

Figure 5 剖検所見. a) 解剖時マクロ像. 蜂巢肺を認めないが下葉の器質化, 上葉のうっ血を認める. b) 下葉の弱拡大像. HE 染色. 顕微鏡的蜂巢肺を認め, 高度に炎症を合併している. c) 上葉の強拡大 HE 染色. DAD の所見で硝子膜の形成を認める.

粘液が充満していた. 菌種の同定は不明であったが, 破碎状の酵母様～糸状真菌が散見された. 上葉は広範に硝子膜の形成を認め, 高度の細胞浸潤を伴っており, DAD pattern と考えられた (Figure 5c).

考 察

本症例における tacrolimus 治療の評価に関しては, まず有効性判定は自覚症状, 胸部 CT など画像所見, 動脈血ガス分析, 肺機能検査(%VC, DLCO), ADL 評価, KL-6 などの血清間質性肺炎マーカーなどで行った. 本症例は使用開始時に Hugh-Jones IV ~ V 度と自覚症状が強く肺機能検査は施行できなかった. 血液ガス分析の経過には明らかな変化はみられなかった. 自覚症状はわずかの時間ではあったが, 一時的に離床してリハビリテーションが可能なるまでに改善した. 胸部 CT では感染症合併までの期間は所見の改善が見られた. 以上より一定の臨床的効果があったものと考えられる. しかし, 感染症のコントロールがつかず, 最終的に敗血症性ショックで死亡した. 臨床経過においては β -D-glucan が持続高値でアスペルギルスの感染が問題となった. 剖検時には細菌性肺炎以外にサイトメガロウイルス肺炎も認められ, 免疫抑制剤の投与

には十分な感染症のコントロールが肝要であるといえる.

Tacrolimus は放線菌 *Streptomyces tsukubaensis* より同定された. 細胞内で FK506 binding protein (FKBP) と結合し, calcineurin を競合的に阻害, 結果的に NK-AT の活性化を阻害することで IL-2 などの炎症性サイトカインの産生を低下させる. これによって活性化された T 細胞の増殖を抑制する²⁾. 間質性肺炎や各種膠原病の治療において, 多数症例に関する検討がほとんどなされていないが, とくにステロイド治療に抵抗性の難治性皮膚筋炎, 多発筋炎などに合併する間質性肺炎において有効であったとする報告が散見される^{3,4)}. Oddis ら³⁾は抗 aminoacyl-tRNA synthetase 抗体症候群に合併した間質性肺炎で, PSL に加え methotrexate, cyclophosphamide などの免疫抑制剤併用療法が無効であった患者 8 例に対し tacrolimus を経口投与し, 臨床症状, 肺機能検査や CT などの検査所見の改善を認めたと報告した. 本邦でも Ochi ら⁴⁾が皮膚筋炎・多発筋炎に合併した間質性肺炎の患者 2 人に tacrolimus が有効であったと報告した.

線維芽細胞の培養系における *in vitro*, およびマウスの *in vivo* blemomycin モデルでの検討では, TGF- β 依存性の膠原線維産生が抑制され, 肺の線維化が軽減したことが示されており⁵⁾, tacrolimus に

は抗線維化作用があると考えられている。

以上から tacrolimus は間質性肺炎の治療薬として臨床応用が可能であることが示唆される。今後多施設、前向き検討に向けて症例の集積が必要である。

参考文献

- 1) 宮本 篤, 本間 栄, 高谷久史, 杉野圭史, 坂本 晋, 泉川公一, 川畑雅照, 岸 一馬, 坪井永保, 元井紀子, 黒崎敦子, 吉村邦彦: 特発性間質性肺炎「分類不能型」の臨床病理学的検討. 難治性疾患克服研究事業びまん性肺疾患調査研究班平成 16 年度研究報告書. p110-117, 2005.
- 2) Taylor AL, Watson JE, Bradley JA: Immunosuppressive agents in solid organ transplantation: Mechanisms of action and therapeutic efficacy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005; 56: 23-46.
- 3) Oddis CV, Scirba FC, Elmagd KA, Starzl TE: Tacrolimus in refractory polymyositis with interstitial lung disease. *Lancet* 1999; 353 (9166) : 1762-1763.
- 4) Ochi S, Nanki T, Takada K, Suzuki F, Komano Y, Kubota T, Miyasaka N: Favorable outcomes with tacrolimus in two patients with refractory interstitial lung disease associated with polymyositis/dermatomyositis. *Clin Experiment Rheumatol* 2005; 23: 707-710.
- 5) Nagano J, Iyonaga K, Kawamura K, Yamashita A, Ichiyasu H, Okamoto T, Suga M, Sasaki Y, Kohroggi H: Use of tacrolimus, a potent antifibrotic agent, in bleomycin-induced lung fibrosis. *Eur Respir J* 2006; 27: 460-469.

マウスモデル研究

ブレオマイシン誘発肺線維症モデルにおける Gleevec と マクロライド併用による抗線維化効果の検討

西岡 安彦 東 桃代 青野 純典 曾根 三郎*

我々は分子標的治療薬 imatinib (Gleevec[®]) の肺線維化抑制効果と α 1-acid glycoprotein (AGP) による阻害効果について報告してきた。さらにエリスロマイシン併用により AGP の阻害作用が解除され、Gleevec の抗線維化効果が回復することも報告した。今回、そのメカニズムについてさらに詳細に検討した。AGP の作用を解除するには、エリスロマイシン同様クラリスロマイシンの併用も効果的であった。Ki-67 染色により、Gleevec + マクロライド投与では *in vivo* で肺線維芽細胞の増殖が抑制されることが明らかとなった。一方、血清 AGP 濃度は健常人においてすでに 400 μ g/ml 前後であり、マウスよりかなり高値であったが、特発性肺線維症患者においてはさらに上昇しており、Gleevec 投与時には、その作用を抑制する可能性が示唆された。

Role of α 1-acid glycoprotein in therapeutic antifibrotic effects of imatinib *plus* macrolides in mice

Yasuhiko Nishioka, Momoyo Azuma, Yoshinori Aono, and Saburo Sone

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

Imatinib is an inhibitor of platelet-derived growth factor receptors. We have reported that treatment with imatinib inhibited bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. However, late treatment with imatinib had no effect. To clarify why imatinib had no antifibrotic effect when its administration was delayed, we focused on α 1-acid glycoprotein (AGP), since it was reported to bind imatinib and mediate drug resistance. Addition of AGP abrogated imatinib-mediated inhibition of the growth of fibroblasts. However, treatment with EM or CAM restored the growth-inhibitory effects of imatinib. The level of AGP in serum in mice rapidly increased after the administration of bleomycin and reached a plateau on day 14. Imatinib alone did not ameliorate pulmonary fibrosis when treatment was started on day 15, whereas co-administration of imatinib and EM or CAM significantly reduced the fibrogenesis via inhibition of the growth of fibroblasts *in vivo*. Serum levels of AGP were higher in patients with IPF than in healthy subjects. These results suggest that AGP is an important regulatory factor modulating the ability of imatinib to prevent pulmonary fibrosis in mice, and combined therapy with imatinib and EM or CAM might be useful for treatment of pulmonary fibrosis.

