

図3 SP-C 変異の位置と構造変化

も招来している可能性が示唆された。また, exon2 の変異を認めた症例 (V49A) では, 図 2, 3 に示すように mature SP-C 蛋白の Valine rich な膜貫通領域の Valine が alanine へ置換していた。これは, 蛋白の構造解析をしてみると α -helix 構造の消失をまねいていることが明らかになった。SP-C 蛋白を人工的に処理し, α -helix 構造が消失させるとアミロイドフィブリルへ変換されることがわかっていることを考え合わせると有効な surfactant 機能が維持できていないことが推測される。

今後の展望

本研究 SP-C 遺伝子変異以外に 2 つの興味ある知見がえられた。1) SP-C 遺伝子変異と ATP-binding cassette A3 (ABCA3) 遺伝子変異を併存している重篤な間質性肺炎症例を同定した。この症例と同じ ABCA3 遺伝子変異を持ちながら間質性肺炎を発症している症例と発症していない症例も存在することを発見した。臨床的にも間質性肺炎発症例では, ABCA3 遺伝子変異単独では慢性で症状も軽度であった。ABCA3 が surfactant 生成に関わる lamellar body 形成にかかわる¹²⁾ ことから SP-C 遺伝子変異による間質性肺炎の重症度等に影響を与えていることが推測された。Nogge らも, I73T 変異 SP-C を持つ症例で本症例同様 ABCA3 遺伝子変異を併存している症例ほど重篤であったと報告している¹³⁾。Surfactant 蛋白生成

から間質性肺炎の成因を考える時, SP-B, SP-C, ABCA3, HPS-1 等の複数の因子が絡み合って病勢や発症を複雑にしている可能性が考えられた。2) 3代にわたる SP-C 遺伝子変異をもつ家族性間質性肺炎の 1 家系で発症が世代を経る毎に速くなる症例を明らかにした。複数の因子が関係していることが推測される。この因子の一つに米国より報告された hTERT 遺伝子変異が挙げられる¹⁴⁾。これはテロメアの長さを調節しているため, たとえば肺泡 II 型上皮細胞に TERT 遺伝子の変異があれば, 炎症修復が繰り返されればこの細胞の寿命も短くなる。したがって SP-C 遺伝子変異等が誘因となり炎症修復が加わることでより肺泡 II 型上皮細胞の寿命もさらに短くなることが予想される。

SP-C や ABCA3 遺伝子変異による間質性肺炎もはじめ単一遺伝子異常として考えられていたが単一遺伝子の変異だけでは説明が困難なことも出てきており, 複雑に種々の関連する遺伝子異常が絡み合って病態を形成していることが明らかになりつつある。このような意味で特発性間質性肺炎においても同一環境でも発症に差異があることから genetic な要素は必ず存在しているはずであり, これまで報告された遺伝子変異の中には特発性間質性肺炎と共通の因子が存在する可能性もあり臨床情報と対比しながら検索していくことが重要であると考えられる。また, 治療においても本研究のような SP-C 遺伝子の変異のように細胞内分子の動態異常が誘因となるような間質性

肺炎の場合、肺胞 II 型上皮細胞を標的とした small molecule 治療薬の開発の可能性を有している。

謝 辞

ABC-A3 構造解析と機能解析

京都大学大学院医学研究科糖尿病・栄養内科学 稲垣暢也

秋田大学医学部機能制御医学講座細胞制御学分野 坂 信広 松村欣宏

症例紹介施設

神奈川県立循環呼吸器センター

札幌医科大学第三内科

多摩南部病院内科

順天堂大学医学部呼吸器内科

坪井病院内科

日本医科大学第四内科

広島大学大学院分子内科

岩手医科大学 NICU

磐田市立総合病院小児科

大阪大学医学部小児科

京都大学医学部小児科

岸和田市立病院小児科

信州大学医学部小児科

聖マリア病院母子総合医療センター新生児科

西埼玉中央病院小児科

東北大学医学部小児科

姫路赤十字病院小児科

藤沢市民病院小児科

琉球大学医学部小児科

参考文献

- 1) Nogee LM. Genetics of the hydrophobic surfactant proteins. *Biochem Biophys Acta* 1408: 323-333, 1998
- 2) Whitsett JA, Weaver T. Hydrophobic surfactant protein in lung function and disease. *N Engl J Med* 347: 2141-2148, 2002
- 3) Nogee LM, Dunbar AE, Wert SE, Askin F, Hamvas A, Whitsett J. A mutation in the surfactant protein C gene associated with familial interstitial lung disease. *N Engl J Med* 344: 573-579, 2001

