表面マーカーとして知られる F4/80・CD11c と CD4 との二重免疫染色により、従来の典型的肺肉芽腫²⁾と同様の細胞構成であることが分かった (図 3)。更に、インターフェロンガンマ (IFN γ)・インターロイキン 4 (IL4) と CD4 との二重免疫染色を行うと、これらは IFN γ 産生性、すなわち Th1 型肉芽腫であった (図 4)。

このモデルにおける発症メカニズムの仮説の前提として、正常下気道肺における *P. acnes* の常在を明らかにするために、抗 *P. acnes* 抗体を使用して免疫染色を行った。図 5 に定常状態のマウス肺における *P. acnes* 染色像を示す。弱拡大では肺腔内に表出した細胞内に陽性像がみられ、強拡大では比較的辺縁明瞭な複数の顆粒の集合として *P. acnes* が染色された。そこで、この *P. acnes* 貪食細胞を同定し、*P. acnes* の常在を裏付けるために F4/80, CD11c, DEC205 の抗体を用いて *P. acnes* との二重免疫染色を行った。*P. acnes* は F4/80 発現細胞に貪食されており、CD11c・DEC205 発現細胞には貪食されていなかった (図 5)。

次に、定常状態のマウス肺における *P. acnes* に対する免疫応答の存在を確認するために、未感作マウスより肺所属リンパ節と、比較のために他の器官における所属リンパ節も摘出し、リンパ節細胞増殖アッセイを行った (図 6)。鼠径、腸間膜、肺、肝臓の各リンパ節では、いずれにおいても *P. acnes* に対する免疫応答が認められたが、脾臓では反応が弱かった。これらにより、

正常マウス肺における *P. acnes* の常在と免疫応答の成立が示唆された。

そこで、肺外で増殖した *P. acnes* 感作リンパ球が循環血流を経て、未感作肺に肉芽腫を誘導し得ることを確認するために、*P. acnes* 感作 CD4 陽性細胞の移入実験を行った。2 \times 10⁵ 個の *P. acnes* 感作 CD4

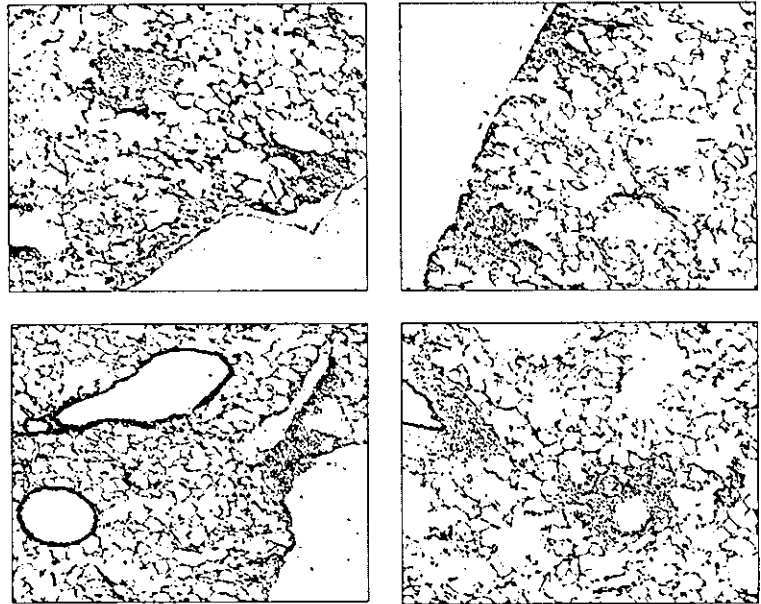
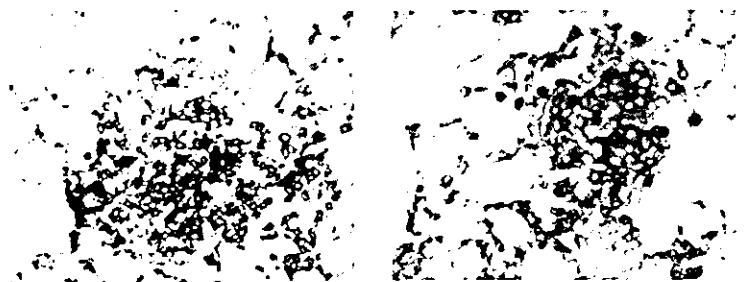
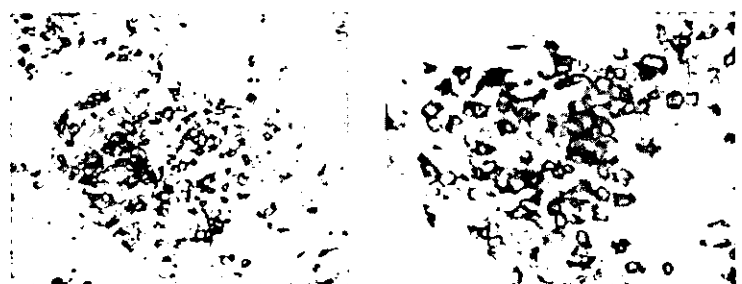