はじめに

特発性肺線維症 (IPF) は、原因不明の慢性進行性肺線維化疾患であり、5年生存率は50%以下である。未だ生命予後を延長する治療法は確立されておらず、新規治療法の開発が急務となっている。我々は、imatinib (Gleevec®) が肺線維症の病態において重要な役割を果たしている血小板由来増殖因子 (PDGF) のレセプターを特異的に阻害する点に注目し、ブレオマイシン誘発肺線維症モデルを用いて抗線維化効果を検討した。その結果、imatinib は強力な抗線維化効果を有するものの、後半投与 (days15-28) において抗線維化効果が認められないことが明らかとなった¹⁾。この後半で imatinib が効かない原因として α 1-acid glycoprotein (AGP) の可能性に着目した。血清中 AGP は imatinib と結合し imatinib の活性を阻害することが明らかとなっており、さらに AGP と imatinib との結合に競合的に働く薬剤、例えば14印環マクロライド等を imatinib と併用することで imatinib の薬剤耐性が改善されることが報告されている^{2,3)}。今回、我々はブレオマイシン肺線維症モデルにおける imatinib 耐性機構への AGP の関与と erythromycin (EM), clarithromycin (CAM) 併用による耐性克服効果とそのメカニズムについて検討した。

方 法

肺線維症モデルは8週齢の C57/BL6 マウスに BLM125mg/kg を 200 μ l の生理食塩水に溶解し Alzet mini-osmotic pump を用いて約7日間かけて持続皮下投与することにより作成した。Imatinib はブレオマイシン投与15日目から14日間、50mg/kg/day を 200 μ l の蒸留水に溶解し腹腔内投与した。EM は 5mg/kg/day, CAM は 20 mg/kg/day を同時に皮下投与した。28日後にマウスを sacrifice し、右肺を Sircol Collagen Assay を用いて肺コラーゲン含量を定量し、左肺組織片は組織学的な線維化の評価を Ashcroft score を用いて2人の病理医により行った。

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
分子制御内科学分野

* 分担研究者

さらに増殖期線維芽細胞を検討する目的で、21日目に sacrifice した肺切片にて抗 Ki-67 抗体について免疫染色を行った。また蛍光抗体法を用い、抗 Ki-67 抗体と抗 S100A4/FSP1 抗体の2重染色を行い、その解析は共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。また IPF 患者血清を用いて radial immunodiffusion assay にて AGP 測定を行った。また imatinib と AGP, EM 又は CAM による線維芽細胞増殖抑制効果を ³H-TdR 取り込み試験を用いて検討した。

結 果

マウスにおける血清 AGP 濃度は、コントロールマウスで 90 ~ 110 μ g/ml, ブレオマイシン肺線維症モデルでは3日目より上昇し、14日目以降は 650 ~ 1000 μ g/ml で推移することを報告した。Imatinib (1 ~ 3 μ M) は PDGF-BB (10 ng/ml) で刺激した線維芽細胞株の増殖反応を抑制したが、AGP は濃度依存性に imatinib の増殖抑制効果を解除した (図 1A-C)。しかし Albumin ではそのような効果は認めなかった (図 1D)。一方、EM, CAM の添加により AGP の効果は濃度依存性に消失し、imatinib の肺線維芽細胞増殖抑制効果が回復した (図 2A, 2B)。またブレオマイシン肺線維症マウスにおいて imatinib と EM および CAM の併用効果を検討した。治療は imatinib と EM あるいは CAM の併用群と、各々単独で15日目から14日間の後半投与を行った。Imatinib と EM あるいは CAM の単独では抗線維化効果を認めなかったが、併用群で HE 染色所見, Ashcroft score, コラーゲン定量にて著明な抗線維化効果を認めた (図 3)。またこの効果が線維芽細胞の増殖抑制によるかどうかを検討するために増殖期に発現する Ki-67 の免疫染色を行った。その結果、間質に存在する Ki-67 陽性細胞は imatinib と EM 併用群で著明に抑制されていることが確認された (図 4)。さらに蛍光抗体法にて、この間質に存在する Ki-67 陽性細胞は、同時に S100A4/FSP1 も陽性であることが確認された。また IPF 患者において血清 AGP 濃度上昇を認めた (図 5A) が、CRP 値との相関関係は認めなかった (図 5B)。

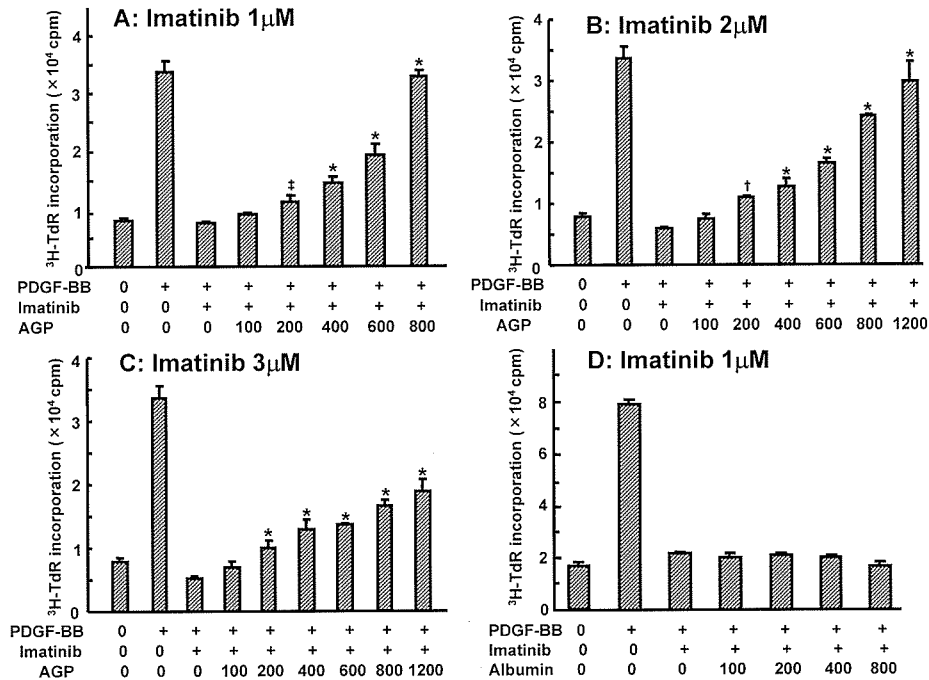


図1 Imatinibによるマウス肺線維芽細胞の増殖抑制効果に及ぼすAGPの影響
 C57BL/6マウスより作成した肺線維芽細胞株を用いて、PDGF-BB (10 ng/ml) で72時間刺激後³H-TdR (1µCi/well) を18時間パルスし、増殖能を測定した。1, 2, 3µMのimatinibに対しAGPを100~1200µg/mlの濃度で添加しその効果を検討した。その結果、AGP添加によりimatinibの線維芽細胞増殖抑制効果は有意に減弱された。

考 察

今回、imatinibの抗線維化効果における耐性メカニズムにAGPが関連していることが*in vivo*, *in vitro*での結果により示唆された。

*In vitro*の結果からは、200µg/ml以上のAGP濃度でimatinibによる細胞増殖抑制効果が認められた。ブレオマイシン肺線維症マウスでは後期においてAGP濃度は700~1000µg/mlとなり*in vivo*においてもimatinibの効果が減弱されている可能性が示唆された。一方、ヒト血清AGP濃度は健常人においても400µg/ml前後と高く、IPF患者の60%においてAGP濃度は1000µg/ml以上とさらに高値であった。ヒト健常人におけるAGP濃度は、imatinibの効果をある程度抑制してしまう濃度であるものの、図1からAGPの作用はimatinibの血中濃度とのバランスによって発揮されてくることが明らかである。IPF患者ではさらにAGP値が上昇しており、imatinibの作用抑制がより強く出現する可能性が示唆される。今後、肺線維症のステージや活動性によるAGPの推移の検討が重要と思われる。

一方、ブレオマイシンモデルにおいてimatinib単剤では効果が認められなかった後半投与群におい

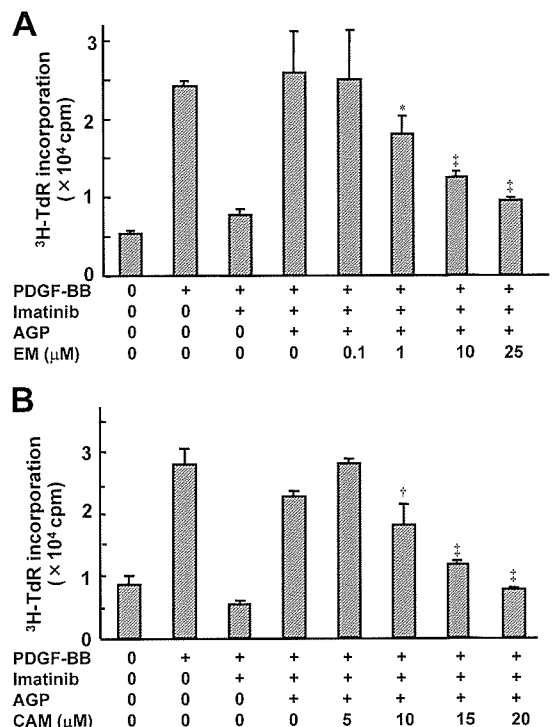


図2 Erythromycin, ClarithromycinによるAGPの作用抑制
 C57BL/6マウスより作成した肺線維芽細胞を用いて、PDGF-BB (10 ng/ml) で72時間刺激後³H-TdR (1µCi/well) を18時間パルスし、増殖能を測定した。1µMのimatinibと800µg/mlのAGPに対し、Erythromycin (EM)を0.01~25µM, Clarithromycin (CAM)を5~25µMの濃度で添加しその効果について検討した。その結果、800µg/mlのAGPの効果は>1µMのEM, >10µMのCAMの添加で有意に解除された。

