

な診断を当てはめると、多くの肺炎症例で、その以前から DAD の硝子膜の形成と器質化が存在することが明らかとなり、臨床的な ARDS の発症時期と一致していた。

AECC の診断基準は、臨床的に適応しやすい反面、心不全以外の肺炎などの病態を除外する必要は特にないことなどから問題点があると指摘されている。しかし、今回の検索では、ARDS と診断された症例の大多数がやはり DAD であった点は、今後の臨床診断に当たって参考となろう。

文 献

- 1) Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, et al.: American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 149: 818-824, 1994
- 2) ALI/ARDS 診療のためのガイドライン. 社団法人日本呼吸器学会 ARDS ガイドライン作成委員会編集. 秀潤社 2005
- 3) Esteban A, Fernandez-Segoviano P, Frutos-Vivar F, et al.: Comparison of clinical criteria for the acute respiratory distress syndrome with autopsy findings. *Ann Intern Med* 141: 440-445, 2004
- 4) Fukuda Y, Ishizaki M, Masuda Y, Kimura G, Kawanami O, Masugi Y: The role of intraalveolar fibrosis in the process of pulmonary structural remodeling in patients with diffuse alveolar damage. *Am J Pathol* 126: 171-182, 1987
- 5) Katzenstein AA, Askin FB: Acute lung injury patterns. In: *Surgical Pathology of non-neoplastic lung disease*. WB Saunders, Philadelphia, 1990, pp. 9-57
- 6) Fukuda Y, Basset F, Ferrans VJ, Yamanaka N: Significance of early intraalveolar fibrotic lesions and integrin expression in lung biopsies from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Human Pathol* 126: 53-61, 1995
- 7) Fukuda Y, Mochimaru H, Terasak Y, Kawamoto M, Kudoh S: Mechanism of structural remodeling in pulmonary fibrosis. *Chest* 120: 41S-43S, 2001

肺線維芽細胞機能に対する各種メディエーターの効果

幸山 正 山内 康宏 滝澤 始

肺間質では多くの炎症性メディエーターがその構成細胞の遊走, 増殖に関与し組織修復に携わっている。肺線維芽細胞は遊走能, 収縮能, そして細胞外基質産生能を通して組織修復に重要であることがわかってきた。しかしこの過程に問題が生じれば, 構造に変化をきたし機能障害を招くことになる。末梢気道周囲に生じた線維化は気腔の狭小化と気流制限を引き起こし COPD の病態増悪に関与する。また基底膜の線維化, 肥厚が引き起こされると, 気管支喘息患者においては非可逆性の気道変化が進行し気道過敏性も上昇し, 難治化すると考えられる。正常な修復ではこのリモデリングに至る過程を阻害するなんらかの機序が働いていると考えられる。そこで, 気道炎症の場でその構成細胞から産生されるプロスタノイドの線維芽細胞への効果に着目した。実験は blindwell chamber technique で線維芽細胞の遊走能を, また Type I collagen gel 内での 3 次元的培養法を利用して線維芽細胞の収縮能を検討した。PGE₂, PGI₂ アナログは線維芽細胞の遊走や収縮能を抑制し, 抗線維化に作用すると考えられた。一方 TXA₂ アナログ U-46619 は遊走や収縮能を増強させ線維化の増悪因子的動きをしていると考えられた。PGD₂ は遊走と収縮能とは効果が異なった。これらのことから炎症の場に存在するプロスタノイドは線維芽細胞の機能を制御し, 創傷治癒を修飾していると考えられる。これらプロスタノイドのバランスを検討することは治療戦略上重要と考えられる。

The effects of several mediators on the functions of lung fibroblast

Tadashi Kohyama, Yasuhiro Yamauchi, and Hajime Takizawa

Department of Respiratory Medicine, The University of Tokyo

In the parenchyma of the lung, many inflammatory mediators are recognized as able to stimulate fibroblasts, and repair the tissue function after injury.

Fibroblast plays an important role to modulate both normal airway repair and tissue remodeling with its function of migration, contraction and protein production.

The development of small airway fibrosis and the associated contraction of fibrotic tissue can lead to airway narrowing and compromised airflow. These changes might characterize IIPs, COPD and bronchial asthma.

Under normal repair process, there might be the factors that could inhibit excess fibroblast functions which make the tissues fibrosis. In this regard, we paid attention to the prostanoid effects, which are important in the inflammatory area, on fibroblast migration and contractility.

The Boyden blind well chamber technique was used for in vitro migration assays and gel contraction assay was used as an in vitro contraction model. PGE₂ and PGI₂ analog inhibited both fibroblast migration and contraction. TXA₂ analog augmented both functions. PGD₂ increased migration but decreased contraction.

Through these mechanisms, prostanoid could contribute to the modulation of fibrotic stimuli and therefore play an important role in controlling fibrotic responses after injury.

はじめに

線維芽細胞が近隣の組織から動員され炎症部位へ遊走していくことは生体の組織修復過程において重要である。しかし炎症の場では浸潤してくる炎症細胞から産生される炎症性サイトカインにより、線維芽細胞の組織への過剰な遊走、集積、収縮、そして collagen, fibronectin などの細胞外マトリックスの過剰な沈着は線維化（組織再構築）を引き起こし組織機能の障害をもたらす¹⁻⁴⁾。慢性炎症の治癒過程において発生するこの線維化のメカニズムを断つことが重要である。間質性肺炎、COPD そして気管支喘息などの呼吸器疾患はこの末梢気道の慢性炎症により病態が進行していくと考えられる。

間質性肺炎は肺泡間質を主座とする炎症性の疾患である。過敏性肺臓炎、薬剤性肺炎、膠原病肺、塵肺などのように病因が解明されているものもあるが、その殆どが原因不明である。これら病態が引き起こされていく背景に認められるのは繰り返す傷害因子の肺胞腔への進入による恒常性の破綻であり、すなわち肺泡間質における組織修復異常である。炎症細胞からフリーラジカル、蛋白分解酵素、種々のサイトカインが放出され肺胞上皮に傷害が生じ基底膜にまで波及すると基底膜の断裂が生じ、肺泡間質から活性化した過剰な肺線維芽細胞が肺胞腔内へと侵入し、線維化が形成されていくものと考えられる。

COPD は終末細気管支より末梢気道の異常拡大と肺胞の破壊を特徴とした疾患であり、末梢気道に始まった外来性の有害因子やガスに対する異常な炎症反応が肺胞に進展していくことにより発症する⁵⁾⁶⁾。細気管支領域での肺線維芽細胞の過剰集積で引き起こされる過剰な細胞外マトリックスの蓄積と肺線維芽細胞に関与する収縮が⁷⁾、末梢気道の狭小化すなわち気流制限を引き起こす。さらに check valve 機構の存在は肺胞の破壊を進行させることとなる。

気管支喘息は肥満細胞、好酸球など多くの細胞が関与する気道の慢性炎症性疾患で気道の収縮と浮腫そして気道過分泌により起こる気流閉塞を特徴とする疾患である。気流閉塞は自然にまた治療により可逆的であるが、気道炎症は種々の刺激に対する気道反応性

の亢進を伴い時に持続していく。時に気道上皮剥離に伴う修復異常が認められ⁸⁾、気管支上皮下に集積する肺線維芽細胞により過剰な細胞外マトリックスの産生が認められ組織の改築が進んでいく⁹⁾¹⁰⁾。気管支喘息の effector 細胞である肥満細胞が肺の線維化部位に存在し TGF- β の産生に関与しているとの報告¹¹⁾¹²⁾、上皮下肥厚が気道の過敏性に関与しているとの報告¹³⁾ などから、肥満細胞を介したアレルギー性炎症もまたその修復過程での線維化に関与し病態増悪の一因になると考えられる。

以上のことから、これら呼吸器疾患には肺線維芽細胞の機能が深く関わっており、この機能を制御する物質は疾患の病態形成において重要と考えられる。内因性のプロスタノイドは炎症や創傷など様々な条件下でその産生が上昇することが知られている。これら炎症性メディエーターの線維芽細胞への効果を検討することは、肺の線維化のメカニズムを検討していくうえでも重要である。そこで今回は、肺の組織修復過程において起こりうる、遊走能、収縮能へのプロスタノイドの効果について in vitro model で検討した。

対象と方法

1) HFL-1 遊走実験は Boyden blindwell chamber technique に従い Nucleopore 社 (Cabin John, MD) の 48-well chamber を利用して行った。chemoattractant は chamber の下部 well に添加し、細胞 (1.0×10^6 個/ml 無血清 DMEM) は上部 well へ添加した (図 1)。検討する試薬類は細胞とともに上部 well へ添加した。上下の well は 0.1% gelatin (Bio Rad, Hercules, CA) でコートした $8 \mu\text{m}$ 孔の migration assay 用 membrane (Nucleopore, Pleasanton, CA) で隔て、 $37^\circ\text{C} 5\% \text{CO}_2$ 内で 6 時間静置した。その後 chamber から回収した membrane の上方表面に残っている細胞は残存細胞として filter wiper で除去した。その後 membrane はメタノール固定し PROTOCOL (Biochemical Science, Swedesboro, NJ) で染色し glass microscope slide にマウントし、光学顕微鏡下で 5 high power fields 内に観察された細胞を遊走細胞としてカウントし data とした。実験は triplicate で少なくとも 3 回以上繰り返した。Data はそれぞれの実験の control 値で除した値を解析した。