図 2 *P. acnes* 反復免疫後のマウス肺



F4/80 + CD4



CD11c + CD4

図 3 肉芽腫内細胞構成

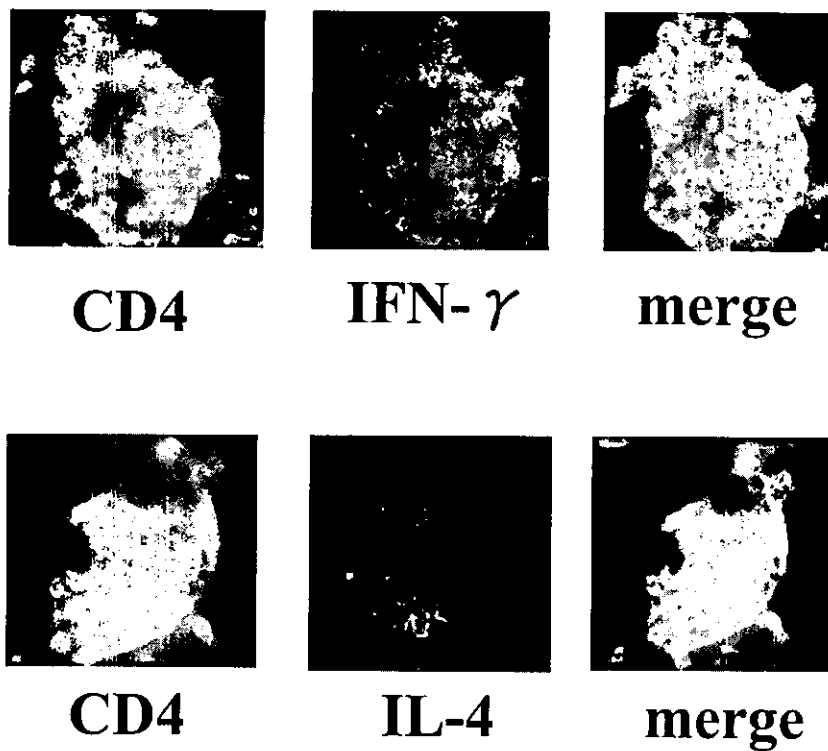


図4 肉芽腫内ヘルパーT細胞の再生サイトカイン

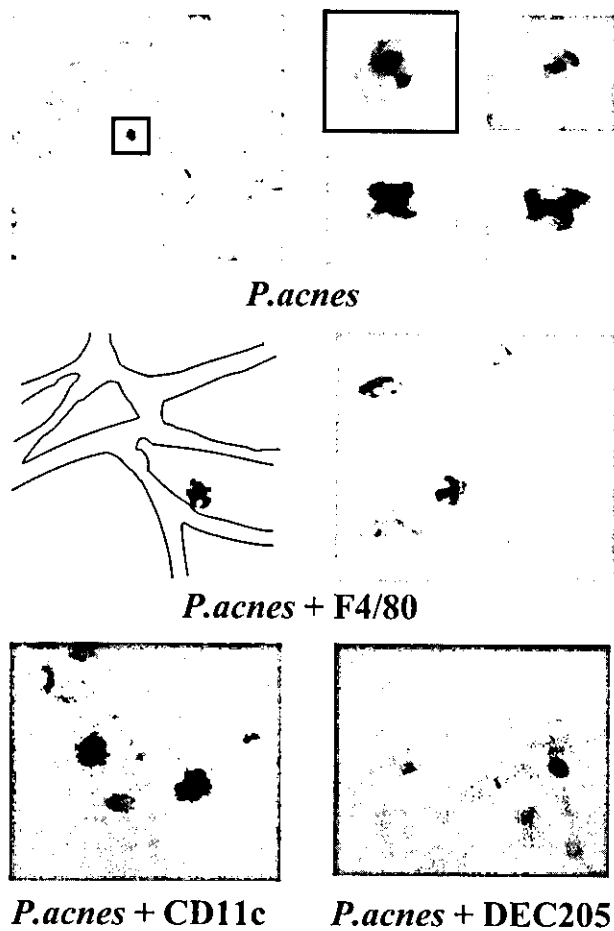


図5 正常マウス肺における *Pacnes* 貪食細胞

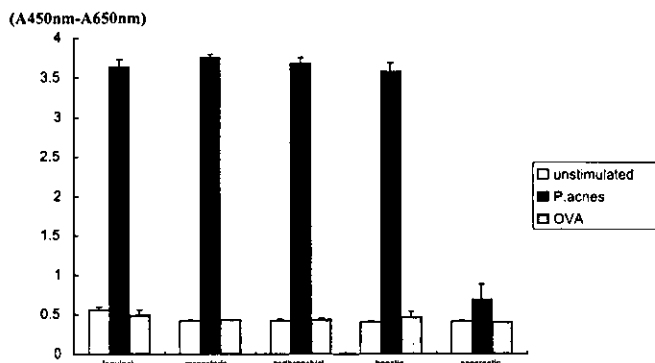
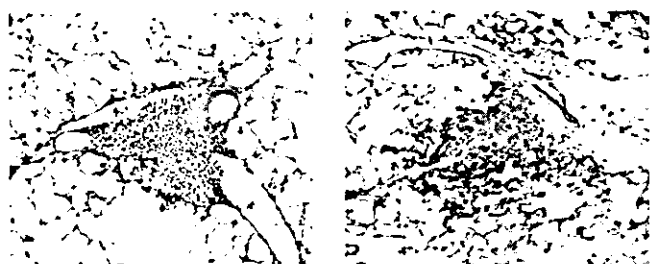


図6 リンパ節細胞増殖アッセイ

陽性細胞を経尾静注された正常マウスでは、2週間後から肺肉芽腫の形成が観察された。一方、未感作マウスから単離したCD4陽性細胞の移入では肉芽腫は誘導されなかった(図7)。

最後に、定常肺における*P. acnes*の存在が、*P. acnes*の反復免疫で肺肉芽腫を誘導し得る要因であることを確認するため、生菌*P. acnes*気管内投与後の反復免疫が病変形成に与える影響を、図8の実験により観察した。すると、極微量な*P. acnes*の前投与によっても、量依存的に病変が強くなる傾向がみられた(図9)。



*P.acnes*感作CD4陽性細胞 正常マウス



正常CD4陽性細胞 正常マウス

図7 ヘルパーT細胞移入実験

考案・結論

肺肉芽腫症の病態形成機序に対する従来の考え方は、肺結核・粟粒結核症や過敏性肺臓炎に代表されるような、外来性抗原の経気道・経血管的肺内侵入後の長期停滞に対する免疫応答を基本とするものが主流であった⁷⁾。従って、サルコイドーシスをはじめとする原因不明の肺肉芽腫性疾患も、各種抗酸菌・真菌・ウイルス肺感染の続発症という観点から研究されることが多く⁸⁾、肉芽腫形成の免疫機構を解析するために用いられる動物モデルのほとんどは、抗原を静注・肺血管塞栓させて肺内に繫留させることによるものであった^{3,4)}。

