

ICAM-1 の欠損により **tight skin** マウスの皮膚硬化は減弱する

分担研究者 長谷川稔 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学講師
協力者 松下幸世 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学大学院生
協力者 藤本 学 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学助教授
分担研究者 佐藤伸一 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学教授
主任研究者 竹原和彦 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授

研究要旨

全身性強皮症のモデルマウスである **tight skin** (TSK/+)マウスを用いて、L-selectin、ICAM-1 および両者を欠損した TSK/+マウスを作成し、皮膚硬化における細胞接着分子の役割を検討した。L-selectin^{-/-}ICAM-1^{-/-}TSK/+マウスおよび ICAM-1^{-/-}TSK/+マウスでは TSK/+マウスと比較し皮膚硬化は減弱していた。さらに ICAM-1 の発現を阻害するアンチセンスオリゴを TSK/+マウスに投与することでも皮膚硬化は減弱した。TSK/+マウス由来線維芽細胞では野生型マウスと比べ、コラーゲンと TGF-β の mRNA の発現が増強していたが、ICAM-1^{-/-}TSK/+マウスではその発現の減弱が認められた。また TSK/+マウスでは野生型マウスと比べ、皮膚組織における Th2 サイトカイン(IL-4、IL-6)の mRNA 発現が亢進していたが、ICAM-1^{-/-}TSK/+マウスではその発現が抑制された。ICAM-1 は TSK/+マウスの皮膚硬化において重要な役割を果たしているとともに、全身性強皮症において ICAM-1 が治療のターゲットとなりうる可能性が示唆された。

A. 研究目的

全身性強皮症 (systemic sclerosis; SSc) は皮膚硬化と内臓諸臓器の線維化を主徴とする疾患で、病因は解明されていない。SSc 患者皮膚には CD4 陽性 T 細胞の浸潤を認め、サイトカイン産生を介して線維化に寄与しているものと考えられている¹。IL-4 は SSc 患者由来線維芽細胞を刺激し膠原線維の産生を増強する²。また、IL-6 も SSc 患者由来線維芽細胞にお

いて用量依存性に膠原線維の産生を増強する。さらに early-stage の SSc 患者血清中の IL-6 の上昇が報告されており³、Th2 サイトカインが皮膚硬化に関与していると考えられている。SSc のモデルマウスである **tight skin** (TSK/+)マウスでは皮膚硬化や SSc に特徴的な自己抗体の産生などが観察される。その TSK/+マウスにおいて CD4 陽性 T 細胞を欠損させると皮膚硬化が減弱するとの報告⁴や、IL-4 の中和

抗体を投与すると皮膚硬化が減弱することが報告されており⁵、TSK/+の皮膚硬化においても Th2 サイトカインが重要な役割を果たしていると考えられている。

細胞接着分子であるL-selectin、ICAM-1は白血球の血管内から組織への浸潤に関与しており、L-selectinはほぼすべての白血球に発現し、白血球が血管外へ浸潤する際のcaptureおよびrollingに関与している。ICAM-1は血管内皮細胞に発現し白血球が血管外へ浸潤する際のrolling、firm adhesionに関与しているほか、線維芽細胞、白血球に恒常的に発現し、炎症性サイトカインなどにより活性化されるとICAM-1の発現が上昇する。強皮症患者においては、血清中sICAM-1^{6,7}、L-selectin⁸が増加していること、病変部皮膚の血管内皮細胞や線維芽細胞でICAM-1の発現が亢進していることが知られている⁹

今回我々はTSK/+マウスを用いて、L-selectin、ICAM-1および両者を欠損したTSK/+マウスを作成し、皮膚硬化における細胞接着分子の役割を検討した。

B. 研究方法

1)細胞接着分子欠損 TSK/+マウスの作成、および皮膚硬化の評価

TSK/+マウスでは皮膚よりも皮下疎性結合織の肥厚が認められる。L-selectin^{-/-}マウス、ICAM-1^{-/-}マウスならびに L-selectin^{-/-}ICAM-1^{-/-}マウスと TSK/+マウスを交配し、L-selectin^{-/-}TSK/+、ICAM-1^{-/-}TSK/+、L-selectin^{-/-}ICAM-1^{-/-}TSK/+マウスを作成し、生後 12 週のマウス背部皮下疎性結合織の厚さを測定し

た。また野生型マウス、TSK/+マウス、ICAM-1^{-/-}マウス、ICAM-1^{-/-}TSK/+マウスについて生後 2 週目より経時的に皮下疎性結合織の厚さを比較した。

2) 皮膚でのサイトカインの発現

各マウス皮膚より mRNA を抽出し、サイトカインの発現量を real-time RT-PCR にて定量した。

3) マウス皮膚線維芽細胞の培養

各マウスの線維芽細胞を培養し、IL-4 刺激前後で mRNA を抽出し、COL1A2 と TGF-β の発現量を real-time RT-PCR にて定量、IL-4 刺激後の ICAM-1 の発現量をフローサイトメトリーにて測定した。

4) アンチセンスオリゴの投与

生後 4 週のマウスに ICAM-1 のアンチセンスオリゴを 2 週間連日投与した。対照群として、scramble オリゴを投与した。

5) 抗トポイソメラーゼ I 抗体の測定

ELISA 法によりマウス血清中の抗トポイソメラーゼ I 抗体の測定を行った。

C. 研究結果

1) 皮膚硬化の定量

生後 12 週マウスの皮下疎性結合織の厚さを比較したところ、L-selectin^{-/-}TSK/+マウスでは TSK/+マウスと同等の皮膚硬化であったが、ICAM-1^{-/-}TSK/+マウスと L-selectin^{-/-}ICAM-1^{-/-}TSK/+マウスでは有意に皮膚硬化が減弱していた (図 1; p<0.0001)。ICAM-1^{-/-}TSK/+マウスと L-selectin^{-/-}ICAM-1^{-/-}TSK/+マウスの間には有意差は認めなかった。TSK/+マウスの皮膚硬化を時系列で観察すると生後 2 週目ころ

より皮膚硬化が明らかとなり、6週目以降 ICAM-1^{-/-}TSK/+マウスでは有意に皮膚硬化が減弱していた(図1)。TSK/+マウスの皮膚硬化において L-selectin の関与は乏しく ICAM-1 の関与が重要と示されたため、以降の解析は ICAM-1^{-/-}TSK/+マウスを主に使用した。

2) 皮膚でのサイトカインの発現。

TSK/+マウスでは野生型マウスと比べ、皮膚組織における Th2 サイトカイン(IL-4、IL-6) の mRNA 発現が亢進していたが、ICAM-1^{-/-}TSK/+マウスではその発現の低下が認められた。また Th1 サイトカインである IFN- γ 、IL-2 に有意差は認めなかった(図2)。

3) マウス皮膚線維芽細胞の培養

TSK/+マウス由来線維芽細胞では野生型マウスと比べ、IL-4 刺激下での COL1A2 と TGF- β の mRNA の発現が増強していたが、ICAM-1^{-/-}TSK/+マウスではその発現の減弱が認められた(図3)。また TSK/+マウス由来線維芽細胞では野生型マウスと比較し、IL-4 刺激下での ICAM-1 の発現量は有意に上昇していた(図4; $p < 0.001$)。一方、線維芽細胞の活性化マーカーである CD44 は TSK/+マウス由来線維芽細胞と野生型マウスでほぼ同程度の発現であった(図4)。

4) アンチセンスオリゴの投与

生後4週齢の TSK/+マウスにアンチセンスを二週間投与し皮膚硬化を比較した(図5)。ICAM-1 の発現を阻害するアンチセンスオリゴ投与群では非投与群およびスクランブルオリゴ投与群と比較して、有意に皮膚硬化が減弱していた ($p < 0.001$)。また ICAM-1 のアン

チセンスオリゴ投与群では皮膚組織での ICAM-1 の mRNA 発現量が低下していた。

5) 抗トポイソメラーゼ I 抗体の測定

各マウスの血清中抗トポイソメラーゼ I 抗体を測定した(図6)。IgG 型抗トポイソメラーゼ I 抗体の相対的吸光度は TSK/+マウスと ICAM-1^{-/-} TSK/+マウスの間に有意差はなく、ともに野生型マウスや ICAM-1^{-/-}マウスと比較し優位に上昇しており、ICAM-1 の自己抗体産生に対する影響は認めなかった。

D. 考案

今回の検討で、TSK/+マウスにおいて細胞接着分子である ICAM-1 を欠損させると、自己抗体産生に影響を及ぼさないが、皮膚硬化が有意に減弱しており、TSK/+マウスの皮膚硬化における ICAM-1 の重要性が示された。一方 TSK/+マウスの皮膚硬化における L-selectin の関与は明らかでなかった。TSK/+マウスの皮膚では Th2 サイトカインである IL-4、IL-6 の mRNA の発現亢進があり、Th2 偏倚を認めた。TSK/+マウスで ICAM-1 を欠損させると Th2 偏倚の是正とともに皮膚硬化の減弱を認めることより、ICAM-1 はサイトカインバランスの制御を介して皮膚硬化に関与している可能性が示された。