2) Gel contraction 法: Rat の Tail から抽出した

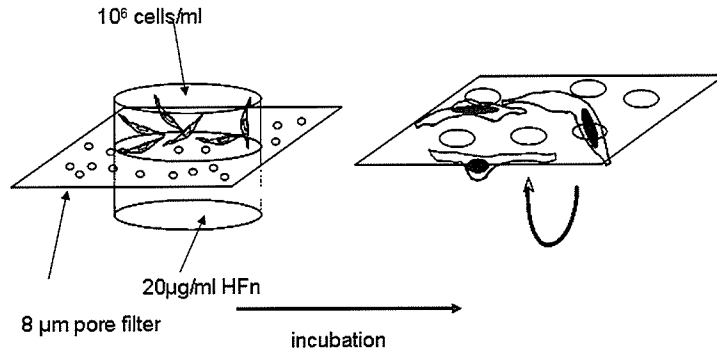


図1 Boyden blindwell chamber technique
fibronectin は下部 well に、試薬と細胞は上部 well へ添加した。上下部 well は 8 μm 孔の membrane で隔て、37°C5%CO₂ で6時間静置した。Membrane 回収後、上面に残っている細胞は除去し下面の細胞数を光学顕微鏡下でカウントした。

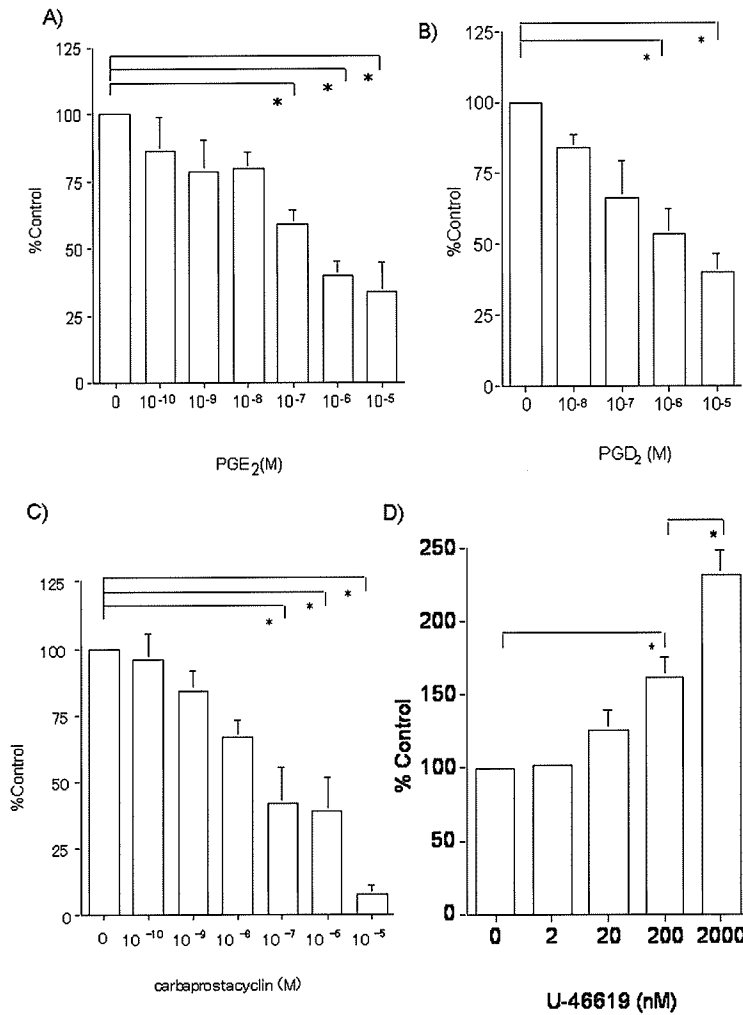


図2 fibronectin に対する肺線維芽細胞遊走へのプロスタノイドの効果：濃度依存性の検討
A) PGE₂, B) PGD₂, C) PGI₂ アナログ carbaprostacyclin, D) TXA₂ アナログ U46619
Y 軸：HFL-1 の遊走数をそれぞれのコントロールで除した値 (%), X 軸：各種プロスタノイドの濃度。データは独立した3回の実験の平均、means+SEM. **p*<0.05

Type I collagen を4倍濃度のDMEMと蒸留水とで生理的浸透圧に調整し、最終collagen濃度を0.75 mg/ml に、細胞濃度として3×10⁵ cells/mlをゲルとして作成

した。すなわち24wellプレートで0.5 ml/wellになるようゲルを入れ20分静置し固相化させた。そのゲルを各種試薬が添加された6 cm dish (5 ml DMEM) 内

に浮遊させる。Type I collagen 内で三次元的に培養される線維芽細胞の収縮能はゲルのサイズを CCD カメラで計測することにより評価した。

結 果

1) PGD₂, PGI₂ アナログ carbaprostacyclin, PGE₂ は濃度依存的にヒトファイブロネクチンで誘導される線維芽細胞遊走を濃度依存的に抑制し, TXA₂ アナログ U-46619 は濃度依存的に増強することを示した (図 2)。

2) PGE₂, PGI₂ は肺線維芽細胞の収縮能を抑制したが, PGD₂, PTX₂ は亢進した (図 3)。

考 案

この研究では Boyden blindwell chamber technique や gel contraction 法を利用して PGD₂ をはじめとしたプロスタノイドが HFL-1 の遊走や収縮能に対して効果を示すことを示した。プロスタノイドはアラキドン酸から cyclooxygenase の作用により Prostaglandin H を経て産生されるが, 炎症や創傷など様々な条件下でその産生が上昇することが知られている。創傷治癒において線維芽細胞の遊走, 集積, 収縮においてプロスタノイドの関与が重要であることを示していると考えられる。

すでに線維化が生じている組織を回復させることは現在のところ不可能と考えられていることから線維化に関わる慢性炎症性肺疾患の治療では, 創傷治癒

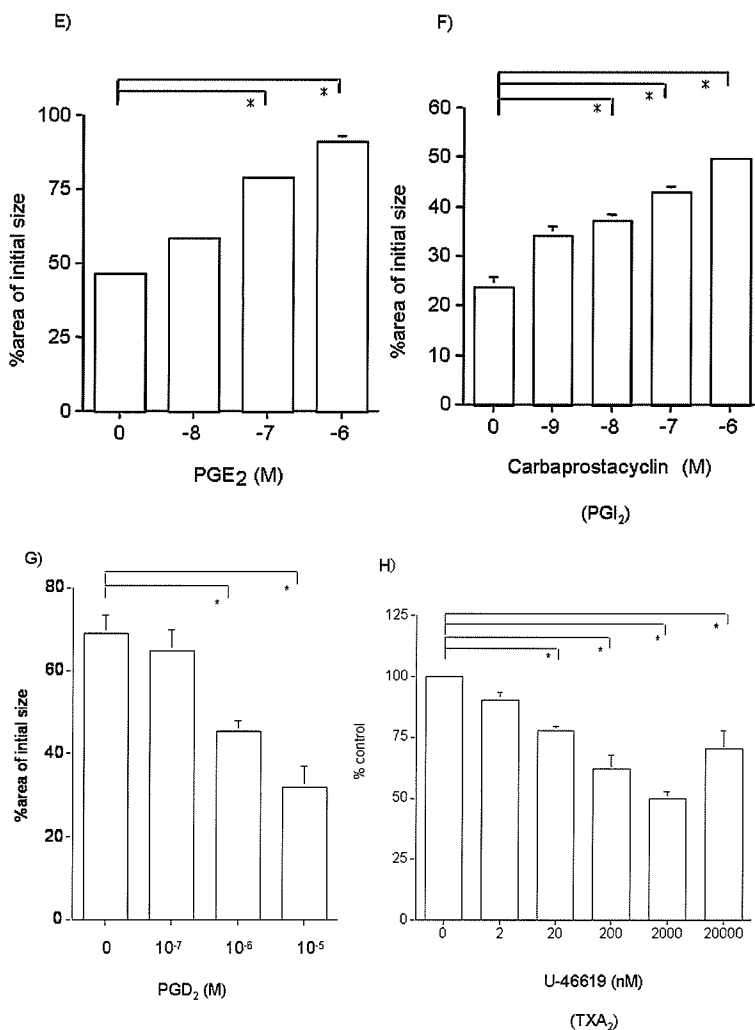


図 3 肺線維芽細胞収縮能へのプロスタノイドの効果：濃度依存性の検討
 E) PGE₂, F) PGI₂ アナログ carbaprostacyclin, G) PGD₂, H) TXA₂ アナログ U46619
 Y 軸：5 日目の gel size で control を 100% として表記。X 軸：各種プロスタノイドの濃度。データは独立した 3 回の実験の平均。means + SEM, *p < 0.05

