

はじめに

特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis/usual interstitial pneumonia, IPF/UIP) において原発性肺癌の合併は重要な予後規定因子であり¹⁾, IPF/UIP の死因の約 10~15% を占めるといわれている^{2,3)}. 2002 年の ATS/ERS consensus statement および, 厚生労働省びまん性肺疾患研究班第 4 次診断基準(以下, 第 4 次診断基準)では, IPF/UIP は特発性間質性肺炎 (idiopathic interstitial pneumonias, IIPs) の 7 病理組織型の 1 つとして位置づけられている^{4,5)}. この中で IPF のみに臨床診断基準が設けられ, ここで示された典型的臨床所見, HRCT 所見を呈し, 明らかな原因が否定されれば, 外科手術による肺生検なしに臨床診断を下すことが可能である. 言い換えれば, IPF 臨床診断基準に照らし合わせて非典型的な HRCT 所見を呈する場合には, 外科手術による肺生検による診断が推奨されている.

一方で, 原発性肺癌合併症例ではその治療の重点が肺癌治療に置かれることとなる. 肺癌の臨床病期や, 全身状態, 残存肺機能などの条件により外科的根治手術が可能であれば, 積極的に外科手術が選択される^{6,7)}.

IPF の臨床診断基準上の HRCT の典型像を呈さない特発性間質性肺炎に合併した原発性肺癌症例は, 臨床的にはしばしば経験される. しかしながら, その間質性肺炎の病理組織像が ATS/ERS consensus statement におけるどの組織分類に該当するか, またはその臨床病理学的特徴について検討された報告はほとんどない.

今回我々は, IPF の臨床診断基準に照らした際に胸部 CT 所見が非典型的である特発性間質性肺炎に合併した原発性肺癌症例を対象に, その臨床病理学的特徴を明らかにする目的で検討を行った.



Figure 1 典型的な IPF の HRCT 所見, 蜂巢肺に接して肺癌の合併が認められる.

方 法

1993 年 1 月から 2005 年 6 月までに当院で臨床的に診断された原発性肺癌合併 IIPs 55 例を対象とした. ATS/ERS consensus statement あるいは第 4 次診断基準に準じて IPF 臨床診断基準に合致する例, すなわち IPF/UIP 群と, HRCT 所見が診断基準に合致しない非典型例である IIP/non-UIP 群の 2 群に分類した. なお, 「典型的」HRCT 所見とは, 1) 明らかな蜂巢肺 (大きさ 2-10 mm 程度の比較的大きさの揃った壁の厚い嚢胞性病変の集簇) が認められ, 2) 両側肺底部胸膜直下優位に分布し, 3) 比較的正常と思われる部分と蜂巢肺や網状病変などの線維化病変が混在している, の 3 要素をすべて満たすものとした (Fig. 1).

まず IPF/UIP 群と IIP/non-UIP 群の患者背景, 臨床検査所見, 肺癌の組織型, 癌の発生部位, 治療内容などについて retrospective に比較検討した. さらに HRCT 所見が IPF 臨床診断基準に合致しない非典型的な IIP/non-UIP 群 26 例のうち, 間質性肺炎の病理組織学的評価が可能であった 20 例について, 間質性肺炎の病理組織分類, 肺癌と線維化との位置関係について検討を行った.

¹⁾ 虎の門病院呼吸器センター内科,

²⁾ 同 呼吸器センター外科,

³⁾ 同 病理部,

⁴⁾ 同 放射線診断学科

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

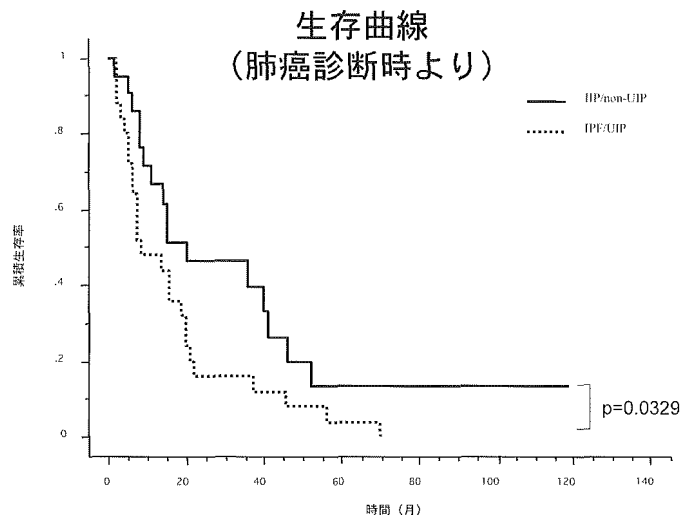


Figure 2 IPF/UIP 群と IIP/non-UIP 群の Kaplan-Meier 生存曲線。IIP/non-UIP 群において有意に生存期間が長い (p=0.0329)。

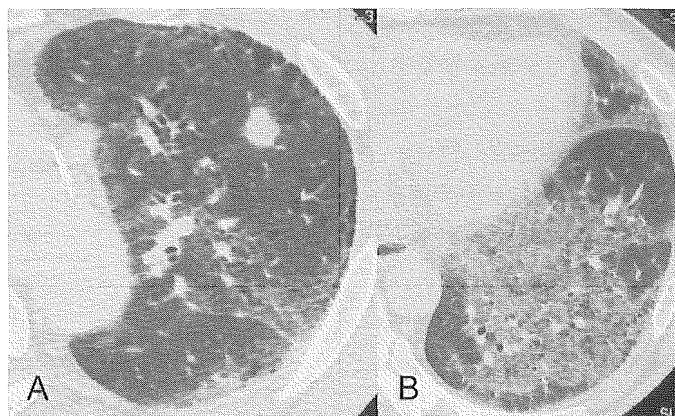


Figure 3 IIP/non-UIP 合併肺癌症例の HRCT 所見。A) 左 S3 に径 18 mm の境界明瞭で辺縁不正の分葉状結節を認める。B) 下葉にはび漫性に GGO が分布し、内部は牽引性気管支拡張を認める。

使用した CT 機種は GE 製 CT9800 または High Speed Advantage であった。CT 画像は 10 mm 厚または 3 mm 厚/10 mm 間隔で全肺を撮像し病変の強い部分を中心に 1~5 mm 厚・5 mm 間隔で HRCT 画像を作成した。

結 果

IPF/UIP 群 (n=84) と、IIP/non-UIP 群 (n=201) の肺癌合併率はそれぞれ 29/84 (34.5% M:F=27:2, 平均年齢 69.4 歳, Brinkman index 1197), 26/201 (12.9% M:F=24:2, 平均年齢 67.8 歳, Brinkman index 1265) であった。肺癌の組織型は IPF/UIP 群では腺癌 12 例, 扁平上皮癌 14 例, 小細胞癌 4 例, 大細胞癌 1 例であった (重複癌 1 例を含む)。IIP/non-UIP 群では腺癌

14 例, 扁平上皮癌 5 例, 小細胞癌 4 例, 大細胞癌 2 例, その他 3 例であった (重複癌 1 例を含む)。両群の比較では統計学的に有意差は認められなかった。IPF/UIP 群の臨床病期は stage IA 7 例, stage IB 3 例, stage IIA 0 例, stage IIB 2 例, stage IIIA 2 例, stage IIIB 7 例, stage IV 10 例であった。一方, IIP/non-UIP 群の臨床病期は stage IA 3 例, stage IB 4 例, stage IIA 1 例, stage IIB 1 例, stage IIIA 9 例, stage IIIB 4 例, stage IV 4 例であった。外科手術の対象となりうる stage IA~IIIA と, 内科治療の対象となる IIIB~IV で大別すると, IPF/UIP 群 14/17 例, IIP/non-UIP 群 18/8 例で IIP/non-UIP 群では手術可能早期例の割合が多い傾向にあった (P=0.088)。呼吸機能検査では, VC, %VC, FEV1.0, FEV1.0%, DLco, DLco% について比較検討したが, 統計学的に有意差を認めなかった。血液ガス分