TSK/+マウスでは野生型マウスと比べ、皮膚由来の線維芽細胞は IL-4 刺激下で ICAM-1 の発現が増強しており、さらにコラーゲン・TGF- β の mRNA の発現亢進も認められた。IL-4 の刺激により ICAM-1 の発現が増強する機序は不明であるが、線維芽細胞上の ICAM-1 の発現が増強することにより、皮膚に浸潤して

来る白血球上の LFA-1 との interaction を介して白血球を活性化させ、活性化した白血球から産生された Th 2 サイトカインが線維芽細胞上の ICAM-1 の発現を亢進させるという、白血球と線維芽細胞の活性化ループを介してコラーゲン産生を増強する可能性が考えられた。

ICAM-1 のアンチセンスオリゴ投与はマウスやラットの腸炎モデル¹¹、炎症疾患¹¹や臓器移植¹²において有効性が示されており、ヒトにおいても炎症性腸疾患¹³、関節リウマチ¹⁴において臨床試験が開始されている。TSK/+マウスにおいて ICAM-1 のアンチセンスオリゴ投与にて皮膚硬化が減弱したことより、強皮症においても ICAM-1 が治療の標的となりうる可能性が示唆された。

E. 結 論

強皮症において ICAM-1 が治療の標的となりうる可能性が示唆された。

F. 文 献

1. Chizzolini, C. 1999. T lymphocyte and fibroblast interactions: the case of skin involvement in systemic sclerosis and other examples. *Springer Semin Immunopathol* 21:431-450.
2. Gillery, P. et al. 1992. Interleukin-4 stimulates collagen gene expression in human fibroblast monolayer cultures. Potential role in fibrosis. *FEBS Lett* 302:231-234.
3. Hasegawa, M. et al. 1998. Serum levels of interleukin 6 (IL-6), oncostatin M, soluble IL-6 receptor, and soluble gp130 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 25:308-313.
4. Wallace, V.A. et al. 1994. A role for CD4+ T cells in the pathogenesis of skin fibrosis in tight skin mice. *Eur J Immunol* 24:1463-1466.
5. Ong, C.J. et al. 1999. A role for T helper 2 cells in mediating skin fibrosis in tight-skin mice. *Cell Immunol* 196:60-68.
6. Ihn, H. et al. 1997. Circulating intercellular adhesion molecule-1 in the sera of patients with systemic sclerosis: enhancement by inflammatory cytokines. *Br. J. Rheumatol.* 36:1270-1275.
7. Sfikakis, P.P. et al. 1993. Circulating intercellular adhesion molecule-1 in patients with systemic sclerosis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 68:88-92.
8. Shimada, Y. et al. Elevated serum L-selectin levels and decreased L-selectin expression on CD8(+) lymphocytes in systemic sclerosis. *Clin Exp Immunol* 124:474-479.
9. Gruschwitz, M.S. et al. 1997. Up-regulation of class II major histocompatibility complex and intercellular adhesion molecule 1 expression on scleroderma fibroblasts and endothelial cells by interferon- γ and tumor necrosis factor α in the early disease stage. *Arthritis Rheum.* 40:540-550.
10. Bennett, C.F. et al. 1997. An ICAM-1 antisense oligonucleotide prevents and reverses dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 280:988-1000.

11. Kumasaka, T. et al. 1996. Role of the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in endotoxin-induced pneumonia evaluated using ICAM-1 antisense oligonucleotides, anti-ICAM-1 monoclonal antibodies, and ICAM-1 mutant mice. *J Clin Invest* 97:2362-2369.
12. Stepkowski, S.M. et al. 1994. Blocking of heart allograft rejection by intercellular adhesion molecule-1 antisense oligonucleotides alone or in combination with other immunosuppressive modalities. *J Immunol* 153:5336-5346.
13. Yacyshyn, B.R. et al. 2002. Dose ranging pharmacokinetic trial of high-dose alicaforsen (intercellular adhesion molecule-1 antisense oligodeoxynucleotide) (ISIS 2302) in active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 16:1761-1770.
14. Maksymowych, W.P. et al. 2002. A randomized, placebo controlled trial of an antisense oligodeoxynucleotide to intercellular adhesion molecule-1 in the treatment of severe rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 29:447-453.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

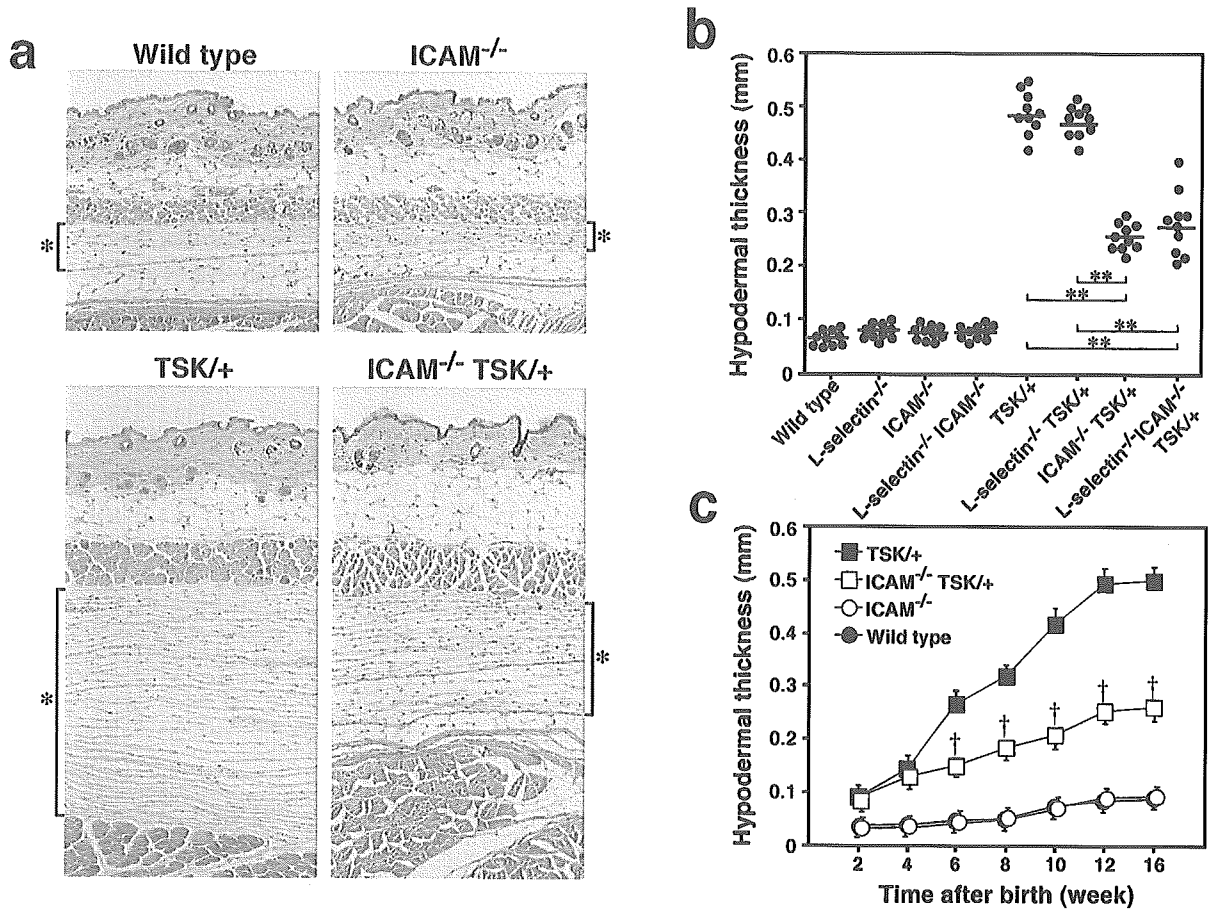


図 1: (a, b) 12 週雌マウスにおける皮膚疎性結合織の厚さ。*hypodermal thickness。** $P < 0.0001$ は TSK^{+/+}マウスとの比較。(c) 各マウスにおける皮膚疎性結合織の厚さの経時的変化。† $p < 0.01$ は TSK^{+/+}マウスとの比較。

