

はじめに

特発性肺線維症 (Idiopathic Pulmonary Fibrosis; IPF) の病理学的な特徴として筋線維芽細胞増生が注目されている¹⁾。筋線維芽細胞は α -smooth muscle actin (α SMA) を発現し、超微細構造上は線維芽細胞と平滑筋細胞との中間的特徴を持つ。機能的には、各種炎症性メディエーター・サイトカイン・成長因子を分泌し、膠原線維を始めとする細胞外基質の沈着を促進させるなど、IPF 病態に強く関すると推定されている²⁾。

一方、IPF 病態では生体内酸化還元系の制御異常ならびに抗酸化活性と酸化活性のバランス異常が指摘されている³⁾。Selenoprotein (SEP) はセレンシステイン残基を有する一連の蛋白であり、生体内酸化還元反応において重要な役割を果たしている⁴⁾。SEP の一つであるセレンプロテイン P (SEPP) は特有の構造を持ち、多数のセレンシステイン残基を有し、他の SEP よりも強い抗酸化能を持つ。本研究では、IPF 患者肺由来の初代培養細胞および IPF 患者生検肺組織標本を用いて SEPP の発現解析を行い、IPF 病態への SEPP の関与を初めて明らかにした。

対 象

1) IPF 肺組織からの培養線維芽細胞の樹立

胸腔鏡下肺生検により得られた 2 例の IPF 患者肺組織から初代線維芽細胞 (LF1 及び LF2) を樹立した。線維芽細胞の単離は以前に報告した方法に準じて行った⁵⁾。肺組織を細切後コラゲナーゼ処理し RPMI1640 培地中で分離した。10%牛胎児血清を含む RPMI 培地にて、37°C、5%CO₂ 下で数日間培養し、サブコンフルエントまで成長させたのち継代した。線維芽細胞の対照としてヒト胎児肺正常線維芽細胞由来の培養細胞株 (TIG7)、II 型肺胞上皮系細胞として A549 細胞を用いた。

2) IPF 患者肺組織

IPF 患者 5 例の胸腔鏡下肺生検ならびに剖検で得

られた凍結肺組織を用いた。IPF の診断は、臨床・画像・病理所見を総合し、ATS・ERS 診断基準に準じて行った⁶⁾。また、対照として肺癌手術例 3 例の非癌部分の正常と思われる肺組織を用いた。なお、本研究は福島県立医科大学倫理委員会での承認を受け、患者の同意を得て行った。

方 法

1) 培養細胞系における mRNA 定量

IPF 患者から樹立した初代培養線維芽細胞 (LF1 および LF2) における抗酸化酵素の発現をリアルタイム PCR 法により検討した。対照として、ヒト胎児正常線維芽細胞 (TIG7) を用い、SEPP と α SMA の mRNA 発現を検討し、比較した。

2) 培養細胞におけるイムノプロット法による蛋白解析

コンフルエント TIG7、LF1 および LF2 細胞より細胞可溶画分を調製した。蛋白質濃度をブラッドフォード法により定量し、それぞれの試料の蛋白濃度を標準化した後、2-メルカプトエタノールを含んだドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 中で可溶化し、10% のポリアクリルアミドゲルを用いた SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離した。その後、蛋白質をポリフッ化ビニリデンジフロリドフィルターに転写し、イムノプロット解析を行った。一次抗体として抗 SEPP 抗体 (BD bioscience, Frankline Lakes, NJ, USA)、抗 α SMA 抗体 (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark) を用いた。二次抗体として horseradish peroxidase 標識のヤギ抗マウス二次抗体 (Bio Rad Lab., Hercules, CA USA) を用いた。また同様の方法で、TIG7 細胞と A549 細胞を TGF- β (5 ng/ml) で刺激した際の SEPP ならび α SMA 蛋白発現の変化も検討した。

3) 肺組織の免疫組織化学染色

OCT コンパウンド に包埋した凍結肺組織から厚さ 10 μ m の切片を作製した。スキムミルクにて 30 分間ブロッキング後 PBS で 3 回洗浄、さらに内因性ペルオキシダーゼを不活性化した。再度 PBS で 3 回洗浄後、一次抗体と共に 4°C 一晩インキュベート、PBS で 3 回洗浄後、二次抗体とともに室温で 30 分間インキュベートした。PBS で 3 回洗浄した後、3,3-diaminoben-

¹⁾ 福島県立医科大学医学部呼吸器科学講座

²⁾ 同 生体情報伝達研究所生体物質部門

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

zidine tetrahydrochloride (Nichirei, Tokyo, Japan) には発色した。最後に、ヘマトキシリンでカウンター染色を行った。

4) 統計解析

mRNA の定量およびイムノブロット解析では 3 回の実験結果を平均値±標準偏差で示した。比較は Student's *t* test を用い、 $P < 0.05$ を有意とした。すべての計算は統計解析ソフト (SPSS) プログラムを用いて行った。

結 果

1) IPF 患者線維芽細胞における SEPP および α SMA 発現

リアルタイム PCR による SEPP mRNA 発現の検討では TIG7 と比較し明らかな発現増強が認められ、LF1 で約 10 倍、LF2 で約 12 倍であった。また、ウエスタンブロット法による蛋白発現解析でも、LF1 で 2.8 倍、LF2 で約 6 倍の SEPP 蛋白発現増強が認められた。一方、IPF 患者由来の線維芽細胞 LF1、LF2 における α SMA の mRNA 発現は TIG7 と比較し、それぞれ 3.5 倍、4.5 倍に増強していた。また、蛋白質レベルの解析でも LF1、LF2 では TIG7 に比較し、それぞれ 8 倍、10 倍の発現増強が認められた。

2) IPF 患者肺における SEPP および α SMA の発現

IPF 患者肺の免疫組織化学染色では、強い線維化を示す領域内で散在性に SEPP 染色陽性細胞を認めた。SEPP 陽性細胞は紡錘形の胞体を持ち、線維芽細胞様の細胞であった。また、肺泡領域では、肺泡腔内壁を裏打ちするように陽性細胞が見られ、強拡大では角型の豊富な胞体を持ち、過形成を示す II 型肺胞上皮細胞と推測された。正常肺組織では一部の肺胞上皮に弱い染色性を認めるのみであった。

α SMA 抗体による免疫組織化学染色では SEPP と同様に、強い線維化を示す領域内に散在性に α SMA 染色陽性細胞を認め、強拡大では紡錘形胞体を持つ線維芽細胞様細胞であった。また SEPP と同様、肺泡腔を裏打ちするように α SMA 陽性細胞が認められ、強拡大像では II 型肺胞上皮細胞と推測された。

3) TIG7 および A549 細胞の TGF- β 刺激による SEPP および α SMA の誘導

TIG7 細胞では時間依存性に SEPP が誘導され、36 時間でピークを示した。 α SMA もやや遅れて時間依存性に発現増強が認められた。II 型肺胞上皮系の A549 細胞を用いた場合にも、同様に時間依存性に SEPP と α SMA の蛋白発現の増強が認められた。

考 察

本研究では、SEPP が IPF 病態に関与する可能性を考え種々の検討を行い、① IPF 患者由来の肺線維芽細胞では SEPP の mRNA ならびに蛋白質発現の増強が認められること、② 同時に α SMA の mRNA ならびに蛋白質発現も増強しており筋線維芽細胞様の性質を持つこと、③ IPF 患者肺では間質の線維芽細胞や II 型肺胞上皮細胞で SEPP と α SMA の発現が増強すること、④ 正常肺線維芽細胞 TIG7 ならびに A549 細胞を TGF- β で刺激すると SEPP と α SMA 両者が誘導されること、などを明らかにした。

IPF 患者肺では酸化ストレスと窒素化ストレスの両者が増大している³⁾。この酸化ストレスの亢進している IPF 患者肺由来の線維芽細胞で SEPP の発現が増強していた。また、IPF 肺の免疫組織染色では強い線維化を示す領域の線維芽細胞様細胞と、酸化ストレス暴露を受けやすい II 型肺胞上皮で SEPP 発現が見られた。これらの結果から、IPF 肺では内因性・外因性酸化ストレスに対する防御機能の一部として SEPP 発現が増強している可能性が示唆された。

筋線維芽細胞の増殖は IPF の病理学的特徴の一つとされている¹⁾。線維芽細胞は TGF- β などの内因性サイトカインや活性酸素種により刺激を受け筋線維芽細胞に分化する。一般的には、筋線維芽細胞は線維芽細胞と平滑筋細胞の中間的な機能と形態を有する細胞と認識され、その特性の一つとして α SMA の発現がある²⁾。本研究では、IPF 患者肺由来の線維芽細胞で α SMA の mRNA ならびに蛋白発現が増強していた。また、免疫組織化学染色の結果でも SEPP 陽性細胞の一部は α SMA も発現しており、紡錘形の形態を持つことから、SEPP 発現細胞は筋線維芽細胞類似の細胞と考えられた。

IPF 肺における筋線維芽細胞は TGF- β 刺激により線維芽細胞から分化すると考えられている⁷⁾。本研究

でも、ヒト胎児正常線維芽細胞 (TIG7) を TGF- β で刺激することで、SEPP 発現誘導と同時に α SMA の発現も誘導された。また、II 型肺胞上皮の過形成も IPF の病理組織学的な特徴の一つである。肺胞上皮細胞も TGF β による暴露を長時間受けると筋線維芽細胞に形質転換することが知られ、IPF 肺における筋線維芽細胞が肺胞上皮に由来する可能性も示唆されている^{8,9)}。本研究においても、II 型肺胞上皮系の A549 細胞を TGF- β で刺激することで SEPP ならびに α SMA の発現が誘導されることが確認された。