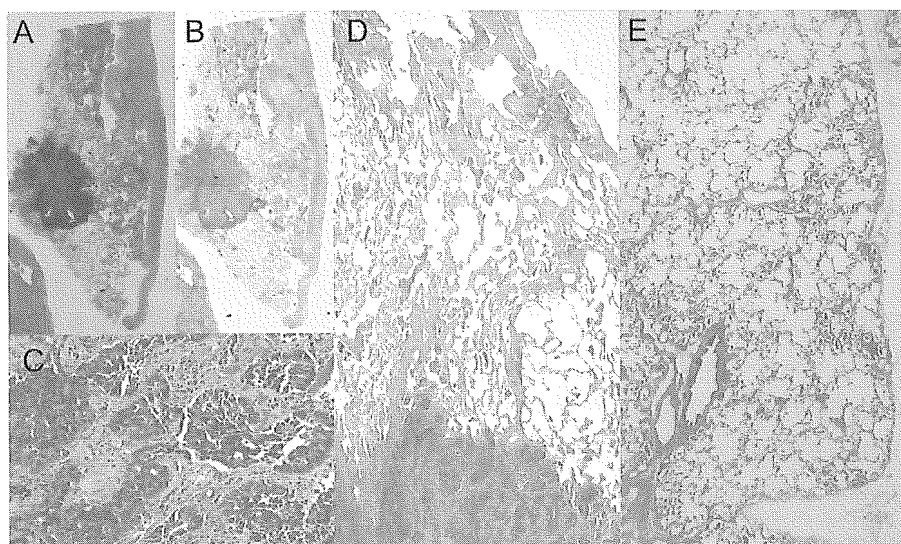


Figure 4 Figure 3 症例の左 S⁹ 病理組織のルーペ像。A) H-E 染色。B) EVG 染色。径 18 mm の腫瘍を認める。胸膜直下には肺嚢胞を認め、胸膜側から線維化巣が広がっている。C) 腫瘍部分の強拡大 H-E 染色。N/C 比の高い腫瘍細胞が胞巣状、索状に増殖し、ロゼット様構造を認める。Apoptosis や核分裂像を多数認める。D) 腫瘍辺縁と線維化巣が接する部分の強拡大。H-E 染色。E: 左 S⁹ の病理組織所見の弱拡大像 (H-E 染色)。小葉単位における病変分布はび漫性で、肺泡隔壁の浮腫状肥厚とリンパ球、形質細胞を中心とした炎症細胞浸潤、および部分的な膠原線維の増生を伴う。

Table 1. Respiratory function test

	IPF/UIP群	IIP/non-UIP群
VC (L)	3.20 ± 0.77	3.36 ± 0.79
%VC (%)	102.7 ± 21.2	103.1 ± 25.5
FEV1.0 (L)	2.29 ± 0.55	2.33 ± 0.68
FEV1.0% (%)	71.1 ± 9.1	70.3 ± 14.7
DLCO (mL/min/mmHg)	14.3 ± 5.56	13.8 ± 5.62
%DLCO (%)	56.3 ± 17.0	69.3 ± 22.
PaO ₂ (Torr)	74.9 ± 14.3	77.5 ± 10.9
PaCO ₂ (Torr)	40.3 ± 9.88	38.5 ± 4.00

NS

析でも 2 群間に有意差を認めなかった (Table 1)。Kaplan-Meier 法による生存曲線では、IIP/non-UIP 群が有意に生存期間が長期であった (Fig. 2)。

IPF 臨床診断基準の胸部 CT 所見に合致しない、IIP/non-UIP 群 26 例のうち、間質性肺炎の病理組織学的評価が可能であったのは 20 例であったが、これら 20 例における間質性肺炎の病理組織分類は UIP 11 例、NSIP 2 例、その他 3 例、病理組織上間質性肺炎が確認できなかったもの 4 例であった。その他には subpleural fibrosis の範疇で間質性肺炎と診断できないもの、lymphoid hyperplasia、広義間質病変などが目立ち、所見が多彩で 7 病理組織型に分類できないもの、などが含まれた。癌と線維化との病理組織上の位置関係は

Table 2. Laboratory data on admission of the presented case

Hematology			
WBC	10200 /μL	PR3-ANCA	20 EU
Hb	16.4 g/dL	MPO-ANCA	32 EU
Plt	19.7 × 10 ⁴ /μL	KL-6	1236 U/mL
ESR	26 mm/hr	sIL2R	853 U/mL
Chemistry			
TP	7.9 g/dL	Blood gas analysis (room air)	
Alb	3.6 g/dL	pH	7.40
UN	15 mg/dL	PaO ₂	67 Torr
Cr	0.7 mg/dL	PaCO ₂	42 Torr
AST	36 IU/L	HCO ₃	25 mmol/L
ALT	29 IU/L	SaO ₂	92.7 %
LDH	288 IU/L	Pulmonary function test	
CRP	0.5 mg/dL	VC	3.28 L
		%VC	87 %
		FEV1.0	2.63 L
		FEV1.0%	87 %
		%DLco	64 %

UIP 11 例のうち蜂巣肺と接するもの 7 例、線維化巣と接するもの 1 例、関係がないもの 3 例、NSIP 2 例のうち線維化巣と関係するもの 1 例、関係がないもの 1 例であった。

症例呈示 (fibrotic NSIP 症例)

症例: 52 歳 男性

主訴: 労作時呼吸困難

家族歴: 父 肝硬変, 母 胃癌

既往歴: 50 歳 急性心筋梗塞

喫煙歴: 60 本/day (50 歳まで 30 年間)

職業歴: 会社員 明らかな粉塵暴露, 動物飼育歴・接触歴なし

経過：2002年2月頃からHugh-Jones II度の労作時呼吸困難を自覚するようになり、同年8月の健診で胸部異常陰影を指摘された。胸部X線上、両側下葉優位の間質影と左上肺野の約2cm大の結節影が認められたため精査目的に入院となった。

入院時検査所見：ESR 26 mm/hr, CRP 0.5 mg/dLと軽度高値であった。動脈血ガス分析ではPaO₂ 67 Torrと、安静時に軽度の低酸素血症を認めた。呼吸機能検査ではVC 3.28 L, %VC 87%, %DLco 64%と拡散能障害を認めた (Table 2)。間質性肺炎の原因精査では明らかな粉塵暴露、動物飼育歴はなく、特異抗体などの検索ではPR3-ANCAとMPO-ANCAが軽度上昇していたが、臨床症状あるいは尿所見などから血管炎の診断に至る所見はなかった。

入院時CTではground-glass opacity (GGO) がびまん性かつ下肺優位に分布していた。病変内部に牽引性気管支拡張を認め、左S³には径18mm程度の境界不正で明瞭、分葉構造を呈した充実性の結節を認めた (Fig. 2)。なお、VATS下肺生検は左S³および左S⁸より実施した。

生検検体の組織所見 (Fig. 3) は左S⁸では小葉単位での病変分布がpan lobular distributionを呈し、肺胞隔壁にはリンパ球、形質細胞を中心とした細胞浸潤を認め、胞隔炎を認めた。狭義の間質は浮腫状に肥厚し一部に膠原線維の増生を認めた。以上から間質性肺炎の組織分類はfibrotic NSIPとした。左S³の結節はN/C比の高い大型腫瘍細胞が胞巣状、索状に増殖し、一部ロゼット様構造を認めた。Apoptosisや核分裂像を多数認め、免疫染色の結果NCAM (CD56) 陽性、CD57弱陽性、synapophysin弱陽性、TTF-1陽性であった。以上からlarge cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC) と診断した。腫瘍と線維化の関係はCT上明確ではなかったが、病理組織所見では腫瘍の背景肺に間質の線維化を認め、一部が腫瘍と接していた。

考 察

IPF/UIPと原発性肺癌の合併についてはこれまですでに多くの報告がある。原発性肺癌はIPF/UIPの死因の約10%に寄与し、重要な予後規定因子である。疫学的検討ではIPF/UIPの肺癌合併率は10~40%で一般集団の肺癌発症率 (約5%) と比較して有意に高率である。IPF/UIPは一般的に男性に多いが、肺癌を

合併する場合の性差はさらに男性に高率である。IPFに合併する肺癌の特徴は、1) IPF/UIPの中でも長期生存例に多い、2) 肺癌の発症部位は末梢でかつ下葉に多い、3) 組織型は扁平上皮癌あるいは腺癌が多い、4) 同時または異時多重癌発症の頻度が高い、などがこれまでに報告されている⁸⁻¹²⁾。また、その発症機序の一つに蜂巢肺の腺様化生や扁平上皮化生の部位から発生する可能性があるとする指摘もある^{13,14)}。IPF/UIP合併原発性肺癌の治療についてはいくつかの問題点が指摘されている。まず診断時に進行癌が多く、手術可能な症例が少ない点である。また、手術が可能であっても、術後に間質性肺炎の急性増悪を来たす危険性がありこれが致死的となる場合もある¹⁵⁻¹⁷⁾。さらに、進行癌で内科的治療が選択される場合にも、新規抗癌剤のなかには間質性肺炎合併例には慎重投与、あるいは使用禁忌の薬剤が多い。これらの状況を考慮すると、IPF/UIPに合併する肺癌の治療は必ずしも容易ではない¹⁸⁾。

IPF臨床診断基準に合致する典型的なHRCT所見を満たさない間質性肺炎に合併する原発性肺癌の症例は、日常臨床上しばしば経験される。このような症例20例を今回検討した結果、特筆すべきは1) HRCT所見が典型的IPFでなくとも、病理組織学的に20例中11例がUIPであり、そのうち癌発生と線維化との関連が示唆される例が8例認められたこと (以下病理診断UIP症例)、2) 20例中2例にfibrotic NSIPが含まれたこと (以下病理診断NSIP症例) である。

1) 病理診断UIP症例について

病理診断UIP症例では、HRCT上は明らかな蜂巢肺を認めず、reticular patternといわれる網状病変が両側下葉背側に認められる例が多くみられた。また、線維化巣と比較的正常な部分が混在する、いわゆる空間的不均一性を示唆する所見や、下葉の容積減少は認められなかった。病理組織所見、HRCT所見からはIPF/UIPのきわめて初期の病変をみている可能性があるとして解釈できるかもしれない。しかし、前述のように臨床的にIPF/UIP群およびIIP/non-UIP群2群に分類した際の肺機能検査や血液ガス分析の両群比較では有意差が認められなかったため、病理組織所見やHRCTでの病変の広がりや程度だけでこのような症例の全体像を判断するのは困難である。ただし、病理組織診断がUIPであるため、手術可能例では術後急性増悪を来たす可能性があり、周術期管理に注意を要す