- 4) Thomas AQ, Lane K, Phillips J III, Prince M, Markin C, Speer M, Schwartz DA, Gaddipati R, Marney A, Johnson J. Heterozygosity for a surfactant protein c gene mutation associated with usual interstitial pneumonia and cellular nonspecific interstitial pneumonitis in one kindred. *Am J Respir Crit Care Med* 165: 1322-1328, 2002.
- 5) 瀬戸口靖弘, 福地義之助 家族集積性特発性間質性肺炎の臨床像と sp-C 遺伝子変異についての検討 厚生労働省科学研究費補助金 難治性疾患克服調査研究班 平成 16 年度報告書 65-70, 2005
- 6) Setoguchi Y, Ikeda T, Fukuchi Y. Clinical features and genetic analysis of surfactant protein C in adult-onset familial interstitial pneumonia. *Respirology* 11: S41-S45, 2006
- 7) Du Bois RM Genetics of interstitial lung disease; in Cstabel U, Du Boi RM, Egan JJ (eds): Diffuse parenchymal lung disease. *Prog Respir Res. Karger. Basel*, 2007, pp. 70-86
- 8) Setoguchi Y, Kohno Y, Abe T, Hattori N. Identification of novel mutation in the surfactant protein C gene and ABC-A3 gene in patients with familial interstitial pneumonia or sporadic interstitial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 175: A148, 2007
- 9) Sanchez-Pulido L, Devos D, Valencia A. BRICHOS: a conserved domain in proteins associated with dementia, respiratory distress and cancer. *Trends Biochem Sci* 27: 329-332, 2002
- 10) Mulugeta S, Nguyen V, Russo SJ, Muniswamy M, Beers MF. A surfactant protein C precursor protein BRICHOS domain mutation causes endoplasmic reticulum stress, proteasome dysfunction, and caspase 3 activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32: 521-530, 2005
- 11) Wang W-J, Mulugeta S, Russo SJ, Beers MI. Deletion of exon 4 from human surfactant protein C results in aggresome formation and degeneration of a dominant negative. *J Cell Sci* 116: 683-692, 2003
- 12) Yamano G, Funahashi H, Kawanami O, Zhao L-X, Ban N, Uchida Y, Morohoshi T, Ogawa J, Shioda S, Inagaki N. ABCA3 is a lamellar body membrane protein in human lung alveolar type II cells. *FEBS*

Lett 508 : 221-225, 2001

- 13) Bullard JE, Noguee LM. Heterozygosity for ABCA3 mutations modifies the severity of lung disease associated with a surfactant protein C gene (SFTPC) mutation. *Pediatr Res* 62 : 176-179, 2007
- 14) Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD, Alder JK,

Ingersoll RG, Markin C, Lawson WE, Xie M, Vulto I, Phillips JA 3rd, Lansdorp PM, Greider CW, Loyd JE. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *N Engl J Med* 356 : 1317-1326, 2007

短期培養骨髄間葉系幹細胞移植によるブレオマイシン誘導肺線維症病態改善効果の検討

西脇 徹 熊本 牧子 松尾 直樹 松島 綱治*

骨髄間葉系幹細胞 (Bone marrow mesenchymal stem cells; BMMSCs) の臨床応用は、肺線維症や急性呼吸促迫症候群などの難治性呼吸器疾患治療の将来を考える上で大きな期待を寄せられている。しかしながら、これまでの動物モデルを使った前臨床的な検討では、ヒトにおける BMMSCs の治療効果を予測するのは難しく、さらに細胞培養や処理に要する設備や時間など、臨床応用の障害となりうる要素を孕んでいる。

今回我々は、BMMSCs による細胞治療における細胞培養の弊害を払拭すべく、従来の報告で検討されている BMMSCs (9~10 日間培養) (Conventionally-cultured BMMSCs; ConBMMSCs) と、最小限 (2 時間) の培養により得られた BMMSCs (Minimally-cultured BMMSCs; MinBMMSCs) を *in vitro* で比較した。さらに、それら 2 種類の BMMSCs 移植による肺障害改善効果を、ブレオマイシンの経気道投与 3 日目に細胞移入するという、より臨床に近い厳格な条件下において比較した。

今回の検討における MinBMMSCs 移植の線維形成性肺障害に対する有用性は、実地臨床において自家骨髄を肺疾患治療に応用しうる可能性を示唆するものであり、今後の更なる検討に値するものであると考え、ここに報告する。

Restoring capacity of minimally-cultured bone marrow mesenchymal stem cells for bleomycin-induced lung injury in mice

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

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

Clinical use of bone marrow mesenchymal stem cells (BMMSCs) holds great promise for regenerative medicine in intractable lung diseases such as lung fibrosis or acute respiratory distress syndrome. However, preclinical animal models are limited in their ability to predict the efficacy of BMMSC-based therapy in humans. Another severe obstacle to the clinical application of BMMSC-transplantation is the time-consuming, laborious processes required for cell-culture.