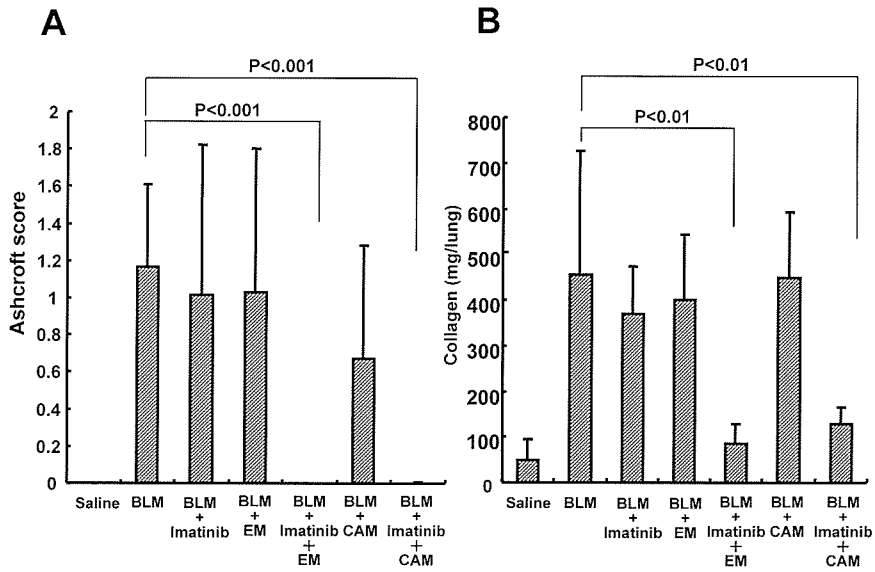


図3 BLM誘発肺線維症モデルにおける imatinib と EM および CAM の併用効果

C57BL/6 マウスに osmotic mini-pump を用いて 125mg/kg の BLM を持続皮下投与した。BLM 投与開始 14 日目から, imatinib (50mg/kg) 単独投与, EM (5mg/kg) 単独投与, CAM (20mg/kg) 単独投与, imatinib と EM または CAM の併用投与を行った。28 日後の右肺を用いてコラーゲン量を Sircol assay kit により定量化し, 左肺の組織学的検討により Ashcroft score を算出した。14 日目からの後期投与では, imatinib あるいは EM, CAM 単独では肺線維化を抑制しなかったが, 併用投与において有意にコラーゲン産生が抑制された。

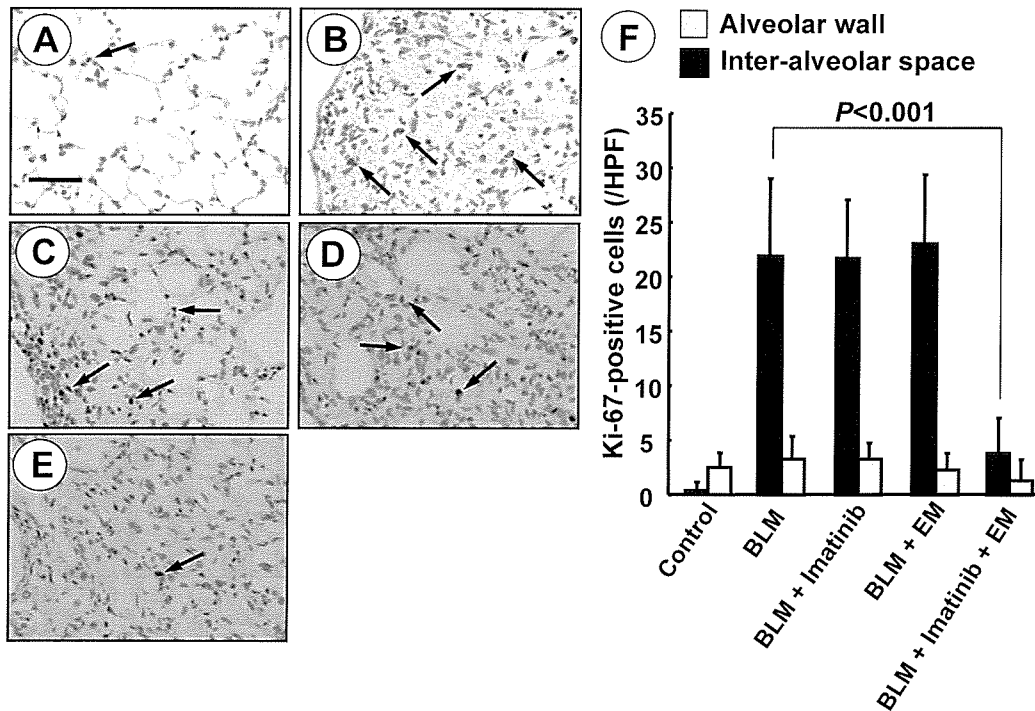


図4 Imatinib と EM 併用による *in vivo* での肺線維芽細胞増殖抑制効果

Ki-67 の抗体を用い免疫染色を行った。その結果, 間質に存在する Ki-67 陽性細胞は Imatinib と EM 併用群で著明に抑制されていることが確認された。さらに蛍光抗体法にて, この間質に存在する Ki-67 陽性細胞は, 同時に S100A4/FSP1 も陽性であり, 線維芽細胞であることが確認された。

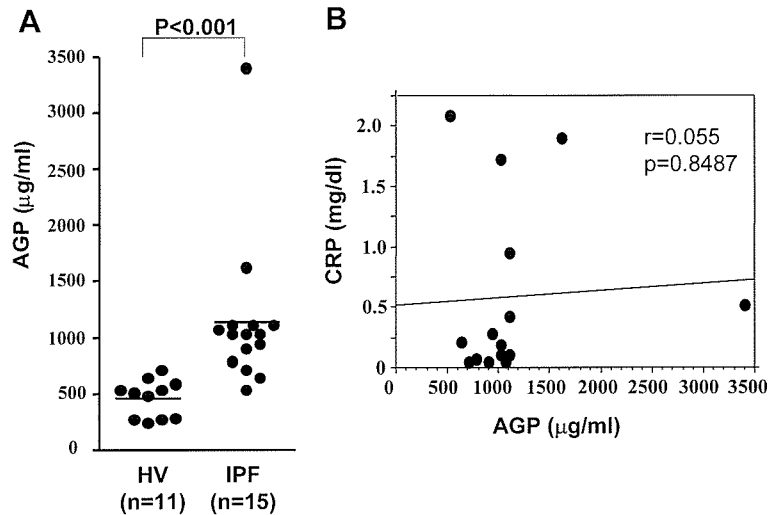


図5 IPF患者血清中のAGP濃度
IPF患者(15人)と健常人(11人)の血清中AGP濃度を測定した。IPFでは有意にAGP濃度が高値であった(A)。同時に測定したAGPとCRP値に相関は見られなかった。

でも14印環マクロライドの併用が有効であった。この結果は、imatinibに治療的な抗線維化効果を期待できることを示唆しており重要な知見と考えられる。我々の検討では800μg/mlのAGP濃度でimatinibの薬剤耐性を改善するためにはEM, CAMの濃度が各々、1μM, 10μM以上必要である。その血中濃度は通常の投与量でマウス、ヒトでも到達し得る濃度であり、imatinibとマクロライドの併用療法は実地臨床においても実施可能なアプローチであることが示唆された。

参考文献

- 1) Aono Y, Nishioka, Y, Inayama M, Kishi J, Ugai M, Uehara H, Izumi K, Sone, S. Imatinib is a novel anti-fibrotic agent in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 171:1179-1185, 2005.
- 2) Gambacorti-Passerini C, Barni R, le Coutre P, Zucchetti M, Cabrita G, Cleris L, Rossi F, Gianazza E, Brueggen J, Cozens R, Pioltelli P, Pogliani E, Corneo G, Formelli F, D'Incalci M. Role of alpha1 acid glycoprotein in the in vivo resistance of human BCR-ABL (+) leukemic cells to the abl inhibitor STI571. *J Natl Cancer Ins.* 92 (20) :1641-50, 2000.
- 3) Gambacorti-Passerini C, Zucchetti M, Russo D, Frapolli R, Verga M, Bungaro S, Tornaghi L, Rossi F, Pilotelli P, Pogliani E, *et al.* of α1 acid glycoprotein binds to imatinib (STI571) and substantially alters its pharmacokinetics in chronic myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 625-632.