る。また術後再発例では抗癌剤の選択に制約が生じる可能性があり、手術時に肺癌に対する根治手術の他、積極的に下葉の部分切除（間質性肺炎に対する肺生検）を併用するなどして間質性肺炎の病理組織診断を付ける努力が必要であると思われる。

今回の retrospective な検討で、IIP/non-UIP 群と臨床診断された 26 例のうち、間質性肺炎の病理組織診断が困難であった 6 例は、そのほとんどが癌の発生部位が上・中葉であって、癌に対する根治手術が行われていても、下葉に存在する間質性肺炎が評価できない例であった。

今回の検討では、臨床診断 IIP/non-UIP 群 26 例では臨床診断 IPF/UIP 群と比較した際、外科的手術の対象になった例の割合が多い傾向にあった。これまでに報告された IPF/UIP に合併する肺癌症例では、診断時進行例が多く、手術可能な例が少ないので予後が悪いとされている。その理由の一つは原発巣が小さくても転移が存在するケースが多いことである^{6,10,15}。この点、今回検討の対象とした病理診断 UIP 症例は間質性肺炎の画像上および病理組織所見上の進行程度は軽度であり、癌の診断の目的で胸部 CT が施行された際に初めて間質性肺炎が指摘された例が少なからず含まれた。また、11 例中 8 例では線維化と肺癌が接しており、線維化が肺癌発生の発生母地となっている可能性が示唆された。しかし、これまでの報告にみられるような、蜂巣肺の腺様化生や扁平上皮化生からすべての癌が発生しているのではないため、その機序については今後の検討を待ちたい。

2) 病理診断 NSIP 症例について

ATS/ERS consensus statement 以来、NSIP は IIPs の一病理組織型と位置づけられている。NSIP の概念を提唱した Katzenstein らが原著で報告しているように、NSIP は膠原病合併間質性肺炎など原因が推定可能な症例に合併することもある¹⁹。NSIP と原発性肺癌の合併に関する報告はこれまでのところ少ない。また、数ヶ月の経過で増悪する間質性肺炎と肺癌が同時に指摘される症例がみうけられる。NSIP に合併する肺癌症例で抗サイトケラチン-8 抗体、抗サイトケラチン-19 抗体などの癌細胞に対する自己抗体が産生され、paraneoplastic syndrome として NSIP が発症する可能性が指摘されている^{20,21}。今回の検討では、2 例中 1 例は NSIP と原発性肺癌が同時に指摘されたが、呈示症例では労作時呼吸困難を生じた 2 年前の胸部 CT

を retrospective に検討するとごく淡い GGO をその時点で指摘しうるため、必ずしも paraneoplastic syndrome だけでは NSIP と肺癌の発症の相互機序を説明できないと考えられた。今後、症例の集積、検討が重要である。

参考文献

- 1) Hubbard R, Venn A, Lewis S, et al : Lung cancer and cryptogenic fibrosing alveolitis — A population-based cohort study —. *Am J Respir Crit Care Med* 2000 ; 161 : 5-8
- 2) 吉村明修, 弦間昭彦, 工藤翔二 : 特発性肺線維症と肺癌. *日本醫事新報* 2004 ; 4206 : 18-24
- 3) 棟方 充, 浅川三男, 本間行彦ら : 特発性間質性肺炎の実態 — 疫学から病因論へ —. *日胸疾会誌* 1994 ; 32 : S187-S192
- 4) American Thoracic Society. American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 2002 ; 165 : 277-304.
- 5) 日本呼吸器学会びまん性肺疾患診断・治療ガイドライン作成委員会. 特発性間質性肺炎診断と治療の手引き. 2004. 南江堂.
- 6) 中川勝裕, 安光 勉, 古武彌宏ら : 特発性間質性肺炎を伴った肺癌手術症例の検討. *日胸外会誌* 1994 ; 42 : 1993-1939
- 7) 渡辺 敦, 小柳哲也, 大澤久慶ら : 間質性肺病変を伴う肺癌手術 — とくに非合併例との比較 —. *胸部外科* 2005 ; 58 : 9-13
- 8) 岡野 弘, 谷本普一, 中田紘一郎ら : 特発性間質性肺炎の肺癌合併. *日胸* 1989 ; 48 : 189-198
- 9) 小倉 剛, 近藤有好, 佐藤篤彦ら : 特発性間質性肺炎における肺癌合併とその臨床的特徴. *日胸疾会誌* 1997 ; 35 : 294-299
- 10) 谷村一則, 清水 透, 本間行彦ら : 特発性間質性肺炎と肺癌合併例の特徴 — とくに頻度, 組織型, 発生部位, 病期, 年齢, 肺機能について —. *日胸疾会誌* 1987 ; 25 : 216-221
- 11) Mizuhashi Y, Kobayashi M : Clinical characteristics of synchronous multiple lung cancer associated with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 1995 ;

- 108: 1272-1277
- 12) 渡辺秀一, 北村 諭, 横山 武ら: 特発性間質性肺炎に合併した肺癌解剖例の臨床病理学的検討. 肺癌 1990; 30: 841-847
- 13) 清水英男: 特発性間質性肺炎に合併した肺癌の病理学的研究—特に蜂窩構造との関係について—. 日胸疾会誌 1985; 23: 873-881
- 14) 松下 央: 特発性間質性肺炎と肺癌. 病理と臨床 1993; 11: 178-182
- 15) 谷村繁雄, 友安 浩, 伴場次郎ら: 特発性間質性肺炎に合併した肺癌に対する手術の検討. 日胸 1992; 51: 208-213
- 16) 吉村邦彦, 中谷龍王, 中森祥隆ら: 特発性間質性肺炎の急性増悪に関する臨床的検討および考察. 日胸疾会誌 1984; 22: 1012-1020
- 17) 坂本 晋, 本間 栄, 川畑雅照ら: 肺癌術後の対側肺からの急性増悪を確認しえた idiopathic pulmonary fibrosis/usual interstitial pneumonia の 1 解剖例. 日呼吸会誌 2004; 42: 760-766
- 18) 埴淵昌毅, 山口俊彦, 岡田達也ら: 特発性間質性肺炎 (IIP) 合併肺癌に対する肺癌治療後 IIP 急性増悪症例の臨床的検討. 肺癌 2001; 41: 281-286
- 19) Katzenstein ALA, Fiorelli RF: Nonspecific interstitial pneumonia/fibrosis: histologic features and clinical significance. Am J Surg Pathol 1994; 18: 136-147
- 20) Yamadori I, Sato T, Fujita J et al: A case of non-specific interstitial pneumonia associated with primary lung cancer: possible role of antibodies to lung cancer cells in the pathogenesis of non-specific interstitial pneumonia. Respir Med 1999; 93: 754-756
- 21) Sato T, Yamadori I, Fujita J, et al: Three cases of non-specific interstitial pneumonia associated with primary lung cancer. Intern Med 2004; 43: 721-726

ブレオマイシン誘発肺線維症マウスモデルにおける線維芽細胞、 プロテオグリカンの役割

甲斐 吉郎 米山 博之 西脇 徹 松尾 直樹
熊本 牧子 松島 綱治*

特発性肺線維症は過剰な線維芽細胞 (fibroblast) の集積とコラーゲン, プロテオグリカンといった細胞外マトリックス (ECM) の沈着を特徴とする予後不良の慢性肺疾患である。近年, 肺線維症の治療標的として fibroblast の浸潤制御がクローズアップされている。しかしながら fibroblast は均一な細胞集団ではないことも徐々に判明してきている。一方 ECM は線維化の最終産物, すなわち構造物の形態維持といった静的な働きが主と考えられてきたが, ECM の主たる構成成分であるプロテオグリカンは細胞浸潤, 細胞接着ら動的な役割を持つことが近年報告されてきている。そこでわれわれはマウスブレオマイシン誘発肺線維症モデルにおいて線維芽細胞, プロテオグリカンの経時的な変化, 局在を免疫染色により詳細に検討した。ブレオマイシン投与前では ER-TR7 陽性 fibroblast は主に気管支周囲, 肺胞間質に局在し, 投与後には同位部で fibroblast の増殖を認めた。またプロテオグリカンもブレオマイシン投与前には気管支周囲, 肺胞間質に局在し, 投与後には線維化病変形成部にびまん性に認めた。蛍光免疫染色によりプロテオグリカンは初期より主に線維芽細胞より産生が亢進することが分かった。時間的・空間的に fibroblast の遊走・活性化様式を詳細に解析し, かつその亜集団の同定を試みることは, サブセット選択的あるいは分化段階選択的な fibroblast を標的とした新しい肺線維症治療法開発への基礎的知見を提供できるものと期待できる。

Pivotal role of fibroblasts and proteoglycan in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice

Yoshiro Kai, Hiroyuki Yoneyama, Tetsu Nishiwaki, Naoki Matsuo,
Makiko Kumamoto, and Kouji Matsushima

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

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is characterized by fibroblast proliferation and extracellular matrix (ECM) deposition. Recently, the control of the accumulation of fibroblasts is focused for the treatment of pulmonary fibrosis. However, it has been revealed that fibroblasts were composed of heterogeneous populations. On the other hands, proteoglycans, one of the major components of the ECM, not only provide structural integrity on tissue but also play an important role in the cell migration and adhesion. In this study, we examined the role of fibroblasts and proteoglycans in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. Immunohistochemical study showed that ER-TR7⁺ fibroblasts are detected around bronchus and alveolar areas. After bleomycin challenge, the proliferation of fibroblasts was detected. Similarly, at day14, proteoglycan deposition was detected in fibrotic area. Immunofluorescence analysis showed that at day3 ER-TR7⁺ fibroblasts synthesize proteoglycan. To analyze the migration and activation of fibroblasts in time and space, and to identify a subset of fibroblasts/fibrocytes is expected to be helpful for the development of new therapeutic approaches for lung fibrosis.