の初期の段階で起こる治癒機転の障害を修正することが重要である。この観点からみると炎症の場で上昇している fibronectin が誘導する線維芽細胞の遊走を、初期の段階で産生されるプロスタノイドが制御することは創傷治癒やその障害のメカニズムを考える上でも重要でありひいては線維化の治療の可能性に結びつく。

今回の検討において組織機能を維持するために働く間質細胞の制御バランスがプロスタノイドで修飾されている可能性のあることがわかった。線維化のスイッチがどのような状況下で入るのかは不明であるが、これら内因性の物質の有効利用が線維化の治療戦略においても重要であると考えられる。

結 論

肺線維芽細胞機能は炎症局所でプロスタノイドなどメディエーターにより制御されている。

謝 辞

本研究の遂行にご協力いただいた東京大学医学部呼吸器内科 長瀬隆英教授に深謝いたします。

参考文献

- 1) Rennard S.I., Jaurand M.-C., Bignon J., Kawanami O., Ferrans V.J., Davidson J., and Crystal R.G.: Role of pleural mesothelial cells in the production of the submesothelial connective tissue matrix of lung. *American Review of Respiratory Disease* 130: 267-274, 1984
- 2) Brewster C.E., Horwarth P.H., Djukanovic R., Wilson J., Holgate S.T., and Roche W.R.: Myofibroblasts and subepithelial fibrosis in bronchial asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 3: 507-511, 1990
- 3) Roche W.R., Beasley R., Williams J.H., and Holgate S.T.: Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. *Lancet* 1: 520-524, 1989
- 4) Evans J.N., Kelley J., Low R.B., and Adler K.B.: Increased contractility of isolated lung parenchyma in an animal model of pulmonary fibrosis induced by bleomycin. *Am Rev Respir Dis* 125: 89-94, 1982
- 5) Fujita J., Nelson N.L., Daughton D.M., Dobry C.A., Spurzem J.R., Irino S., and Rennard S.I.: Evaluation of elastase and antielastase balance in patients with bronchitis and pulmonary emphysema. *Am Rev Respir Dis* 142: 57-62, 1990
- 6) Thurlbeck W.M., and Muller N.L.: Emphysema: definition, imaging, and quantification. *AJR Am J Roentgenol* 163: 1017-25, 1994
- 7) Wang H., Liu X., Umino T., Kohyama T., Zhu Y.K., Wen F.Q., Spurzem J.R., Romberger D.J., Kim H.J., and Rennard S.I.: Effect of cigarette smoke on fibroblast-mediated gel contraction is dependent on cell density. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L205-13, 2003
- 8) Bousquet J., Jeffery P.K., Busse W.W., Johnson M., and Vignola A.M.: Asthma. From bronchoconstriction to airways inflammation and remodeling. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 1720-45, 2000
- 9) Murphy G., Reynolds J.J., and Werb Z.: Biosynthesis of tissue inhibitor of metalloproteinases by human fibroblasts in culture. Stimulation by 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate and interleukin 1 in parallel with collagenase. *J Biol Chem* 260: 3079-83, 1985
- 10) Fine A., and Goldstein R.H.: The effect of transforming growth factor-beta on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts. *J Biol Chem* 262: 3897-3902, 1987
- 11) Kawanami O., Ferrans V.J., Fulmer J.D., and Crystal R.G.: Ultrastructure of pulmonary mast cells in patients with fibrotic lung disorders. *Lab Invest* 40: 717-734, 1979
- 12) Chanez P., Lacoste J.-Y., Guillot B., Giron J., Barneon G., Enander I., Godard P., Michel F.-B., and Bousquet J.: Mast cells' contribution to the fibrosing alveolitis of the scleroderma lung. *Am Rev Respir Dis* 147: 1497-1502, 1993
- 13) Wiggs B.R., Bosken C., Pare P.D., James A., and Hogg J.C.: A model of airway narrowing in asthma and in chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 145: 1251-1258, 1992

シリカ肺障害モデルマウスに対する KGF 発現 プラスミド投与の効果

長瀬 洋之 吉原 久直 石田 博文 大田 健*

【目的】 間質性肺炎や ARDS の病態に肺胞上皮細胞傷害が深く関与しており，その抑制や修復の誘導は，ひとつの治療戦略である．KGF (keratinocyte growth factor) は II 型肺胞上皮細胞の増殖因子であり，動物モデルでは肺障害保護的に作用する．既報では KGF 蛋白を投与したものが多く，また，緩徐に進行する線維化を特徴とするシリカ肺障害モデルに及ぼす影響は報告されていない．今回，シリカ肺障害モデルに対する KGF 発現プラスミドの効果を検討した．

【方法】 C57BL/6 マウスを用い，pVAX/KGF を，シリカ点鼻前日 (前投与群)，または翌日 (後投与群) に気道内投与した．また day 7 追加投与群を作成した．

【結果】 pVAX/KGF 前投与群では，コントロール群と比して，病理学的スコア (Ashcroft score, day 3)，BALF 総細胞数，好中球数，マクロファージ数 (day 7) が有意に抑制され，リンパ球数，ハイドロキシプロリン値の抑制傾向を認めた (day 7)．一方後投与群では抑制効果は認めなかった．Day 7 追加投与群では前投与単独群と比して，day 14 の BALF 炎症細胞数が有意に増加した．

【結論】 pVAX/KGF の前投与により，シリカ肺障害は抑制され，放射線照射や薬剤投与による肺障害予防の治療戦略開発の端緒たりうる知見と考えられた．一方，後投与や追加投与では肺障害を抑制しえず，既存の肺障害への臨床応用に関しては，慎重な検討を要するとともに，さらなる機序の検討が必要である．

The Effect of KGF-expressing Plasmid Vector on Silica-induced Lung Injury

Hiroyuki Nagase, Hisanao Yoshihara, Hirofumi Ishida, and Ken Ohta

Department of Medicine, Teikyo University School of Medicine

【Rationale】 The repair of alveolar epithelial cells is an important process in recovery from lung injury. KGF (keratinocyte growth factor) is a growth factor for alveolar type II cells and previous studies have shown the protective effect of KGF on various experimental lung injury models. But to date, the effect of KGF on silica-induced lung injury, which shows the slowly progressive lung fibrosis, has not been reported and most of the previous studies utilized the recombinant KGF protein. The aim of the present study is to clarify the effect of KGF expressing vector pVAX/KGF on silica-induced lung injury model.

【Method】 Six weeks old male C57/BL6 mice were intranasally administered 16 mg of silica particle. pVAX/KGF was intratracheally administered (1) 24 hr before, (2) 24 hr after, or (3) 24 hr before and 7 days after silica administration.

【Results】 When pVAX/KGF was administered before silica, total cell counts, the number of neutrophils and macrophages in BALF at day 7 were significantly decreased compared to control. The histological change (Ashcroft score: day 3) was also diminished and hydroxyproline content tended to be decreased by pVAX-KGF pre-treatment. In contrast, when pVAX/KGF was administered after silica, suppressive effect was not observed. When pVAX/KGF was additionally administered at day 7 after pre-treatment, the BALF cell count was significantly increased at day 14.

【Conclusion】 Pre-treatment by pVAX/KGF suppressed the lung inflammation and fibrosis in silica-induced lung injury, suggesting the potential validity for the prevention of radiation or drug-induced lung injury. In contrast, the protective effect of pVAX/KGF against already established lung injury could not be observed. Further investigation about the mechanism of time dependent effect of KGF is required.