In order to evaluate whether engraftment of minimally-cultured BMMSCs ameliorates progressive fibrotic lung injury, we examined the differences between murine BMMSCs cultured for 2 hours (minimally-cultured BMMSCs; MinBMMSCs) and conventionally (9-10 day)-cultured BMMSCs (ConBMMSCs) *in vitro*. Moreover, effects of grafting either type of BMMSCs on fibrotic lung injury were then assessed by transfer experiments in a murine bleomycin-induced lung fibrosis model, in which donor cells were administered 3 days after challenge.

Here we demonstrate the usefulness of transplanting minimally-cultured BMMSCs for acute fibrotic lung injury in a preclinical model and propose using this promising novel cell preparation from autologous bone marrow cells in the clinical setting.

はじめに

再生医学の領域において、幹細胞の基礎的な研究から実地臨床への応用は主要な目標の一つである。難治性疾患治療における臓器移植・人工臓器の応用に伴う合併症・ドナー不足・コスト問題などを回避し、また、治療適用疾患の幅を広げる意味でも幹細胞治療に寄せられる期待は大きい。

昨今、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示すことが分かってきており、新しい幹細胞治療資源として注目されている。骨格筋・心筋・骨など間葉系器官障害への応用が先行する一方、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に有用であるとの報告が散見される¹⁻⁵⁾。

BMMSCsは、とくにヒト細胞において増殖能に長け、培養・処理が容易であることから、多くの基礎研究・動物疾患モデルを用いた前臨床研究において、長期培養された細胞を対象に検討がなされている(以下 Conventionally-cultured BMMSCs; ConBMMSCs)。しかしながら、それらは一定の培養期間の必要性から、急性疾患における自家骨髄を利用するケースには不適であり、培養過程で生じる異物混入、培養液に添加されるウシ血清からの感染(プリオン、ウィルス)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からも、臨床応用に際して様々な問題を孕んでいる。さらに、先行する報告では、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知見もある⁹⁻¹⁰⁾。

今回我々は、前年度の報告に引き続き、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、前述の諸問題を解決しうる可能性があると考え、ConBMMSCsとMinBMMSCsの細胞特性、および移植による肺障害改善能をin vitro・in vivoにおいて比較したのでここに報告する。

方法

BMMSCsの採取

6-8週齢C57BL/6Jマウスの大腿骨および脛骨の骨髓腔をヘパリン加PBSにて灌流後、浮遊細胞とした全骨髓細胞を $3-5 \times 10^7$ 個/100 mmdishにて播種。MinBMMSCsは2時間後に非接着細胞を除去し、接着細胞から磁気ビーズにてCD11b-CD31-CD45⁻細胞を分離して得た。一方、ConBMMSCsは、骨髓細胞を播種より2日後に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およびpenicillin-streptomycinを添加したものを使用した。

BMMSCs細胞特性の解析

骨髓接着細胞の形態は光学実態顕微鏡を用いて、培養皿上にて観察した。また、目的に応じて磁気ビーズによる分離後の細胞を再培養したのも対象とした。

BMMSCsの細胞増殖能は、BMMSCs培養液中にBrdU(10 μ M)を添加し、45分間インキュベートした後、BrdU FLOW KIT (BD Biosciences)を用いて、回収したMinBMMSCsとConBMMSCs両者の細胞周期(BrdU陽性細胞率=S期細胞率)を計測することで解析した。

BMMSCsにおけるケモカインレセプター・プロコラーゲン1 α ・TGF- β の発現は、回収されたMinBMMSCsとConBMMSCsの逆転写PCRにより定量(対GAPDH比)した。

ブレオマイシン(BLM)肺障害モデルにおけるBMMSCs移入実験

6-7週齢C57BL/6JマウスにBLM(4 mg/kgまたは3 mg/kg: 大日本化薬より提供)を経気管投与し、3日後、尾静脈より 5×10^5 個のBMMSCsを移入した。改善効果の評価は細胞移植後マウスにおける体重変化・BAL細胞数(総細胞・好中球数)・プロコラーゲン1 α 発現量・組織像(HE染色像)・生存率などにより行った。