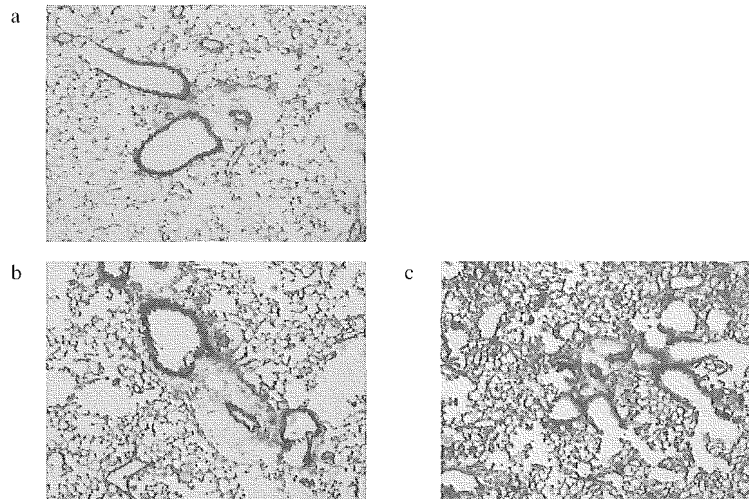


図1. BLM 誘発肺線維症モデルにおける ER-TR7⁺ fibroblast の経時的変化
a. BLM 投与前, b. 投与 3 日目, c. 投与 14 日目 ×100

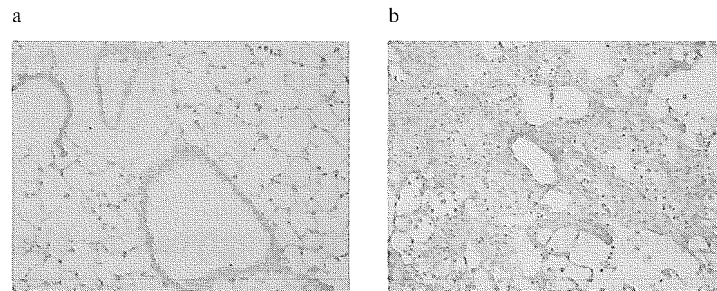


図2. BLM 誘発肺線維症モデルにおける Proteoglycan (CSPG) の沈着
a. BLM 投与前, b. 投与 14 日目 ×200

はじめに

われわれはこれまで、マウス肝臓/肺における肉芽形成機序の解析を生体内レベルで展開し、その成果を発表してきた¹⁻³⁾。 *Propionibacterium acnes* 誘導肉芽形成モデルに於いて、肉芽病変局所の Th1/Th2 免疫バランスがケモカインによって制御されていること、すなわち Th1 優位環境を誘導するのはケモカイン受容体 CXCR3/CCR5 とそのリガンドであり Th2 を誘導するのは CCR4 とそのリガンドであること、を実験的に立証した。さらに、この局所免疫環境が Th2 に傾く事が、慢性化・重症化につながる事を示し、肉芽反応が慢性線維化病変にシフトしうる状況下での、ケモカインと Th2 シフトの概念を提供してきた。実際にマウス肺線維症モデルに於いて、CCR4 リガンドに対する

中和抗体や CXCR3 遺伝子欠損マウスを用いた実験により、ケモカインによる Th2 シフトを阻害する事で線維化を軽減できる事が他のグループからも報告されている^{4,5)}。また私たちは肺線維症モデルにおいても、ケモカイン受容体 CCR1 の阻害により単球/マクロファージの過剰遊走を抑制する事で、線維化を軽減する事を示してきた⁶⁾。このようなケモカインによる各種炎症細胞浸潤ならびに病変形成制御という独自の研究成果に基づき、fibroblast の浸潤様式を掘り下げ、さらに近年細胞接着、細胞増殖に関与が報告されている ECM の主要な構成成分であるプロテオグリカンが線維化にいかに関わりがあるかにつき解析した。

方 法

肺線維症モデルは 6 週齢の C57BL/6J マウスに気管内にブレオマイシン (0.04U) を生理食塩水 50 μ l

東京大学大学院医学系研究科分子予防医学

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 分担研究者

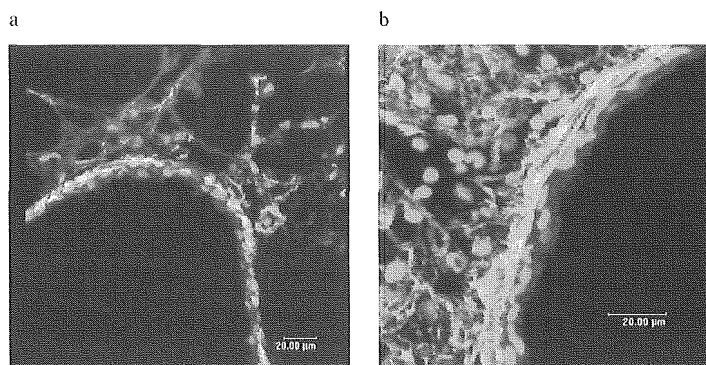


図3. BLM 誘発肺線維症モデルにおける蛍光免疫染色。
ER-TR7; green, nucleus; red, CS-56; blue
a. BLM 投与前, b. 投与3日目

に溶解して投与することで作成した。Day 0,3,14にて肺を取り出し、肺組織切片を免疫染色により検討した。免疫染色は間接免疫アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ法により試行した。一次抗体としてコンドロイチン硫酸 (CS-56): 生化学工業製でヒストファインマウスステインキット: ニチレイ製により染色した。方法はキットの説明書による。また蛍光免疫染色には一次抗体として, ER-TR7: BMA 製, 二次抗体として ALP 標識抗ラット免疫グロブリン抗体: Jackson Immuno Research 製, Alexa Fluor 488 抗ラット免疫グロブリン, CS-56 は Alexa Fluor 647 Monoclonal Antibody Labeling Kit を使用した。核染色は SYTOX orange を使用した。いずれも Molecular Probes 社製。

結 果

ER-TR7⁺ fibroblast の経時的变化を示す (図 1)。プレオマイシン投与前では気管支壁, 肺胞間質に局在を示す。プレオマイシン投与後初期に同部位の fibroblast の増殖を認めた。さらに day 14 には線維化病変形成部に過剰な fibroblast の集積が認められた。次にプロテオグリカンの免疫染色像を示す (図 2)。プレオマイシン投与前では気管支壁, 肺胞間質に位置しており, プレオマイシン投与 14 日目には線維化病変形成部に一致しびまん性に沈着を認めた。また蛍光免疫染色でプロテオグリカンの産生細胞は主に気管支周囲に存在する fibroblast と考えられた (図 3)。

考案, 結論

線維化病変形成部には過剰な fibroblast の集積が認められ, 肺線維症の治療標的として fibroblast の浸潤制御がクローズアップされている。現在まで fibroblast の活性化には多彩なサイトカイン (TGF- β や IL-13 など), ケモカイン (MCP-1/CCL2 や SDF-1/CXCL12 など), 接着分子 (CD44 など) が関与している事が解明されてきている。しかしながら一方で, fibroblast は均一な細胞集団ではないことも徐々に判明してきている。実際, プレオマイシン投与後に ER-TR7 陽性 fibroblast が増殖しているが, その起源や亜集団ならびに遊走・活性化機序ははっきりしておらず, より包括的かつ詳細に解析する必要性が新たに生じている。その起源としても, 1) 肺常在線維芽細胞の活性化, 2) 上皮細胞からの transdifferentiation, さらに 3) 血中 fibrocyte の遊走と, 少なくとも 3 種の異なる fibroblast が混在すると考えられる。今後本研究では, fibroblast の生体内遊走・活性化の制御機構を, ケモカイン/ケモカイン受容体を中心とした観点から解析するとともに, fibroblast の亜集団とそのマーカーの検索も試みる。とりわけ血中 fibrocyte は CXCR4 と CCR7 を発現し, 局所に遊走后 fibroblast/myofibroblast まで活性化すると報告され, SDF-1/CXCL12 が新たな治療標的として注目されている。また, 浸潤 fibroblast が I 型コラーゲンを過剰産生する際に CCR2 システムが関わるとされ, MCP-1/CCL2 も治療標的として考えられている。このような多彩な要素の混在が判明するに伴い, 時間的・空間的に fibroblast の遊走・活性化様式を詳細に解析し, かつその亜集団の同定を試みることは, サブセット選択的あ

るいは分化段階選択的な fibroblast を標的とした新しい肺線維症治療法開発への基礎的知見を提供できるものと期待できる。

参考文献

- 1) Yoneyama, H. 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, 35-49 (2001).
- 2) Yoneyama, H. 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, 1257-66 (2002).
- 3) Nishiwaki, T. et al. Indigenous pulmonary *Propionibacterium acnes* primes the host in the development of sarcoid-like pulmonary granulomatosis in mice. *Am J Pathol* 165, 631-9 (2004).
- 4) Wynn, T.A. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol* 4, 583-94 (2004).
- 5) Strieter, R.M. and Keane, M.P. Innate immunity dictates cytokine polarization relevant to the development of pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 114, 165-8 (2004).
- 6) Tokuda, A. et al. Pivotal role of CCR1-positive leukocytes in bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *J Immunol* 164, 2745-51 (2000).