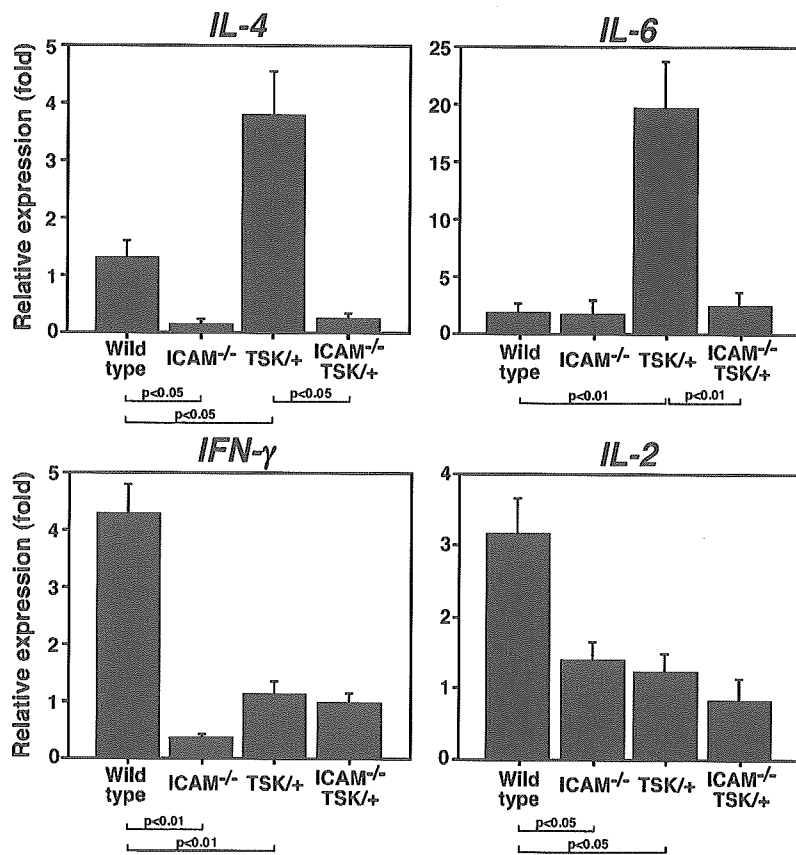


図 2: 野生型マウス、ICAM-1^{-/-}マウス、TSK^{+/+}マウス、ICAM-1^{-/-} TSK^{+/+}マウスの皮膚におけるサイトカイン mRNA 発現量の比較。

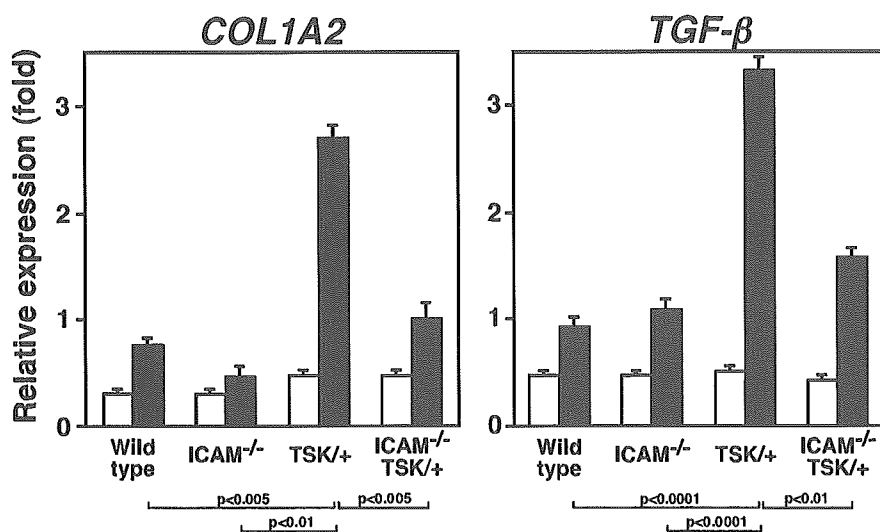


図3: 各マウスの培養皮膚線維芽細胞におけるCOL1A2、TGF-βのmRNA発現量の比較。IL-4刺激下を黒塗り、非刺激下を白塗りで示した。

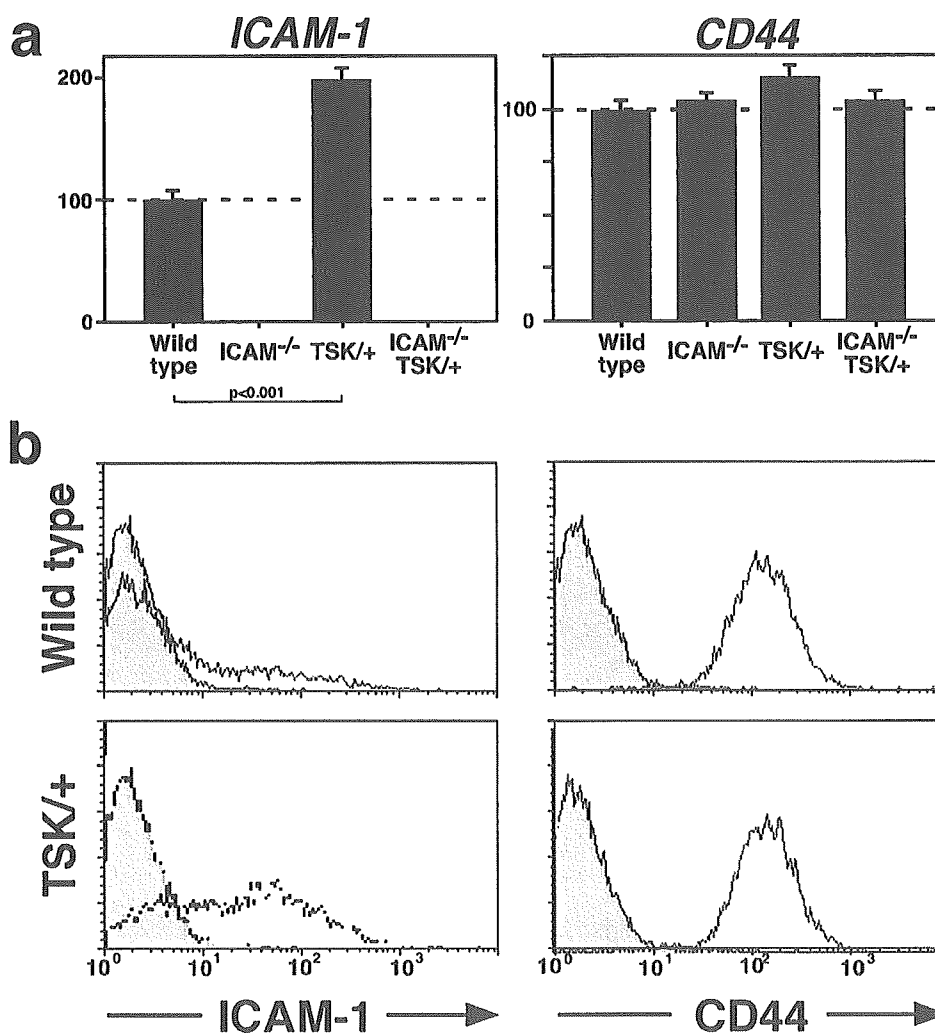


図4: 各マウスの培養皮膚線維芽細胞をIL-4で刺激した後にフローサイトメトリーにてICAM-1、CD44の発現量を測定した。(a) 野生型マウスのMFI (mean fluorescence intensity)を100とした際の相対量。(b) アイスotype・コントロールをグレーで示す。