以上の結果から、SEPP は線維芽細胞ならびに II 型上皮細胞の筋線維芽細胞への形質転換と共に発現し、IPF の病態に重要な関与をしていると推測された。

参考文献

- 1) Tomasek JJ, Gabbiani G, Hinz B, Chaponnier C, Brown RA. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodeling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, 3 : 349-363.
- 2) Walker GA, Guerrero IA, Leinwand LA. Myofibroblasts: molecular crossdressers. *Curr Top Dev Biol* 2001, 51 : 91-107.
- 3) Vuokko LK, Cherly LF, Roderick JT and Tim DO. Oxidative Stress in Pulmonary Fibrosis: A Possible Role for Redox Modulatory Therapy. *Am J Respir Crit Care Med* 2005, 172 : 417-422.
- 4) Raymond FB and Kristina EH. SELENO-PROTEIN P: An Extracellular Protein with Unique physical Characteristics and a Role in Selenium Homeostasis. *Annu. Rev. Nutr.* 2005, 25 : 215-235.
- 5) American Thoracic Society (ATS) and the European Respiratory Society (ERS) Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. *Am J Respir Crit Care Med* 2003, 161 : 646-664.
- 6) Satoh K, Kikuchi S, Masayuki S, Kabuyama Y, Homma MK and Homma Y, Involvement of ErbB-2 in rheumatoid synovial cell growth. *Arthritis & Rheumatism*, 2001, 44 : 260-265.
- 7) Thannickal VJ, Lee DY, White ES, Cui Z, Larios JM, Chacon R, Horowitz JC, Day RM, Thomas PE. Myofibroblast differentiation by transforming growth factor-beta1 is dependent on cell adhesion and integrin signaling via focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 2003, 278 : 12384-12389.
- 8) Kasai H, Jeremy TA, Roger MM, Kamimura T, and Zhi Z. TGF- β 1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respiratory Research* 2005, 6 56.
- 9) Brigham CW, Janice ML, Katherine LP, Andrew GN, Edward DC, Roland M du B and Zea Borok. Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Cells by Transforming Growth Factor- β 1 *Am J pathol* 2005, 166 : 1321-1332.

特発性肺線維症の Fibroblastic foci における遺伝子発現の検索

石井 芳樹*

【目的】 特発性肺線維症 (IPF) の肺組織における遺伝子発現の変化を知ることは線維化のメカニズムの解析に重要であると思われる。なかでも fibroblastic foci は線維化の最も活発な部分であり、その局所における遺伝子発現解析は特に有用である。

【対象と方法】 IPF 症例の VATS 検体から凍結切片を作成し、HistoGene にて染色。Laser capture microdissection 法にて fibroblastic foci の部分のみを選択的に採取した。PicoPure RNA isolation kit を用いて RNA を分離したのち、RiboAmp RNA amplification kit によって RNA を増幅した。さらに AmpoLabeling-LPR kit でラベリングして、GEArray Q シリーズ TGF β BMP signaling pathway gene array と Extracellular matrix and adhesion molecules gene array を用いてそれぞれ約 100 種類の gene の発現を測定した。解析は SuperArray analysis suite 上で行った。正常成人ヒト線維芽細胞における遺伝子発現をコントロールとし、2 倍以上または 2 倍以下の発現を示した遺伝子を抽出した。

【結果】 IPF/UIP5 症例の fibroblastic foci における遺伝子発現パターンはいずれの症例でもほぼ同様であった。TGF β BMP signaling pathway 系では BMP6, BMPreceptor 2, CDKN1A, CDKN2B, EVI1, Integrin β 7, LEFTY1, SMAD7, SMAD9, MYC, RUNX1, TDGF1, TGFB3, TGFR1, TGFR2 で 2 倍以上の発現増加が見られ、Follistatin, SMAD2, SERPINE1, TIMP1 では 1/2 以上の減少が見られた。Extracellular matrix 系では Contactin 1, Cathepsin G, ICAM-1, Integrin α 2b, MMP-7, MMP-12, MMP-16, Plasminogen activator, E-selectin, L-selectin, P-selectin, osteopontin, Thrombospondin 2 の増加と Caveolin 1, CD44, Cystatin C, Catenin, Cathepsin L, Fibronectin 1, Integrin α 11, α 3, β 1, β 5, Laminin β 1, MMP-1, MMP-2 の減少を認めた。

【結論】 変動の見られた遺伝子の役割を特定し検証することによって線維化のメカニズムを解明したい。

Analysis of gene expression profiles in fibroblastic foci from patients with IPF

Yoshiki Ishii

*Department of Pulmonary Medicine and Clinical Immunology,
Dokkyo Medical University School of Medicine*

RATIONALE: To know the gene expression profiles in the fibrotic lung tissue is important for the development of new drugs. Fibroblastic foci are most active area of lung fibrosis and predictors of lung function and mortality in IPF. OBJECTIVES: To find the key genes in the pathogenesis of lung fibrosis, we compared the gene expression profiles in fibroblastic foci from patients with IPF and those in cultured normal lung fibroblasts. The cells in the fibroblastic foci were captured using laser capture microdissection. Total RNA was extracted and amplified. mRNA expression was determined using selective microarray systems (GEArray Q series) for human TGF β BMP signaling pathway and human extracellular matrix and adhesion molecules (EMAM). RESULTS: The gene expression pattern in fibroblastic foci of 5 IPF patients was almost similar. The genes that showed increased expression more than 2 times in comparison with normal lung fibroblasts were BMP6, BMP receptor 2, CDKN1A, CDKN2B, EVI1, Integrin β 7, LEFTY1, SMAD7, SMAD9, MYC, RUNX1, TDGF1, TGF β 3, TGFR1 and TGFR2 in TGF β BMP signaling pathway system, and Contactin 1, Cathepsin G, ICAM-1, Integrin α 2b, MMP-7, MMP-12, MMP-16, Plasminogen activator, E-selectin, L-selectin, P-selectin, Osteopontin and Thrombospondin 2 in EMAM system. On the other hand, decreased expression less than 1/2 was seen in Follistatin, SMAD2, Serpine1 and TIMP1 in TGF β BMP signaling pathway system, and Caveolin 1, CD44, Cystatin C, Catenin, Cathepsin L, Fibronectin 1, Integrin α 11, α 3, β 1, β 5, Laminin β 1, MMP-1 and MMP-2 in EMAM system. CONCLUSION: Altered gene expression in fibroblastic foci likely plays an important role in pathogenesis of lung fibrosis in the patients with IPF. We would like to confirm the role of these genes. These approaches may be helpful to develop new drug for IPF.

はじめに

特発性肺線維症 (IPF) は、5 年生存率が 30% の予後不良な疾患であるが、現時点でその治療法は確立されていない。何らかの原因によって線維芽細胞が増殖して肺胞構造が畳み込まれ蜂巣肺が形成される。病因には、線維芽細胞の増殖制御の異常が中心にかかわっていると考えられる。線維芽細胞増殖には、TGF- β などの増殖因子が働くと考えられるが、増殖因子や抑制因子の相互作用については十分に解明されていない。そこでまず、IPF の肺組織における遺伝子発現の変化を知ることから病因に関与の大きいと考えられる線維化関連遺伝子の変化を探索した。正常な線維芽細胞における発現遺伝子と有意に異なる遺伝子について選択し、その機能や病態における役割を解明することは、新たな治療法の開発に繋がるものと考えられる。線維化肺組織のなかでも fibroblastic foci は線維化の最も活発な部分であり、その局所における遺伝子発現解析は特に有用であると思われる。

対象と方法

IPF 症例の VATS 検体から凍結切片を作成し、HistoGene (Arcturus) にて染色。Laser capture microdissection 法 (Arcturus LM200) にて fibroblastic foci の部分のみを選択的に採取した。PicoPure RNA isolation kit (Arcturus) を用いて RNA を分離したのち、RiboAmp RNA amplification kit (Takara) によって RNA を増幅した。さらに AmpoLabeling-LPR kit でラベリングして、GEArray Q シリーズ TGF β BMP signaling pathway gene array と Extracellular matrix and adhesion molecules (EMAM) gene array を用いてそれぞれ約 100 種類の gene の発現を測定した。解析は SuperArray analysis suite 上で行った。Human fetal lung fibroblasts (HFL-1) と Normal human lung fibroblasts (NHLF) の 2 種類の正常成人ヒト線維芽細胞における遺伝子発現をコントロールとし、2 倍以上または 2 倍以下の発現を示した遺伝子を抽出した。

結 果

IPF/UIP5 症例の fibroblastic foci における遺伝子発現パターンはいずれの症例でもほぼ同様であった。TGF β BMP signaling pathway 系では BMP6, BMPreceptor 2, CDKN1A, CDKN2B, EVI1, Integrin β 7, LEFTY1, SMAD7, SMAD9, MYC, RUNX1, TDGF1, TGFB3, TGFR1, TGFR2 で 2 倍以上の発現増加が見られ、Follistatin, SMAD2, SERPINE1, TIMP1 では 1/2 以上の減少が見られた。EMAM 系では Contactin 1, Cathepsin G, ICAM-1, Integrin α 2b, MMP-7, MMP-12, MMP-16, Plasminogen activator, E-selectin, L-selectin, P-selectin, osteopontin, Thrombospondin 2 の増加と Caveolin 1, CD44, Cystatin C, Catenin, Cathepsin L, Fibronectin 1, Integrin α 11, α 3, β 1, β 5, Laminin β 1, MMP-1, MMP-2 の減少を認めた。

考 察

これまで線維化肺における遺伝子のプロファイリングは肺組織全体から得た RNA を用いて行われていたため、微細な変化が検出できないという危惧もあった^{1,2)}。これに対してターゲットとなる細胞を選択的に採取して、プロファイリングを行うことはより効率的に変化を検出できる可能性が高い。線維化肺においては、fibroblastic foci が線維化の最も活発な部分であり、その数が活動性や予後とも相関するといわれる。この局所における RNA を laser capture microdissection 法を用いて採取して解析した。また、このような手法では採取できる RNA 量も少ないため検討する遺伝子が特定のものに限定されてしまうが³⁾、RNA の増幅を行うとともに、特定の機能を持った遺伝子群ごとに解析が可能な selective な microarray を用いることで、特定の増殖因子のみでなくその受容体や制御因子など関連遺伝子についても解析可能であった。