ブレオマイシン誘発肺線維症モデルにおける IKK β 阻害剤 IMD-0354 の抗線維化効果の検討

西岡 安彦 稲山 真美 上原 久典 泉 啓介 曾根 三郎*

抗炎症薬として開発された I κ B kinase β (IKK β) 阻害剤 IMD-0354 に注目し、ブレオマイシン (bleomycin: BLM) 誘発肺線維症モデルを用いて、その抗線維化効果について検討した。肺線維症モデルは、8 週齢の C57BL/6 マウスに BLM を Alzet mini-osmotic pump を用いて持続皮下投与することにより作成した。IMD-0354 は BLM 投与開始日から 5 あるいは 20 mg/kg/day で腹腔内投与した。28 日後にマウスを sacrifice し Sircol Collagen Assay による肺コラーゲン含量の定量と、病理医による Ashcroft score を用いた線維化の定量化、ELISA kit を用いた BALF、肺ホモジネートのサイトカインの検討を行った。肺組織における NF- κ B の活性化についても検討した。BLM 肺線維症モデルによる組織学的検討から、IMD-0354 投与は BLM により誘発される肺線維化を有意に抑制することが明らかとなった。また BLM 投与後 28 日目の肺コラーゲン含量は、IMD-0354 投与群で有意に減少した。BALF では、BLM による好中球およびリンパ球の浸潤が抑制され、BALF 中および肺ホモジネートの TNF- α および IL-1 β も IMD-0354 投与群で有意に減少していた。IMD-0354 投与群では NF- κ B の活性化抑制が確認された。以上から IMD-0354 は NF- κ B 抑制を介してブレオマイシン誘発肺線維症を効果的に抑制することが示唆されるとともに、線維症治療薬としての応用が期待された。

A novel I κ B kinase- β inhibitor IMD-0354 ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice

Yasuhiko Nishioka, Mami Inayama, Hisanori Uehara, Keisuke Izumi, and Saburo Sone

Departments of Internal Medicine and Molecular Therapeutics, and Molecular and Environmental Pathology, Institute of Health Biosciences, the University of Tokushima Graduate School, Tokushima 770-8503, Japan

I κ B kinase- β is a critical regulator in the activation of nuclear factor-kappa B, a transcription factor related to the expression and regulation of proinflammatory cytokines. To evaluate if inhibition of I κ B kinase- β ameliorates pneumonitis and pulmonary fibrosis, we examined whether a novel I κ B kinase- β inhibitor, IMD-0354, attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. Administration of IMD-0354 significantly improved the loss of body weight and survival of mice treated with bleomycin, while IMD-0354 alone did not cause any morphological change in the lung. When mice were evaluated 28 days after bleomycin administration, IMD-0354 dose-dependently reduced the collagen content and fibrotic scores as shown by histological examination. The findings in the bronchoalveolar lavage demonstrated that the proportions of neutrophils and lymphocytes were decreased in mice treated with IMD-0354 on day 7 and 14, respectively. IMD-0354 treatment was confirmed to inhibit the activation of nuclear factor-kappa B, but not activator protein-1, in the lungs treated with bleomycin. The production of inflammatory cytokines, tumor necrosis factor- α and interleukin-1 β , was reduced in the lungs of mice treated with IMD-0354. These results suggest that IMD-0354 might be useful to ameliorate the inflammation in the lungs induced by fibrotic injury and the subsequent fibrogenesis via inhibiting the expression of profibrotic cytokines related to the activation of nuclear factor-kappa B.

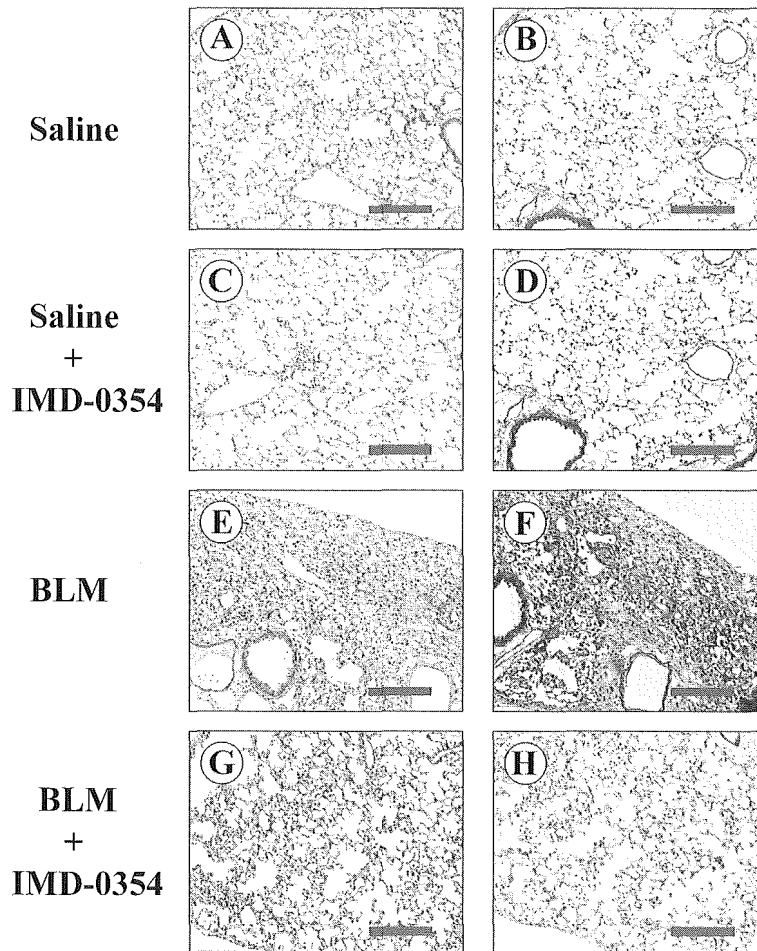


Figure 1 Histological examination of the antifibrotic effects of IMD-0354 on bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Mice were treated with osmotic minipumps containing saline or bleomycin (BLM) (125 mg/kg). IMD-0354 (20 mg/kg/day) was intraperitoneally injected. On day 28, mice were sacrificed and histological examination was performed by H & E staining (A, C, E, G) and Masson's-trichrome staining (B, D, F, H) (original magnification: $\times 100$). A, B: saline alone, C, D: saline+IMD-0354 (20 mg/kg/day), E, F: BLM alone, G, H: BLM+IMD-0354 (20 mg/kg/day). Data are representative of three separate experiments. Bar=200 μ m.

はじめに

特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) は肺線維芽細胞の増殖と細胞外マトリックスの沈着によって特徴づけられる予後不良の慢性進行性肺疾患である。ステロイド、免疫抑制剤等にて治療が試みられているが、未だ生命予後を延長する治療法が確立されていないのが現状である。IMD-0354 は (株) 医薬分子設計研究所で開発された抗炎症薬で, $I\kappa B$ kinase β (IKK β) 阻害剤である。In vitro の実験では, tumor necrosis factor- α (TNF- α) による nuclear factor-kappa B (NF- κ B) 活性化を抑制し, concanavallin A や lipopolisaccharide (LPS) による炎症性物質の放

出を抑制するが, 免疫反応に関する kinase や受容体結合は阻害しないことが確認されている。一方, IPF 患者の肺泡マクロファージにおいて IL-1 β や TNF- α などの炎症性サイトカインの産生が亢進していることが知られている¹⁾。また, これらのサイトカインの産生経路には NF- κ B が重要な役割を果たしている。実際, プレオマイシン (bleomycin: BLM) 誘発肺線維症モデルマウス肺において, TNF- α mRNA レベルの増加と共に NF- κ B の活性化を認めたと報告されている²⁾。以上より我々は, BLM 誘発肺線維症モデルマウスにおける IMD-0354 の抗線維化効果について検討した。