はじめに

間質性肺炎や ARDS における肺障害の病態には、肺胞上皮細胞傷害が深く関与している。肺胞上皮細胞傷害を抑制し、正常な修復を誘導することは、その治療戦略のひとつとして位置づけられる。I 型肺胞上皮細胞は、それ自身は細胞分裂せず、外界からの有害刺激に対して感受性が高く、損傷をうけやすいが、II 型肺胞上皮細胞は増殖・分化能を有し、I 型肺胞上皮細胞へも分化するために、肺障害の修復に重要な役割を担っていることが想定されている¹⁾。

KGF (keratinocyte growth factor: FGF-7) は、1989 年に線維芽細胞株からクローニングされた増殖因子であり²⁾、II 型肺胞上皮細胞の増殖を誘導する³⁾。KGF は主に線維芽細胞によって産生され、上皮細胞特異的に作用する成長因子であり、EGF (epidermal growth factor), TGF (transforming growth factor), basic FGF (fibroblast growth factor) 等の成長因子と異なり、線維芽細胞増殖を惹起しない点が特徴的である⁴⁾。KGF は KGF 受容体 (FGFR2-IIIb) を介して細胞を活性化するが、受容体発現も上皮細胞特異的である⁵⁾。疾患との関連では、ヒト特発性肺線維症患者由来の肺線維芽細胞からの KGF 分泌は、健常人に比して低下しており⁶⁾、KGF 分泌不全による肺障害修復障害が示唆されている。

このような特徴から、KGF は実験的肺障害に対して保護的に働く可能性が想定され、プレオマイシン^{7,8)}、高濃度酸素⁹⁾、オレイン酸¹⁰⁾、放射線¹¹⁾ 等の種々の肺障害を抑制することが示されてきたが、シリカによる肺障害モデルにおよぼす影響に関しては報告がない。

シリカ気道内投与によるマウス肺障害モデルは、1-2 週間後に生じる炎症に引き続き、緩徐に進行する肺線維化を生ずることを特徴とする。プレオマイシンと比較して、線維化が緩徐に進行することから、特発性肺線維症に近いモデルとして位置づけられている¹²⁾。また、既報では KGF 蛋白を直接投与した検討が多いが、臨床応用を想定すると、一般的に蛋白製剤は高価である。さらに、既報の動物実験では、肺障害を惹起する前に KGF 蛋白を前投与したモデルが殆どである

が⁷⁻¹¹⁾、臨床応用を考慮すると、既存の肺障害に対する KGF の効果を検討する必要がある。そこで今回の検討の目的は、1) シリカ肺障害モデルマウスに対する KGF の効果を明らかにすること、2) KGF 投与の方法論として、KGF 発現プラスミドの効果を検討すること、3) KGF 発現プラスミドの投与時期別の効果を検討することとした。

方 法 (図 1)

● 試薬と動物:

C57BL/6: 6 週齢♂ (日本チャールズ・リバー) を用いた。シリカ粒子 (石英標準試料/JAWE451/遊離珪酸分析用, 日本作業環境測定協会, 東京) は、生理食塩水に懸濁後、ultrasonicate したものをを用いた。

プラスミドベクターは hKGF 遺伝子を挿入した pVAX/KGF を用いた。基礎検討として、HEK293 細胞に pVAX/KGF を transfect し、KGF 蛋白発現が細胞内、培養上清ともに認められることを western blotting で確認した。また気道上皮細胞株 16-HBE に、*in vitro* で pVAX/lacZ を 4 種の試薬を用いて transfect 後に β -galactosidase 陽性細胞数を計数し、Lipofectamine 2000 の効率が優れていることを確認した。さらに、*in vivo* で pVAX/lacZ を Lipofectamine 2000 を用いて気道内投与し、肺組織が β -galactosidase 染色で陽性となることを確認した。

● 実験プロトコル:

図 1 に示す 3 群を設定した。(A) シリカ点鼻 24 時間前に pVAX/KGF を投与する前投与群、(B) シリカ点鼻 24 時間後に pVAX/KGF を投与する後投与群、(C) シリカ点鼻 24 時間前、7 日後に pVAX/KGF を投与する 2 回投与群を設定した。

シリカ粒子懸濁液は、16 mg/匹を点鼻投与した。プラスミドベクターに関しては、pVAX/KGF 2 μ g を 5 μ l の Lipofectamine 2000 と投与直前に混じ、PBS で総量 50 μ l とし、26G 針で気管内投与した。いずれもエーテル麻酔下で投与した。陰性コントロールとして、5 μ l の Lipofectamine 2000 を PBS で総量 50 μ l としたものを投与した。

● 解析:

図 1 に示したスケジュールで、気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い、細胞数、分画を検討した。また、両肺を凍結乾燥し、線維化の生化学的指標としてハイドロ

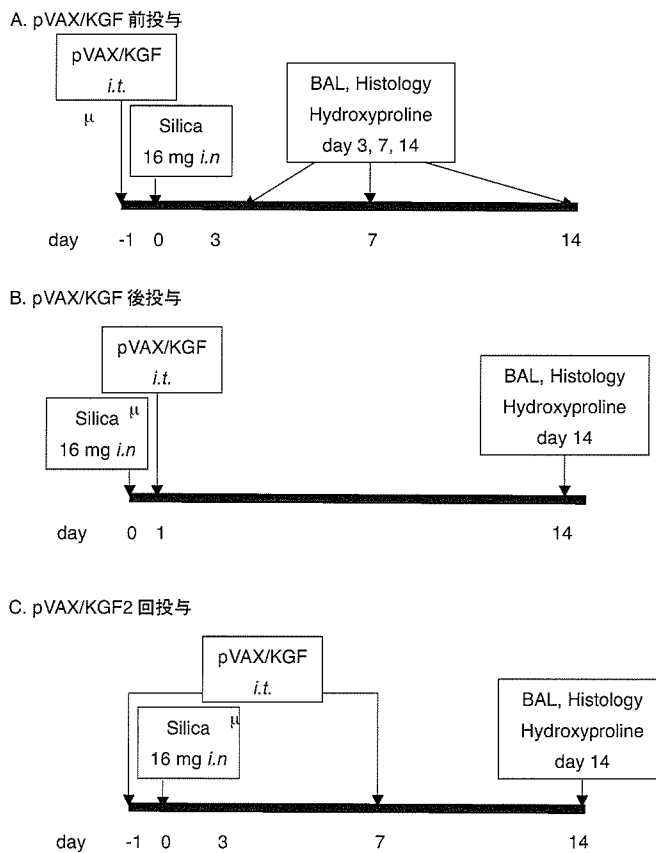


図1 実験プロトコル

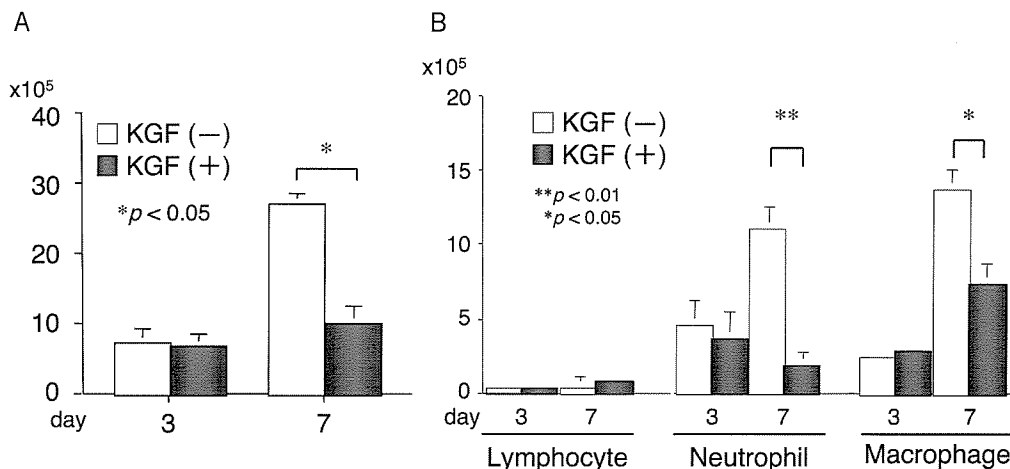


図2 pVAX/KGF 前投与後の BALF 細胞分画

キシプロリン量を測定した。組織学的検討も行い、Ashcroft Score を用いてスコア化した。

● 統計:

データは平均値±標準誤差で示す。pVAX/KGF 投与群およびコントロール群の群間比較を、対応のない *t* 検定で行った。

結 果

(I) pVAX/KGF 前投与の効果

まず、シリカ投与前に pVAX/KGF を投与した群の結果を示す。シリカ投与7日後 (day 7) に、BALF 中総細胞数がコントロール群 (KGF (-)) では増加したが、pVAX/KGF 投与群 (KGF (+)) では、有意に