正常肺線維芽細胞における発現と有意な変動を示した遺伝子の意義と役割については今後の検討となるが、このような方法で一定の結果が得られることが明らかとなった点意義は大きいと思われる。今回、最も線維化に関与する可能性の高い TGF- β family の関連遺伝子群と extracellular matrix 関連遺伝子群について焦点を絞って解析したが、TGF- β superfamily に属

する bone morphogenic protein (BMP) とその受容体および制御因子に関連する遺伝子群などが線維化病態に關与する候補として考えられた。BMP については腎線維化病態におおいての關連が検討されているが、肺におおいての検討はほとんどなされておらず、新たな成果が期待できる。

今後、本研究で得られた情報をもとに病因に關与の大きいと考えられる分子を選定し、プレオマイシンによるマウス肺線維症モデル⁴⁾を用いて、マウスの肺線維化局所におおいても同様な分子の発現が認められるか否か確認したうえ、それに対する抗体やその機能を阻害すると考えられる薬剤を用いて抑制効果を検討したい。このようにしてヒトの IPF の線維化巣局所で最も重要な役割をしている分子を選定することから新規治療法の開発へと繋げていきたい。

文 献

1) Zuo F, Kaminski N, Eugui E, Allard J, Yakhini

Z, Ben-Dor A, Lollini L, Morris D, Kim Y, DeLustro B, Sheppard D, Pardo A, Selman M, Heller RA. Gene expression analysis reveals matrilysin as a key regulator of pulmonary fibrosis in mice and humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99: 6292-7.

2) Selman M, Pardo A, Barrera L, Estrada A, Watson SR, Wilson K, Aziz N, Kaminski N, Zlotnik A. Gene expression profiles distinguish idiopathic pulmonary fibrosis from hypersensitivity pneumonitis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 173: 188-98.

3) Kelly MM, Leigh R, Gilpin SE, Cheng E, Martin GE, Radford K, Cox G, Gauldie J. Cell-specific gene expression in patients with usual interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 174: 557-65.

4) Ishii Y, Fujimoto S, Fukuda T: Gefitinib prevents bleomycin-induced lung fibrosis in mice. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006; 174: 550-556.

肺上皮細胞の Epithelial-mesenchymal transition (EMT) と アポトーシスに影響を及ぼす諸因子と その相互作用についての検討

福元重太郎 河口 知允 山田 瑞穂 濱田 直樹
前山 隆茂 桑野 和善 中西 洋一*

肺の線維化過程において肺上皮細胞のアポトーシスは病態に深く関与していると考えられている。また肺上皮細胞の EMT も肺の線維化過程に重要な役割を果たすことが最近、報告されている。実際、特発性肺線維症 (Idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) の切除肺組織において、線維化の起点とされる fibroblastic foci に隣接して肺上皮細胞のアポトーシスや EMT が数多くみられるという報告もある。本研究は、肺上皮細胞が TGF- β の刺激下にアポトーシスと EMT を同時に起こす際のメカニズムを明らかにすることを大きな目的としている。そこで、まずにて肺上皮細胞 (LA-4 細胞) が TGF- β 1 によって EMT を誘導されることを示し、更に EMT のシグナル蛋白のひとつである β -catenin を siRNA でノックダウンすることで EMT が抑制されることを明らかにした。次に、LA-4 細胞にアポトーシス刺激 (TGF- β 1) と EMT 刺激 (スタウロスポリン) を同時に加えた場合の両者の相互作用について調べた。その結果、TGF- β 1 は LA-4 細胞に対して単独ではアポトーシスを誘導しないが、アポトーシス刺激下ではアポトーシスに対して相加的に作用すること、また、スタウロスポリンが EMT に対して抑制的に作用することを明らかにした。

Analysis of the relationship between the factors that induce pulmonary epithelial cells to undergo EMT or apoptosis

Jutaro Fukukumoto, Tomonobu Kawaguchi, Mizuho Yamada, Naoki Hamada,
Takashige Maeyama, Kazuyoshi Kuwano, and Yoichi Nakanishi

Research Institute for Disease of the Chest, Graduate School of Medical Science, Kyushu University

Apoptosis of pulmonary epithelial cells is closely related to the pathophysiology of the fibrosing process of the lung. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) has also been recently reported to be involved in it. Furthermore, other studies revealed that cells undergoing apoptosis or EMT are most seen at the site adjacent to the fibroblastic foci of the resected lung tissue sample from IPF which are widely accepted to be the initial site of fibrosing process. The ultimate object of this study is to clarify the hidden mechanism by which alveolar epithelial cells undergo apoptosis and EMT at the same time under the exogenous stimulus of TGF- β . Here we show in the first experiment that TGF- β 1 induced LA-4 cells, alveolar epithelial cell line, to undergo EMT and that small interfering RNAs targeting β -catenin, an essential signal transducer of EMT pathway, attenuated TGF- β 1 induced EMT. In the second experiment, we treated LA-4 cells with both of staurosporine and TGF- β 1, which are inducers of apoptosis and EMT respectively for LA-4 cells, and analyzed the interacting influence between them. The second experiment showed that TGF- β 1 with staurosporine, but not TGF- β 1 alone, significantly increased the apoptotic rate of LA-4 cells and that staurosporine had an inhibitory effect on TGF- β 1 induced EMT.

はじめに

肺の線維化過程において肺上皮細胞のアポトーシスは病態に深く関与していると考えられている¹⁾⁻⁴⁾。このことは肺の線維化において最も中心的な役割を果たすと考えられている多機能性のサイトカイン TGF- β が線維芽細胞に対しては細胞外マトリックスの産生を強力に誘導する^{5),6)} 一方で、肺上皮細胞に対してはアポトーシスを誘導する^{7),8)}、というように、線維化促進とアポトーシスの誘導という二つの異なる作用を有することからも裏付けられる。

上皮-間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT), すなわち上皮系の細胞が間葉系の細胞へ変化する現象は、もともと胎生期の器官形成、癌の浸潤・転移に関連した現象として知られ、TGF- β がそのシグナル伝達に中心的な役割を果たすことが知られていたが、最近、肺の線維化にも EMT が関与していることを示唆する報告が出され^{9),10)}、その線維化の病態の中心的サイトカインである TGF- β によって肺上皮細胞に EMT が誘導されることも報告された⁹⁾。

以上のことから肺の線維化において、肺上皮細胞は TGF- β による刺激に応じて時にアポトーシスに陥り、時に EMT を起こすという二つの全く異なる反応をすという、ひとつの仮説がたてられる。実際、特発性肺線維症 (Idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) の切除肺組織において、線維化の起点とされる fibroblastic foci に隣接した肺上皮細胞に DNA が断片化したアポトーシス細胞が数多くみられる¹¹⁾ という報告や fibroblastic foci に隣接して上皮系マーカーと間葉系マーカーに二重に染色される EMT を起こしつつあると考えられる細胞が数多くみられる⁹⁾ という報告があることから、線維化の病態にアポトーシスと EMT の両者が密接に関わっていることが伺われる。In vitro にて肺上皮細胞の周囲にフィブロネクチンやフィブリンといった細胞外マトリックスがあると EMT が誘導され、これらがないと細胞はアポトーシスに陥ることを示した報告¹⁰⁾ もあり、肺上皮細胞の TGF- β に対する反応が細胞に隣接する線維化組織に制御されていることがうかがわれる。また肺とは異なるが肝細胞に対して TGF- β 1 を作用させアポトーシ

スと EMT が同時に誘導されることを示した報告もある¹²⁾。その中では細胞周期を G2/M に同調させると主にアポトーシスが、G1/S に同調させると EMT が起こったと述べている。仮に肺の上皮細胞においても肝細胞と同様に細胞周期によって TGF- β の刺激に対する反応が異なるとすれば、傷害をうけ、細胞増殖を始め、cell cycle が次々と回りだした肺上皮細胞が、その時々細胞周期の位置によって、TGF- β 刺激に対してアポトーシスと EMT という全く異なる反応を起こすとしても何ら不思議ではない。

我々はこのような考察を踏まえた上で、以前 TGF- β 1 によって EMT を誘導することを明らかにした肺上皮細胞のセルライン LA-4 細胞に対して、EMT 誘導因子である TGF- β 1 とアポトーシス誘導因子であるスタウロスポリンを同時に作用させる実験を試みた。というのも TGF- β 1 単独で LA-4 細胞に EMT は誘導するものの、アポトーシスを誘導しないからで、何らかの別のアポトーシス刺激を加えることで LA-4 細胞に EMT とアポトーシスを同時に誘導できれば、実際の IPF の肺組織内の肺上皮細胞に近い状況を in vitro にて再現できるのではないかと考えたからである。なお前半の実験においては EMT の重要なシグナル蛋白のひとつである β -catenin を siRNA でノックダウンすることで肺上皮細胞の TGF- β 1 誘導性 EMT を抑制する試みも行っている。EMT のシグナル伝達経路を構成する様々な蛋白の発現を siRNA によりノックダウンすることで in vitro での TGF- β 1 誘導性の EMT とアポトーシスを自由に制御できれば、IPF の病態をより詳しく分析でき、そのことが治療法の開発に直結すると考えたからである。

実験材料および方法

培養細胞としてはマウス肺上皮細胞よりセルライン化された LA-4 細胞を用いた (ATCC より購入)。

実験 1: TGF- β 1 によって誘導される EMT が β -catenin 標的 siRNA により抑制されるかどうかを、細胞の形態観察、上皮系細胞のマーカーである Cytokeratin 19 と間葉系細胞のマーカーである α -SMA に対するウェスタンブロットにて検討した。siRNA は二本鎖のものを扱い、導入にはカチオニックリポソーム製剤を使用した。実験の手順を簡単に説明すると、day 0 に細胞の継代と同時に細胞に siRNA を導入 (Non-