我々が見出した*P. acnes*の反復免疫による肺肉芽腫症モデルは、肺内に抗原を留めずに病変を誘導する点で、従来の肺肉芽腫モデルとは大きく異なり、無菌とされている下気道肺には定常時より抗原である*P. acnes*が存在する可能性を示唆している。抗*P. acnes*抗体を用いた免疫組織化学的な検討では、正常マウス肺において*P. acnes*が存在し、さらに、樹状細胞の代表的表面マーカーであるCD11c・DEC205陽性の細胞よりも、貪食能に長けたマクロファージのマーカーであるF4/80陽性の細胞に多く取り込まれており、肺常在免疫担当細胞の機能分担にも合致する結果であった⁹⁾。

また、一般に肺内抗原は抗原提示細胞により速やかに所属リンパ節に運ばれT細胞に情報が伝播される⁹⁾。従って、正常肺所属リンパ節においても*P. acnes*に対する免疫応答が成立しているはずである。未感作マウスから摘出した各所属リンパ節では、脾臓を除いた、すべてにおいて*P. acnes*に対する明らかな免疫反応が認められた。この結果は、従来*P. acnes*の常在が示唆されている器官と各リンパ節の解剖学的な関係とも矛盾せず、*P. acnes*の正常肺内の存在を裏付けるものとなった。

正常マウス肺の解析結果と、*P. acnes*に感作されたCD4陽性細胞の移入が未感作マウスに肺肉芽腫を誘導する事実は、*P. acnes*反復免疫モデルの病変形成機序におけるアウトラインを構成していると考えられる。しかし、これらの結果のみでは、感作ヘルパーT細胞が肺間質に影響を与えて、最終的な間質内病変形成に至る詳細なメカニズムは分からない。