結果

マウス骨髓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)。多角形で線維芽細胞

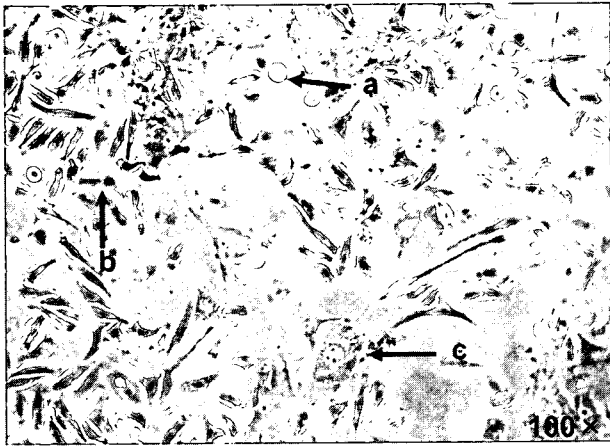


図1 培養骨髄接着細胞は形態学的に3種類に分類される。(培養8日目)
 先行論文より, a. endothelial stem-cell lineage b. myeloid lineage c. ConBMMSCsである¹¹⁾.

胞様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). さらに, BMMSCs 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 細胞増殖能が低下すること (図4), ③ 多くのケモカインレセプターの発現が減弱すること (図5), ④ プロコラーゲン 1α ・TGF- β 発現が増強し, 線維芽細胞様の性質を獲得すること (図6) が分かった.

以上のように, 培養過程における BMMSCs の細胞特性の変化は細胞移植には好ましくないものであると考えられた為, 既に報告されている ConBMMSCs の肺障害における移植効果に対し, MinBMMSCs のそれが匹敵するか否かを, プレオマイシン誘導肺障害モデルを用いて検討した. プレオマイシン投与3日後のマウスに PBS, MinBMMSCs, ConBMMSCs を経静脈投与するという3群を設けたところ, PBS 群に比し MinBMMSCs 群・ConBMMSCs 群は体重減少が軽減 (図7) し, 肺出血量・BAL 中総細胞数・BAL 中好中球数の減少を認めた (図8). さらに BMMSCs 投与7日後のマウス肺では有意にプロコラーゲン 1α の発現量が減少しており, HE 染色像もそれに呼応するものであった (図9). また, 同プロトコールで行った3回の実験の集計により作成した生存曲線においては, PBS 群に比し MinBMMSCs 群・ConBMMSCs 群における生存率が高い結果となり, MinBMMSCs 群については統計学的に有意なものであった (図10).

考 察

骨髄間葉系幹細胞は, 自家細胞を利用できる可能性もあることから, 再生医学/医療の領域において早期の治療応用実現を有望視されるものの一つである. すでに心疾患や骨疾患への臨床応用は始まっており, 今

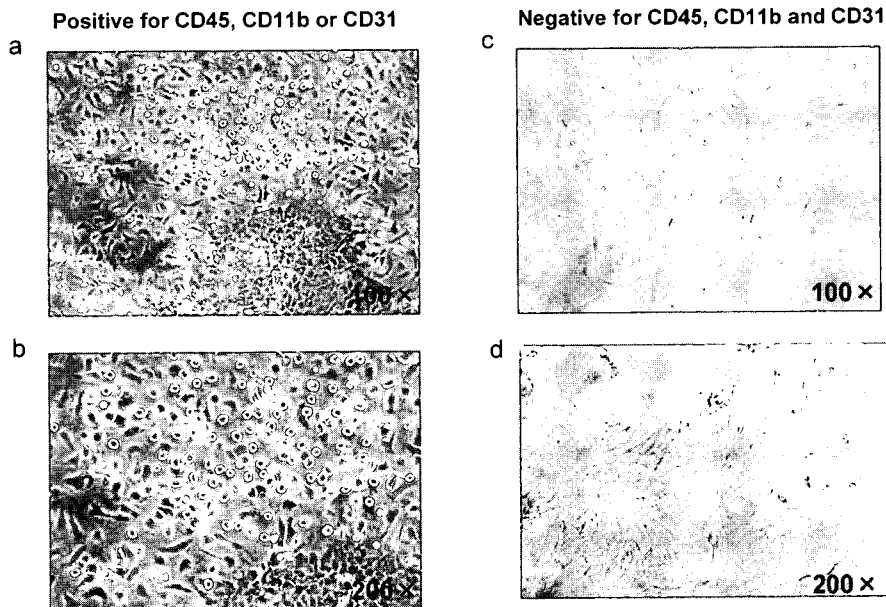


図2 全骨髄細胞培養2時間後の接着細胞を, CD45, CD11b or CD31 のいずれかが陽性の群 (a and b) と CD45, CD11b and CD31 (MinBMMSCs について) の全てが陰性 (c and d) の群に分け, それぞれ14日間培養した. MinBMMSCs は培養によって, ConBMMSCs と同様の形態を示した.