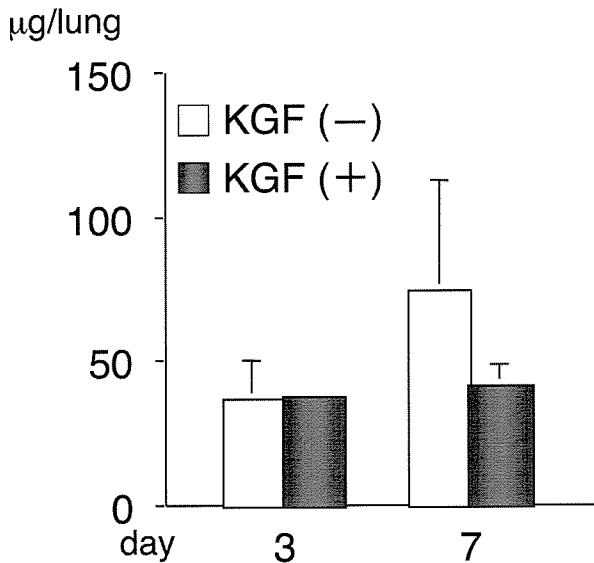


図3 pVAX/KGF 前投与後のハイドロキシプロリン量

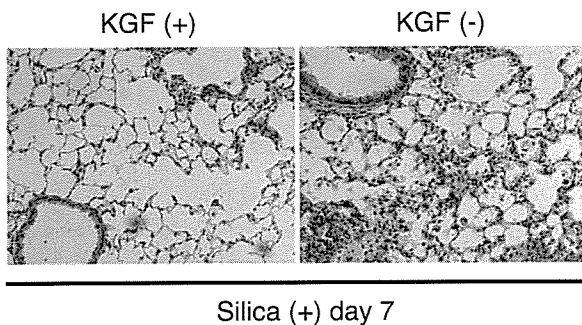


図4 pVAX/KGF 前投与後の肺組織所見

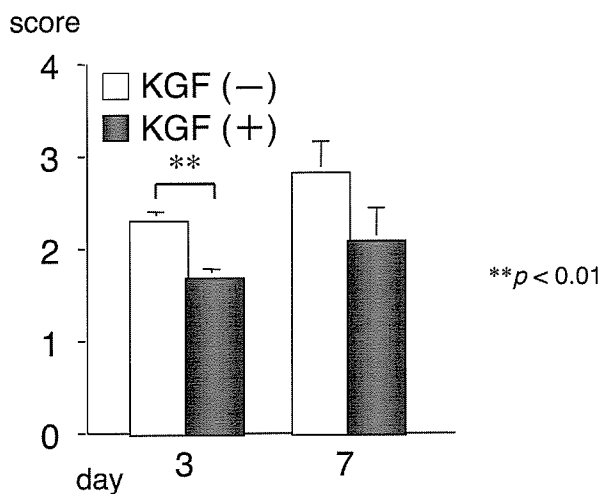


図5 pVAX/KGF 前投与後の Ashcroft Score

BALF 総細胞数が抑制された (図 2A)。細胞分画としては、好中球数とマクロファージ数が有意に抑制された (図 2B)。

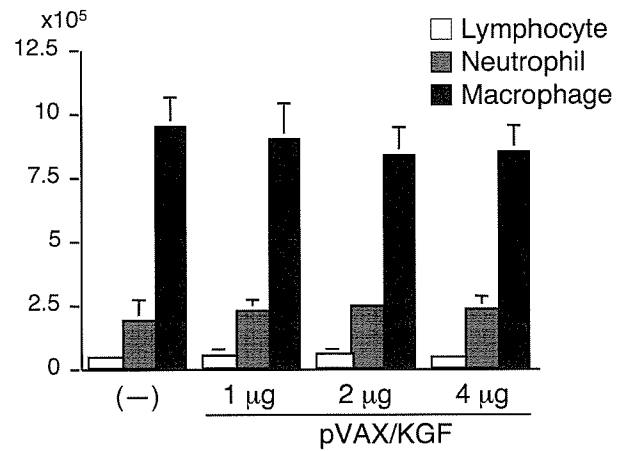


図6 pVAX/KGF 後投与後の BALF 細胞分画 (day 14)

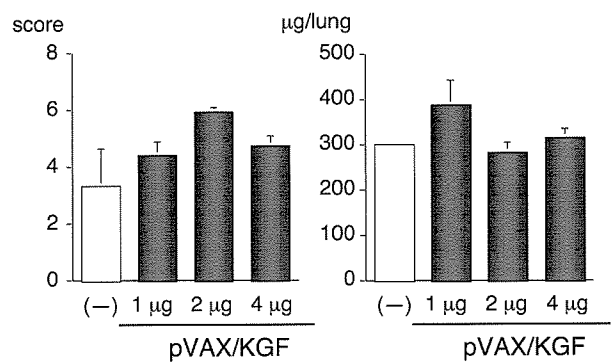


図7 pVAX/KGF 後投与後の Ashcroft Score およびハイドロキシプロリン量 (day 14)

また、線維化の生化学的指標であるハイドロキシプロリン量は、pVAX/KGF 投与で day 7 に抑制傾向を示した (図 3)。組織学的にも、シリカ投与で認められる肺胞隔壁の肥厚や、炎症細胞浸潤が抑制された (図 4)。Ashcroft score でスコア化すると、day 3 から有意に抑制され、day 7 では抑制傾向を示した (図 5)。以上のように、シリカによるマウス肺障害モデルにおいて、pVAX/KGF の前投与は炎症細胞浸潤、線維化を抑制した。

(2) pVAX/KGF 後投与の効果

一方、シリカ投与の翌日に pVAX/KGF を投与した場合、BALF 中のいずれの白血球分画も、有意には抑制されなかった (図 6)。また、ハイドロキシプロリン量や、Ashcroft score も抑制されなかった (図 7)。

(3) pVAX/KGF2 回投与の効果

さらに、pVAX/KGF 前投与で認められた肺障害抑制効果が、pVAX/KGF の day 7 での追加投与でいかに修飾されるかを検討した。day 7 に pVAX/KGF を

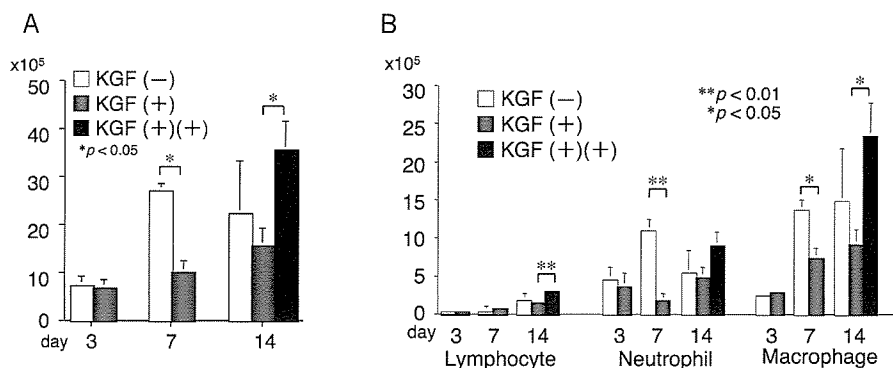


図8 pVAX/KGF2 回投与後の BALF 細胞分画

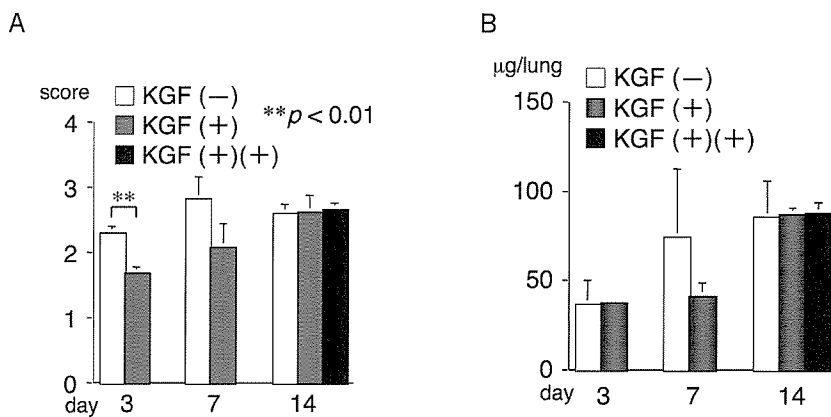


図9 pVAX/KGF2 回投与後の Ashcroft Score およびハイドロキシプロリン量

表1 pVAX/KGF の投与時期による効果の差異

	BALF				Ashcroft
	Total	Neu	Mp	HOP	
前投与	↓	↓	↓	↓	↓
	d7	d7	d7		d3
後投与	→	→	→	→	→
2回投与	↑	→	↑	→	→

追加投与すると、単回前投与群に比して、day 14 の BALF 総細胞数は有意に増加しており (図 8A)、細胞分画ではリンパ球、マクロファージが有意に増加していた (図 8B)、また、追加投与によるハイドロキシプロリン量 (図 9A)、Ashcroft score (図 9B) への有意な影響は認めなかった。

以上の結果を表 1 にまとめると、pVAX/KGF の前投与は炎症細胞浸潤、線維化を抑制したが、後投与では有意な抑制効果を認めず、day 7 で追加投与すると、day 14 における炎症細胞浸潤は増強した。

考 察

今回の検討で、pVAX/KGF をシリカ投与前に前投与した場合は、炎症細胞浸潤や肺線維化を抑制しうることを示された。また、方法論として、プラスミドベクターを用いた KGF の強制発現の有効性も示唆された。

KGF による肺障害抑制機序としては、II 型肺胞上皮細胞の増殖、遊走、分化を促進すること³⁾、Akt 依存性に肺胞上皮細胞死を抑制することが、*in vitro*¹³⁾、*in vivo*¹⁴⁾ で示されており、細胞増殖促進と細胞死抑制によって、肺障害を減弱し、修復機転を促進することが想定されている。動物モデルの検討では、KGF 投与によって、プレオマイシンによる BALF 中蛋白増加⁷⁾、TGF-β や PDGF-BB 産生増加⁷⁾、II 型肺胞上皮細胞損傷⁷⁾、肺容量減少⁸⁾、コラーゲン産生増加⁸⁾、サーファクタント減少⁸⁾ が抑制され、多面的な作用によって肺障害が抑制されることが示唆されている。さらに、Na-K ATPase α1 subunit 発現を増強することで、間質の水バランスを改善し、間質浮腫を軽減する可能性も示