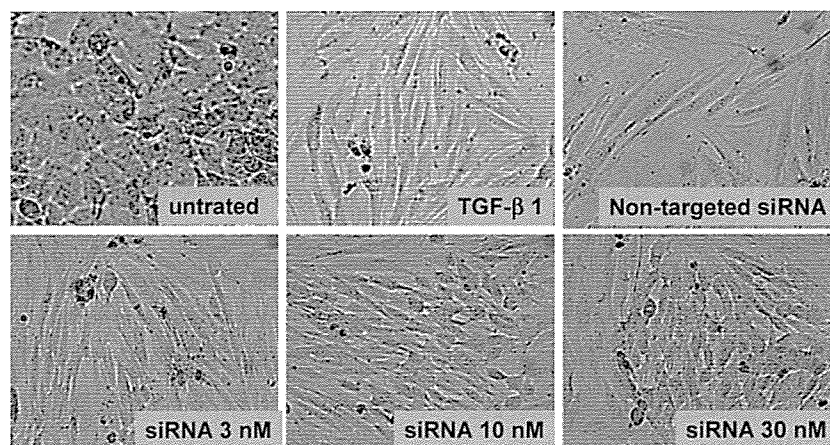


図1 β -catenin 標的 siRNA 投与による TGF- β 1 誘導 EMT の抑制

targeted siRNA は 10 nM, β -catenin siRNA は 3, 10, 30 nM の三段階の濃度). day 2 に TGF- β 1 を加えた培地に交換し, day 5 に細胞を回収し, 細胞の形態観察, 上皮細胞のマーカである Cytokeratin 19 (CK19) と間葉系細胞のマーカである α -smooth muscle actin (α -SMA) に対するウェスタンブロットを行った.

実験 2: LA-4 細胞を何も処理しない細胞, TGF- β 1 のみ作用させる細胞, スタウロスポリンのみ作用させる細胞, TGF- β 1 とスタウロスポリンの両方を作用させる細胞の 4 群に分け, 培養開始後 18 時間後にフローサイトメトリーを行いアポトーシス細胞の割合を比較, 培養開始後 3 日後に細胞を回収し形態観察, 間葉系マーカである α -SMA に対するウェスタンブロットを行った.

結 果

実験 1

形態観察

通常 LA-4 細胞は円形に近い形態をしている (図 1 の上段左). TGF- β 1 を加えた細胞では形態が紡錘状に変化している (図 1 の上段中央と上段右). β -catenin 標的 siRNA を導入したあとで TGF- β 1 を作用させた細胞では細胞の紡錘状への形態変化が抑制されている (図 1 の下段). 抑制効果は 10 nM, 30 nM の濃度で顕著にみられる.

ウェスタンブロット

β -catenin 標的 siRNA を導入したあとで TGF- β 1 を作用させた細胞 (図 2 の左から 3-5 番目の列) では

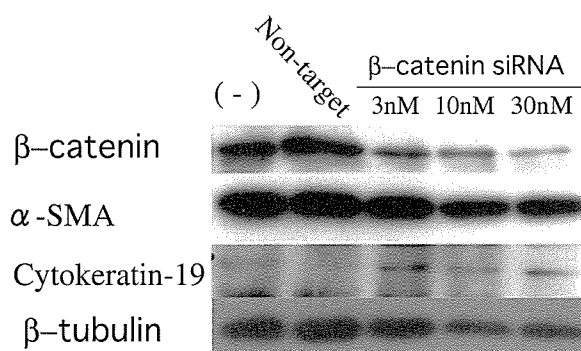


図2 β -catenin 標的 siRNA 投与による TGF- β 1 誘導 EMT の抑制

TGF- β 1 のみを作用させた細胞 (図 2 の一番左の列) や Non-targeted siRNA を導入したあとで TGF- β 1 を作用させた細胞 (図 2 左から二番目の列) に比べて間葉系細胞のマーカである α -SMA の発現が低下しており, また, 上皮系細胞のマーカである CK19 の発現が上昇している.

実験 2

形態観察

何も処理しない細胞では細胞は円形に近い形をしている (図 3 の左上). TGF- β 1 のみを加えた細胞では形態が紡錘状に変化し, 柵状の細胞配列を示す傾向がみられた (図 3 の右上). スタウロスポリンのみを加えた細胞では細長く, 胞体のやや広い形態へと変化していた. また培地表面に浮遊した死細胞の数がやや多くみられた (図 3 の左下). TGF- β 1 とスタウロスポリンを加えた細胞では形態は紡錘から細長いものまで多様であり, 柵状の細胞配列を示す傾向が認められた. また培地表面に浮遊した死細胞を多数認めた (図 3 の右下).

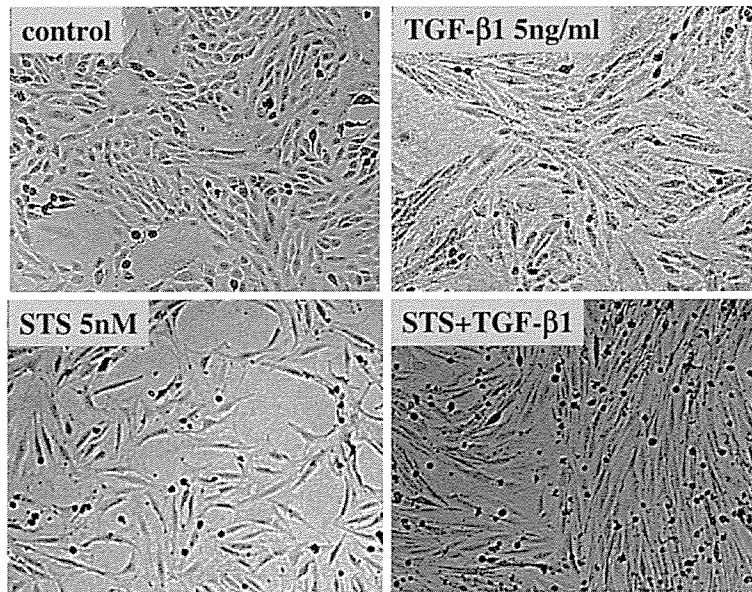


図3 スタウロスポリン単独, TGF-β1 単独, 両者が共存した場合の細胞の形態変化と細胞死 (day 3)

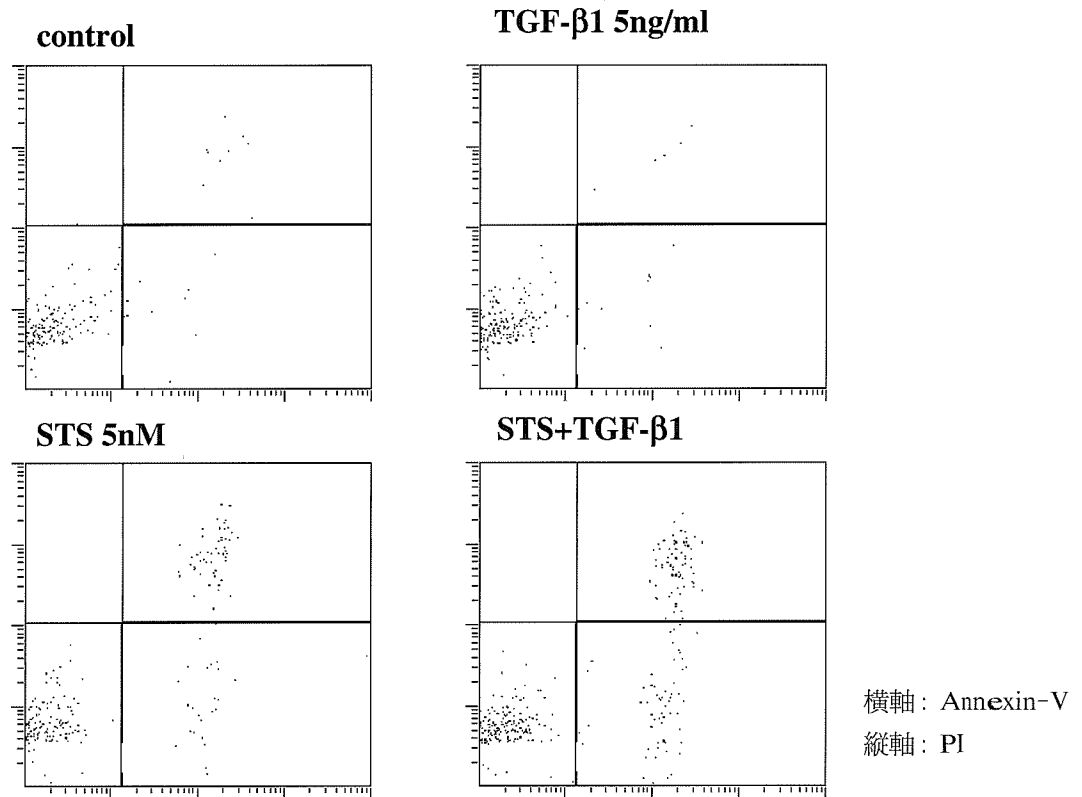


図4 TGF-β1 がスタウロスポリン誘導性の肺上皮細胞のアポトーシスに及ぼす影響 (16 hr)

フローサイトメトリー

何も処理しない細胞ではほとんどの細胞は Annexin V 陰性, PI 陰性の生細胞であった (図4の左上). TGF-β1 のみを加えた細胞においても同様にほとんどの細胞は Annexin V 陰性, PI 陰性の生細胞であった (図4の右上). スタウロスポリンのみを加えた細胞

では Annexin 陽性のアポトーシス細胞を多く認めた (図4の左下). TGF-β1 とスタウロスポリンを加えた細胞では Annexin 陽性のアポトーシス細胞が, スタウロスポリン単独投与の場合よりも多く認められた (図4の右下).