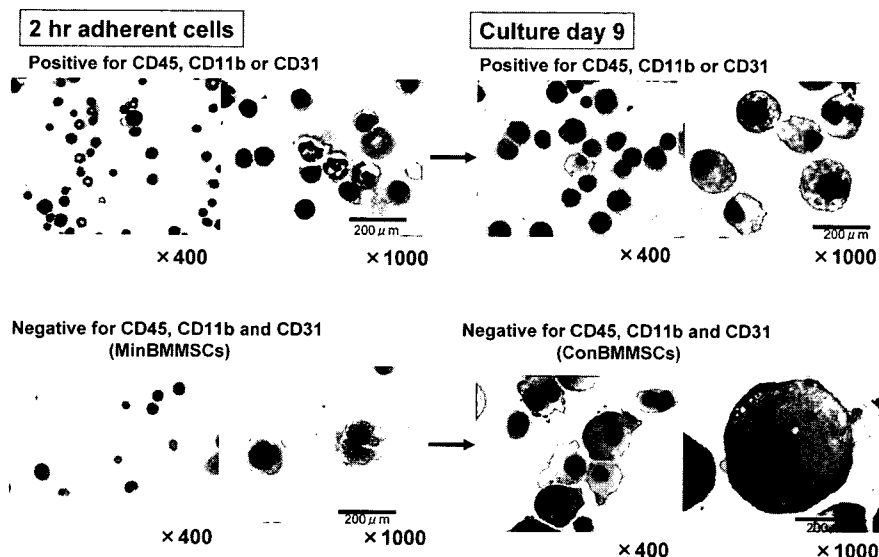


図3 培養による MinBMSCs、ConBMSCs の細胞形態の変化。BMSCs の細胞サイズ・細胞質比率は培養により、とくに CD45、CD11b (、CD31) 陰性群において著明に増大する。

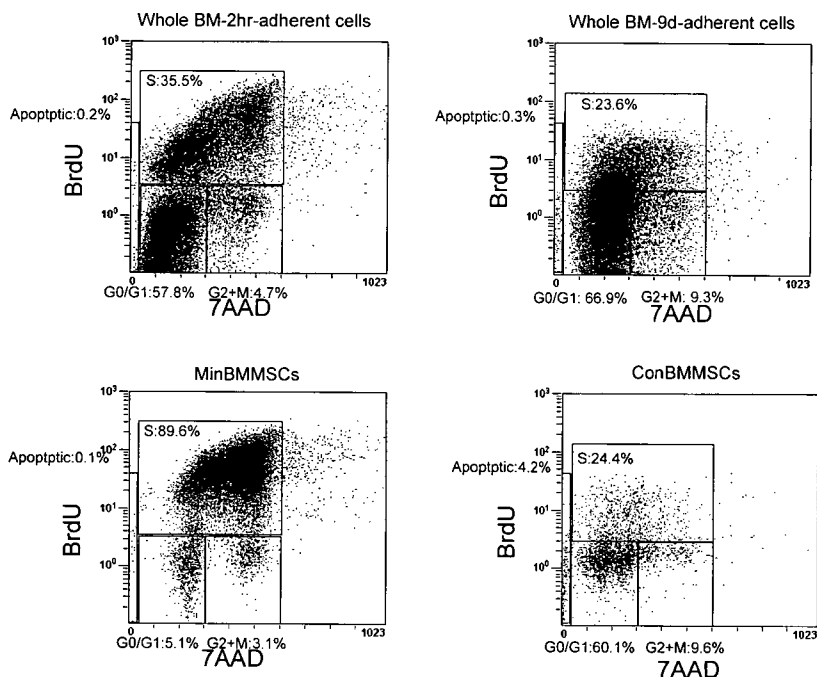


図4 MinBMSCs は ConBMSCs に比べて増殖能が高い。細胞を $10 \mu\text{M}$ の BrdU と共に 45 分間培養することで、BrdU を S 期の細胞に取り込ませ、全 DNA に結合する色素 (7-AAD) との組み合わせで細胞周期を解析した。MinBMSCs では約 90% の細胞が S 期にあり、活発に増殖していることが分かる。S 期 (DNA 合成期)、G0/G1 期 (休止期)、G2/M 期 (分裂期)