されている¹⁵⁾。今回の検討では、シリカ投与後 day 3 という早期から Ashcroft score の抑制を認めたが (図 5), Ashcroft score は主に胞隔肥厚をスコア化するため、早期の間質浮腫の抑制が反映された可能性もある。

KGF 投与による BALF 細胞分画の変化については、これまで詳細な報告がないが、今回の検討では、pVAX/KGF 前投与によってシリカによる炎症細胞浸潤は抑制された。この機序としては、肺胞上皮細胞死 (necrosis) の抑制に伴う炎症性サイトカイン・ケモカインなどの放出抑制が可能性として考えられる。また、ハイドロキシプロリン定量や組織学的な検討から、線維化も抑制されることが示唆された。KGF 投与によって、TGF- β や PDGF-BB 産生が抑制されることが *in vivo* で報告されており⁷⁾、線維化抑制の機序としては、これらの向線維化サイトカインの産生細胞浸潤が抑制された結果である可能性がある。これらについては、肺胞上皮細胞死や肺局所のサイトカイン・ケモカインのさらなる解析が必要である。

既報では、肺障害を抑制しえた殆どの動物モデルにおいて、KGF 蛋白は前投与されているが、治療的観点からは、既存の肺障害を改善しうるかどうかも重要である。しかしながら、今回の検討では、pVAX/KGF をシリカ後に投与した場合は、肺障害の抑制効果を認めなかった。シリカ投与翌日は、既に炎症機転が発動している可能性があり、滲出液や浮腫による物理的バリアによって、有効に肺構築細胞に pVAX1/KGF が transfect しえなかった可能性がある。また、図 8 に示すように、pVAX/KGF を前投与した場合、day 7 では細胞浸潤を有意に抑制したが、day 14 では抑制傾向にとどまっている。また、Ashcroft score (図 9A) やハイドロキシプロリン量 (図 9B) に関しても、day 7 までは抑制傾向を認めたが、day 14 での差は認められていない。効果の持続性の観点からは、より長期の検討が必要である。

さらに、KGF を day 7 に追加投与した場合、day 14 の炎症細胞浸潤はむしろ増強したことから、物理的バリアのみならず、炎症下で病的に活性化された上皮細胞に対しては、KGF は定常状態とは異なる作用を及ぼす可能性も考えられる。また、炎症細胞における KGF 受容体発現についての詳細な報告はないが、局所集積した炎症細胞を KGF が直接活性化した可能性も考えられる。炎症細胞や活性化上皮細胞における

KGF 受容体発現や機能的解析も今後の検討課題である。

結 論

プラスミドベクターを用いた pVAX/KGF の前投与により、シリカによる肺障害は抑制された。このことは、放射線照射や薬剤投与による肺障害予防の治療戦略開発の端緒たりうる知見と考えられた。一方、pVAX/KGF の後投与や追加投与では肺障害を抑制しえず、投与時期によって異なる影響を及ぼした。既に発症している肺障害への臨床応用に関しては、慎重な検討を要するとともに、*in vivo* での KGF の作用の多様性も示唆され、さらなる機序の検討を要するものと考えられた。

文 献

- 1) Adamson IY, Bowden DH. The type 2 cell as progenitor of alveolar epithelial regeneration. A cytodynamic study in mice after exposure to oxygen. *Lab Invest* 1974; 30: 35-42.
- 2) Finch PW, Rubin JS, Miki T, et al. Human KGF is FGF-related with properties of a paracrine effector of epithelial cell growth. *Science* 1989; 245: 752-5.
- 3) Panos RJ, Rubin JS, Csaky KG, et al. Keratinocyte growth factor and hepatocyte growth factor/scatter factor are heparin-binding growth factors for alveolar type II cells in fibroblast-conditioned medium. *J Clin Invest* 1993; 92: 969-77.
- 4) Rubin JS, Osada H, Finch PW, et al. Purification and characterization of a newly identified growth factor specific for epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989; 86: 802-6.
- 5) Miki T, Fleming TP, Bottaro DP, et al. Expression cDNA cloning of the KGF receptor by creation of a transforming autocrine loop. *Science* 1991; 251: 72-5.
- 6) Marchand-Adam S, Plantier L, Bernuau D, et al. Keratinocyte growth factor expression by fibroblasts in pulmonary fibrosis: poor response to interleukin-1beta. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2005; 32: 470-7.

- 7) Yi ES, Salgado M, Williams S, et al. Keratinocyte growth factor decreases pulmonary edema, transforming growth factor- β and platelet-derived growth factor-BB expression, and alveolar type II cell loss in bleomycin-induced lung injury. *Inflammation* 1998; 22: 315-25.
- 8) Sugahara K, Iyama K, Kuroda MJ, et al. Double intratracheal instillation of keratinocyte growth factor prevents bleomycin-induced lung fibrosis in rats. *J Pathol* 1998; 186: 90-8.
- 9) Panos RJ, Bak PM, Simonet WS, et al. Intratracheal instillation of keratinocyte growth factor decreases hyperoxia-induced mortality in rats. *J Clin Invest* 1995; 96: 2026-33.
- 10) Ulrich K, Stern M, Goddard ME, et al. Keratinocyte growth factor therapy in murine oleic acid-induced acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288: L1179-92.
- 11) Yi ES, Williams ST, Lee H, et al. Keratinocyte growth factor ameliorates radiation- and bleomycin-induced lung injury and mortality. *Am J Pathol* 1996; 149: 1963-70.
- 12) Callis AH, Sohnle PG, Mandel GS, et al. Kinetics of inflammatory and fibrotic pulmonary changes in a murine model of silicosis. *J Lab Clin Med* 1985; 105: 547-53.
- 13) Bao S, Wang Y, Sweeney P, et al. Keratinocyte growth factor induces Akt kinase activity and inhibits Fas-mediated apoptosis in A549 lung epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2005; 288: L36-42.
- 14) Ray P, Devaux Y, Stolz DB, et al. Inducible expression of keratinocyte growth factor (KGF) in mice inhibits lung epithelial cell death induced by hyperoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 6098-103.
- 15) Borok Z, Danto SI, Dimen LL, et al. Na(+)-K(+)-ATPase expression in alveolar epithelial cells: upregulation of active ion transport by KGF. *Am J Physiol* 1998; 274: L149-58.

ブレオマイシン誘導肺線維症モデルにおける 骨髄間葉系幹細胞移植の検討

熊本 牧子 西脇 徹 松尾 直樹 松島 綱治*

近年、骨髄間葉系幹細胞 (Bone marrow mesenchymal stem cells; BMMSCs) が、ブレオマイシン誘導肺線維症モデルを含む様々な臓器傷害の修復に寄与することが報告されている。しかし、現在使用されている多くは培養 BMMSCs (Conventionally cultured BMMSCs; ConBMMSCs) であり、臨床応用に際してこの培養過程は多くの弊害をもたらすと懸念される。よって培養期間を最小限に留めた BMMSCs (Minimally cultured BMMSCs; MinBMMSCs) の性質及び有効性を検討した。現在多くの報告で、骨髄接着細胞のうちの単球系細胞及び血管内皮前駆細胞を除いた細胞を murine BMMSCs として用いているため、培養 2 時間後の骨髄接着細胞のうち、CD11b-CD31-CD45-細胞を MinBMMSCs とした。一方、ConBMMSCs は従来どおり、全骨髄細胞を培養 2 日後に非接着細胞を除去し、さらに 7 日培養した後、CD11b-CD45-細胞を分離して得た。今回我々が分離した MinBMMSCs は、培養にて ConBMMSCs と同様の形態を示し、この 2 つの細胞は同一の細胞群であることが確認できた。また BMMSCs は培養によって、1) 細胞サイズが増大し、細胞内部の密度が高くなること、2) 多くのケモカインレセプターの発現が減弱すること、3) 増殖能が低下することが分かった。以上から、われわれが分離した ConBMMSCs は MinBMMSCs と比較して機能が減弱しており、ブレオマイシン誘導肺線維症モデルなどに対する細胞治療において MinBMMSCs がより効果的である可能性が示唆された。

Establishment of cell-based therapy for bleomycin-induced pulmonary fibrosis with bone marrow derived mesenchymal stem cells

Makiko Kumamoto, Tetsu Nishiwaki, Naoki Matsuo, and Kouji Matsushima

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

Bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) have been proven to be a potential tool for tissue repair including bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. Conventionally cultured BMMSCs (ConBMMSCs) have been used in most therapeutic strategies. However, the culture process may be an obstacle to clinical application of ConBMMSCs. Thus the identification of the biological properties of minimally cultured BMMSCs (MinBMMSCs) and its effect on tissue repair may enable establishment of more effective cell-based therapy. Since it has already been reported that murine BMMSCs (except endothelial stem cell lineage and myeloid lineage) are plastic adherent cells, we isolated CD45-CD11b-CD31-cells at early time period of their adherence (2 hrs) as MinBMMSCs. On the other hand, ConBMMSCs were isolated as previously described. Briefly, whole bone marrow cells were cultured for 48 h and then the nonadherent cells were removed. Cells were cultured for additional 7 days and then cells positive for CD45 or CD11b were removed. When MinBMMSCs were cultured again, they showed morphological similarity with ConBMMSCs, suggesting MinBMMSCs and ConBMMSCs are the same cells. Depending on the duration of culture, BMMSCs increased in their cell size and cellularity, and decreased expression of chemokine receptor and multiplication speed. These data suggest that ConBMMSCs are impaired in comparison to MinBMMSCs, and MinBMMSCs are likely to be more effective tool for cell-based therapy.