方 法

肺線維症モデルは 8 週齢の C57BL/6 マウスに

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部分子制御内科学

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 分担研究者

BLM 125 または 150 mg/kg を 200 μ l の生理食塩水に溶解し Alzet mini-osmotic pump を用いて約 7 日間かけて持続皮下投与することにより作成した。コントロール群として同様に 200 μ l の生理食塩水を pump にて持続皮下投与した。IMD-0354 は、BLM 投与開始日から 5 あるいは 20 mg/kg/day を 200 μ l の 0.5% carboxymethylcellulose (CMC) に溶解し腹腔内投与した。コントロールとして 200 μ l の CMC を腹腔内投与した。28 日後にマウスを sacrifice し、右肺は Sircol Collagen Assay を用いてコラーゲン含量の定量に使用した。左肺組織切片の HE 染色により組織学的な線維化の評価を Ashcroft score を用いて 2 人の病理医により行った。さらに、day 7, 14, 28 において sacrifice したマウスに対し気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage: BAL) を施行し、総細胞数および細胞分画を検討した。また、Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kit を用い気管支肺胞洗浄液 (BAL fluid: BALF) および、肺組織中のサイトカイン、ケモカインの検討を行った。肺組織から抽出した核蛋白を用いてゲルシフト法および TransAM kit により NF- κ B の活性化状態を検討した。

結 果

BLM 肺線維症モデルに対する IMD-0354 20 mg/kg/day の投与は、BLM によって誘発されるマウスの体重減少および生存率を改善した。さらに、BLM 肺線維症モデルの Ashcroft score による組織学的検討から、IMD-0354 容量依存性に BLM により誘発される肺線維化を有意に抑制することが明らかとなった (Figure 1, 2)。一方、コントロール群マウスに対する IMD-0354 の単独投与では組織学的に著明な変化はみられなかった。また BLM 投与後 28 日目の肺コラーゲン含量は、5 mg/kg/day あるいは 20 mg/kg/day の IMD-0354 投与で容量依存性に減少していた (Figure 2)。一方、BLM による炎症細胞浸潤に対する IMD-0354 の影響を検討するために BAL を行ったところ、IMD-0354 投与により day 7 における好中球の浸潤、day 14 におけるリンパ球の浸潤が有意に抑制された (Table 1)。BALF 中の TNF- α および肺ホモジネート中の TNF- α 、IL-1 β も IMD-0354 投与群で減少していた (Figure 3)。ゲルシフト分析では BLM 投与後 7 日目の肺のホモジネートにおける NF- κ B 活性は、

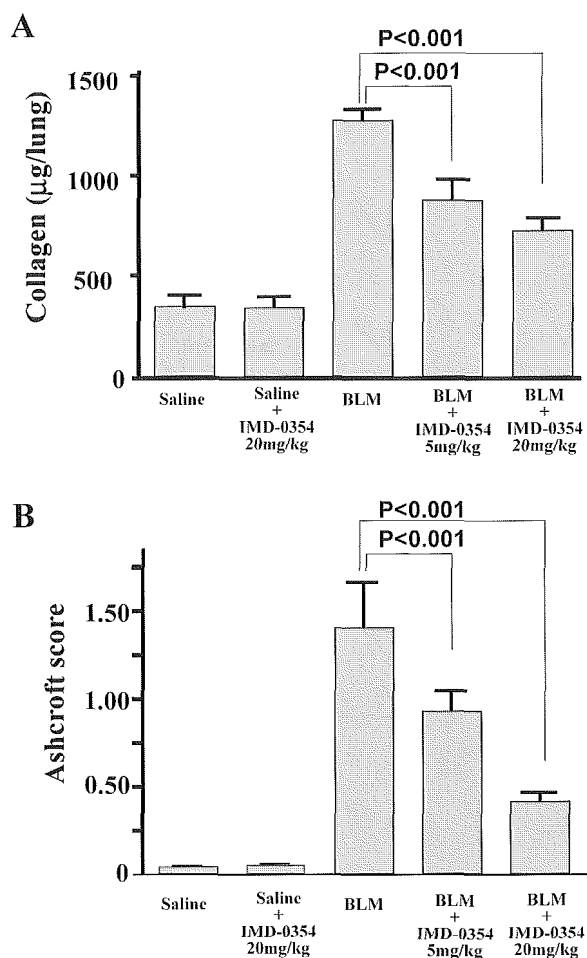


Figure 2 Quantitative examinations of the antifibrotic effects of IMD-0354 on bleomycin-induced pulmonary fibrosis. Mice were treated with osmotic minipumps containing saline or bleomycin (BLM). IMD-0354 (5 mg/kg or 20 mg/kg) was given by intraperitoneal injection on a daily basis for the entire duration of the experiment. Mice were sacrificed on day 28. **A**: Evaluation of fibrotic change in the lung using numerical fibrotic score. Histological examination in the left lung was performed by H & E staining. The fibrotic score was determined by two pathologists as described in the Methods. Data are presented as mean \pm SD of all fields examined in each group of 6 mice. **B**: Effects of IMD-0354 on collagen deposition after treatment with BLM. Collagen content in the right lung was measured using a Sircol collagen kit. Data are presented as mean \pm SD of 6 mice. Data are representative of two separate experiments. (文献 5 より引用)

IMD-0354 投与群で減少していた (Figure 4)。一方、TransAM kit による解析においても BAL 細胞および肺ホモジネート中の NF- κ B 活性は、IMD-0354 投与群で有意に抑制されていたが、AP-1 活性には有意差を認めなかった (Figure 4)。

考 察

我々は、マウスにおける BLM 誘発肺線維化を

Table 1 Analysis of bronchoalveolar lavage

Days after Treatment	Total cells ($\times 10^6$)	Cell differentiation (%)		
		Macrophages	Lymphocytes	Neutrophils
Day 0	0.69 \pm 0.14	94.8 \pm 2.2	3.2 \pm 1.8	2.1 \pm 0.3
Day 7				
BLM	2.20 \pm 0.57	63.2 \pm 11.4	6.38 \pm 4.82	30.18 \pm 8.53
BLM+IMD-0354	1.33 \pm 0.33	96.9 \pm 2.22	0.55 \pm 0.34	2.55 \pm 2.17*
Day 14				
BLM	6.36 \pm 2.91	67.2 \pm 10.20	24.7 \pm 7.68	8.05 \pm 3.65
BLM+IMD-0354	6.58 \pm 2.42	78.3 \pm 4.98	4.98 \pm 3.09*	16.63 \pm 5.15
Day 28				
BLM	2.19 \pm 0.79	61.01 \pm 5.10	28.68 \pm 3.75	10.30 \pm 4.69
BLM+IMD-0354	3.00 \pm 1.64	65.75 \pm 6.53	24.30 \pm 3.59	9.95 \pm 3.66

Mice were treated with osmotic minipumps containing bleomycin (BLM: 125 mg/kg). IMD-0354 (20 mg/kg) was intraperitoneally injected daily. On days 0, 7, 14 and 28, bronchoalveolar lavage was performed as described in Methods. Data are presented as mean \pm SD in the group of 6 mice. Similar results were obtained in three separate experiments.

P<0.001 v.s. percentage in BLM group
(文献5より引用)

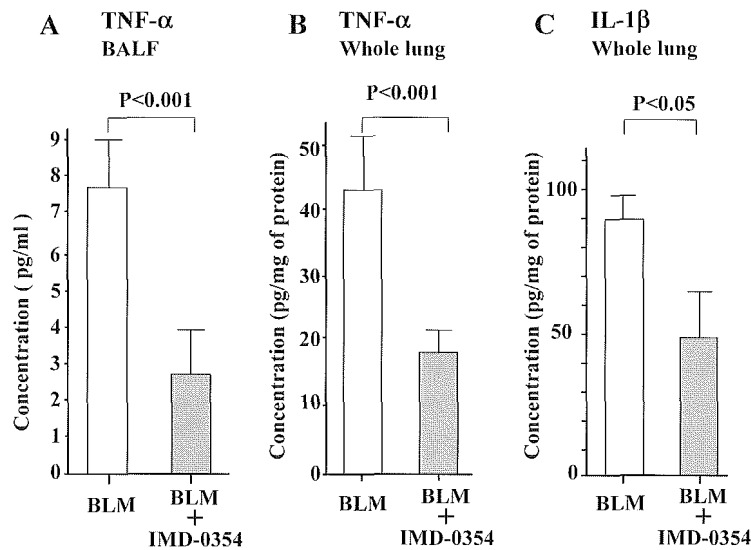


Figure 3 IMD-0354 inhibits the expression of TNF- α and IL-1 β in BALF or lung homogenates of mice treated with bleomycin. The levels of TNF- α and IL-1 β in BALF and lung homogenates 7 days after treatment with bleomycin (BLM) were measured by ELISA as described in Methods. Data are shown as the mean \pm SD of 8 mice. Data are representative of two separate experiments. (文献5より引用)

IMD-0354が抑制することを示した。また、IMD-0354は *in vivo* における NF- κ Bの活性化を有意に抑制した。NF- κ B decoyあるいは antisense oligonucleotideを用いたこれまでの報告では、BLM投与肺でのNF- κ B抑制は示されておらず^{3,4)}、我々の結果が最初にBLM肺におけるNF- κ B抑制を示した報告である。すなわち、IKK β 抑制が効果的なNF- κ B抑制の手段であり、さらには少なくともBLMモデルでは肺線維化