後さらに多くの疾患に対する利用が期待されている。

しかしながら、現在一般に BMSCs とされているのは培養された細胞群であり、培養過程に生じる様々な問題が臨床応用に際して障害になると予測される。そこで我々は、培養期間を最小限に留めた MinBMSCs を確立し、その細胞特性について ConBMSCs と比較すると共に、臓器障害に対する移植効果の有無

を検証した。その結果、BMSCs 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、ConBMSCs は MinBMSCs と比較して、増殖能が著明に低下しており、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。細胞移植において、移植された後の細胞はその活性を発揮するべく生

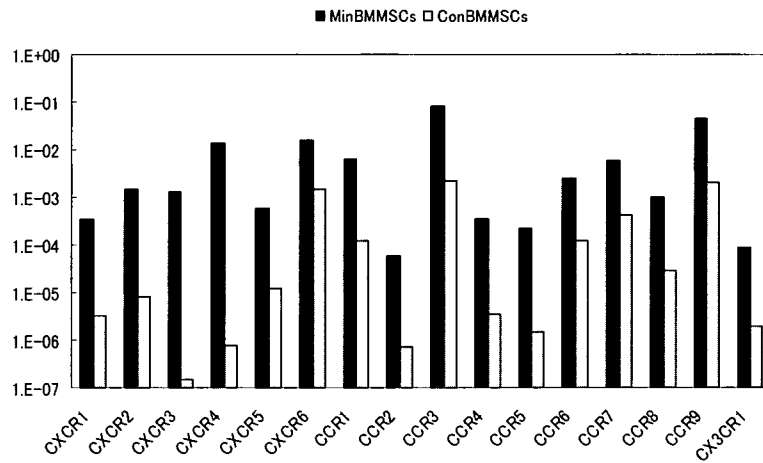


図5 MinBMSCs と ConBMSCs のケモカインレセプター発現の比較
Real time PCR にて解析した全てのケモカインレセプターは、ConBMSCs に比べ、MinBMSCs においてより強く発現していた。

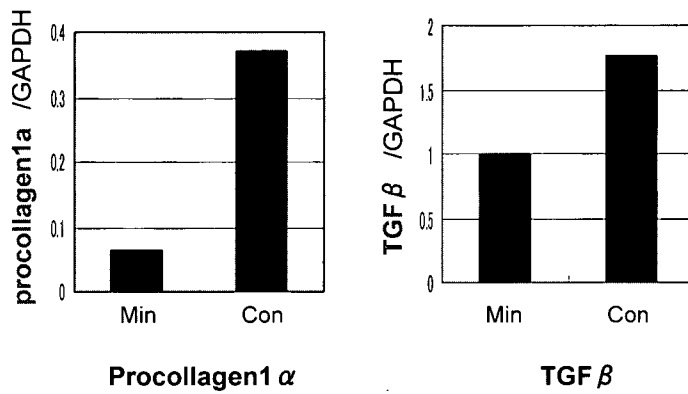


図6 骨髄間葉系幹細胞の培養による線維芽細胞様特性の獲得。BMSCs は培養によりプロコラーゲン 1α ・TGF- β の mRNA 発現レベルが増強した。

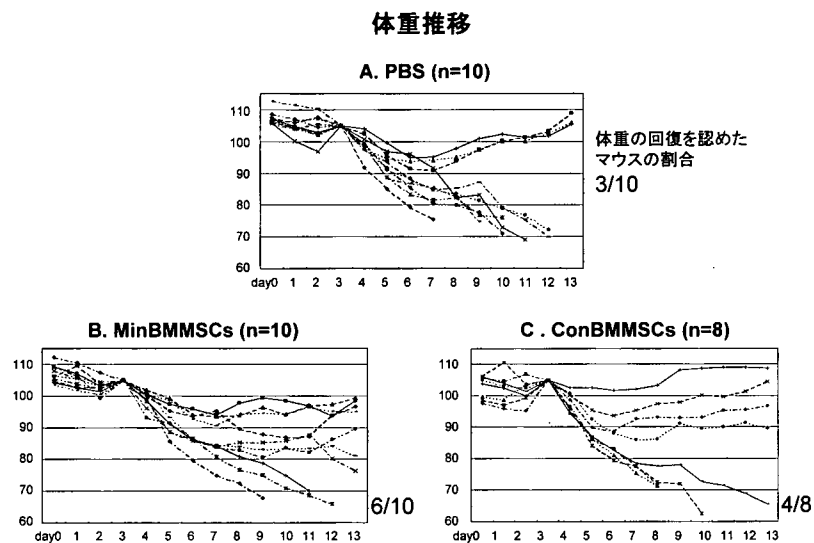


図7 プレオマイシン誘導肺線維症モデルマウスにおける体重の推移。PBS 投与群 ($N=10$)、MinBMSCs 群 ($N=10$)、ConBMSCs 群 ($N=8$)。