縦軸にアポトーシス細胞の割合を示した棒グラフ

(図 5) を書くと、何も処理しない細胞においてはアポトーシス細胞の割合はわずかであり、TGF- β 1 単独投与ではアポトーシスは誘導されないことが分かった。スタウロスポリンを 1 nM, 5 nM, 10 nM と濃度を変えて加えていくとアポトーシス細胞の割合は濃度依存性に増加していった。単独投与ではアポトーシス誘導作用を示さない TGF- β 1 であるがスタウロスポリンによるアポトーシス刺激下ではアポトーシスに対して相加的に作用した。

ウェスタンブロット

ウェスタンブロットの結果 (図 6) からは、スタウロスポリンの投与の有無にかかわらず TGF- β 1 の投与が α -SMA の発現上昇を誘導していた。ただしスタウロスポリンを投与された細胞でもともと細胞が発現している α -SMA の発現レベルが著明に低下していた。

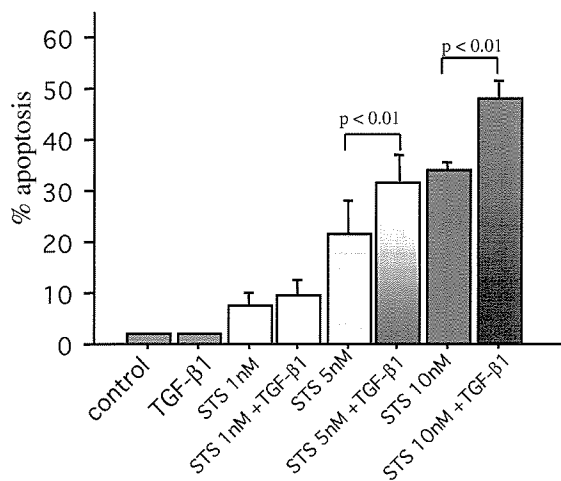


図 5 TGF- β 1 がスタウロスポリン誘導性の肺上皮細胞のアポトーシスに及ぼす影響 (16 hr)

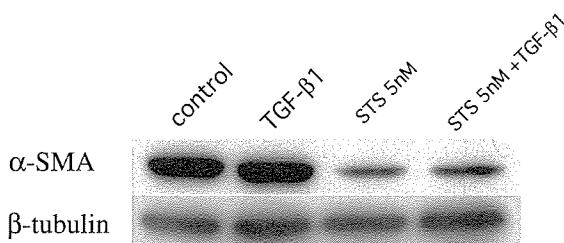


図 6 スタウロスポリンが TGF- β 1 誘導性の肺上皮細胞の EMT に及ぼす影響 (day 3)

結果のまとめ

肺上皮細胞 (LA-4 細胞) において:

1. β -catenin 標的 siRNA 投与により TGF- β 1 誘導性の EMT は抑制される。
2. TGF- β 1 単独投与により EMT は誘導される。アポトーシスは誘導されない。
3. スタウロスポリンは 1 nM から 10 nM の範囲において濃度依存性にアポトーシスを誘導する。
4. スタウロスポリン 1 nM のアポトーシス刺激下では TGF- β 1 はアポトーシス誘導作用を示さないが、5 nM, 10 nM のアポトーシス刺激下ではアポトーシスに対して相加的に作用する。
5. TGF- β 1 により EMT の指標である α -SMA の発現は上昇する。スタウロスポリンによるアポトーシス刺激下では α -SMA の発現が減弱する。

考 察

実験 1, 実験 2 の結果より TGF- β 1 は肺上皮細胞に EMT を誘導することが示された。実験 2 より更に、TGF- β 1 は単独ではアポトーシス誘導作用を示さないものの、アポトーシス刺激下ではアポトーシスに対して相加的に作用する可能性が示された。実験 2 の結果よりスタウロスポリンによるアポトーシス刺激下では EMT が抑制される可能性が示された。

参考文献

- 1) Kuwano K et al. P21^{Waf1/Cip1/Sdi1} and p53 expression in association with DNA strand breaks in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 154: 477-83, 1996.
- 2) Barbas-Filho JV et al. Evidence of type II pneumocyte apoptosis in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)/usual interstitial pneumonia (UIP). *J Clin Pathol* 54: 132-8, 2001.
- 3) Hagimoto N et al. Apoptosis and expression of Fas/Fas ligand mRNA in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16: 91-101, 1997.
- 4) Hagimoto N et al. Induction of apoptosis and

- pulmonary fibrosis in mice in response to ligation of Fas antigen. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17 : 272-8, 1997.
- 5) Ignatz RA et al. Transforming growth factor- β stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into extracellular matrix. *J Biol Chem* 261 : 4337-42, 1986.
- 6) Xu YD et al. Release of biologically active TGF- β 1 by alveolar epithelial cells results in pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285 : L527-L539, 2003.
- 7) Hagimoto N et al. TGF- β 1 as an Enhancer of Fas-Mediated Apoptosis of Lung Epithelial Cells. *J Immunol* 168 : 6470-8, 2002.
- 8) VICTOR T et al. Proteolytic Activation of Latent TGF- β Precedes Caspase-3 Activation and Enhances Apoptotic Death of Lung Epithelial Cells. *J Cell Physiol* 207 : 445-53, 2006.
- 9) Willis BC et al. Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition in Alveolar Epithelial Cells by Transforming Growth Factor- β 1. *Am J Pathol* 166 : 1321-32, 2005.
- 10) Kim KK et al. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *PNAS* 103 : 13180-5, 2006.
- 11) Uhal BD et al. Alveolar epithelial cell death adjacent to underlying myofibroblasts in advanced fibrotic human lung. *Am J Physiol* 275 : L1192-99, 1998.
- 12) Yang Y et al. Transforming growth factor- β 1 induces epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis via cell cycle-dependent mechanism. *Oncogen* doi : 10.1038/onc.1209712, 2006.

Endothelial-mesenchymal transition を介した 血管内皮由来肺線維芽細胞の可能性

橋本 直純 今泉 和良 長谷川好規*

特発性肺線維症は、fibroblastic foci の病理学的特徴を有する。線維化病変における線維芽細胞は組織リモデリング、細胞外マトリックスの過剰沈着、そして肺胞上皮との相互作用などで重要な役割を担うと考えられている。近年、線維化病変で多様な表現型を示す線維芽細胞の中に、骨髄由来や epithelial-mesenchymal transition (EMT) を介した上皮細胞由来の線維芽細胞が同定された。血管内皮細胞が付加的な線維芽細胞を誘導するかを検討するために、血管内皮細胞株 M1 における活性型 Ras および TGF- β の効果を flow cytometry および RT-PCR にて評価した。TGF- β 投与活性型 Ras 導入細胞株は血管内皮細胞マーカーの有意な発現減少が認められた一方、間葉系細胞マーカーの新たな誘導が認められた。活性型 Ras 導入細胞株は、TGF- β の除去によっても発現マーカーの変化は持続した。今回の所見は、EMT と同様に、血管内皮細胞が Endothelial-MT を介して肺線維芽細胞の一部を構成する可能性を示した。

Possible existence of endothelial-derived lung fibroblasts through endothelial-mesenchymal transition

Naozumi Hashimoto, Kazuyoshi Imaizumi, and Yoshinori Hasegawa

Department of Respiratory Medicine, Nagoya University Graduate School of Medicine, Japan

The pathological hallmark lesions in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) are the fibroblastic foci, in which fibroblasts are thought to be involved as key mediators of matrix deposition. Accumulating evidences indicate that some of the heterogeneous fibroblasts in fibrosis may be derived from bone marrow and in part from epithelial cells through epithelial-mesenchymal transition (EMT). Although comprehensive knowledge of the fibroblast origin should lead to new therapeutic strategy for IPF, it has not fully been established. To evaluate whether endothelial cells can give rise to fibroblast phenotype, the effects of activated Ras and TGF- β on the endothelial cell line M1 were evaluated by flow cytometry and RT-PCR. Combined treatment with activated Ras and TGF- β caused a significant decrease in expression of endothelial-specific markers, while inducing *de novo* expression of mesenchymal-specific markers. The altered expression of these markers in M1 cells with activated Ras persisted after withdrawal of TGF- β . These findings indicate that endothelial cells may give rise to some population of the lung fibroblast population through an endothelial-mesenchymal transition process comparable to that seen in EMT.

はじめに

臓器の線維症は、慢性的・断続的な炎症に伴い線維芽細胞の増殖と細胞外マトリックスの過剰産生を呈し、臓器不全をもたらす予後不良の病態として歴史的に把握されている。しかしステロイドを含む抗炎症薬の治療効果は認められず、近年線維芽細胞およびその線維化経路自体への関与の解明が焦点となっている。

臓器線維症のひとつである特発性間質性肺炎は有効な治療法が確立されていない難治性の呼吸器疾患である。この疾患の特徴的な所見として、著しい線維芽細胞の増殖と遠位側の肺泡領域の閉塞をもたらす細胞外マトリックスの沈着と活動性を示す線維化形成所見である fibroblast foci が挙げられる。線維芽細胞は間質での主要な細胞外マトリックス産生細胞とされているが、多くの表現型において多様性を示している。

このような中で、肺外起源由来として骨髄由来線維芽細胞の存在が報告され、肺内起源由来としても肺泡上皮由来線維芽細胞の存在が報告された。これらの知見から肺の微小環境化においてさまざまな細胞が線維芽細胞に分化・形質転換する可能性が示唆されている。このように線維芽細胞の起源を再考することは肺線維症の病態解明への理解と肺線維症への将来的な治療法の開発に対して大いに示唆に富むと考えられる。今回我々は、血管内皮細胞が付加的な線維芽細胞を誘導し得るかどうかを検討した。