抑制につながるといえる。IMD-0354投与による肺線維化抑制には、BALF中の好中球、リンパ球浸潤の抑制効果、あるいは肺組織でのTNF- α やIL-1 β といった pro-inflammatory cytokinesの抑制効果が関与していることが推測された。

一方、近年抗線維化薬として臨床試験が進められている pirfenidoneも、当初は抗炎症薬として開発された経緯があることから、今後IMD-0354の肺線維芽細胞

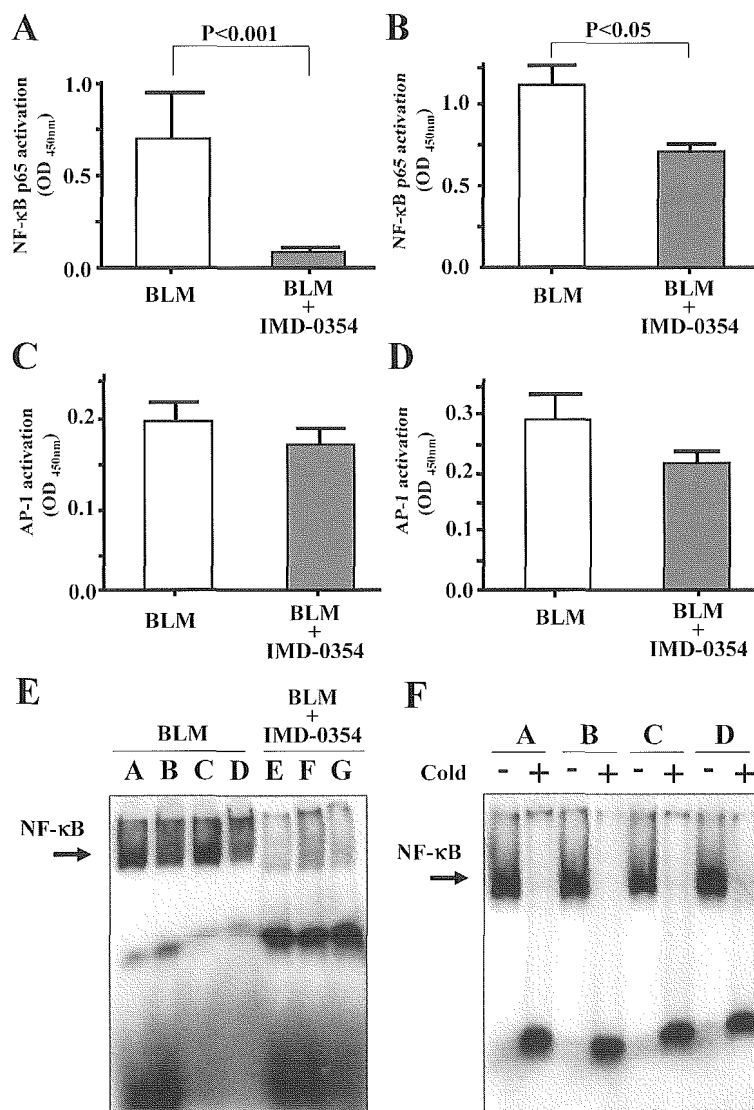


Figure 4 Inhibition of activation of NF- κ B, but not AP-1, by IMD-0354 in the lungs treated with bleomycin. NF- κ B activities in nuclear protein extracts of BALF (A) and lung tissues (B) in mice treated with bleomycin (BLM) with or without IMD-0354 on day 7 were examined by measuring the level of the p65 subunit of NF- κ B heterodimer using a Trans AM kit. AP-1 activity was also examined in BALF (C) and lung tissues (D) by measuring the level of the c-Jun subunit of AP-1 heterodimer using a Trans AM kit. Data are presented as mean \pm SD of 4 mice. The DNA binding activity of NF- κ B in nuclear extracts of lung tissues was examined by an electrophoretic mobility shift assay (E). Competition experiments were performed by adding a 1000-fold excess of unlabeled oligonucleotide before the labeled probes (F). Each lane in Figure E and F shows the data from the nuclear extract of the lung of an individual mouse. Data are representative of two separate experiments. (文献 5 より引用)

胞に対する直接の抗線維化効果についても検討をすすめる必要があると思われる。

参考文献

- 1) Zhang Y, Lee TC, Guillemin B, Yu MC, Rom WN. Enhanced IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha release and messenger RNA expression in macrophages from idiopathic pulmonary fibrosis or after asbestos exposure. *J Immunol* 150 (9) : 4188-4196, 1993.
- 2) Giri SN, Gurujeyalakshmi G and Wang Y. Suppression of bleomycin-induced increased production of nitric oxide and NF- κ B activation by treatment with taurine and niacin. *Adv Exp Med Biol* 483 : 545-561, 2000.
- 3) Zhang XY, Shimura S, Masuda T, Saitoh H, Shirato K. Antisense Oligonucleotides to NF- κ B Improve Survival in Bleomycin-induced Pneumopathy of the Mouse. *Am J Respir Crit Care*

Med. 162 : 1561-1568, 2000.

- 4) Griesenbach U, Cassady RL, Cain RJ, duBois RM, Geddes DM, Alton EW. Cytoplasmic deposition of NF κ B decoy oligonucleotides is insufficient to inhibit bleomycin-induced pulmonary inflammation. *Gene Ther* 9 : 1109-1115, 2002.
- 5) Inayama M, Nishioka Y, Azuma M, Muto S, Aono Y, Makino H, Tani K, Uehara H, Izumi K, Itai A, Sone S. A novel I κ B kinase- β inhibitor ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice *Am J Respir Crit Care Med* (in press).

肺線維症及びブレオマイシン肺臓炎モデルにおける epithelial-mesenchymal transition (EMT) の役割

山田 瑞穂¹ 桑野 和善¹ 吉見 通洋¹ 前山 隆茂¹ 濱田 直樹¹
福元重太郎¹ 江頭 健輔² 渡辺憲太郎³ 高山 浩一¹ 中西 洋一^{1*}

EMT は器官形成, 組織のリモデリング, 癌の浸潤, 転移等において重要な役割を果たしており, 近年腎や肺の線維化における役割が注目されている. 特発性肺線維症, マウス・ブレオマイシン (BLM) 肺臓炎モデルにおける EMT を検討する. ヒト肺線維症の検討は, 胸腔鏡下肺生検によって得られた肺組織, マウス肺組織は, C57/BL6 マウスに BLM 3 U/kg を気管内投与し, 1 日目, 3 日目, 5 日目, 7 日目, 10 日目, 14 日目に採取した. 肺組織の E-cadherin と α -smooth muscle actin の蛍光免疫二重染色を行い, EMT を検出した. IPF においては fibroblastic foci の被覆上皮細胞に, EMT を認めた. 正常肺, 及び BLM 投与後 1 日目から 5 日目には EMT の所見を認めなかった. BLM 投与後 7 日目の細気管支上皮に有意な EMT の所見を認め, 10 日目, 14 日目には細気管支上皮の EMT は減少したが, 14 日目の細気管支上皮周囲の線維化組織に EMT を認めた. 肺線維症, BLM 肺臓炎モデルにおける線維化に EMT が関与していることが示唆された.

Involvement of epithelial-mesenchymal transition in idiopathic pulmonary fibrosis and bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice

Mizuho Yamada¹, Kazuyoshi Kuwano¹, Michihiro Yoshimi¹, Takashige Maeyama¹, Naoki Hamada¹,
Jutaro Fukumoto¹, Kensuke Egashira², Kenichi Hiasa², Kentaro Watanabe³,
Koichi Takayama¹, and Yoichi Nakanishi¹

¹Research Institute for Diseases of the Chest,

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

³Division of Respiratory Medicine, Department of Internal Medicine 4, Fukuoka University School of Medicine

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) has been proven to be an important process in organ fibrogenesis. However, there is few direct evidence of this process in the pathophysiology of pulmonary fibrosis in vivo. Therefore, we tried to verify the involvement of this process in the development of pulmonary fibrosis. Since the co-expressions of E-cadherin and α -smooth muscle actin are thought to be a marker of EMT, we performed dual immunohistochemistry to assess the co-expressions of these proteins in lung tissues from patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) and nonspecific interstitial pneumonia (NSIP). Double positive cells for E-cadherin and α -smooth muscle actin were remarkably prevalent in cells overlaying the fibroblastic foci in IPF, whereas no positive cell was detected in normal lung parenchyma and only a few were found in NSIP. In bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice, double positive cells were prevalent in the bronchioalveolar duct junction, while only a few such cells were found in other lung fields. The in vivo gene transfer of soluble TGF- β receptor II significantly attenuated EMT, fibrosis, and apoptosis in this model. These results suggest that EMT may be involved in the progression of pulmonary fibrosis and may be a therapeutic target against pulmonary fibrosis.