エンドトキシン肺障害における MyD88 依存性，非依存生経路による プロテオグリカンとヒアルロン酸の調節機序

谷野 功典 佐藤 俊 王 新涛 石井 妙子
猪腰 弥生 齊藤 香恵 福原 敦朗 齋藤 純平
石田 卓 棟方 充*

プロテオグリカン (PG) とヒアルロン酸 (HA) は肺細胞外マトリックスの構成成分であるとともに肺への炎症細胞の遊走に重要な役割を果たしている。しかし，炎症肺における発現と発現調節機序に関してはよく知られていない。そこで，我々は lipopolysaccharide (LPS) 気管内投与後の肺における PG と HA の発現，およびその発現に対する MyD88 の関与を検討した。Wild-type (WT) C57BL/6 マウスに PBS または LPS を気管内投与し，投与後 2，6，24 時間後の肺での PG と HA の発現を real-time PCR により検討し，更に MyD88 欠損マウスでの LPS 投与後の PG と HA の発現を WT マウスと比較検討した。マウス肺において，LPS 気管内投与 2，6 時間後，versican, hyaluronan synthase (HAS)-1, -2, syndecan-4 の mRNA 発現が著明に上昇した。また，MyD88 欠損マウスを使った検討では，syndecan-4 の上昇には MyD88 依存性経路のみが関与し，versican, HAS-1, -2 の上昇には MyD88 依存性と非依存生経路の両方が関与していることが示された。以上より，LPS による肺での PG と HAS の発現の増加に対する MyD88 依存性と非依存生経路の関与は単一ではなくそれぞれ異なっていることが示唆された。

Lipopolysaccharide Regulates the Expression of Proteoglycans and Hyaluronan through MyD88-Dependent- and Independent-Pathways.

Yoshinori Tanino, Suguru Sato, Xintao Wang, Taeko Ishii
Yayoi Inokoshi, Kazue Saito, Atsuro Fukuhara, Junpei Saito
Suguru Ishida, Mitsuru Munakata

Department of Pulmonary Medicine, School of Medicine, Fukushima Medical University

Proteoglycans (PGs) and hyaluronan (HA) play an important role in regulating cellular phenotype and leukocyte migration in the lungs. Lipopolysaccharide (LPS) activates the innate immune response through Toll like receptor-4 and the Toll-like receptor adaptor molecules, MyD88 and TRIF. To determine the role of the MyD88 signaling pathway in the regulation of PG and HA expression in the lungs, we compared the responses of wild-type (WT) and MyD88 deficient mice to intratracheal LPS. MyD88 deficient mice and WT mice were treated with intratracheal PBS or LPS and then euthanized 2 and 6 h later. The relative amount of mRNA for syndecan (Sdn)-1, -2, -4, perlecan, versican, decorin, biglycan, and HAS-1, -2, and -3 was quantified. LPS significantly increased the expression of versican, HAS-1, HAS-2, and Sdn-4 at 2 and 6 h in WT mice as compared to PBS controls. MyD88 dependent pathways were responsible for the increased expression of Sdn-4. In contrast, versican, HAS-1, and HAS-2 expression was regulated through MyD88 dependent- and independent-pathways. Taken together, we conclude that the expression of specific PGs and HAS is upregulated very early to LPS by MyD88 dependent- and independent-signaling pathways and the rapid increase in versican, HAS-1, HAS-2, and Sdn-4 mRNA suggests an important role for these molecules in lung inflammation.

はじめに

プロテオグリカンは、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ケラタン硫酸などのグリコサミノグリカンといわれる硫酸化多糖がコア蛋白に共有結合してできる糖タンパクであり、細胞外マトリックスの一種である。また、ヒアルロン酸はコア蛋白に結合していないグリコサミノグリカンで hyaluronan synthase-1 (HAS-1), HAS-2, HAS-3 の3つの酵素によって細胞表面で合成される。近年、プロテオグリカンとヒアルロン酸は組織の構造を維持する単なる glue ではなく、肺の発生や炎症、組織の修復過程に重要な役割を担っていることが報告されているが、lipopolysaccharide (LPS) による肺障害においてそれぞれのプロテオグリカンやヒアルロン酸合成酵素がどのように発現しているかについては知られていない。

Toll-like receptor (TLR) は細菌性抗原を認識し、宿主の初期免疫反応に重要な役割を果たしており、グラム陰性菌の細胞壁の成分である LPS は Toll-like 4 (TLR4) /MD-2/CD14 の受容体複合体を介して初期免疫反応を引き起こす。LPS は TLR4 に結合すると MyD88 と TRIF によるシグナルが細胞を活性化し、組織における種々の炎症反応を引き起こす。

本研究において、我々は LPS が肺においてどのようなプロテオグリカンやヒアルロン酸合成酵素を上昇させるのか、またこの過程において MyD88 依存性と非依存性経路がどのように関与しているかを検討した。

方 法

実験 1) Wild-type (WT) C57BL/6 マウスに PBS または LPS (1 mg/kg) を気管内投与し、投与後 2, 6, 24 時間後の肺でのプロテオグリカンとヒアルロン酸合成酵素の発現を定量的 real-time PCR により検討した。

実験 2) MyD88 欠損マウスを使用し、LPS 投与後のプロテオグリカンとヒアルロン酸合成酵素の発

現を WT マウスと比較検討した。

結 果

実験 1) LPS 気管内投与、肺においてコンドロイチン硫酸プロテオグリカンでは decorin, biglycan の発現は変わらなかったが、versican は 2, 6 時間後に上昇した (Figure 1A)。ヘパラン硫酸プロテオグリカンでは、perlecan, syndecan-1, syndecan-2 には変化がみられず、syndecan-4 のみが投与後 2, 6 時間で上昇した (Figure 1B)。ヒアルロン酸合成酵素では HAS-1, HAS-2 は上昇したが、HAS-3 には変化がみられなかった (Figure 1C, D)。

実験 2) LPS 投与後、MyD88 欠損マウス肺における versican, HAS-1, HAS-2 の発現は、PBS を投与したマウスと比較し有意に上昇がみられたが、LPS を投与した WT マウスよりも低値であった (Figure 2A, C, D)。一方、肺における syndecan-4 の発現は、LPS 投与後 WT マウスでは PBS を投与したマウスと比較して上昇が認められたが、MyD88 欠損マウスでは LPS 投与後にも変化がみられなかった (Figure 2B)。

結論と考察

我々はマウス LPS 肺障害モデルを使用して肺におけるプロテオグリカンとヒアルロン酸合成酵素の発現を検討した。本研究では LPS 投与後の肺において versican, syndecan-4, HAS-1, HAS-2 の上昇が認められ、syndecan-4 の上昇には MyD88 依存性経路のみが関与していたのに対し、versican, HAS-1, HAS-2 の上昇には MyD88 依存性と非依存性経路の両方が関与していることが示された。

これまで、種々の肺疾患においてコンドロイチン硫酸プロテオグリカンである versican, decorin, biglycan が上昇すること^{2,3)}や、ヒアルロン酸が炎症肺で増加し炎症反応を惹起すること⁴⁾が報告されている。LPS による炎症ではヘパラン硫酸優位の正常肺がコンドロイチン硫酸優位に変化することが報告されている⁵⁾が、LPS による炎症反応のそれぞれのプロテオグリカンやヒアルロン酸合成酵素に対する影響については検討されていなかった。今回、LPS 肺障害で発現の増加が認められた