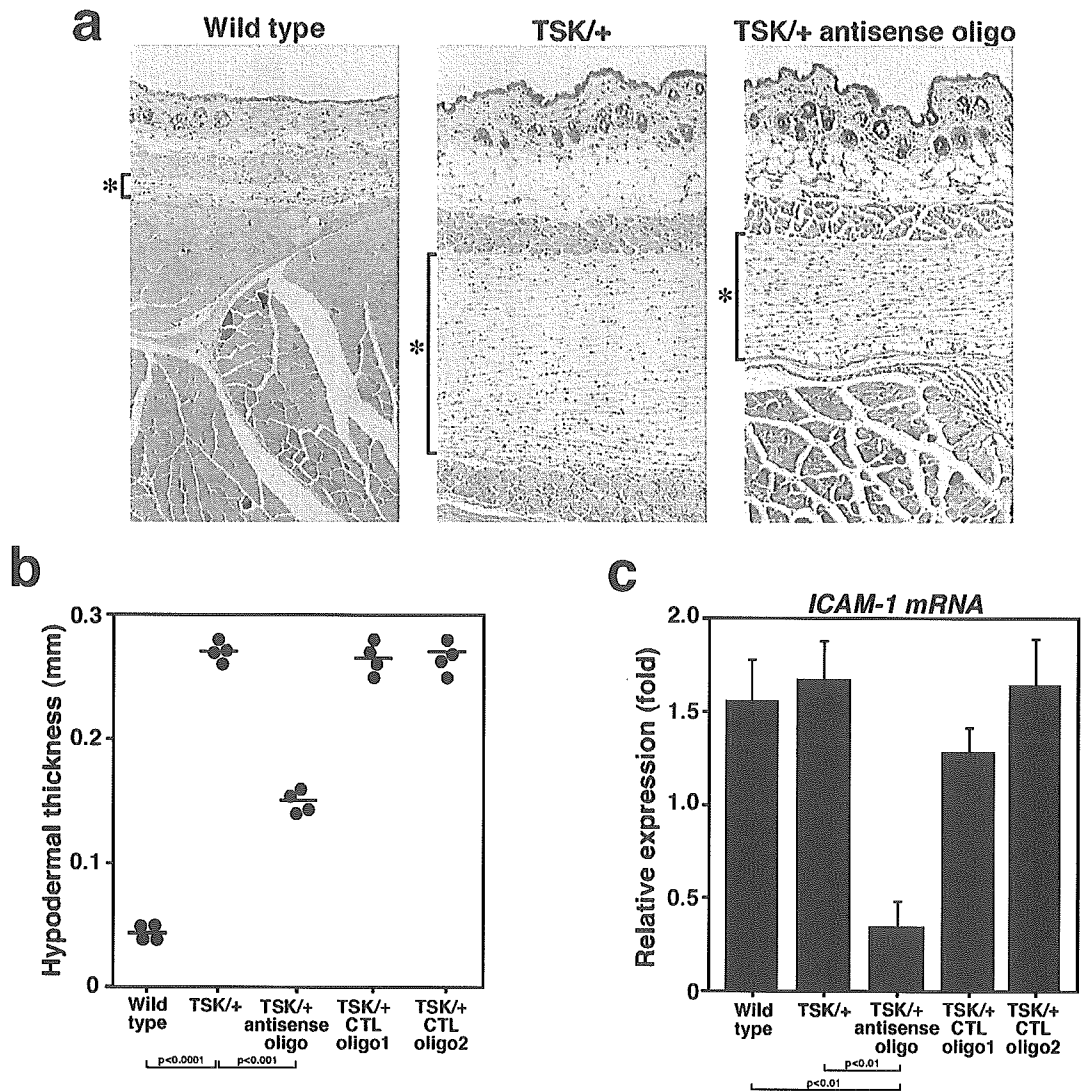


図5: ICAM-1 アンチセンスオリゴ投与による皮膚疎性結合織の厚さの比較。(a, b) 6週雌マウスにおける皮膚疎性結合織の厚さ。*hypodermal thickness。(c) 皮膚組織におけるICAM-1 mRNAの発現定量。

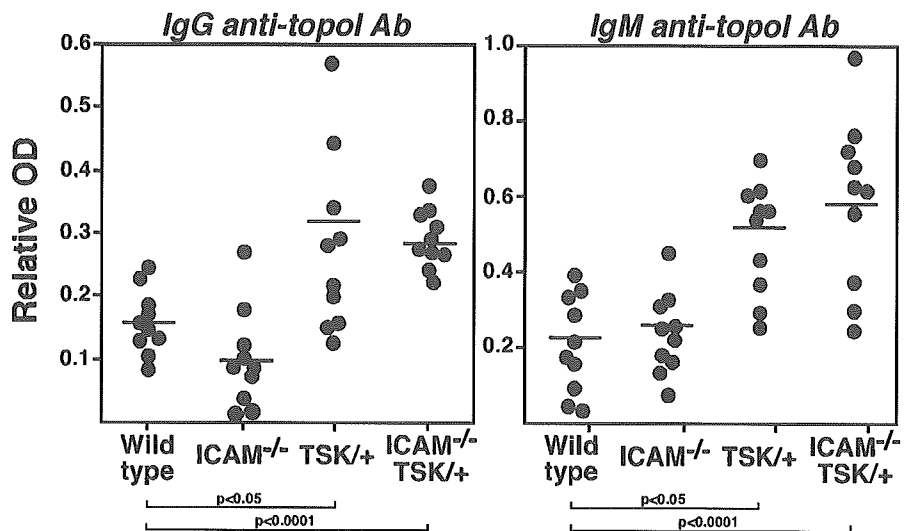


図6: ELISAにて血清中抗トポイソメラーゼI抗体価を測定した。

ブレオマイシン誘発肺臓炎モデルにおける細胞接着分子の役割

分担研究者	長谷川稔	金沢大学医学部附属病院皮膚科講師
協力者	堀川真由香	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学大学院生
協力者	濱口儒人	金沢大学医学部附属病院皮膚科助手
協力者	藤本 学	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学助教授
分担研究者	佐藤伸一	長崎大学大学院医歯薬学総合研究科皮膚病態学教授
主任研究者	竹原和彦	金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授

研究要旨

ブレオマイシン誘発性肺線維症モデルにおける E-selectin, P-selectin の役割は解明されていない。今回我々は P-selectin^{-/-}マウス, E-selectin^{-/-}マウス、および抗 P-selectin 抗体を投与した E-selectin^{-/-}マウスでブレオマイシンを経気管支的に投与し肺線維症を誘導した。肺病理組織、肺組織中のコラーゲン量および死亡率は野生型マウスと比較し E-selectin^{-/-}で有意に増悪しており、さらに抗 P-selectin 抗体を投与するとその差はより顕著となった。P-selectin^{-/-}マウスは野生型マウスと比べ増悪しているものの有意な変化は認めなかった。肺組織中の IFN- γ は、E-selectin^{-/-}マウスでは有意に減少しており、抗 P-selectin 抗体を投与した E-selectin^{-/-}マウスではさらに減少していた。E-selectin^{-/-}マウスでは、IFN- γ 産生能を有する CXCR3⁺NK1.1⁺T 細胞が気管支肺胞洗浄液中で減少していた。このことから、E-selectin と P-selectin は抗線維化サイトカインである IFN- γ を産生する CXCR3⁺NK1.1⁺T 細胞の肺への浸潤を促進することにより、相乗的に肺線維症の抑制に働いているものと考えられた。

A. 研究目的

間質性肺炎は肺胞壁を病変の主体とする一群の線維化形成性肺炎を指す病名であり、慢性に経過し予後良好な場合もあるが、急速に線維化が進行して呼吸不全を呈し予後不良な経過をとる症例も少なくない。間質性肺炎を呈する疾患は主に特発性間質性肺炎、膠原病性間質性肺炎、薬剤性間質性肺炎の3つがあり、原因の如何に関わらず病理組織学的に肺の線維化を認める。皮膚科領域においては、全身性強

皮症や皮膚筋炎に合併した膠原病性間質性肺炎、抗腫瘍剤であるブレオマイシンによる薬剤性間質性肺炎をしばしば経験する。間質性肺炎の病因に関する研究では、扁平上皮癌の治療に使用されるブレオマイシンを経気管的にマウスに投与し、肺の線維化を誘発する動物モデルが確立されている¹。この動物モデルでは、病変は inflammatory stage と fibrosis stage の2つから構成される²。つまり、ブレオマイシン投与後まず1週後をピークに炎症細胞浸潤が生

じ、次いで2週後に線維化が形成される。このモデルで主に解析されてきたことは、どの白血球サブセットが線維化に最も関与しているかということと、どのようなサイトカインあるいは細胞成長因子が最も線維化の誘導に重要であるのか、という2点である。前者に関しては、好酸球、マクロファージ、T細胞が重要な役割を果たしていると考えられているが、その中でどれが最も重要かということに関しては未だ一定の見解はない。後者に関しては、いくつかのサイトカインや細胞成長因子が候補に挙がっているが、TNF- α 、TGF- β の重要性に関しては多くの報告でほぼ一致している。E-selectin 及び P-selectin は血管内皮及び血小板に発現し、白血球が血管外へ浸潤する際の attachment および rolling の段階に関与する細胞接着分子である。これらの接着分子は白血球の血管外浸潤の際に非常に重要であると考えられる。そこで、E-selectin、P-selectin を欠損したマウスを用いてブレオマイシン誘発肺臓炎モデルを作成し、肺の線維化におけるこれら接着分子の役割について検討した。

B. 研究方法

1) ブレオマイシンの投与

実験動物として、生後 12- 16 週の E-selectin 欠損マウス、P-selectin 欠損マウス、および E-selectin 欠損マウスに抗 P-selectin 抗体を投与したマウスと野生型マウスを用いた。ブレオマイシン 8 mg/kg を生理的食塩水（生食）0.2 ml に溶解し経気管的に1回のみ投与した。生食 0.2 ml 投与群を対象とした。各マウス群間で体重差、肺重量差は認めなかった。

2) 組織学的検討

ブレオマシンの投与 8、16 日後に肺を摘出し、肺へ

の細胞浸潤および線維化の程度について組織学的に検討した。肺肺炎と細胞浸潤の評価のために hematoxylin and eosin (HE) 染色を、コラーゲンの沈着の評価のために Azan-Mallory 染色を行った。細胞浸潤の評価は、高倍率で任意に 30 視野を選定して細胞数を算定し、平均値を求めた。

3) 肺組織中ヒドロキシプロリン測定

ヒドロキシプロリンはコラーゲン中に特異的に高率に含まれるアミノ酸で、その量はコラーゲン量を反映する。従って、肺における線維化を評価するため、Schrier ら³の方法に準じ肺組織中のヒドロキシプロリン量を測定した。

4) 気管支肺胞洗浄液 (BAL) の採取

ブレオマイシン投与 2、4、8、12、16 日後に、生食 1 回 1ml で肺を軽くマッサージしながら洗浄して洗浄液を回収した。同様の操作を 3 回繰り返した。BAL の回収量は 1 検体当たり約 2.5ml だった。回収した BAL は細胞数の測定と細胞分画の評価に用いた。細胞数は Burger-Turk 算定板を用い算定した。細胞分画の評価はまず細胞沈殿法により細胞標本を作成し、May-Giemsa 染色を施行後検討した。細胞分画は任意に選定した視野で、計 200 個の細胞を算定して検討した。好中球の同定は形態学的に行った。