はじめに

Epithelial-mesenchymal transition (EMT) は上皮細胞が間葉系の細胞へ変化する現象であり、胎生期の発生過程、癌の浸潤・転移、傷害組織における間葉系細胞の増殖に関与する。腎線維化モデルにおける線維芽細胞の由来は、上皮細胞が EMT によって線維芽細胞に変化したと考えられる割合は 36% もあったことから、EMT が腎線維化において重要であると推測されている¹⁾。

TGF- β は EMT を促進する主要因子の一つだが、その直接作用によって、ラットの肺胞上皮細胞が筋線維芽細胞へ変換することが報告されている²⁾。

Wnt とその下流の β -catenin は細胞増殖、腫瘍形成、EMT に関与している事が知られているが、 β -catenin の核への集積が、再生細気管支上皮、再生肺胞上皮、線維芽細胞巢中の紡錘状の細胞において観察されている。 β -catenin の下流の MMP-7 の過剰発現も細気管支上皮で認められる³⁾。

肺線維症の線維芽細胞巢の数は予後を反映する病理学的因子とされている⁴⁾。線維芽細胞巢は筋線維芽細胞が構成細胞であるが、筋線維芽細胞は増殖し、collagen を産生し、線維化を助長する。また Angiotensin II を産生して上皮細胞のアポトーシスを誘導する⁵⁾。

EMT の過程で、上皮細胞の細胞間結合分子である E-cadherin は減少し、間葉系細胞の、例えば筋線維芽細胞に変化すると α -smooth muscle actin (α -SMA) を産生する。我々は肺線維症における EMT の役割を明らかにするために、特発性肺線維症とマウスブレオマシン肺臓炎モデルにおける EMT を検出し、 β -catenin 発現を siRNA で抑制することを試みた。

方法と結果

肺線維症患者の検討

特発性肺線維症患者から得られた肺組織で蛍光免疫疫二重染色により EMT を評価した。上皮のマーカーである E-cadherin を赤で、筋線維芽細胞のマーカー

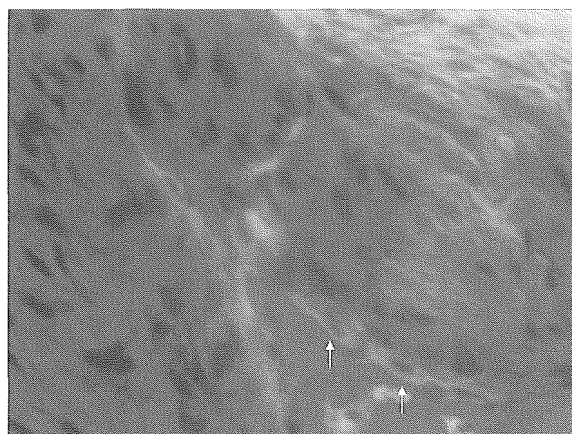


図 1. 線維芽細胞巢に接する上皮に EMT の黄色い細胞を認めた (矢印)。

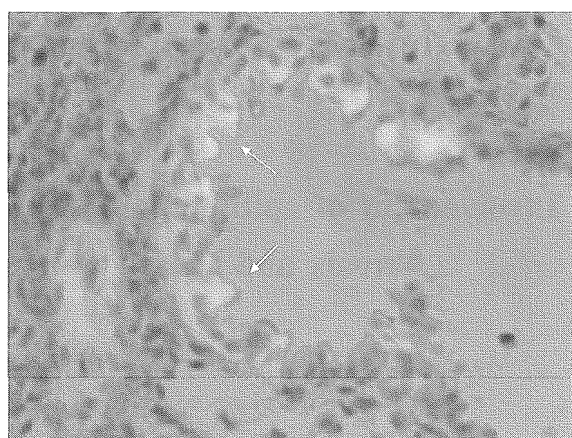


図 2. 細気管支肺胞接合部近傍の細気管支上皮細胞に EMT を認めた (矢印)。

である α -SMA を緑で染色した。EMT が認められる細胞は両方のマーカーが染まり、黄色に見える。正常肺においては二重染色陽性の黄色い細胞は認められなかった。肺線維症の線維化組織に認められる再生上皮に EMT を認めた。特に線維芽細胞巢の被覆上皮には高率に EMT が認められた (図 1)。

定量化すると、線維芽細胞巢以外の線維化病変における上皮細胞では、上皮細胞中約 0~6% に EMT を認めたが、線維芽細胞巢の被覆上皮においては、約 70% と有意に高率であり、肺線維症において EMT が線維化過程において重要な役割を持つと思われた。正常肺と NSIP においては EMT はほとんど認められなかった。

マウスブレオマイシン肺臓炎モデルの検討

マウスブレオマイシン肺臓炎モデルにおいて TGF- β を抑制し、線維化と EMT に及ぼす影響を検

¹ 九州大学大学院医学研究院附属胸部疾患研究施設

² 同循環器内科

³ 福岡大学医学部第四内科

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

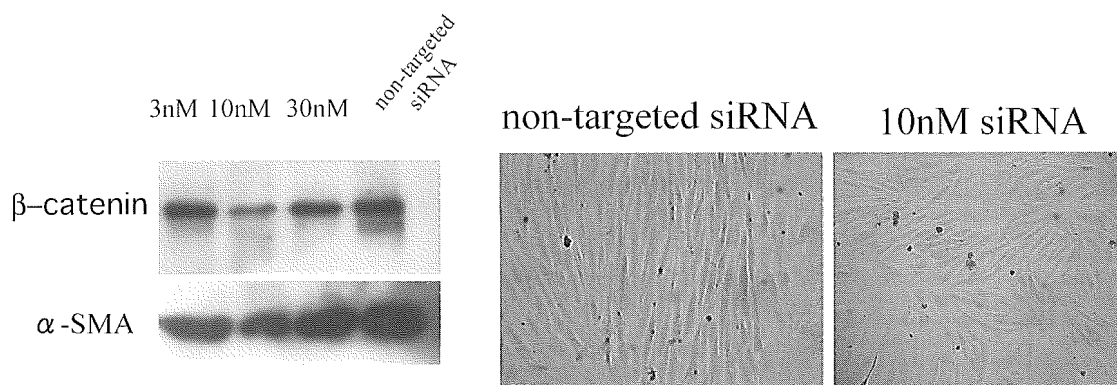


図3. beta-catenin 標的 siRNA 投与による TGF-beta1 誘導 EMT の抑制

討した。TGF- β の抑制は可溶性 TGF- β レセプターの遺伝子導入により行った。プレオマイシン投与日から7日目まで TGF- β を抑制し、7日目に評価する群と、プレオマイシン投与7日目から14日目まで TGF- β を抑制し、14日目に評価する群の2つの群に分けた。

その結果、プレオマイシン投与日から7日目に TGF- β を抑制した群、7日目から14日目に抑制した群それぞれにおいて、病理組織所見上、プレオマイシン投与7日目の肺臓炎および14日目の線維化がコントロール群に比べ有意に抑制されていた。アポトーシスの評価では、プレオマイシン投与後7日目および14日目の TUNEL 陽性細胞が、コントロール群に比べて有意に減少していた。このモデルで蛍光免疫二重染色により、同様に EMT を評価した。全体を見たところ、主に細気管支肺胞接合部近傍の細気管支上皮細胞にて EMT を認めた (図2)。プレオマイシン投与14日目には、EMT の黄色い細胞は7日目に比べて減少していた。末梢細気管支上皮細胞における EMT を定量化すると、プレオマイシン投与後7日目に EMT の黄色い細胞は、全細気管支上皮細胞の約35%と有意に増加し、可溶性 TGF- β レセプターにより有意に抑制された。EMT が観察される細気管支上皮細胞は、14日目には5~10%と自然に減少した。

β -catenin の siRNA による発現抑制の基礎的検討

細胞はマウスの II 型肺胞上皮細胞から cell line 化された LA-4 細胞を用い、siRNA の導入にはカチオニックリポソーム製剤を使用した。day 0 に細胞の継代と同時に β -catenin 標的 siRNA を導入し、day 2 に TGF- β 1 を加えた無血清培地に交換し、day 5 に細胞

を回収し、細胞の形態、ウェスタンブロット法にて解析を行った。 β -catenin 標的 siRNA の導入により TGF- β 1 によって導入される肺胞上皮細胞の EMT を抑制することができた (図3)。今後 EMT プロテオームを標的とすることで線維化の病態を修飾できる可能性があると考えられた。

考 察

肺線維症において、線維化病変の再生上皮細胞に EMT を認めたが、線維芽細胞巢の被覆上皮において最も顕著であった。線維芽細胞巢に接する上皮が EMT によって、筋線維芽細胞に変化している可能性が示唆された。マウスプレオマイシン肺臓炎モデルにおいては、TGF- β が EMT を誘導する重要な因子であり、EMT が線維化過程に関与している可能性が示唆された。また、 β -catenin を制御することによって肺線維化における EMT の役割がより明らかになることが期待される。

参考文献

- 1) Kalluri R et al: Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. J Clin Invest 112: 1776-1784, 2003
- 2) Yao HW et al: TGF- β -induces alveolar epithelial to mesenchymal transition in vitro. Life Sci 76: 29-37, 2004
- 3) Chilosi M et al: Aberrant Wnt/ β -Catenin Pathway Activation in Idiopathic Pulmonary Fibrosis. Am J Pathol 162: 1495-1502, 2003

4) King TE Jr et al : Idiopathic pulmonary fibrosis : relationship between histopathologic features and mortality. Am J Respir Crit Care Med 164 : 1025-1032, 2001

5) Uhal BD et al : Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung. Am J Physiol 275 : L1192-1199, 1998