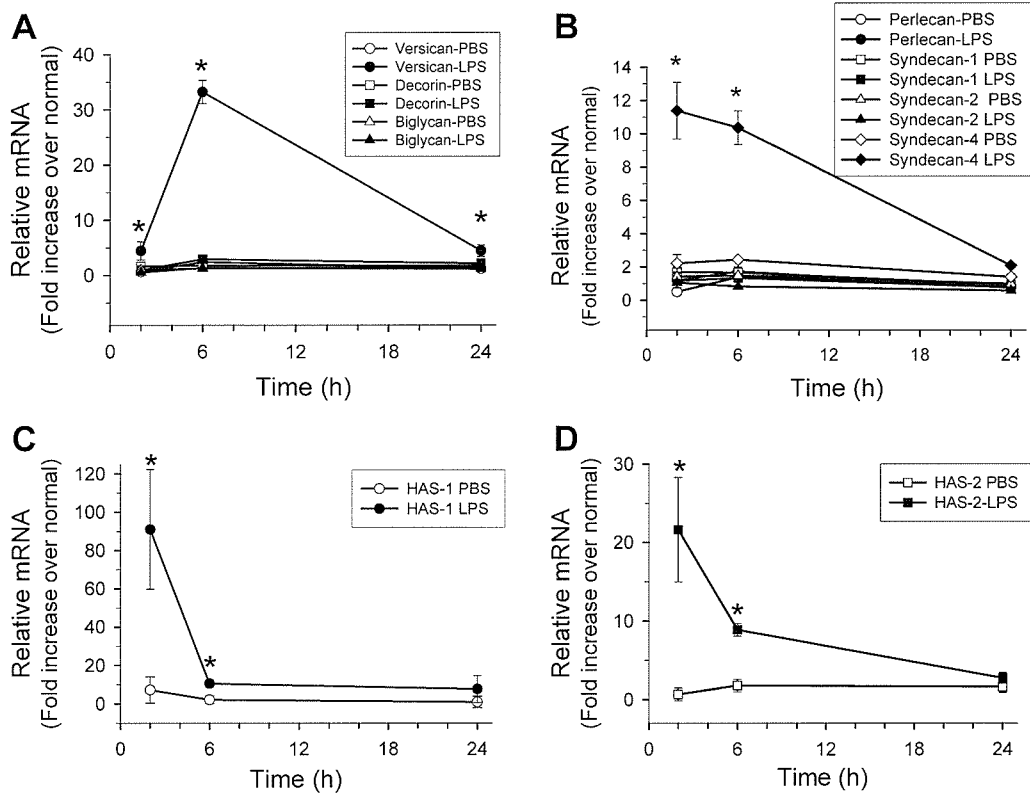


Figure 1 Real time quantitative PCR for CSPG (A), HSPG (B), HAS-1 (C) and HAS-2 (D) in PBS and LPS treated lungs. HAS-3 mRNA expression was not increased in LPS treated mice at 2 or 6 hours (data not shown). Values are the mean \pm SEM with $n = 3$.

* significantly different from PBS treated lungs using Mann-Whitney's U-test and a $p \leq 0.05$.

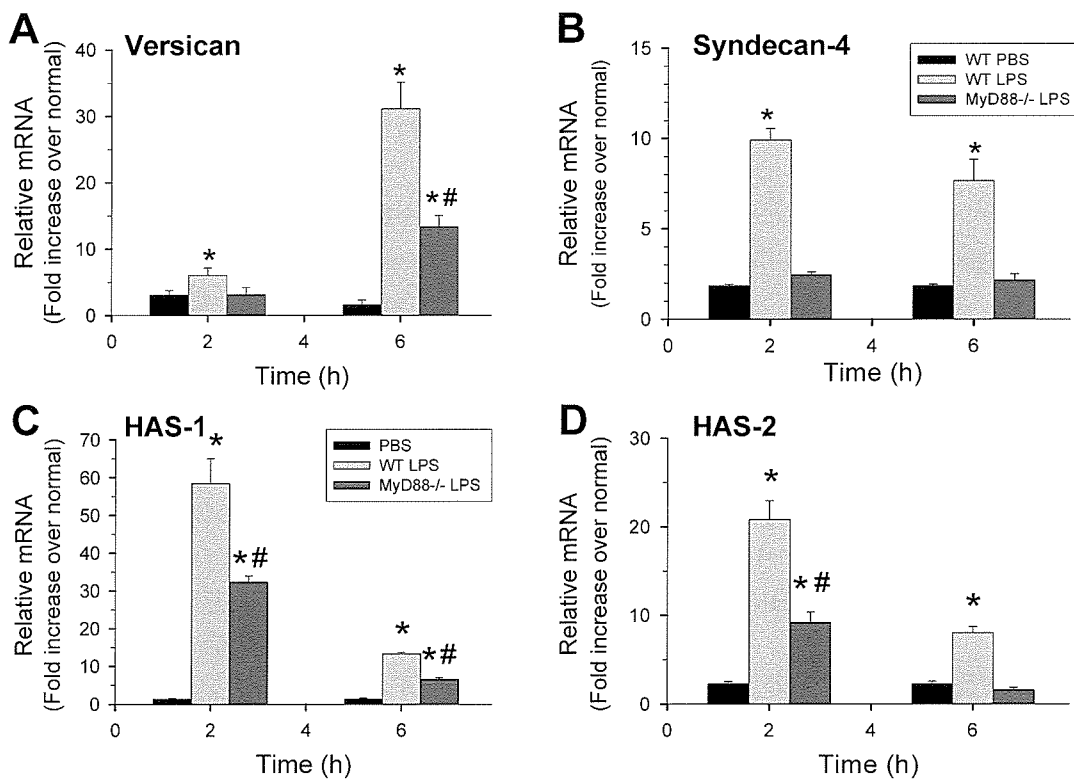


Figure 2 Quantitative real time PCR showing changes in versican (A), syndecan-4 (B), HAS-1 (C) and -2 (D) mRNA at 2 and 6 h after the intratracheal instillation of PBS or LPS in WT or MyD88^{-/-} mice. Values are the mean \pm SEM with $n = 3$.

* $p \leq 0.05$ vs PBS treated lung. # $p \leq 0.05$ vs WT mice treated with LPS.

syndecan-4 は, 種々の細胞表面に発現しているヘパラン硫酸プロテオグリカンであり, syndecan-4 欠損マウスが WT マウスと比較して LPS による敗血症に対する致死率が低いこと⁶⁾が報告され, 炎症性肺疾患における役割が示唆されている. Versican は肺間質に存在し細胞の apoptosis に対して抑制的に働くこと^{7,8)}や, ヒアルロン酸はそれ自身が TLR を介した炎症反応に関与したり, NF- κ B の活性化を介して apoptosis を抑制すること³⁾も報告され, これらのプロテオグリカン, ヒアルロン酸は肺の炎症・修復過程において重要な役割を果たしていると考えられる.

今後, LPS 肺障害におけるプロテオグリカン, ヒアルロン酸の発現機序を検討し, 発現の調節を行うことが肺の炎症・修復過程の病態の修飾を可能にして, 種々の炎症性肺疾患の治療に役立つことが期待される.

参考文献

- 1) Beutler B, *et al.*, Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*, 430:257-63, 2004.
- 2) Bensadoun ES, *et al.*, Proteoglycan deposition in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 154:1819-28, 1996.
- 3) Bensadoun ES, *et al.*, Proteoglycans in granulomatous lung diseases. *Eur Respir J*, 10:2731-7, 1997.
- 4) Jiang D, *et al.*, Regulation of lung injury and repair by Toll-like receptors and hyaluronan. *Nat Med*, 11:1173-9, 2005.
- 5) Blackwood RA, *et al.*, Glycosaminoglycan synthesis in endotoxin-induced lung injury. *Proc Soc Exp Biol Med*, 174:343-9, 1983.
- 6) Ishiguro K, *et al.*, Syndecan-4 deficiency leads to high mortality of lipopolysaccharide-injected mice. *J Biol Chem*, 276:47483-8, 2001.
- 7) Sheng W, *et al.*, The roles of versican V1 and V2 isoforms in cell proliferation and apoptosis. *Mol Biol Cell*, 16:1330-40, 2005.
- 8) Wu Y, *et al.*, Versican protects cells from oxidative stress-induced apoptosis. *Matrix Biol*, 24:3-13, 2005.