5) RT-PCR

線維化におけるサイトカインと細胞成長因子の役割を解明するために、ブレオマシンの投与 8 日後の肺におけるサイトカインと細胞成長因子の発現を RT-PCR 法により検討した。サイトカインと細胞成長因子は TNF- α 、IL-6、IFN- γ 、TGF- β 1 の 4 種類について検討した。

6) Flow Cytometry

E-selectin 欠損マウスおよび野生型マウスより採取した BAL を、フローサイトメトリーにて

CD3, NK1.1, CXCR3, IFN- γ を用いて二重染色及び三重染色して解析した。

C. 研究結果

1) 細胞接着分子欠損マウスにおける肺の線維化

肺における線維化を評価するため、ブレオマイシン投与 16 日後に肺を摘出して HE 染色と Azan-Mallory 染色を行った(図 1)。Azan-Mallory 染色では、コラーゲンは青色に染色された。野生型マウスでは、密な細胞浸潤を伴う肺胞壁の破壊とコラーゲンの沈着を認めた。E-selectin 欠損したマウスでは、これらの変化は野生型マウスに比べ著明に増悪した。さらに抗 P-selectin 抗体を投与した E-selectin 欠損マウスでは、E-selectin 欠損マウスに比べて線維化は著明に増悪した。P-selectin 欠損マウスでは野生型マウスと有意な差がみられなかった。コントロールとして生食を投与したマウスでは線維化は認めなかった。

線維化の程度を定量的に検討するため、ブレオマイシン投与 16 日後における肺組織中ヒドロキシプロリン量を測定した(図 2)。野生型マウスでは、コントロールに比べヒドロキシプロリン量は 2.5 倍に増加していた。野生型マウスに比べ、ヒドロキシプロリン量は P-selectin 欠損マウスでは 20%、E-selectin 欠損マウスでは 60%、抗 P-selectin 抗体を投与した E-selectin 欠損マウスでは 2 倍上昇していた。従って、E-selectin 欠損マウスでは線維化は増悪しており、さらに抗 P-selectin 抗体を投与すると線維化の増悪が顕著となったことが示された。

2) BAL 中の炎症細胞浸潤の検討

肺への炎症細胞浸潤における細胞接着分子の役割を解明するため、ブレオマイシン投与 2、4、8、12、16 日後に BAL を採取し、総細胞数と細胞分画につい

て検討した。野生型マウスにおいて、肺への総炎症細胞浸潤数はブレオマイシン投与 8 日後にピークとなった(図 3A)。これに比べ、投与 8 日後において総細胞数は P-selectin 欠損マウス、E-selectin 欠損マウス、抗 P-selectin 抗体を投与した E-selectin 欠損マウスでは野生型マウスに比べ有意に上昇していた。

3) BAL 中の細胞分画の検討

次に、浸潤細胞の分画について検討した。好中球数に関しては投与 16 日後に野生型マウスに比べ両者の欠損マウスでは総細胞数と同じ動態を示した(図 3B)。つまり、野生型マウスでは好中球数は投与 8 日後にピークとなり、各接着分子欠損マウスでは有意に上昇していた。マクロファージについては一定の傾向を認めなかった。従って、ブレオマイシン誘発肺臓炎モデルにおいて線維化の程度は好中球の浸潤の程度と最も関連しており、線維化を生じる機序において好中球が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

3) サイトカインと細胞成長因子の産生

線維化における細胞接着分子とサイトカインおよび細胞成長因子の関係を解明するため、ブレオマイシン投与 8 日後に肺を摘出し TNF- α 、IL-6、IFN- γ 、TGF- β 1 の発現を RT-PCR 法により検討した(図 4)。投与 8 日後の肺において、E-selectin 欠損マウスと抗 P-selectin 抗体を投与した E-selectin 欠損マウスは野生型マウスと比べ TNF- α が有意に上昇していたが IFN- γ の発現は減少していた。TGF- β 1 の発現に差はなかった。IL-6 の発現量は P-selectin 欠損マウスと E-selectin 欠損マウスで有意に上昇していた。

4) BAL 中リンパ球の Flow cytometry 解析

E-selectin 欠損マウスでは野生型マウスと比べ

NK1.1⁺CD3⁺(NKT)細胞率が有意に低下しており(図5)、さらに、IFN- γ の発現しているCD3陽性T細胞の比率も有意に減少していた。また、E-selectin欠損マウスでは野生型マウスと比べBAL中のCXCR3⁺CD3⁺細胞の頻度が有意に減少していた(図6)。

D. 考 察

本研究では、ブレオマイシン誘発肺臓炎において生体内でE-selectinとP-selectinがどのように関与しているのかをノックアウトマウスを用いて検討した。我々の以前の検討では、L-selectin欠損マウスとICAM-1欠損マウスでは野生型マウスに比べ線維化は同程度に抑制されており、このことは、L-selectinとICAM-1は炎症領域への白血球の遊走とリクルートに対して協調して働いていたとする過去の報告と一致した^{4, 5, 6}。一方、今回の検討ではE-selectin欠損マウスでは野生型マウスに比べ線維化は増悪しており、さらに、E-selectin欠損マウスに抗P-selectin抗体を投与するとその差は顕著となった。

ブレオマイシン誘発肺臓炎におけるサイトカインと細胞成長因子の役割に関しても今までに多数の報告がある。その中でのTNF- α の重要性に関しては多くの報告で一致しており⁷、IL-6についても関与が示唆されている。E-selectin欠損マウスと抗P-selectin抗体を投与したE-selectin欠損マウスでは、野生型マウスに比べTNF- α 、IL-6の発現は上昇していた。IFN- γ については、線維化に対して抑制的に働くとする報告がいくつかあるが、一方でIFN- γ はブレオマイシン誘発肺臓炎において発現が増強しているとする報告もある。今回の検討では、E-selectin欠損マウスと抗P-selectin抗体を投与したE-selectin欠損マウスは野生型マウスに比べ

IFN- γ 産生量は減少しており、その程度は線維化の増悪の程度と相関していた。従ってブレオマイシン誘発肺臓炎の線維化を抑制する機序において、E-selectinとP-selectinを介したIFN- γ の産生が重要であると考えられた。

線維化が生じる病態に関してはまだ不明な点があるが、まず初めに白血球が局所へ浸潤し、次いで白血球そのものによる組織障害あるいは白血球の浸潤により線維化をもたらすサイトカインが産生された結果、線維化を生じるのではないかと考えられている。E-selectinとP-selectinは特にTh1 typeの白血球浸潤に関わっている事が報告されている。ケモカインのレセプターである、CXCR3は主にTh1 typeの細胞に発現されており、E-selectin欠損マウスではBAL中のCXCR3⁺CD3⁺細胞の頻度が有意に減少していた。すなわち、E-selectinがない状態ではTh1 typeの細胞の肺へのrecruitmentが低下されていた。また、E-selectin欠損マウスの気管支肺胞洗浄液中のNKT細胞は著明に減少していた。NKT細胞はIFN- γ 産生能を有するので、E-selectin欠損マウスの肺におけるIFN- γ の発現低下は、NKT細胞の浸潤の減少によるものと考えられた。さらに、本研究ではNKT細胞もCXCR3を高率に発現しており、NKT細胞の肺への浸潤もCXCR3に依存しているものと思われた。このことから、E-selectinとP-selectinはCXCR3を介して、選択的かつ相乗的にNKT細胞の浸潤に関与しているものと考えられた。

E. 結 論

E-selectinとP-selectinはブレオマイシン誘発肺臓炎モデルにおいて、肺の線維化に抑制的に働くIFN- γ を産生するTh1細胞、特にNKT細胞の浸潤を調節することにより、肺の線維化抑制機序に重要な役

割を果たしていることが示唆された。

F. 文 献

1. Paine R, 3rd, Ward PA: Cell adhesion molecules and pulmonary fibrosis. *Am J Med* 1999, 107:268-279
2. Smith RE, Strieter RM, Zhang K, Phan SH, Standiford TJ, Lukacs NW, Kunkel SL: A role for C-C chemokines in fibrotic lung disease. *J Leukoc Biol* 1995, 57:782-787
3. Schrier DJ, Phan SH, McGarry BM: The effects of the nude (nu/nu) mutation on bleomycin-induced pulmonary fibrosis. A biochemical evaluation. *Am Rev Respir Dis* 1983, 127:614-617
4. Steeber DA, Tang MLK, Green NE, Zhang X-Q, Sloane JE, Tedder TF: Leukocyte entry into sites of inflammation requires overlapping interaction between the L-selectin and ICAM-1 pathways. *J Immunol* 1999, 163:2176-2186
5. Steeber DA, Campbell MA, Basit A, Ley K, Tedder TF: Optimal selectin-mediated rolling of leukocytes during inflammation in vivo requires intercellular adhesion molecule-1 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, 95:7562-7567

6. Nagaoka T, Kaburagi Y, Hamaguchi Y, Hasegawa M, Takehara K, Steeber DA, Tedder TF, Sato S: Delayed wound healing in the absence of intercellular adhesion molecule-1 or L-selectin expression. *Am J Pathol* 2000, 157:237-247
7. Piguet PF, Collart MA, Grau GE, Kapanci Y, Vassalli P: Tumor necrosis factor/cachectin plays a key role in bleomycin-induced pneumopathy and fibrosis. *J Exp Med* 1989, 170:655-663