方 法

血管内皮細胞株 M1 および活性型 Ras 導入株 M1 細胞 (SR) に対する TGF- β の効果を flow cytometry および RT-PCR にて評価した。さらに、活性型 Ras 導入株 SR をヌードマウスに皮下接種し、結節形成した SR を樹立培養し flow cytometry および RT-PCR で評価した。

結 果

1. 血管内皮細胞株への活性型 Ras と TGF- β の影響

a) 血管内皮特異的表現型への影響

血管内皮細胞への活性型 Ras の導入または TGF- β の投与は、血管内皮細胞特異的マーカーである CD31, CD34, Tie2, および CD144 の発現を有意に抑制させた。活性型 Ras (-) 血管内皮細胞 M1 における TGF- β の血管内皮特異的マーカーの発現抑制は、TGF- β の除去によりその発現レベルは TGF- β 投与前レベルに回復した。一方、活性型 Ras (+) 血管内皮細胞 SR は TGF- β の除去によっても血管内皮特異的マーカーの発現抑制はさらに強まり持続した (Figure 1)。

b) 間葉系細胞特異的表現型の誘導

間葉系細胞特異的表現型の一つである Fibronectin の発現誘導を検討した。活性型 Ras の導入または

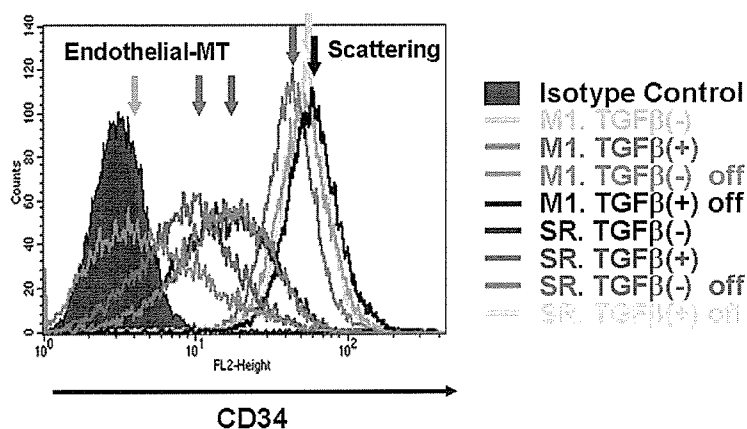


Figure 1

名古屋大学医学部附属病院呼吸器内科

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

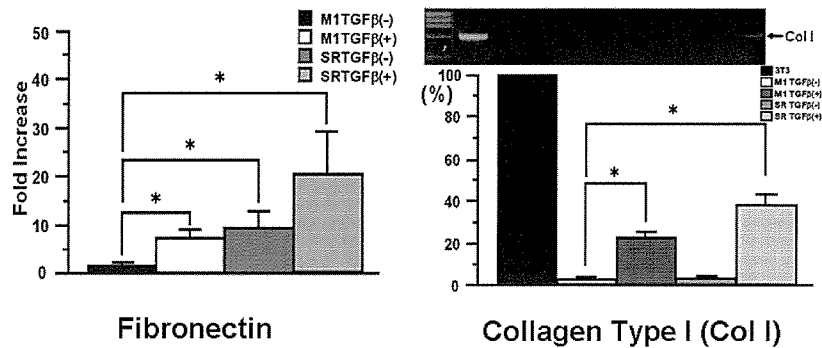


Figure 2

TGF-β 投与のいずれにおいてもコントロール群と比較し有意な上昇が認められたが、活性型 Ras (+) 細胞への TGF-β の投与群における Fibronectin の発現誘導において相乗効果が認められた。さらに、間葉系細胞特異的表現型の一つである collagen type I (Col I) の発現誘導を検討したところ、活性型 Ras の導入のみでは、Col I の発現誘導は認められなかったが、TGF-β 刺激においてその発現誘導が認められた。さらに活性型 Ras (+) SR への TGF-β 刺激は活性型 Ras (-) M1 への TGF-β 刺激時と比較してその発現誘導を増幅した (Figure 2)。

2. ノードマウスに接種した活性型 Ras (+) SR 細胞株の ex vivo 樹立

生体内環境下での活性型 Ras (+) SR の形質転換への影響を評価するために、ノードマウスに皮下接種し、結節形成した SR を ex vivo にて樹立した。樹立した細胞株 (ex vivo SR) の血管内皮細胞特異的マーカーの発現レベルは、解析した 90% 以上の細胞が Isotype control 反応群と同レベルまで発現抑制が認められた。一方、ex vivo SR の Col I の発現レベルは TGF-β 非投与時においても活性型 Ras (+) SR の約 2.5 倍の発現レベルを示し、TGF-β 投与により活性型 Ras (+) SR の約 7 倍の発現増強が認められた。

考案・結論

現時点において、COPD や間質性肺炎をはじめとするびまん性肺疾患に対する根治的な治療方法は確立されるに至らず、在宅酸素療法や薬物療法も、生命予後や QOL・運動耐用能の改善にとどまっているのが現状である。呼吸器疾患領域において、特発性肺線維

症、ステロイド治療抵抗性気管支喘息における気道リモデリング、そして閉塞性細気管炎をはじめとするびまん性肺疾患に共通する線維化所見に対する有効な治療法は確立されておらず、その病態解明は急がれている。現在我々は、びまん性肺疾患に共通する線維化機序解明の試みを線維芽細胞の起源再考という観点から包括的に行い、線維化メカニズムを細胞学的レベルで解明し、将来的にびまん性肺疾患の治療において新たな選択肢として加えられ得る治療標的を導き出し、延いては臓器線維症の治療への応用を探ることに取り組んでいる。

線維化病変における fibroblasts は、組織内の間葉系細胞由来とされてきたが、多くの表現型において多様性を示していることが知られていた。このような背景のなかで、線維芽細胞の起源のひとつとして、2002 年にマウス肺線維症モデルにおいて骨髄由来肺線維芽細胞の存在が報告された¹⁾。この報告以来、骨髄由来線維芽細胞の存在を支持する報告が集積されており、2007 年には、特発性肺線維症での骨髄由来肺線維芽細胞の関与を示唆する報告もなされた²⁾。2006 年、Cre-loxP system を用いた肺胞上皮細胞由来特異的 LacZ 発現マウスを用いて、肺胞上皮細胞が epithelial-mesenchymal transition (EMT) の過程を介して線維芽細胞の表現型を呈して線維化形成に関与する可能性を示唆する報告がなされた³⁾。我々は、線維芽細胞と同じく中胚葉由来である血管内皮細胞を起源とする線維芽細胞の存在を検討した (骨髄細胞もやはり中胚葉由来の細胞である)。EMT の過程には、活性型 Ras と TGF-β の密な相互作用が重要であるという報告がなされている⁴⁾。すなわち、TGF-β などの成長因子単独での刺激では、EMT で認められる形質変化は維持されにくく、その刺激の消失とともに、元の表現型

に戻る (scattering). 一方, 成長因子, 特に TGF- β の刺激と活性型 Ras を介した Raf/MAPK 経路の相互作用のもとでは, その形質変化は維持されることが知られている. 今回の検討においても, 成長因子 TGF- β 単独の刺激において血管内皮特異的マーカーの発現は抑制されるが, その刺激の除去によりその発現レベルが刺激前のレベルに回復した (scattering). 一方, 活性型 Ras (+) 血管内皮細胞は TGF- β の刺激により血管内皮特異的マーカーは抑制するが, 刺激の除去によっても発現抑制は持続した (Endothelial-mesenchymal transition; Endothelial-MT). 活性型 Ras の有無にかかわらず TGF- β の刺激により間葉系細胞特異的表現型の発現は誘導された. 特に collagen type I の発現は TGF- β の刺激により特異的に誘導され, 血管内皮細胞と線維芽細胞の表現型を区別するのに有用であると考えられた. この現象は, 生体内環境下においても再現された. 今回の所見は, EMT と同様に, 血管内皮細胞が Endothelial-MT を介して線維芽細胞の一部を構成する可能性を示した. さらに, 活性型 Ras と TGF- β のシグナル相互作用が上皮細胞および血管内皮細胞の線維芽細胞への分化を誘導し得るといふ知見は, 骨髄由来線維芽細胞の線維化病変内での分化機構を解明する上でも重要な知見であると考えられる.

まとめ

血管内皮細胞株を用いて, 活性型 Ras と TGF- β のシグナル相互作用による血管内皮細胞から線維芽細

胞への表現型誘導を検討した. 活性型 Ras と TGF- β の刺激により, 血管内皮特異的マーカーの発現は抑制され, 間葉系細胞特異的表現型の Fibronectin および Collagen type I の発現誘導が示された. これらの知見は, Endothelial-MT の過程を介した血管内皮由来線維芽細胞の存在の可能性を示唆するものである.