マウス肺線維症モデルに対する PDGF 受容体アンタゴニストの効果

長瀬 洋之 吉原 久直 石田 博文 大田 健*

肺の線維化には線維芽細胞の増殖が深く関与しており，PDGF (platelet derived growth factor) は線維芽細胞の遊走・増殖因子である．PDGF の作用を阻害すると，動物モデルの肺線維化が抑制されることや，ヒトの特発性肺線維症患者由来の肺胞マクロファージで，PDGF 発現が亢進していることが報告されており，PDGF の阻害は肺線維症の有用な治療戦略と想定される．

今回，我々は既に狭心症治療薬として臨床応用され，PDGF 受容体アンタゴニストである trapidil によって，マウスにおけるシリカ肺線維症病態を抑制できるかどうかを検討した．C57BL/6 マウスに，シリカ粒子を点鼻投与し，翌日より 14 日間連続で trapidil を腹腔内投与し，15 日目に解析した．シリカ点鼻投与によって有意に増加した気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の総細胞数，リンパ球数，好中球数，マクロファージ数が trapidil によって有意に抑制された．また，線維化の生化学的指標であるヒドロキシプロリン量も有意に抑制され，組織学的にも，肺胞隔壁の肥厚や，炎症細胞浸潤が抑制された．以上から，シリカによるマウス肺線維症モデルにおいて，trapidil は炎症細胞浸潤，線維化の双方を抑制することが示された．今回の結果は，マウス肺線維症モデルにおける PDGF 経路の重要性を示唆するとともに，PDGF 経路を抑制する治療戦略として，既に臨床使用されている trapidil がひとつの選択肢たりうる可能性を示唆したものと考えられる．

目的・背景

肺の線維化には線維芽細胞の増殖が深く関与している。PDGF (platelet derived growth factor) は線維芽細胞の遊走因子、増殖因子であり、線維芽細胞分裂に対して、G₀期からG₁早期にまで誘導する competence factor として働く¹⁾。また、*In vitro* では、IL-1²⁾、TGF-β³⁾等の機能の一部は、PDGFの発現増強を介して作用を発揮することが示されている⁴⁾。*In vivo*でも、マウス肺にPDGF-Bを強制発現すると、胞隔肥厚や肺線維化が亢進することが報告されている⁵⁾。また、PDGFの作用を阻害すると、動物モデルの肺線維化が抑制されることも示されており、マウスのプレオマイシン肺傷害モデルでは、PDGF-Rβを阻害することで、肺傷害が抑制される⁶⁾。さらに、ヒトにおける検討でも、特発性肺線維症患者から採取した肺胞マクロファージでは、PDGF-AやPDGF-B mRNAの発現や、PDGF蛋白の産生が亢進していることが報告されている^{7,8)}。以上の知見から、PDGFの肺線維化における役割の重要性が示唆されており、その阻害は有用な治療戦略と想定される。

今回、我々はPDGF受容体アンタゴニストであるtrapidil投与によって、マウスにおける肺線維症病態を抑制できるかどうかを検討した。Trapidilは既に狭心症治療薬として臨床応用されているが、線維症病態の抑制効果をシリカ投与によるマウス肺障害モデルで検討することとした。

方法 (図1)

試薬: Trapidil 原末は塩野義製薬 (大阪) より供与された。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。

動物: C57BL/6: 6週齢♂を用いた。シリカ粒子懸濁液 16 mg/匹を各マウスにエーテル麻酔下で点鼻投与した。Trapidil は生理食塩水で溶解し、シリカ点鼻投与翌日より、14日

間連続で腹腔内投与 (i. p.) した。対照群として、control 群: 無処置, シリカ点鼻+生理食塩水 i. p. 群, trapidil i. p. 群を設定した。

解析: シリカ投与 14 日後に気管支肺胞洗浄 (BAL) を行い、細胞分画、細胞数を検討した。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キシプロリン量を測定した。組織学的検討も行った。

統計: データは平均値 ± 標準誤差で示す。one-way ANOVA で有意差を認めた場合、Fisher's PLSD test で群間比較を行った。

結果

シリカ点鼻投与によって、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の総細胞数が有意に増加した。一方、trapidil 投与群では、シリカによる BALF 総細胞数増加が有意に抑制された (図2)。Trapidil 単独投与では、総細胞数に有意な変化は認められなかった。細胞分画別に検討すると、シリカ投与により有意に増加したリンパ球数、好中球数、マクロファージ数を trapidil は有意に抑制した (図3)。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、0.5 mg/日の trapidil で有意に抑制された (図4)。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5)。以上から、シリカによるマウス肺線維症モデルにおいて、trapidil は炎症細胞浸潤、線維化の双方を抑制することが示された。

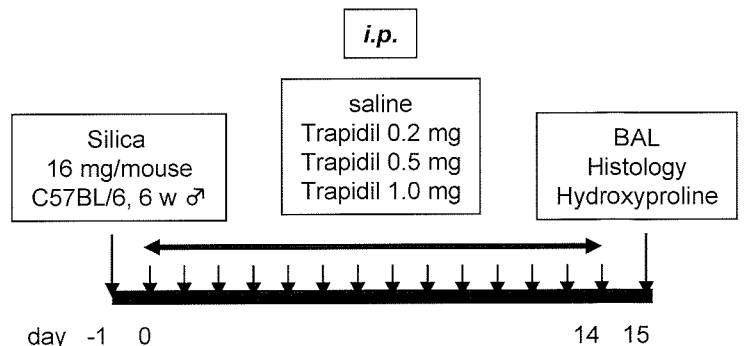


図1 実験プロトコル

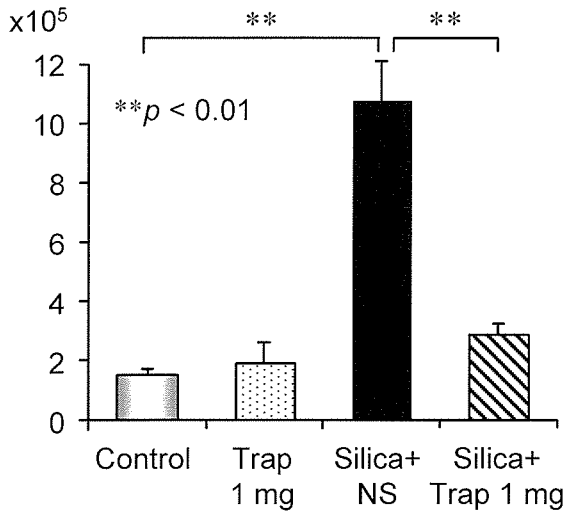


図2 BALF 総細胞数

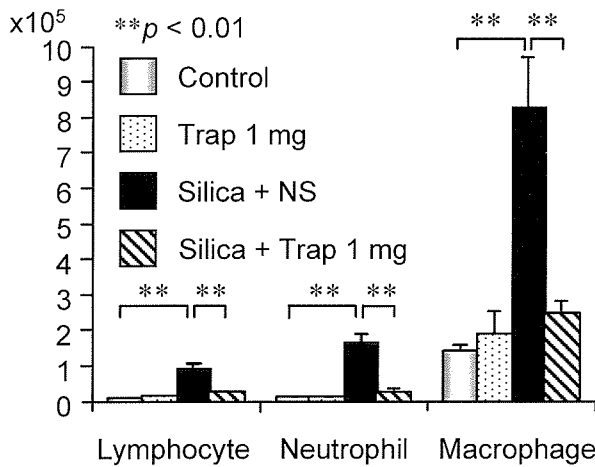


図3 BALF 細胞分画

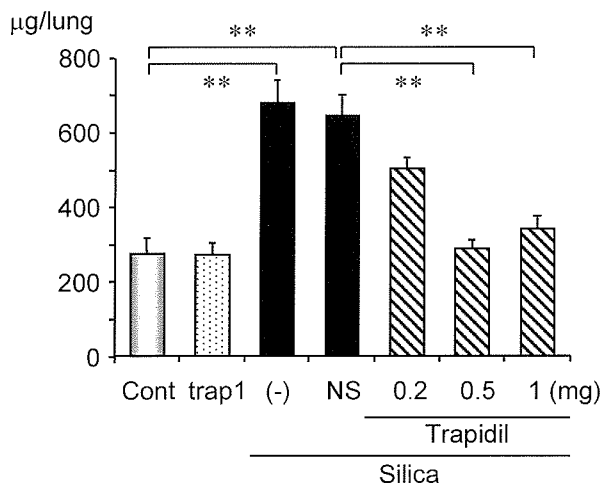


図4 ハイドロキシプロリン量

考 察

今回の検討の結果, PDGF 阻害作用をもつ trapidil が, マウスのシリカ肺線維症モデルの病態を抑制することが示された. Trapidil は冠血管拡張薬として開発され, PTCA 後の再狭窄をアスピリンと同等に予防することが示されている⁹⁾. ヒトにおける投与量は 300 mg/日 (6 mg/kg) であり, 今回のマウスへの投与量は: 25 ~ 50mg/kg である.