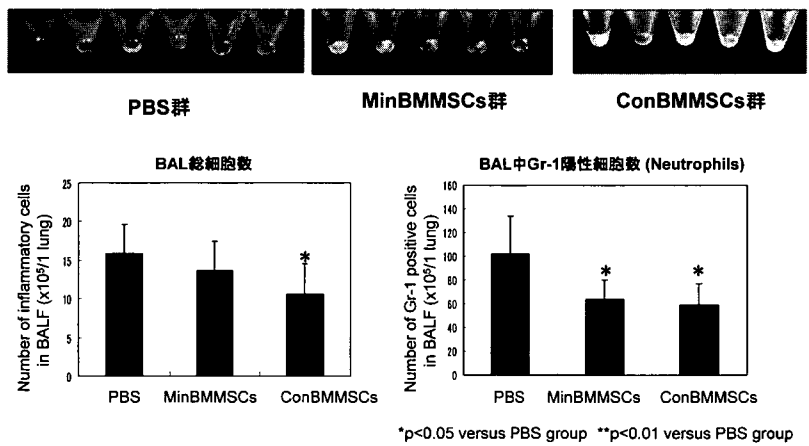


図 8 BMSCs 移植後のプレオマイシン誘導肺線維症モデルマウスにおける肺出血量 (上段)・BAL 中総細胞数 (下段左)・BAL 中好中球数の減少 (下段右) の改善。PBS 投与群 (N=6), MinBMSCs 群 (N=5), ConBMSCs 群 (N=5)。

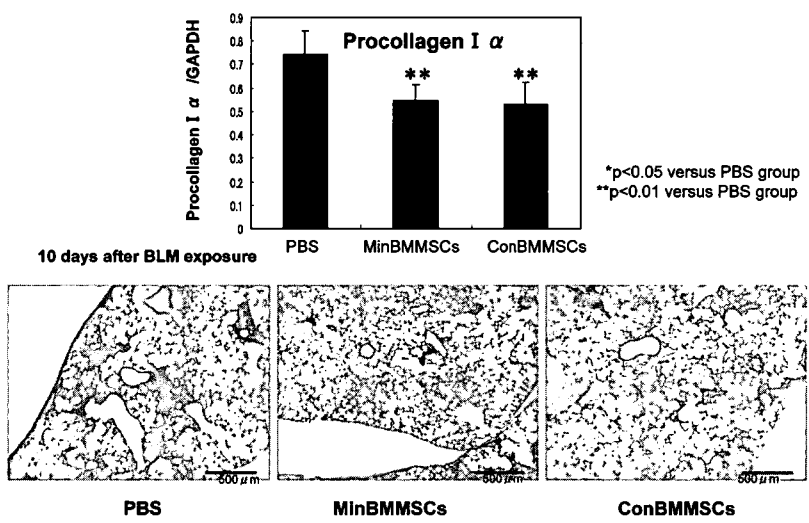


図 9 BMSCs 投与 7 日後 (BLM 投与 10 日後) のマウス肺におけるプロコラーゲン 1 α の mRNA 発現量 (上段) および HE 染色像 (下段)。HE 染色像は各群より BAL 細胞数などの 4 要素のスコア化により、最も病勢の強い個体を選定し、その病理像を示す。PBS 投与群 (N=6), MinBMSCs 群 (N=5), ConBMSCs 群 (N=5)。

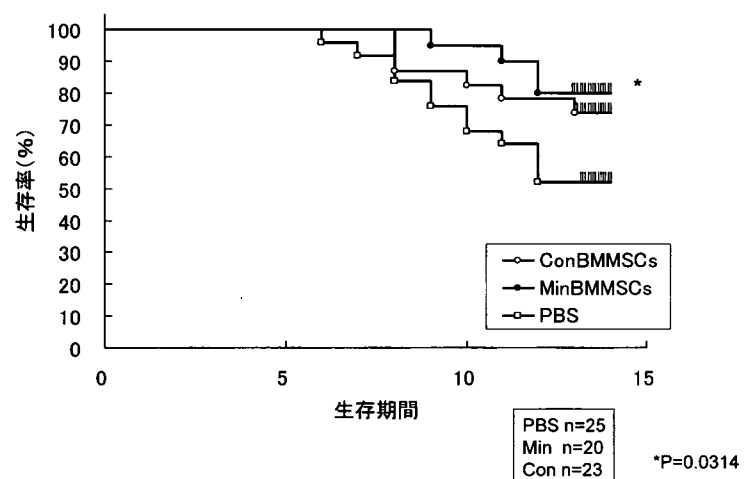


図 10 プレオマイシン誘導肺線維症モデルマウスにおける生存曲線。PBS 投与群 (N=25), MinBMSCs 群 (N=20), ConBMSCs 群 (N=23)。