参考文献

- 1) Hashimoto N, Jin H, Liu T, Chensue SW, Phan SH. Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 113: 243-252, 2004
- 2) Mehrad B, Burdick MD, Zisman DA, Keane MP, Belperio JA, Strieter RM. Circulating peripheral blood fibrocytes in human fibrotic interstitial lung disease. *Biochem Biophys Res Commun* 353: 104-108, 2007
- 3) Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D, Chapman HA. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 13180-185, 2006
- 4) Janda E, Lehmann K, Killisch I, Jechlinger M, Herzig M, Downward J, Beug H, Grunert S. Ras and TGF β cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J Cell Biol* 156: 299-313, 2002

急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) の臨床病理学的解析

福田 悠* 康 徳東 山元 滋樹 小野美紀子
中山 智子 石崎 正通

[目的と方法] ARDSは、現在もなお病態や治療法の確立されていない重大な疾患である。ARDSの病理像はびまん性肺胞傷害 (DAD) であり、DADの特徴は、硝子膜形成、筋線維芽細胞 (MF) の急速な肺胞腔内での増生と線維化とされている。臨床診断 ARDSの剖検による検討報告によると、その1/3は病理的にDADではなく、肺炎、肺出血などであったとされている。そこで、以下の2つの検索を行った。1) 剖検診断がDADである22例を臨床病理学的に検討した。2) 臨床的にARDSと診断された剖検例19例で、病変の時期を含めた病理像を検討した。[結果と考察] 1) 剖検診断DAD症例では、重篤感染症による5/5例は、ARDSに加え多臓器不全症候群 (MODS) を示していた。4/5例で肺動脈血栓、肺胞壁でのMF増生は1/5例でのみ認められた。悪性腫瘍化学療法症例では、MODSは2/11例のみに認められ、血栓は4/11例、肺胞壁のMF増生は10/11例で認められた。AIP症例では、MODSは0/2例、血栓は0/2例で、肺胞壁のMF増生は2/2例で顕著に観察された。重篤感染症によるDADは、循環障害の一分症であり、悪性腫瘍化学療法症例は、AIP類似の病態であることが示唆される。2) 臨床診断ARDSの17/19例はDADそのものであり、1例は肺浮腫、1例はサイトメガロウイルス肺炎であった。特に、15/19例ではARDS発症から死亡の期間とDADの時期が一致していた。やはりDADそのものがARDSの主体であることが確認された。

Clinico-pathological analysis of acute respiratory distress syndrome (ARDS)

Yuh Fukuda, Dedong Kang, Masuki Yamamoto, Mikiko Ono,
Tomoko Nakayama, and Masamichi Ishizaki

Department of Analytic Human Pathology, Nippon Medical School, Tokyo, Japan

[PURPOSE, CASES and METHODS] ARDS is a severe disease and the pathophysiology and the therapy of ARDS are not completely established. Pathology of ARDS is known to be diffuse alveolar damage (DAD) and DAD shows hyaline membrane formation and festinate myofibroblast (MF) proliferation and fibrosis in intraalveolar spaces. There is a recent report one third of clinically diagnosed ARDS were pathologically not DAD, but pneumonia, hemorrhage and the others. In this context, we have done two studies; 1) 22 autopsy cases of pathologically diagnosed DAD were clinicopathologically analyzed. 2) 19 autopsy cases of clinically diagnosed ARDS were pathologically analyzed. In two studies, Elastica Masson stains and immunohistochemistry for type I and IV collagen, alpha smooth muscle actin and Mib-1 (cell proliferation marker) were used and observed the place of MF proliferation and estimated the stage of DAD. [RESULTS and DISCUSSION] 1) The cases with pathologically diagnosed DAD due to severe infection (5 cases) showed clinically multiple organ dysfunction syndrome (MODS) in addition to ARDS in all patients, 4/5 patients showed thrombi, and only 1/5 patient showed mural MF proliferation. DAD due to tumor with chemotherapy showed MODS in only 2/11 patients, 4/11 showed thrombi, 10/11 showed mural MF proliferation. Acute interstitial pneumonia (AIP) patients did not show MODS in 2/2 patients, no thrombi and 2/2 showed marked mural MF proliferation. All of proliferative stage of DAD showed also intraalveolar MF proliferation. These results showed that the pathophysiological mechanism of DAD due to severe infection seems to be one of the systemic circulatory disturbances, and that of DAD due to tumor with chemotherapy seems to be interstitial pneumonia-like lesion similar to AIP. The strategy of treatment of DAD have to be modified depend on the pathophysiology of DAD. 2) 17 of 19 cases of clinically diagnosed ARDS were pathologically DAD. One of 19 cases was lung edema and the other was cytomegalovirus pneumonia. The interval of ARDS and the stage of DAD were concordant in 15/17 cases. It is confirmed that DAD itself mainly causes ARDS.

目 的

さまざまな疾患を背景に発症する急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) は、現在もお病態や治療法の確立されていない重大な疾患である。臨床的に ARDS の定義については、従来、先行する基礎疾患があり、きわめて高度の低酸素血症と胸部 X 線写真上で両側びまん性浸潤影を示し、低い肺コンプライアンスを来し、心不全を伴わない疾患とされてきた。しかし、1992 年、米国胸部疾患学会 (ATS) と欧州集中治療学会 (ESICM) の合同検討会 (American-European Consensus Conference, AECC) では、ARDS の定義は、「急速に発症し、胸部 X 線では両側性の浸潤影を示し、 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ が 200 mmHg 以下で、左心不全を示さない病態。」とされている¹⁾。本邦では、その合同検討会の結論をふまえて、日本呼吸器学会により「ALI/ARDS 診療のためのガイドライン」が 2005 年に発行されているが²⁾、定義などについては問題点もあることが指摘されている。

ARDS の病理像はびまん性肺泡傷害 (DAD) とされているが、ARDS の臨床診断とその剖検により系統的、病理組織学的に検討された報告によると、AECC の定義による ARDS 診断症例 127 例での検討では、剖検で DAD と最終診断された症例の感受性と特異性は、それぞれ 75%, 84% であったと報告されている³⁾。ARDS 診断症例の内 DAD でなかった症例は、肺炎 32 例、肺出血 4 例、肺浮腫 3 例、肺塞栓症 3 例、薬剤性間質性肺炎 1 例で合計 43 例とされている。

DAD の病理像の特徴は、硝子膜形成、筋線維芽細胞 (MF) の急速な増生と線維化であり、病理総論的な傷害と修復の観点から時間的な推定が可能であることが知られている^{4,5)}。また、種々の間質性肺炎の検索から、線維化は肺泡壁自体ではなく肺胞腔内に形成されることが報告されている^{4,6,7)}。今回の検索では、DAD が様々な原因で発症することが知られているので、まず 1) DAD と診断された剖検例で、その原因別に臨床像、病理像に違いがないかを解析した。特に、DAD の時相と、線維化の形成部位に注目して検索した。さらに、2) AECC の診断基準で ARDS と診断された

症例の剖検例において、ARDS 発症時点の病理像について解析した。

方 法

日本医大付属病院での剖検例を対照とした。

1) 死後時間の比較的短い 22 例の剖検診断が DAD である症例を臨床病理学的に検索した。DAD 発症の契機は、重篤感染症 (5 例)、悪性腫瘍と化学療法 (11 例)、膠原病 (4 例)、特発性急性間質性肺炎 (AIP, 2 例) である。免疫組織化学的に I, IV 型コラーゲン、 α 平滑筋アクチン、Mib-1 (Ki67) を染色し、MF の増生部位、I 型コラーゲンの産生部位を検索した。また、IV 型コラーゲンと α 平滑筋アクチンについては、蛍光重染色を行い検索した。

2) 臨床的に AECC の診断基準から ARDS と診断され、比較的死後時間の短い 19 例の剖検例を抽出し、多数の肺切片について、1) と同様の染色を行い検討した。臨床的な情報を得ずに、4 名の病理医が個別に肺にみられる DAD などの病変の時期を含めた診断を行った。その後、臨床的事項との対比を行い、ARDS 病態に相当する病理像が何であるかを中心に検討した。

結 果

1) 剖検診断が DAD であった症例の臨床病理学的検索では、重篤感染症の 5/5 例は、臨床的に急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) に加え、多臓器不全症候群 (MODS) を示していた。4/5 例で肺動脈血栓がみられ、肺泡壁での MF 増生は 1/5 例でのみ認められた (表 1)。悪性腫瘍およびその化学療法を行った症例では、MODS は 2/11 例のみに認められた。血栓形成は 4/11 例、肺泡壁での MF 増生は 10/11 例で認められた (図 1)。AIP 症例では、MODS は 0/2 例、血栓は 0/2 例であった。肺泡壁の MF 増生は 2/2 例で顕著に観察された。また、原因を問わず、すべての増殖期の DAD 症例では、MF 増生は典型的に腔内にも顕著に認められた (図 2)。I 型コラーゲンは腔内、肺泡壁の MF の細胞質および細胞外基質に認められた (図 3)。IV 型コラーゲンは明らかな基底膜に加え、腔内、壁の増生 MF の周囲に不連続に線状に認められた。

2) 臨床診断 ARDS 症例は、すべて ARDS 発症時

表 1 Pathologically diagnosed DAD 22 cases

Clinical Events					Pathological Findings				
Age	Sex	History	Primary Disease	Symptom	HM	Intralum MF	Mural MF	Mural MF/1 Co	Thrombi
82	F	2d	Myoc. Infarct, Pneumonia	MODS	++	-	+	±	+
69	F	9d	Sepsis	MODS	±	++	-	-	+
75	M	11d	Sepsis	MODS	++	~±	-	-	+
34	F	3w, 10d	Bronchopneumonia	MODS	+	++	-	-	+
76	F	9d	Bacterial Endocarditis	MODS	+++	+	-	-	-
71	F	11d	Hepatoma, LC	MODS	+	++	++	+	-
63	F	2d	Hepatoma, LC	ARDS	++	-	+	+	-
61	F	2m, 34d, 3d	Lung Ca	ARDS	++	-	±	-	-
81	M	15d	Malig lymphoma	MODS	±	+++	-	-	+
40	M	7d	Lung Ca	ARDS	++	++	+	±	+
73	F	5d	Hepatoma	ARDS	+++	++	+	+	-
69	M	22d	Lung Ca	ARDS	+	+++	+	+	-
56	M	11d	Malig lymphoma	ARDS	+	++	++	+	-
71	F	12d, 5d	ATL	ARDS	+++	+++	++	+	-
59	F	3w	Lung Ca (Iressa)	ARDS	+	++	+	+	+
69	M	1w	Malig Mesothelioma	ARDS	±	+++	+	+	+
70	M	36d, 1d	Micro PN, IP	ARDS	±	+++	-	-	-
55	F	6w, 8d	PSS, IP	MODS	±	+++	-	-	-
74	M	4w	Rheumatoid A, IP	ARDS	±	+++	-	-	+
74	M	10d	Dermatomyositis, IP	ARDS	++	+	+	++	+
21	M	4w, 20d	AIP, Idiopathic	ARDS	+	++	+++	+	-
66	M	17d	AIP, Idiopathic	ARDS	±	+++	+++	+++	-