G. 研究発表

1. 学会発表
 - ・ The 92th Meeting of American Association of Immunologists (April, 2005, San Diego, USA)
 - ・ 第34回日本免疫学会総会、2004年12月、北海道

H. 知的所有権の出願・登録状況

なし

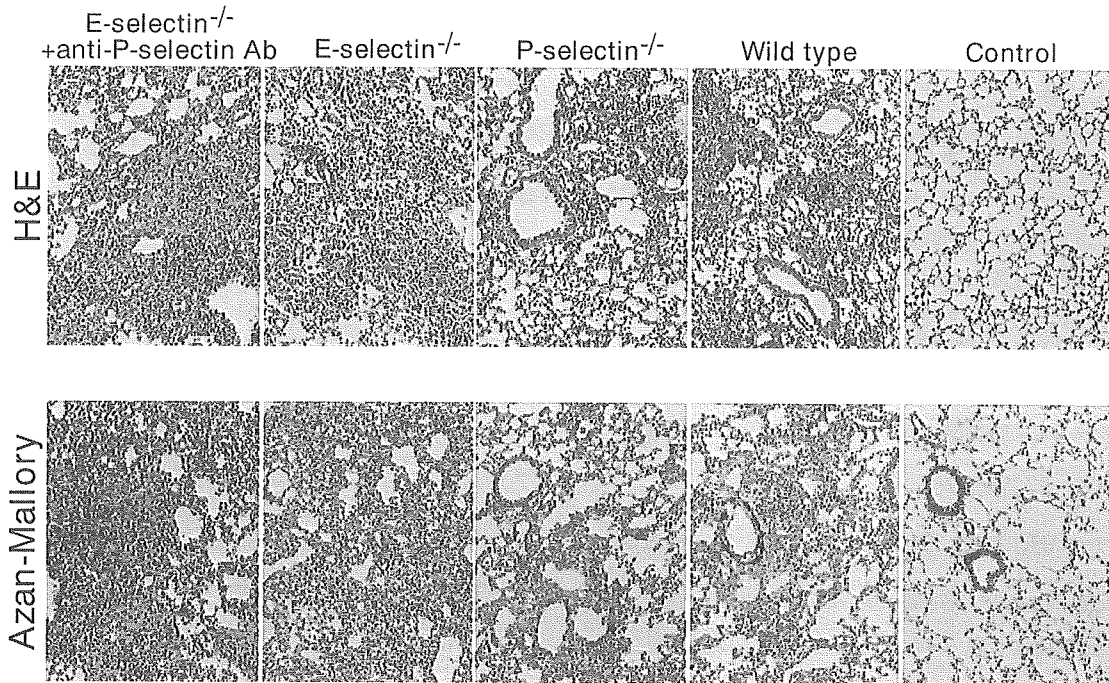


図 1 : ブレオマイシン投与 16 日後に肺を摘出して HE 染色と Azan-Mallory 染色を行った肺組織

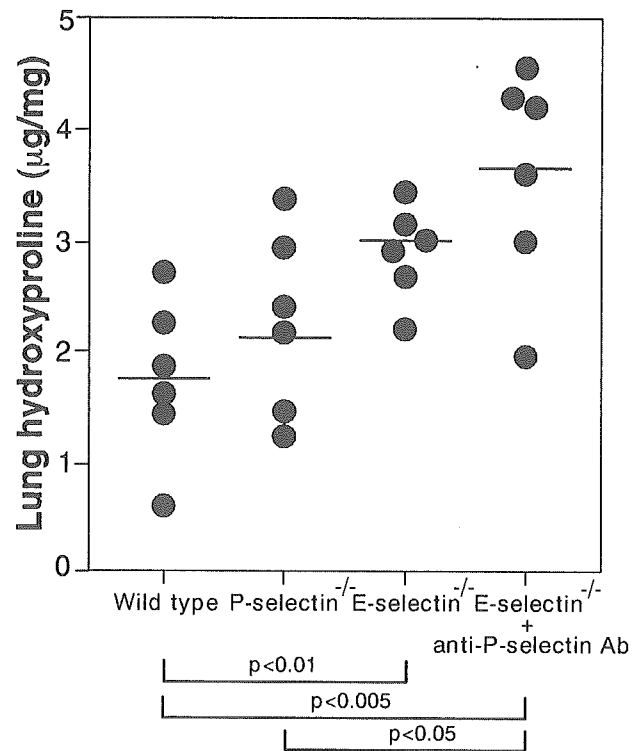


図 2 : ブレオマイシン投与 16 日後における肺組織中ヒドロキシプロリン量

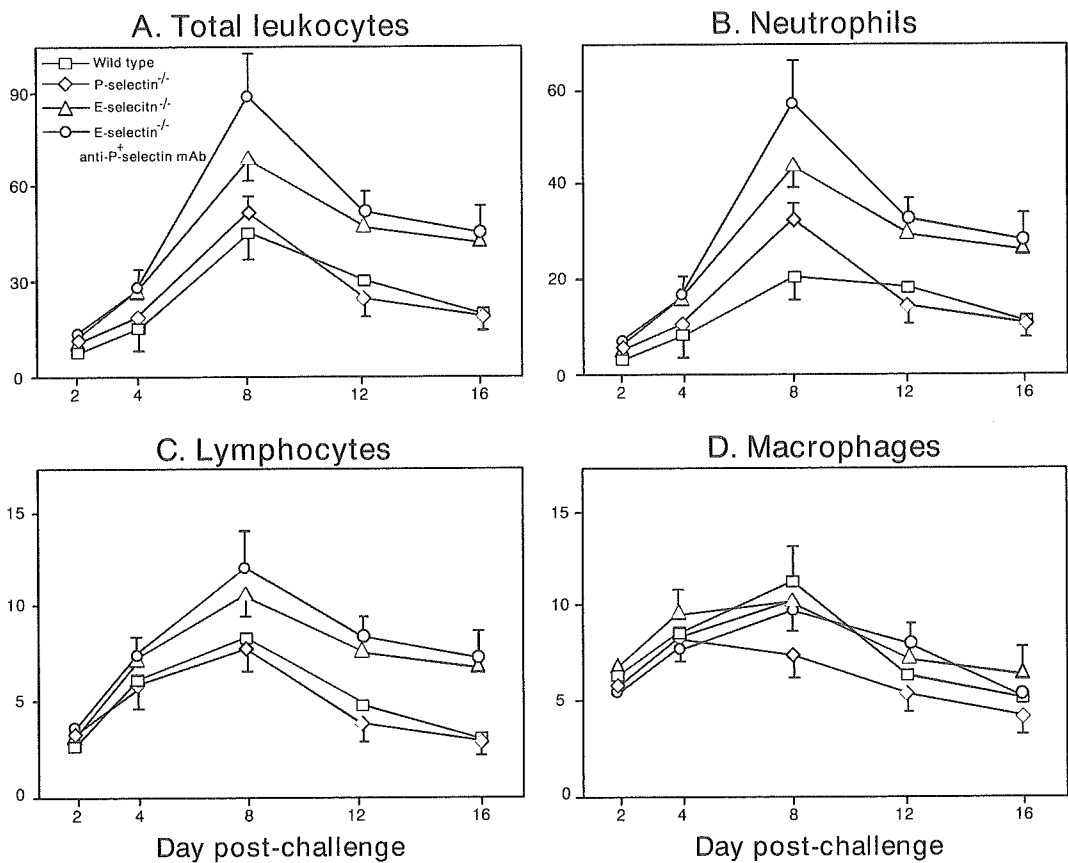


図 3 : ブレオマイシン投与2、4、8、12、16日後の 気管支肺胞洗浄液 (BAL) 中の炎症細胞浸潤

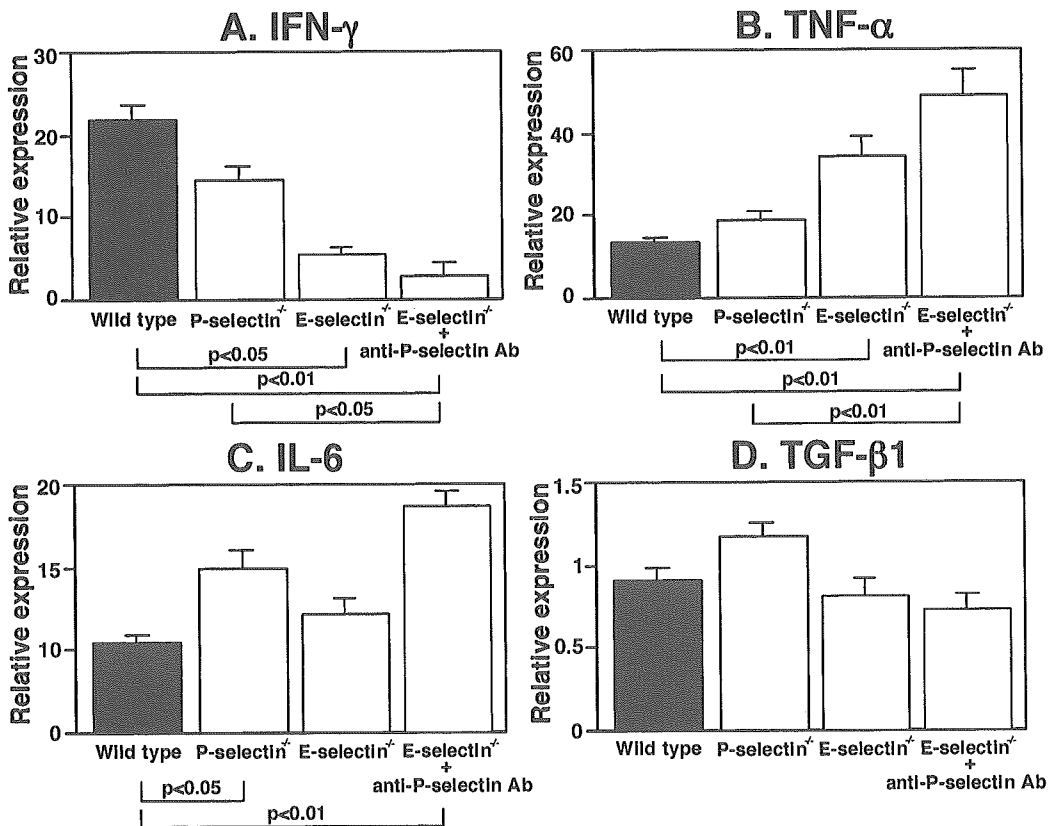


図 4 : ブレオマイシン投与8日後に肺を摘出し、RT-PCR法により TNF- α 、IL-6、IFN- γ 、TGF- β 1 mRNA の発現を測定

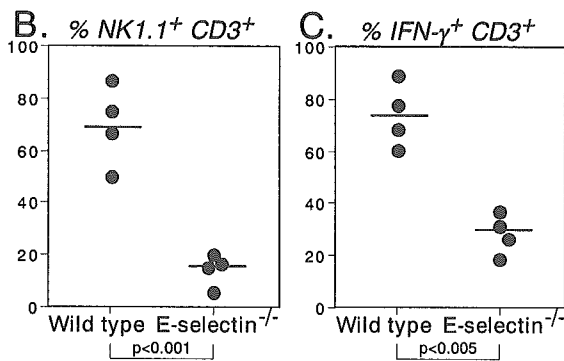
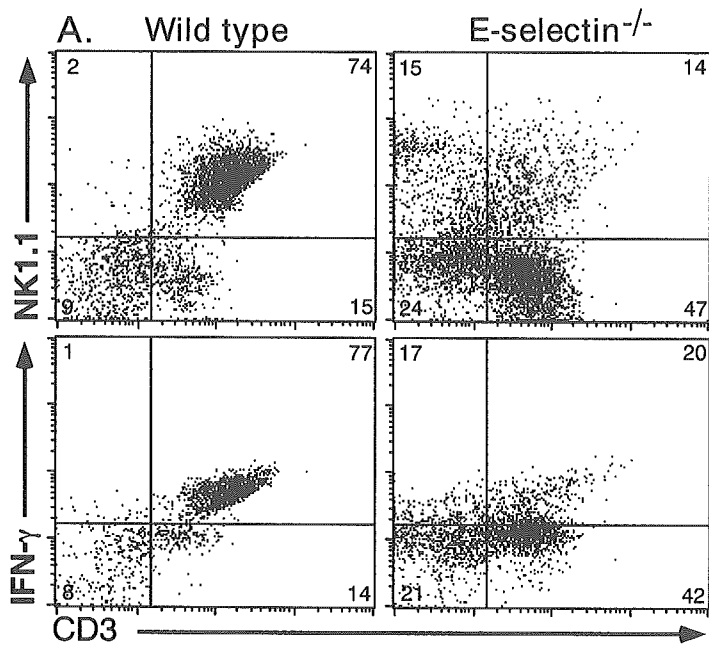


図 5: E-selectin 欠損マウスおよび野生型マウスより採取した BAL を、フローサイトメトリーにて CD3, NK1.1, 及び IFN- γ を用いて三重染色解析

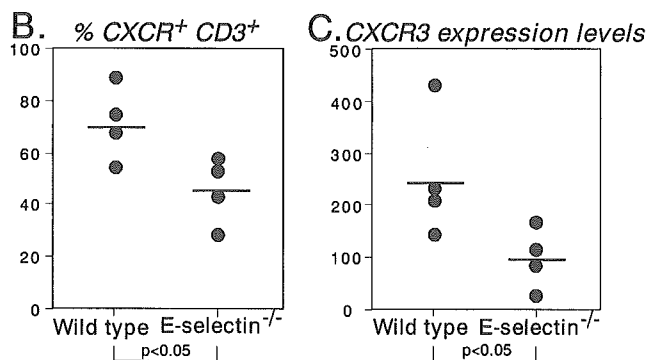
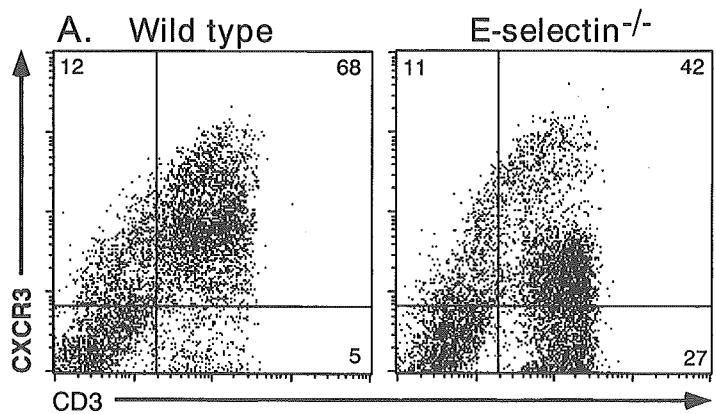


図 6: E-selectin 欠損マウスおよび野生型マウスより採取した BAL を、フローサイトメトリーにて CD3, CXCR3 を用いて二重染色解析

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

肺線維症モデルに対するアンギオテンシン変換酵素阻害薬および
アンギオテンシン受容体拮抗薬の効果

研究協力者 安井正英 金沢大学大学院医学系研究科細胞移植学講師
分担研究者 長谷川稔 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学講師
主任研究者 竹原和彦 金沢大学大学院医学系研究科皮膚科学教授

研究要旨