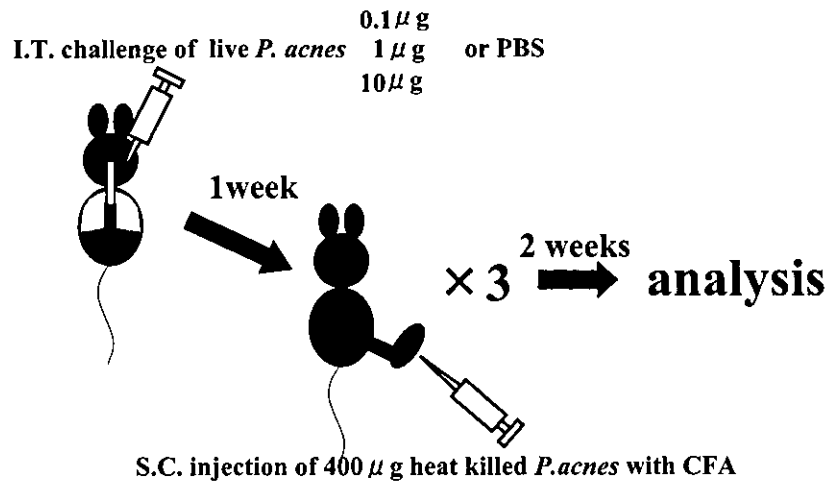


図8 実験スケジュール

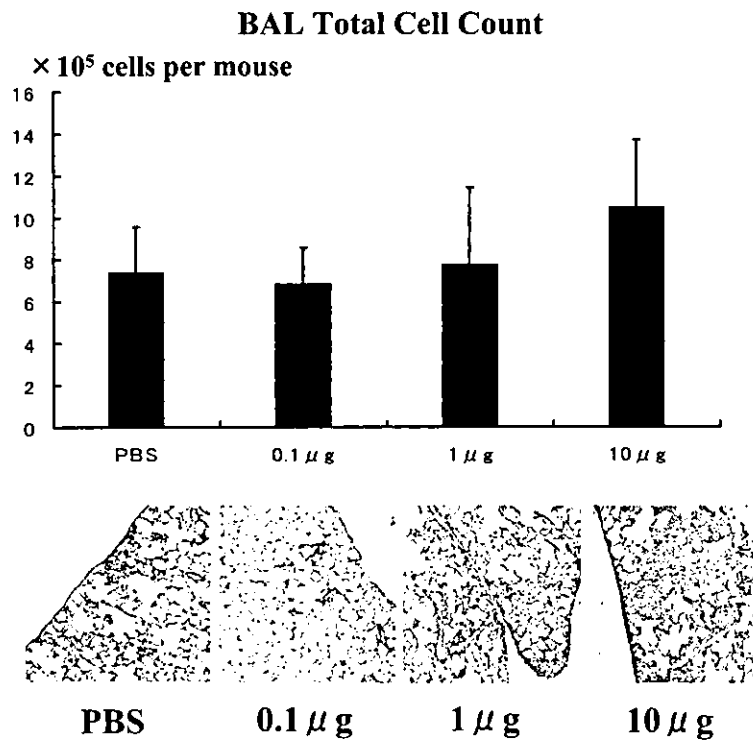


図9 生菌 *P. acnes* の気管内前投与が肉芽腫形成に与える影響

臨床的には、肺外感染が肺間質性病変を誘発・悪化させることは良く知られており、そのメカニズムや責任分子を解明していくことは、今後の間質性肺疾患研究課題の一つになり得ることと考え、ここに報告した。

参考文献

- 1) Yoneyama H, Matsuno K, *et al.* : Regulation by chemokines of circulating dendritic cell precursors, and the formation of portal tract-associated lymphoid tissue, in a granulomatous liver disease. *J. Exp. Med.* 193 (1) : 35-49, 2001.
- 2) Yoneyama H, Narumi S, *et al.* : Pivotal role of dendritic cell-derived CXCL10 in the retention of T helper cell 1 lymphocytes in secondary lymph nodes.

- J. Exp. Med. 195 (10) : 1257-1266, 2002.
- 3) Wangoo A, Sparer T, *et al.* : Contribution of Th1 and Th2 cells to protection and pathology in experimental models of granulomatous lung disease. J. Immunol 166 : 3432-3439.
- 4) Chensue SW, Lukacs NW, Kunkel SL, *et al.* : Aberrant in vivo T helper type 2 cell response and impaired eosinophil recruitment in CC chemokine receptor 8 knockout mice. J. Exp. Med. 193 (5) : 573-584, 2001.
- 5) Matsuno K, Ezaki T, *et al.* : A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: their terminal division, active phagocytosis, and translocation from the liver to the draining lymph. J. Exp. Med. 183 : 1865-1878, 1996.
- 6) Eishi Y, *et al.* : *Propionibacterium acnes* as a causative antigen of sarcoidosis. Sarcoidosis 11 (2) : 148, 1994.
- 7) Robinson DS, *et al.* : Granulomatous Processes. In : Crystal RG, Weibel ER, *et al.* The lung : scientific foundations. 2nd ed, Lippincott-Raven publishers, Philadelphia. : 2395-2409, 1997.
- 8) Conron M, Du Bois RM: Immunological mechanisms in sarcoidosis. Clin Exp Allergy. 31 : 543-554, 2001.
- 9) 西脇 徹, 米山 博之, 松島 綱治: 実験的 *P. acnes* 誘導肺炎症モデルにおける樹状細胞の役割. 呼吸器, 3 (1) : 49-55, 2003.

【平成 14 年度】

サルコイドーシス患者血清における IL-12, IL-18 濃度と疾患活動性について

杉崎 勝教* 津田 富康

40名のサルコイドーシス患者血清中のIL-12p40及びIL-18濃度を測定したところいずれも正常対照に比べ著明な増加を示した。これらの値を血清ACE値と比較したところ正の相関関係が認められた。またIL-12はIL-18と互いに正の相関を認めた。サルコイドーシス患者では末梢血レベルでTh1型免疫反応が起こっており、全身的な疾患活動性を見る上でこうしたTh1系サイトカインの測定が有用と考えられた。

Serum IL-12 and IL-18 Level in Sarcoidosis Patients and Their Relationship to Disease Activity

Katsunori Sugisaki, Tomiyasu Tsuda

Division of Pulmonary Disease, Department of Immunology and Allergy, Oita Medical University

We examined the serum concentration of IL-12p40 and IL-18 in 40 sarcoidosis patients and 20 normal subjects. The results showed that those Th1 cytokines increased significantly in sarcoidosis patients, and serum concentration of IL-12p40 and IL-18 were related each other positively, and to serum ACE level. Those results suggest that sarcoidosis patients have Th1 hyper-reactivity not only in local lesions, also in systemic peripheral blood. Serum Th1 cytokine level is useful indicator for systemic disease activity.