はじめに

近年、骨髄間葉系幹細胞は、組織修復、造血支持、移植時の GVHD 抑制などの様々な作用を有することが分かかってきており、新しい細胞治療のツールとして期待されている。呼吸器分野においても、肺線維症、肺気腫といったいまだ有効な治療法が確立されていない疾患の動物モデルにおいて有用であるとの報告がある¹⁻⁵⁾。しかし、現在検討されている培養 BMMSCs (ConBMMSCs) は、培養期間の必要性から急性疾患への利用には不向きであり、培養過程で生じる異物混入、一般的に培養液に添加されるウシ血清からの感染 (プリオン、ウイルス) や、ウシ血清に対する免疫反応⁶⁾、また培養にかかる費用の面など、臨床応用に際して様々な問題を抱えている。一方、今回我々が検討した培養期間を最小限に留めた MinBMMSCs では、必要な培養液も少量で、ヒト血清でまかなえる可能性があり、このような臨床応用を阻む問題が解決されると期待される。また、BMMSCs は培養開始直後から細胞の老化が始まり、分化能や増殖能が低下することが確認されており^{7,8)}、培養期間中に染色体異常をきたして移入によって腫瘍が形成されたという報告もある^{9,10)}。これらのことから、MinBMMSCs は ConBMMSCs と比較してより安全で効果的な作用を持つ可能性が示唆される。今回我々は MinBMMSCs の分離を試みるとともに、その性質について解析した。

方 法

MinBMMSCs は、6-8 週齢 C57BL/6J マウスの大腿骨及び脛骨の骨髄腔を灌流して取り出した全骨髄細胞 ($3-5 \times 10^7$ 個/100 mmdish) を 2 時間培養し、非接着細胞を除去した後、接着細胞から magnetic beads にて CD11b-CD31-CD45-細胞を分離して得た。一方、ConBMMSCs は、培養 2 日後の全骨髄細胞より非接着細胞を除去し、さらに 7 日培養した後、接着細胞中に CD31 陽性細胞が存在しなかったため、同様に magnetic beads にて CD11b-CD45-細胞を分離して得た。培養液は、20% FBS を含む DMEM に HEPES 及び penicillin-streptomycin を添加したものをを使用した。

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

BMMSCs の培養による細胞サイズや細胞内密度の経時的変化はフローサイトメトリーにて解析した。

BMMSCs の増殖アッセイは、培養液中に BrdU を添加し、45 分間パルスした後、BrdU FLOW KIT (BD Biosciences) を用いて MinBMMSCs と ConBMMSCs 両者の BrdU 陽性率ならびに DNA 量を比較した。さらにプレオマイシン投与肺中の CD45-CD31-の細胞、すなわち血球系細胞及び内皮系細胞を除いた細胞群でのケモカイン発現の経時的変化を PCR にて解析し、それぞれに対するケモカインレセプターの発現を MinBMMSCs と ConBMMSCs において Real time PCR にて、比較解析した。

結 果

マウス骨髄接着細胞培養により形態的に明確な 3 群に分かれる細胞群を得た (図 1)、多角形の大型の細胞が骨髄間葉系幹細胞 (ConBMMSCs) であり¹¹⁾、今回我々が分離した MinBMMSCs は、培養によって ConBMMSCs と同様の形態を示した (図 2)。MSC は培養によって、1) 細胞サイズが増大し、細胞内密度が高くなること (図 3)、2) 多くのケモカインレセプターの発現が減弱すること (図 4)、3) 増殖能が低下すること (図 5) が分かった。また、マウスプレオマイシン誘導肺線維症モデルの非造血・内皮系肺細胞において、BMMSCs で発現しているケモカインレセプターに対する複数のケモカイン発現増強が認められた (図 6)。

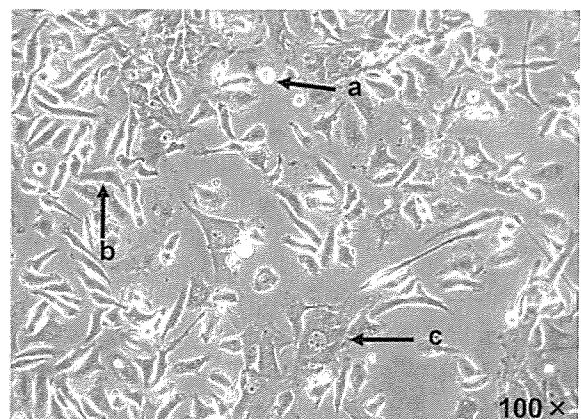


図 1 培養骨髄接着細胞は 3 種類に分類される。(培養 8 日目) 先行論文より、a. endothelial stem-cell lineage b. myeloid lineage c. ConBMMSCs である¹¹⁾。

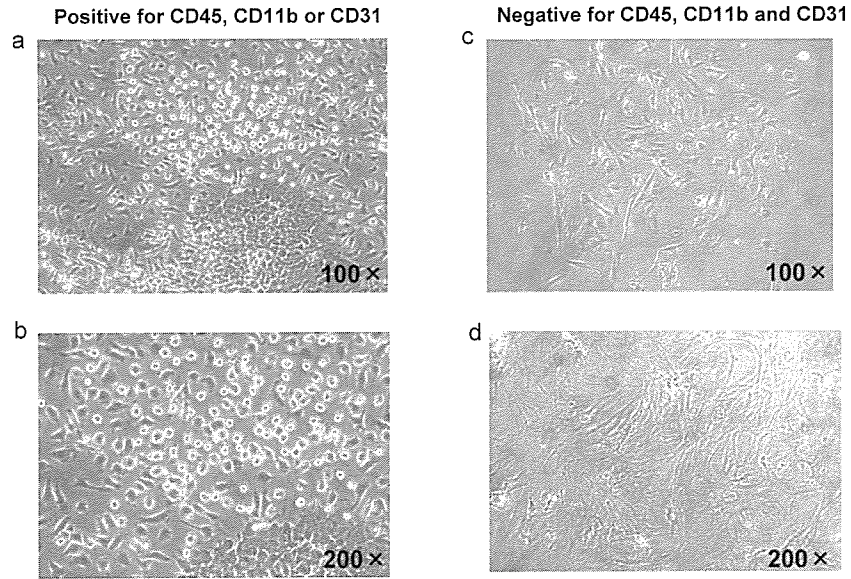


図2 全骨髄細胞培養2時間後の接着細胞を、positive for CD45, CD11b or CD31の群(a and b)とnegative for CD45, CD11b and CD31 (MinBMMSCs) (c and d)の群に分け、それぞれ14日間培養した。MinBMMSCsは培養によって、ConBMMSCsと同様の形態を示した。