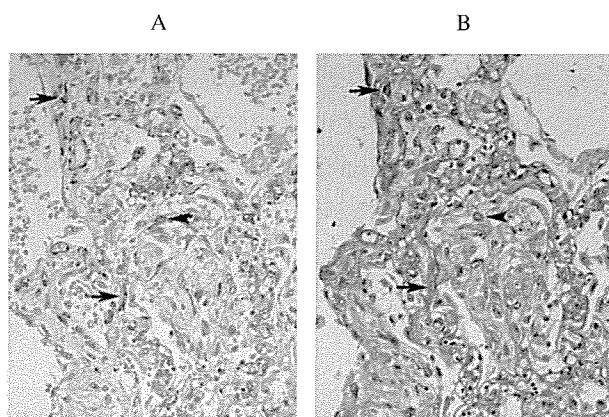


図 1 DAD の増殖期 (肺癌, 化学療法; イレッサ)
 α 平滑筋アクチン陽性の増殖筋線維芽細胞は IV 型コラーゲン陽性の上皮基底膜の分布から肺胞腔内(矢頭)および肺胞壁(矢印)にあることを示す。(免疫組織化学, 連続切片 A: α 平滑筋アクチン, B: IV 型コラーゲン)

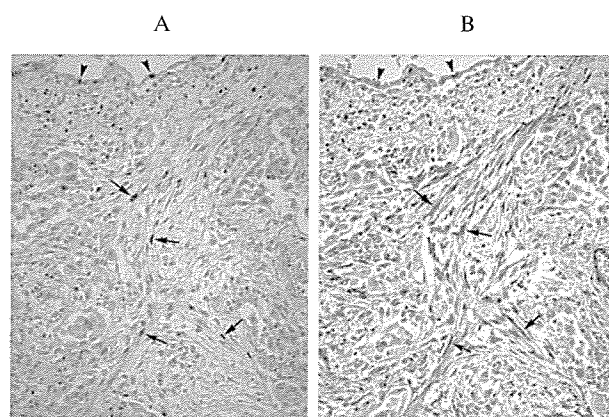


図 2 DAD の増殖期 (悪性中皮腫, 化学療法)
 細胞増殖のマーカーである Mib 1(Ki67) で観察すると, 肺胞上皮(矢頭), 肺胞腔内の α 平滑筋アクチン陽性の筋線維芽細胞(矢印)に陽性であり, 増殖が盛んであることを示す。(免疫組織化学, 連続切片 A: Mib 1(Ki67), B: α 平滑筋アクチン)

の PaO₂/FiO₂ は 200 以下であり, ARDS の病態は, 臨床的に気管支肺炎 (5/19 例), アスペルギルス感染症 (2/19), カリニ肺炎 (1/19), 腫瘍浸潤 (1/19) によると考えられていた (表 2)。しかし, 病理学的検索では, ARDS 発症時点での感染症, 腫瘍浸潤などの病理像は確認できなかった。17/19 例で DAD が認められ, ARDS 発症時点に相当する DAD 像は 15/19 例で確認された (図 4)。DAD でなかった 2 例は, それぞれ感染性心内膜炎による心原性肺浮腫と急性骨髄性白血病で化学療法後のサイトメガロウイルス肺炎であった。

考察と結論

結果 1) からは, 重篤感染症による病理診断 DAD の病態は, ARDS に加えすべての症例で MODS を示していた。重篤感染症による DAD は, 全身循環障害的要素が強く MODS の一分症と考えられた。また, 悪性腫瘍および化学療法後の DAD は, AIP と同様に肺胞間質での筋線維芽細胞の増殖が目立つ症例が多く AIP に類似した間質性肺炎的要素が強いものと考えられた。また, 線維化の場については, DAD, 通常型間質性肺炎, 特発性器質化肺炎, 非特異性間質性肺炎では, 肺胞腔内に形成されることが知られている

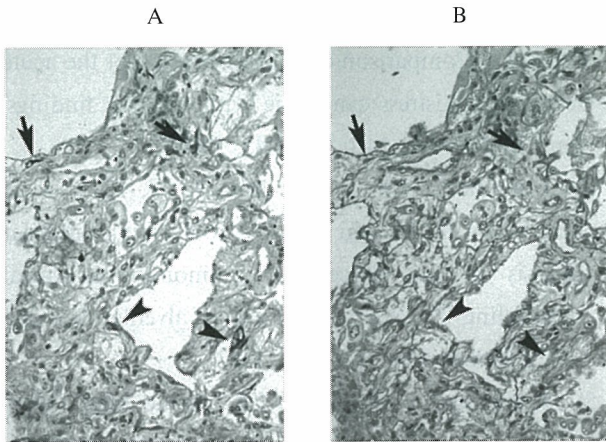


図3 DADの増殖期 (成人T細胞性白血病, 化学療法)
I型コラーゲン陽性の筋線維芽細胞は, IV型コラーゲン陽性の
上皮基底膜の分布から肺腔内(矢頭)および肺胞壁(矢印)
にあることを示す。(免疫組織化学, 連続切片 A: I型コラーゲン,
B: IV型コラーゲン)

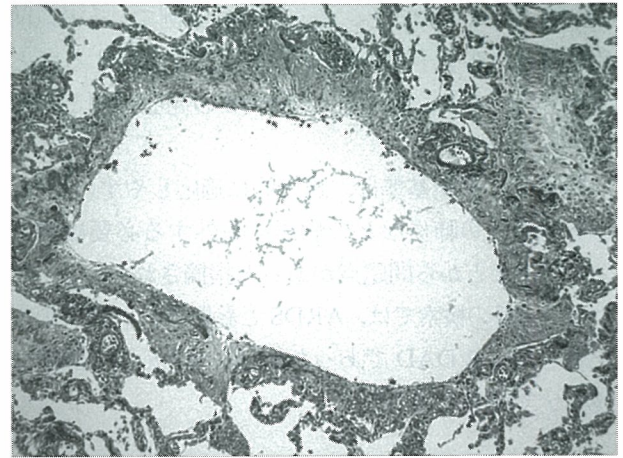


図4 臨床診断 ARDS 時 (死亡の15日前)に, その原因が気管支肺炎
と考えられた症例
剖検では, 一様に硝子膜の器質化, 線維化が見られ, DAD 発症
後 2-3 週間を示している. その時期に一致した気管支肺炎像は
確認されない.

表2 Clinically diagnosed ARDS 19 cases

Age	Sex	Primary disease	Clinical Events			Pathology
			Acute lung lesion	PaO ₂ /FiO ₂	Clinical history	
86	M	Ulcerative colitis, sepsis	ARDS (MODS)	136.2	9d	2w
90	F	sepsis	bronchopneumonia	75.9	4d	3d
55	M	Diabetes, sepsis	ARDS (MODS)	173.2	23d	2w
68	M	Infect. endocarditis, sepsis	ARDS (MODS)	186	7d	No DAD, lung edema
85	M	Malignant lymphoma	ARDS	69.1	19d	3d, 2w
62	F	Lung cancer	Drug-induced IP	48.2	21d	3w
68	M	MDS/AML	bronchopneumonia	181.4	17d	3d
77	F	MDS	bronchopneumonia	93.8	5d	10d
79	F	Malignant lymphoma	Tumor infiltration	170.7	5d	3d
55	M	AML	Aspergillosis	50.8	28d	No DAD, CMV pneumonia
68	M	Malignant lymphoma	ARDS	34.9	19d	3d
46	M	AML	Aspergillosis	77.1	3d	3d
64	M	IPF	Acute exacerbation	42.1	3d	1w
73	F	IPF	Acute exacerbation	83.9	44d	2w+4w
71	M	RA, IP (Araba?)	bronchopneumonia	113.8	15d	2-3w
81	F	RA, IP (MTx)	Drug-induced IP	30.8	23d	1w+2w
69	F	Dermatomyositis, IP	Acute exacerbation	95.4	20d	3d+ 2w+ 4w
87	M	Microscopic PN, IP	Carinii pneumonia	113.4	24d	2w+ 3w+ 4w
74	F	Liver cirrhosis, hemorrhage	bronchopneumonia	57.1	2d	3d+ 2w

が^{4,6,7}、今回の検索により、DADでもAIPおよびAIP
的症例では、腔内に加え肺胞壁自体でも線維化が起
ることが明らかにされた。一般的に、AIPや薬剤性肺
障害によるARDSは、やけどや敗血症によるARDS
よりも、比較的予後が良いことが知られているが、そ
れを裏付ける所見である。以上から、今後の問題とし
ては、さらなるDAD病態の解析が必要であること、
治療法もARDSの病態を考慮したものであるべきこ
とが示唆される。

結果2)から、現在の診断基準による臨床的ARDS
の病態は、病理的にその主体はDADそのものであ
った。DADでなかった2例は感染性心内膜炎による急
激な心不全に伴う肺浮腫症例と、急性白血病の治療中
に起こったサイトメガロウイルス肺炎であった。心不

全とサイトメガロウイルス肺炎は、ARDSの鑑別疾患
にあげられている病態であり、特に心不全は除外項目
とされている。今回の心不全症例は、急激な病変の進
行による物であり、臨床的に除外までには至らなかつ
たものと考えられる。サイトメガロウイルス肺炎は、
間質性肺炎の形を取ってくる肺炎であり、ARDS病態
の原因になったものと思われる。今回の検索からは、
以前のEstebanらの報告にあるような多数の肺炎症
例は確認されなかった。Estebanらの報告³⁾との違い
は、今回の検索ではElastica-Masson染色等を加えた
ことにより、DADおよび他の肺病変の時間軸を検討
し、ARDS発症時点の病態を明らかにしたことがあげ
られる。もちろん、局所的な細菌性肺炎を認めた症例
は散見された。しかし、上記のようにDADの時期的