研究目的

IL-12は主にBリンパ球, マクロファージ, 樹状細胞から産生されTリンパ球やNK細胞の機能の調節に働いている¹⁾. またヘルパーT細胞においてはTh1/Th2サブタイプのうちTh1細胞への分化を促してTh1型反応を増強させる主要なサイトカインであることが分かっている²⁾. 活性型IL-12はp40とp35の2つのサブユニットからなるp70のダイマーでありこの他にp40同士ホモダイマーも存在して相互に活性の調節をおこなっている. 今回我々はサルコイドーシス(以下サ症)患者血清中のIL-12p40の濃度を測定し, サ症における疾患活動性とIL-12p40濃度との関係について検討した.

対象と方法

ステロイド剤が投与されていないサ症患者40名と正常対照20名の血清中のIL-12p40とIL-18の濃度をELISA法で測定した. これらの値を従来からの疾患活動性の指標として知られている血清ACE値やBALF中CD4/CD8比と比較した.

結果

- 1) サ症患者血清中のIL-12p40, IL-18濃度は正常対照に比べ有意に高値を示した. (図1)
- 2) サ症患者血清中のIL-12p40, IL-18濃度は血清ACEと弱い正の相関関係を示した. (図2, 3)
- 3) サ症患者血清中のIL-12p40, IL-18濃度は相互に弱い正の相関関係を示した. (図4)
- 4) サ症患者血清中のIL-12p40濃度はBALF中CD4/CD8比と有意な相関関係を示さなかった.

考案と結論

サ症患者血清中ではIL-12p40やIL-18等のTh1サイトカインが著明に増加しており末梢血のレベルでTh1型の免疫反応が起こっていることが推測された. BALF等の検討によりサ症では肺局所にお

いても同様のTh1型の免疫反応が起こっていることが知られていることから³⁾, サ症では全身的にTh1型免疫反応の活性化により疾患が活動化していることが予想される. こうした事実はサ症が単に局所的な疾患に止まらず, 全身的な病変形成をきたす疾患であることを改めて示していると言えよう.

今後IL-12p40やIL-18などの新しい疾患活動性の指標が従来からの指標と比べ新たな臨床的な意義を持っているかについてさらに十分な検等が必要と思われる.

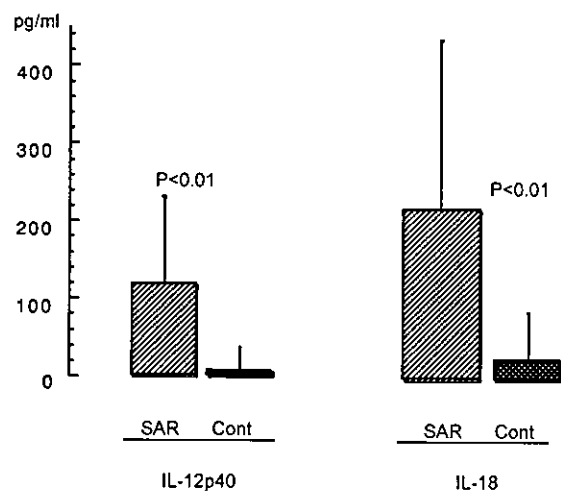


Figure1 Serum IL-12p40 and IL-18 concentration in sarcoidosis patients

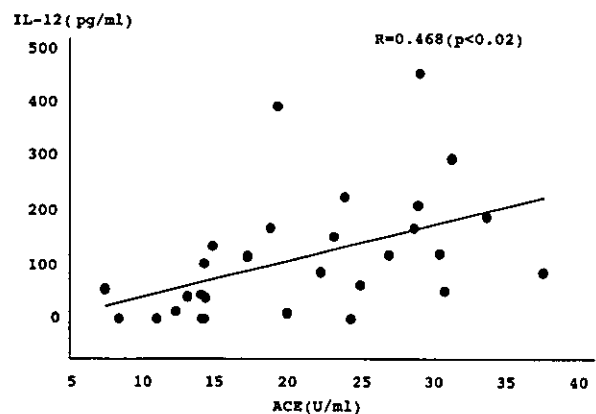


Figure2 The correlation between Serum ACE and IL-12p40