Trapidil の PDGF 阻害作用に関しては, *in vitro* では, PDGF-BB によるヒト腎メサンギウム細胞の増殖を抑制することが示されており, PDGF-BB を競合的に阻害すると報告されている¹⁰⁾. また *in vivo* では, trapidil はウサギ動脈損傷モデルにおいて, PDGF で発現が誘導されるケモカイン MCP-1 の発現を抑制することが示されている¹¹⁾. さらに, ラット動脈損傷モデルにおいて, PDGF-A, B の蛋白発現自体も抑制すること, 受容体に関しても PDGF-R α , R β mRNA 発現を抑制することが示されている¹²⁾. 我々は, PDGF のアンチセンスがシリカ肺線維症モデルにおいて線維化を抑制したことを観察しており¹³⁾, 今回の肺病変の抑制効果も, 少なくとも一部は PDGF 作用の抑制を介している可能性が高い. さらに, trapidil は *in vitro* で PDE (phosphodiesterase) 活性¹⁴⁾, TXA₂ 産生¹⁵⁾, CD40 の下流シグナルを抑制すること¹⁶⁾ が報告されており, これらの経路が関与している可能性は考えられる. 今後, trapidil によって, 線維化のみならず炎症細胞浸潤も抑制された機序について, BALF や肺組織におけるケモカインやサイトカインの解析を通してさらに明らかにしたい.

近日は, PDGF-A や PDGF-B 産生を抑制する pirfenidone が, 実験的に¹⁷⁾, また臨床的に¹⁸⁾, 肺線維症に対して有効であることが報告されている. また, PDGF のシグナル経路を抑制する imatinib が肺線維化を抑制する実験的知見が報告されている¹⁹⁻²¹⁾. 今回の結果は, マウス肺線維症モデルにおける PDGF 経路の重要性を示唆するとともに, PDGF 経路を抑制する治療戦略として, 既に臨床使用されている trapidil がひとつの選択肢たりうる可能性を示唆したものと考えられる.

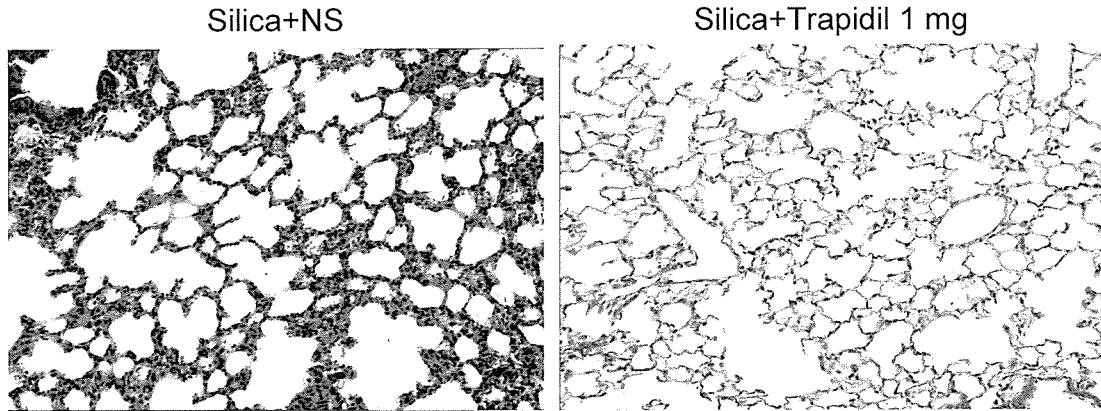


図5 組織学的検討

参考文献

- 1) Ross R, Glomset J, Kariya B, Harker L. A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974; 71:1207-10.
- 2) Raines EW, Dower SK, Ross R. Interleukin-1 mitogenic activity for fibroblasts and smooth muscle cells is due to PDGF-AA. *Science* 1989; 243:393-6.
- 3) Bategay EJ, Raines EW, Seifert RA, Bowen-Pope DF, Ross R. TGF-beta induces bimodal proliferation of connective tissue cells via complex control of an autocrine PDGF loop. *Cell* 1990; 63:515-24.
- 4) Lasky JA, Brody AR. Interstitial fibrosis and growth factors. *Environ Health Perspect* 2000; 108 S4:751-62.
- 5) Hoyle GW, Li J, Finkelstein JB, Eisenberg T, Liu JY, Lasky JA, *et al.* Emphysematous lesions, inflammation, and fibrosis in the lungs of transgenic mice overexpressing platelet-derived growth factor. *Am J Pathol* 1999; 154:1763-75.
- 6) Yoshida M, Hayashi S. Role of TGF-beta and PDGF on the pathogenesis of pulmonary fibrosis--analysis by in vivo gene transfer. *Nippon Rinsho* 1996; 54:418-22.
- 7) Martinet Y, Rom WN, Grotendorst GR, Martin GR, Crystal RG. Exaggerated spontaneous release of platelet-derived growth factor by alveolar macrophages from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 1987; 317:202-9.
- 8) Nagaoka I, Trapnell BC, Crystal RG. Upregulation of platelet-derived growth factor-A and -B gene expression in alveolar macrophages of individuals with idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 1990; 85:2023-7.
- 9) Maresta A, Balducelli M, Cantini L, Casari A, Chioin R, Fabbri M, *et al.* Trapidil (triazolopyrimidine), a platelet-derived growth factor antagonist, reduces restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. Results of the randomized, double-blind STARC study. *Studio Trapidil versus Aspirin nella Restenosi Coronarica. Circulation* 1994; 90:2710-5.
- 10) Gesualdo L, Di Paolo S, Ranieri E, Schena FP. Trapidil inhibits human mesangial cell proliferation: effect on PDGF beta-receptor binding and expression. *Kidney Int* 1994; 46:1002-9.
- 11) Poon M, Cohen J, Siddiqui Z, Fallon JT, Taubman MB. Trapidil inhibits monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage accumulation after balloon arterial injury in rabbits. *Lab Invest* 1999; 79:1369-75.
- 12) Deguchi J, Abe J, Makuuchi M, Takuwa Y. Inhibitory effects of trapidil on PDGF signaling in balloon-injured rat carotid artery. *Life Sci* 1999; 65:2791-9.
- 13) Ohta K, Nakano J, Nishizawa M, Kaneta M, Nakagome K, Makino K, *et al.* Suppressive effect of antisense DNA of platelet-derived growth factor on murine pulmonary fibrosis with silica particles. *Chest* 1997; 111:105S.