シリカおよびブレオマイシン(BLM)による2種類の肺線維症モデルを用い、肺線維化形成におけるアンギオテンシン産生系の関与を検討した。シリカ肺線維症モデルに対し、アンギオテンシン変換酵素(ACE)阻害薬およびアンギオテンシンタイプ1(AT₁)受容体拮抗薬は、用量依存的に肺線維化形成を抑制した。BLM肺線維症モデルに対してもACE阻害薬およびAT₁受容体拮抗薬は肺線維化形成を抑制した。また、BALF中炎症細胞浸潤およびサイトカイン(TNF α , MIP-1 α , TGF β 1)に対する抑制効果も認められた。ACE阻害薬およびAT₁受容体阻害薬は、肺線維症の治療薬としての可能性を有していると考えられた。

A. 研究目的

肺の線維化は、感染症、放射線肺炎、細胞障害性薬剤性肺炎、慢性過敏性肺炎、塵肺など原因の明らかな疾患や特発性肺線維症

(idiopathic pulmonary fibrosis : IPF)、膠原病関連肺疾患、サルコイドーシス等原因不明の疾患まで幅広く認められ、不可逆性の場合が多く臨床的に重要な病態である。強皮症においても、肺線維症・間質性肺炎を高頻度に合併し重要な予後因子となっているが、確立された治療法はない。

近年、心血管系や腎臓を始めとする様々な臓器の線維化において、レニン・アンギオテンシン系(rennin-angiotensin system : RAS)

が重要な役割を担っていることが判明し、各種薬剤が開発され臨床応用されている。

しかし、肺線維化に関する検討は少なく、肺線維症におけるRASの役割は不明な点が多い。

そこで、シリカおよびブレオマイシン(bleomycin : BLM)による肺線維症動物モデルを用いて、アンギオテンシン変換酵素(angiotensin converting enzyme : ACE)阻害薬およびアンギオテンシンタイプ1(angiotensin type 1 : AT₁)受容体拮抗薬の影響を検討してみた。

B. 研究方法

1) 肺線維症モデルの作成

8~10週齢ICR系雄性マウスを用いた。シ

シリカ肺線維症モデルは、マウスをエーテル麻酔後、シリカ10mgを生理的食塩水200 μ lに懸濁溶解し気管内投与することで作成した。

BLMモデルは、BLM150mg/kgを生理的食塩水200 μ lに溶解し、尾静脈より1回投与することで作成した。

2) ACE阻害薬およびAT₁受容体拮抗薬の投与
シリカ肺線維症モデルに対しては、ACE阻害薬captopril (10mg/kg, 32mg/kg), ACE阻害薬cilazapril(1mg/kg, 10mg/kg), AT₁受容体拮抗薬candesartan (3 mg/kg, 32mg/kg)をシリカ投与後8日目から21日目まで連日経口投与した。