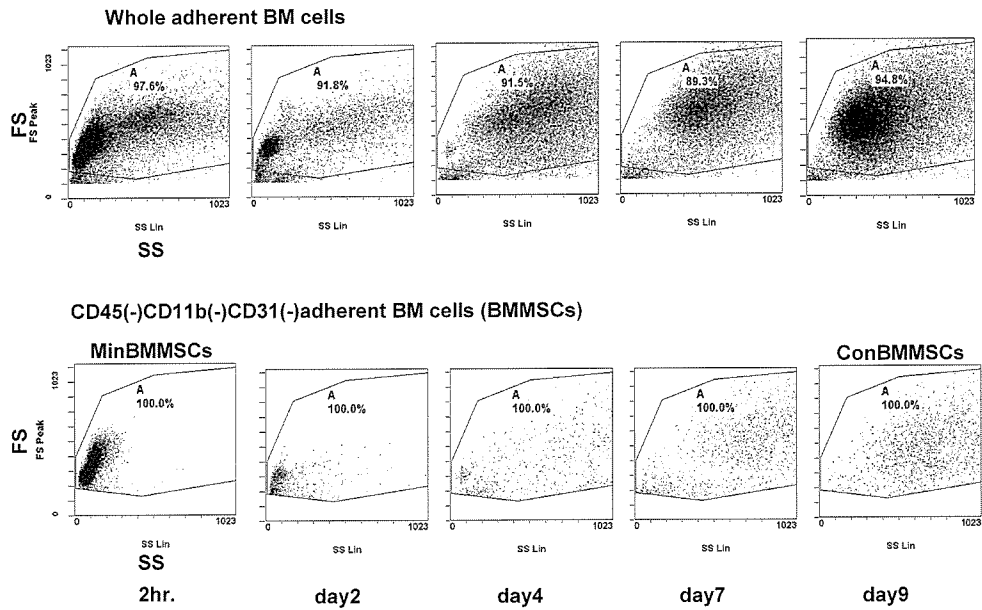


図3 BMMSCsは培養するにつれ、細胞サイズ (FS) は増大し、細胞内密度 (SS) は高くなる。

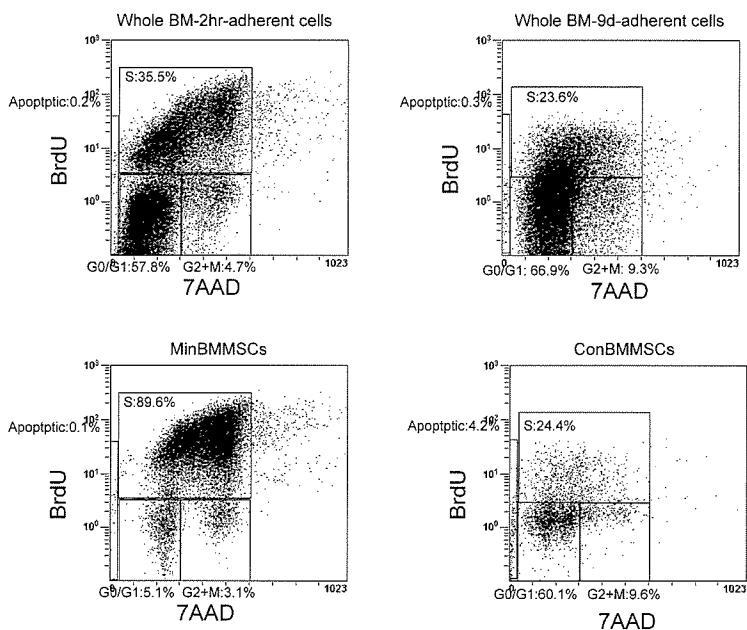


図4 MinBMSCsはConBMSCsに比べて増殖能が高い。
細胞を10 μMのBrdUと共に45分間培養することで、BrdUをS期の細胞に取り込ませ、全DNAに結合する色素(7-AAD)との組み合わせで細胞周期を解析した。MinBMSCsでは約90%の細胞がS期にあり、活発に増殖していることが分かる。S期(DNA合成期), G0/G1期(休止期), G2/M期(分裂期)

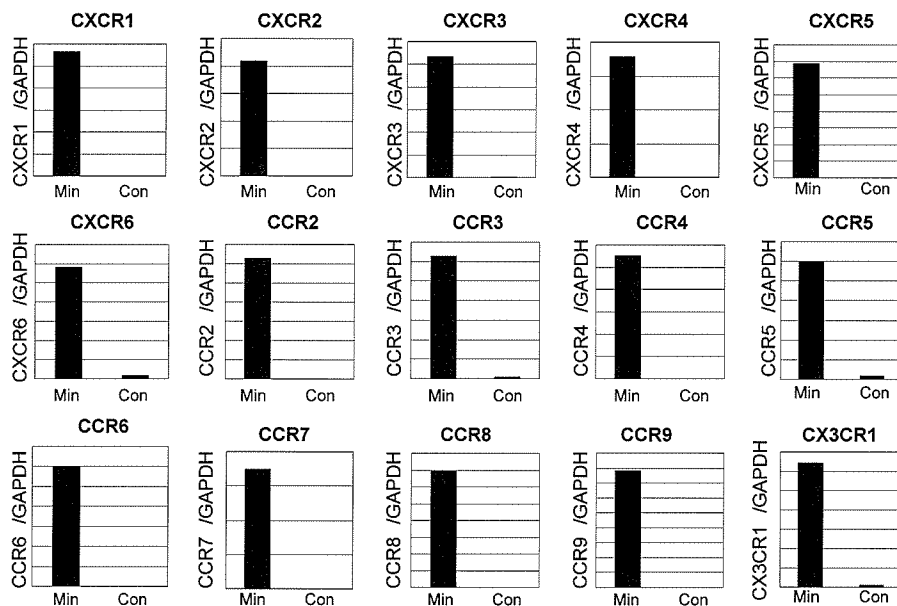


図5 MinBMSCsとConBMSCsのケモカインレセプター発現の比較
Real time PCRにて解析した全てのケモカインレセプターは、ConBMSCsに比べてMinBMSCsにおいてより強く発現していた。

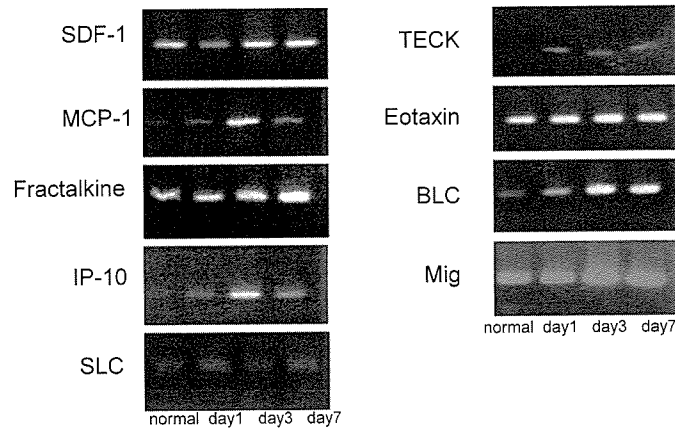


図6 プレオマイシン投与肺のCD45-CD31-細胞群におけるケモカイン発現の経時的変化
 図5で示したBMMSCsで発現しているケモカインレセプターに対応する様々なケモカインの発現が認められた。

考 察

骨髄間葉系幹細胞は、すでに心臓や骨の疾患に対する臨床応用の検討が始まっており、今後さらに多くの疾患に対する利用が期待されている。しかし、現在一般にBMMSCsとされているのは培養されたものであり、培養過程における様々な問題が臨床応用に際して障害となると予測される。そこでわれわれは、培養期間を最小限に留めたMinBMMSCsを確立し、その性質についてConBMMSCsと比較検討した。解析の結果、BMMSCsは培養によって大型化し、細胞内密度が高くなることが示され、細胞治療に際して塞栓を形成する危険性が懸念された。また、ConBMMSCsはMinBMMSCsと比較して、増殖能が著明に低下しており、障害肺で発現が上昇するケモカインに対するケモカインレセプターの発現も著明に減弱していることが示された。以上のことより、プレオマイシン誘導肺障害モデルに対して、MinBMMSCsはConBMMSCsよりもより優れた効果を発揮する可能性が示唆された。現在培養BMMSCs(ConBMMSCs)が使用されている第一の理由は、細胞数の確保であるが、MinBMMSCsの優れた機能が数の問題を凌駕することも期待される。今後、マウスプレオマイシン誘導肺障害モデルを用いて、生体内におけるMinBMMSCs及びConBMMSCsの抗炎症作用や線維化抑制能、肺上皮細胞への分化能などの解析を進めていく必要がある。

参考文献

1) Yamada M, et al. Bone marrow-derived progeni-

tor cells are important for lung repair after lipopolysaccharide-induced lung injury. *J Immunol* 2004; 172: 1266-1272.

2) Ishikawa K, et al. Bone marrow derived cells contribute to lung regeneration after elastase induced pulmonary emphysema. *FEBS Letters* 2004; 556: 249-252.

3) Darrell N. Kotton, et al. Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development* 2001; 128: 5181-5188.

4) Luis A. Ortiz, et al. Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 8407-8411.

5) Mauricio Rojas, et al. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir cell mol Biol* 2005; 33: 145-152.

6) Chachques JC, et al. Autologous human serum for cell culture avoids the implantation of cardioverter-defibrillators in cellular cardiomyoplasty. *Int J Cardiol* 2004; 95(suppl 1): S29-S33.

7) Bonab MM, et al. Aging of mesenchymal stem cell in vitro. *BMC Cell Biology* 2006; 10: 7-14.

8) Rombouts WJC, et al. Primary murine MSC show highly efficient homing to bone marrow but lose homing ability following culture. *Leukemia* 2003; 17: 1146-1149.

9) Rubio J. et al. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res* 2005; 65: 3035-3039.

10) Tolar J, et al. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 2007 ; 25 : 371-379.

11) Kotton DN, et al. Derivation of lung epithelium from bone marrow cells. *Cytherapy* 2003 ; 5 : 169-173.

サルコイドーシス