- 14) Mazurov AV, Menshikov M, Leytin VL, Tkachuk VA, Repin VS. Decrease of platelet aggregation and spreading via inhibition of the cAMP phosphodiesterase by trapidil. FEBS Lett 1984; 172:167-71.
- 15) Ohnishi H, Kosuzume H, Hayashi Y, Yamaguchi K, Suzuki Y, Itoh R. Effects of trapidil on thromboxane A2-induced aggregation of platelets, ischemic changes in heart and biosynthesis of thromboxane A2. Prostaglandins Med 1981; 6:269-81.
- 16) Zhou L, Schandene L, Mordvinov VA, Chatelain P, Pradier O, Goldman M, *et al.* Trapidil inhibits monocyte CD40 expression by preventing IFN-gamma-induced STAT1 S727 phosphorylation. Int Immunopharmacol 2004; 4:863-71.
- 17) Gurujeyalakshmi G, Hollinger MA, Giri SN. Pirfenidone inhibits PDGF isoforms in bleomycin hamster model of lung fibrosis at the translational level. Am J Physiol 1999; 276:L311-8.
- 18) Azuma A, Nukiwa T, Tsuboi E, Suga M, Abe S, Nakata K, *et al.* Double-blind, placebo-controlled trial of pirfenidone in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Am J Respir Crit Care Med 2005; 171:1040-7.
- 19) Abdollahi A, Li M, Ping G, Plathow C, Domhan S, Kiessling F, *et al.* Inhibition of platelet-derived growth factor signaling attenuates pulmonary fibrosis. J Exp Med 2005; 201:925-35.
- 20) Chaudhary NI, Schnapp A, Park JE. Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model. Am J Respir Crit Care Med 2006; 173: 769-76.
- 21) Aono Y, Nishioka Y, Inayama M, Ugai M, Kishi J, Uehara H, *et al.* Imatinib as a novel antifibrotic agent in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. Am J Respir Crit Care Med 2005; 171:1279-85.

研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

雑 誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
A Azuma, S Kudoh	Invited Review: Diffuse Pnabronchiolitis in East Asia.	Respirology	11	249-261	2006
K Ohara, T Takahashi, A Azuma, S Kudoh	Ocular Sarcoidosis	SARCOIDOSIS Edt. Robert P Baughman, Taylor & Francis, Marchal Dekker	ISBN: 08247 59265	553-570	2006
Y Miyake, S Sasaki, T Yokoyama, K Chida, A Azuma, T Suda, S Kudoh, N Sakamoto, K Okamoto, G Kobashi, M Washio, Y Inaba, H Tanaka.	Dietary Fat and Meat Intake and Idiopathic Pulmonary Fibrosis: A Case-control Study in Japan	Int J Tuberc Lung Dis	10 (3)	333-339	2006
YJ Li, A Azuma, J Usuki, K Matsuda, S Abe, S Kudoh, T Kawada, S Takahashi, T Sunazuka, S Omura	EM703, A New Derivative of Erythromycin, Improves Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice by Inhibition of TGF- β Signaling in Fibroblasts	Respiratory Res	7 (1)	16	2006
A Matsumoto, K Hiramatsu, A Azuma S Kudoh Yingji Li, H Takizawa, I Sugawara	Repeated Exposure To Low-Dose Diesel Exhaust After Allergen Challenge Exaggerates Asthmatic Responses In Mice	Clin Innumol	121 (2)	227-235	2006
Y Seo, S Abe, M Kurahara, D Okada, Y Saito, J Usuki, A Azuma, K Koizumi, S Kudoh	Beneficial effect of Polymyxin B-immobilized fiber column (PMX) Hemoperfusion Treatment on Acute Exacerbation of Idiopathic Pulmonary Fibrosis	Inter Med	45 (18)	1033-8	2006
Fuse ET, Tateda K, Kikuchi Y, Matsumoto T, Gondaira F, Azuma A, Kudoh S, Standiford TJ, Yamaguchi K	Role of Toll-like receptor 2 in recognition of Legionella pneumophila in a murine pneumonia model	J Med Microbiol	56	305-12	2007
奥村昌夫, 岩井和郎, 尾形英雄, 吉山崇, 吉森浩三, 水谷清二, 杉田博宣, 吾妻安良太, 工藤翔二	肺 Mycobacterium avium complex (MAC) 症の結核類似空洞型と結節性気管支拡張型, その発症要因ならびに予後因子に関する臨床的検討	日本呼吸器学会誌	44	3-11	2006
吾妻安良太, 高橋光良, 鹿住祐子, 田中さゆり, 吉山崇, 尾形英雄, 中島由槻, 吾妻安良太, 工藤翔二	肺 Mycobacterium avium コメディカルのための疾患知識 (看護教育シリーズ) vol 14	日本呼吸器学会誌 びまん性肺疾患 2. ビデオ (VHS) MEDICAL VISION	44	91-98	2006
瀬尾宜嗣, 吾妻安良太, 工藤翔二	特発性肺線維症	モダン・フィジシャン (企画編集: 滝沢 始)	26	361-366	2006
吾妻安良太	薬剤性肺障害の遺伝性素因と人種差	日本医師会雑誌	134	2111-2115	2006
吾妻安良太	Q&A 特発性間質性肺炎診断・治療ガイドラインの意味するもの	The Lung perspective	13	327-329	2006
藤田和恵, 吾妻安良太, 工藤翔二	間質性肺炎のガイドラインー特発性間質性肺炎 (IIPs) 第4次改訂診断基準による診断と治療ー	呼吸器科	9 (3)	256-265	2006
藤田和恵, 吾妻安良太	ピルフェニドン	医学のあゆみ			2006
吾妻安良太	6. 特発性肺線維症の新しい治療. トレーニング問題	日本内科学会雑誌	95	1069-1075	2006

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
松本亜紀, 吾妻安良太	特集インターフェロン治療学, 特発性肺線維症	日本臨床	64 (7)	1354-1360	2006
吾妻安良太, 神尾孝一郎, 土方美奈子, 慶長直人	びまん性汎再気管支炎の疾患感受性遺伝子	呼吸と循環	54 (8)	801-805	2006
吾妻安良太	薬剤性肺障害の現状と問題点	呼吸と循環	54 (10)	1071-1076	2006
吾妻安良太, 工藤翔二	薬剤起因性間質性肺炎4. 薬剤起因性間質性肺炎に人種差はあるのか	治療学	40 (11)	1226-1230	2006
Miwa S, Uchida C, Kitagawa K, Hattori T, Oda T, Sugimura H, Yasuda H, Nakamura H, Chida K, Kitagawa M	Mdm-mediated pRB downregulation is involved in carcinogenesis in a p53-independent manner	BBRC	340	54-61	2006
妹川史朗, 佐野武尚, 戸舘亮人, 内山 啓, 安田和雅, 永山雅晴, 櫻本紀之, 須田隆文, 千田金吾	シベレスタット及びステロイド剤の使用で改善した間質性肺炎による急性呼吸不全の2例	日本呼吸器学会雑誌	44 (1)	27-33	2006
千田金吾	特集2喘息診断のひけつ 喘息をする病気とは? 喘息以外で喘鳴をする疾患があるのですか?	Q & Aでわかるアレルギー-疾患	2 (1)	57-59	2006
千田金吾	間質性肺炎とは	呼吸器&循環器ケア	6 (1)	20-24	2006
千田金吾	特発性間質性肺炎のプロフィール	呼吸器&循環器ケア	6 (1)	25-30	2006
千田金吾	特発性間質性肺炎の臨床所見, 検査法と解釈	呼吸器&循環器ケア	6 (1)	31-35	2006
千田金吾	間質性肺炎の治療と看護	呼吸器&循環器ケア	6 (1)	36-41	2006
千田金吾	呼吸器系疾患の病態生理と治療薬	器管別病態生理と治療薬		579-630	2006
豊嶋幹生, 橋本 大, 千田金吾	好酸球性肺炎における好酸球性炎症の病態と制御	呼吸と循環	54 (3)	241-246	2006
Miyake Y, Sasaki S, Yokoyama T, Chida K, Azuma A, Suda T, Kudoh S, Sakamoto N, Okamoto K, Kobashi G, Washio M, Inaba Y, Tanaka H, Japan idiopathic pulmonary fibrosis study group	Dietary fat and meat intake and idiopathic pulmonary fibrosis: a case-control study in Japan	Int J tuberc lung dis	10 (3)	333-339	2006
黒石重城, 千田金吾	好中球エラスターゼ阻害剤(エラスポール)の治療効果	呼吸器科	9 (4)	382-386	2006
千田金吾	呼吸器感染症に対する経口抗菌薬の比較検討 感染症と化学療法	ラジオNIKKEIアポット感染症アワードダイジェスト版			2006
杉山幸比古, 千田金吾, 小倉高志, 山口 哲, 宮崎邦夫	びまん性肺疾患をどう診るか	日本内科学会雑誌	95 (6)	1076-1093	2006
須田隆文, 千田金吾	呼吸不全	内科	98 (1)	65-68	2006