BLM肺線維症モデルに対しては、ACE阻害薬captopril (3mg/kg, 10mg/kg)をBLM投与後1日目より14日目まで連日経口投与した。AT₁受容体拮抗薬candesartan (10 mg/kg)は、BLM投与後1日目から14日目の群と15日目から28日目の群を作成した。

3) 肺組織中ヒドロキシプロリンの測定

シリカ投与後21日目およびBLM投与後28日目に肺を摘出し、コラーゲン量の指標として用いられるヒドロキシプロリン量をSchrierらの方法により測定した。

4) 病理学的肺線維化スコアの評価

シリカ投与後21日目およびBLM投与後28日目に肺を摘出し、パラフィン切片標本作製した。ヘマトキシリンエオジン染色およびアザンマロリー染色を行い、シリカモデルではAschcroft score, BLMモデルでは浴本らの線維化スコアを用いて肺線維化を定量的に評価した。

5) 気管支肺胞洗浄液細胞所見の解析

シリカモデルでは投与後10日目および21日目、BLMモデルでは投与後14日目および28日目に気管支肺胞洗浄 (BAL) を行った。BALは、生理的食塩水1mlで3回肺を洗浄し、得られた液を気管支肺胞洗浄液 (BALF) とした。細胞数を算出後、サイトスピン標本作製し、ギムザ染色を行った後任意の視野で300個細胞を観察し細胞分画を算定した。

6) BALF 中サイトカインの測定

BALF 上清を用いて、IL-1 β , TNF α , MIP-1 α をELISA kitにより測定した。

7) BALF 中 ACE 活性の測定

シリカモデルにおいては、シリカ投与後7日目、14日目および21日目のBALF中ACE活性を笠原法により測定した。

8) RT-PCR

シリカモデルにおいては、シリカ投与後のBALF細胞を用いてRT-PCR法によりACEおよびTGF- β のmRNAの発現をRT-PCR法により検討した。同一の検体を用いてGAPDHの発現も検討し、NIH imageを用いてGAPDHに対する相対的比率を算出した。

9) 統計学的解析

各群間の比較にはMan-Whitney testを用い、危険率5%以下の場合有意差ありと判定した。

C. 研究結果

I シリカ肺線維症モデル

1) ACEの発現

生理的食塩水投与群ではBALF中ACE活性は全く検出されなかったが、シリカ投与群では7日後以降持続的にACE活性が認められた(図1A)。さらに、シリカ投与7日目のBALF

細胞からmRNAを抽出し、RT-PCR法を用いて ACE mRNAの発現を評価した。mRNAに関してもシリカ投与群におけるACE発現の亢進を認めた(図1B)。

2) シリカ肺線維症モデルに対するACE阻害薬の効果

シリカ肺線維症モデルに対して、ACE阻害薬captoprilおよびcilazaprilはいずれも肺ヒドロキシプロリン量および病理学的肺線維化スコアにおいて有意な抑制効果が認められた。また、cilazapril投与により、BALF中炎症細胞(肺胞マクロファージ数、リンパ球数、好中球数)とサイトカイン(IL-1 β , TNF α , MIP-1 α)の増加が抑制された。

3) シリカ肺線維症モデルに対するAT₁受容体拮抗薬の効果

AT₁受容体拮抗薬(candesartan)は容量依存的に肺ヒドロキシプロリン量の増加を抑制し、病理組織学的線維化スコアでも抑制効果が確認された。また、BALF中肺胞マクロファージ数、好中球数およびTNF α , MIP-1 α , TGF- β 1の増加も抑制した。

II BLM肺線維症モデル

1) BLM肺線維症モデルに対するACE阻害薬の効果

ACE阻害薬(captopril)は、肺ヒドロキシプロリン量およびBALF中肺胞マクロファージ数、リンパ数の増加を有意に抑制した。

2) BLM肺線維症モデルに対するAT₁受容体拮抗薬の効果

AT₁受容体拮抗薬(candesartan)は肺ヒドロキシプロリン量および病理組織学的線維化スコアの増加を有意に抑制した。また、

BALF中肺胞マクロファージ数、リンパ数およびMIP-1 α の増加も抑制した。

D. 考案

肺線維化とACE

まず、肺線維化過程におけるACEに関しては、シリカ投与後比較的早期から持続的に発現していることが確認された。BLM肺線維症モデルにおいても、Newmanら¹⁾がBLM気管内投与1日後よりBALF中ACE活性が増加し、さらにBLM投与量依存的であることを示している。また、臨床的には、Specksら²⁾は、様々な間質性肺疾患において気管支肺胞洗浄液(broncho-alveolar lavage fluid: BALF)中のACE活性を測定している。その中で特発性肺線維症(idiopathic pulmonary fibrosis: IPF)においてBALF中ACE活性が上昇し、さらにBALF好中球数と正の相関関係が認められている。Idellら³⁾も急性呼吸窮迫症候群(acute respiratory distress syndrome: ARDS)においてBALF中ACE活性が上昇し、IPFを含めたBALF中ACE活性はBALF中好中球比率と正の相関があることを示している。したがって、原因に関わらず肺線維化病態においては肺局所のACE発現が亢進し、線維化過程の共通因子として関与していることが考えられる。

次に、肺線維化過程においてACE発現の意義に関し検討する目的でACE阻害薬の効果を検討した。シリカおよびBLMいずれの肺線維症モデルにおいても、ACE阻害薬は肺線維化を抑制し、BALF中炎症細胞およびサイトカインの増加を抑制した。したがって、ACE阻害

薬はシリカまたは BLM 投与により惹起される炎症性サイトカインやケモカインの発現を抑制し、炎症細胞浸潤およびこれに続く線維化過程を抑制することが考えられた。Wang ら⁴⁾は、ラット BLM 気管内投与モデルにおいて、ACE 阻害薬 (captopril) が肺胞上皮のアポトーシス抑制を介して肺線維化を抑制することを報告している。また、Ward ら⁵⁾は、ラット放射線肺線維症モデルに対して、ACE 阻害薬 (captopril, CL242817) が肺ヒドロキシプロリン量増加を抑制することを報告している。ただし、チオール基を持たない ACE 阻害薬 (CGS13945) は線維化を抑制できておらず、チオール基によるラジカルスカベンジャー作用が線維化抑制効果に関連していることも考えられる。しかし、我々の検討では、チオール基を有する ACE 阻害薬 (captopril) とチオール基を持たない ACE 阻害薬 (cilazapril) の効果を検討した。いずれの阻害薬も抑制効果が認められ、チオール基の有無に拘らず ACE 阻害作用により抑制効果が得られるものと考えられた。

動物モデルの結果からは、原因に関わらず肺線維化過程において肺局所で増加する ACE は線維化進展に関与し、ACE 阻害薬は線維化抑制効果があると考えられる。

肺線維化と AT₁ 受容体

シリカおよび BLM いずれのモデルに対しても AT₁ 受容体拮抗薬 (candesartan) は肺線維化を抑制し、さらに BALF 中炎症細胞浸潤およびサイトカインの増加を抑制した。また、BLM モデルにおいて、BLM 投与後早期 2 週間と後

期 2 週間に AT₁ 受容体拮抗薬を投与し、いずれの群でも線維化抑制効果を認められた。したがって、AT₁ 受容体拮抗薬は肺線維化の様々な過程において抑制効果を有していることを推測している。すなわち、炎症性サイトカイン、ケモカインおよび増殖因子など多面的にサイトカイン発現を阻害することで、間質性肺炎および肺線維化形成を抑制するものと考えられた。

大塚ら⁶⁾はラット BLM 肺線維症モデルに対して、AT₁ 受容体選択的阻害薬 (candesartan) の経口投与を行い、BALF 中アルブミン、肺胞マクロファージ数、好中球数、TGF- β 1 および肺ヒドロキシプロリン量の増加を抑制することを報告している。また、Losartan に関しても BLM 肺線維症モデルにおける抑制効果が報告されている^{7),8)}。したがって、AT₁ 受容体阻害作用により肺線維化が抑制されることは間違いのないものといえる。ヒトでは、肺胞上皮、気道上皮下の間質細胞、血管平滑筋、肺胞マクロファージに AT₁ 受容体の発現が認められている⁹⁾。大塚ら⁶⁾は、ラット正常肺組織における AT₁ 受容体の分布を検討し、肺胞マクロファージ、気道上皮、肺胞上皮、血管内皮に発現していることを報告している。また、彼らは BLM 肺線維症モデルにおいて、線維化形成に伴い肺組織中の AT₁ 受容体の発現が増加してくること、線維化部位の間質の肺胞マクロファージおよび線維芽細胞を主体として AT₁ 受容体が発現していることを示している。BLM 肺線維症モデルにおいて、肺胞上皮細胞のアポトーシスが肺線維化形成に重要であることが報告されている¹⁰⁾。肺胞上皮細胞のア