体内に留まり、細胞分裂・増殖することが望まれる。従って、これらの結果はBMMSCsが細胞培養によって移植治療に好ましくない特性を獲得することを示唆する。さらに今回の検討において、BMMSCsは長期培養によりプロコラーゲン 1α ・TGF- β 発現を増強し、線維芽細胞様の性質を獲得していくことも示されており、線維形成性臓器障害への治療応用については殊更不適である可能性が高い。

先行する報告においてはConBMMSCsによるプレオマイシン誘導肺障害の改善効果を認めており、in vitroにおけるConBMMSCsとMinBMMSCsの細胞特性の違いがin vivoにおける移植効果に直接反映するとは限らない。しかしながらMinBMMSCsがConBMMSCsの代替となりうる細胞資源か否かを検討することは前述の如くBMMSCsの臨床応用実現をうらなう上で重要であると考えられる。今回行ったConBMMSCsとMinBMMSCsのプレオマイシン誘導肺障害に対する移植効果の比較検討においては、両群とも体重減少・肺出血・炎症細胞浸潤・線維化・死亡率のいずれにおいても対照群に比し改善する傾向を認めた。これまでの報告においてはBMMSCsの投与はプレオマイシン投与と同日であったため、肺障害・肺炎症が成立してから治療を開始するという実際の臨床状況と乖離すると考え、本検討ではプレオマイシン投与3日後に細胞移入するというプロトコールで実験を実施したが、これでも移植効果が認められたことはBMMSCs投与の肺障害に対する寄与をさらに確かめることとなった。

本研究における、数時間内に調整可能な自家骨髄細胞が線維形成性肺障害の病態を改善するという結果は、BMMSCsの臨床応用に纏わる諸問題を解決する糸口になる可能性があるだろう。しかしながら、今回の検討においては、病態修復のメカニズムは判明しておらず、また、移植効果も改善の余地を残しており、今後も更なる検証が必要であることは言うまでもない。

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

ブレオマイシン肺線維症モデルマウスにおける RNA 干渉を利用した PAI-1 の発現抑制による抗線維化作用の検討

服部 登 妹尾 直 風呂中 誠
谷本 琢也 河野 修興*

根拠: Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) の発現量を人為的に操作した遺伝子改変マウスを用いた研究から, PAI-1 が肺線維症の進展の鍵となる分子のひとつであることが示されてきた。特に, PAI-1 ノックアウトマウスでは, ブレオマイシンによる肺線維症が制限されることから, PAI-1 の発現を抑制することが肺線維症の治療に応用できる可能性が示唆される。

目的: PAI-1 をターゲットにした small interfering RNA (siRNA) を肺内に投与することで, ブレオマイシン肺線維症モデルにおける PAI-1 の発現を抑制でき, 線維化進展を制限できるのかを検討する。

方法: ブレオマイシンを経気管内投与を行ったマウスへ, マウス PAI-1 に対する siRNA (PAI-1-siRNA) 経鼻投与し, 肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度を測定するとともに, 肺線維症の程度を肺内コラーゲン量によって評価した。

結果: PAI-1-siRNA の単回経鼻投与は, ブレオマイシン投与後 5 日目の肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度を, コントロール siRNA に比して, 有意に低下させることがわかった。また, PAI-1-siRNA の複数回経鼻投与により, ブレオマイシン投与後 14 日目の肺内コラーゲン量を, コントロール siRNA に比して, 有意に低下させ, 生存率も改善されることが明らかとなった。

結論: 肺線維症の進展を制限する治療手段の一つの可能性として, RNA 干渉を起こす siRNA が核酸医薬として応用できる可能性が示され, そのターゲット分子として, PAI-1 が挙げられることが示唆された。

Effect of intrapulmonary administration of siRNA targeting PAI-1 on bleomycin-induced pulmonary fibrosis

Noboru Hattori, Tadashi Senoo, Makoto Furonaka, Takuya Tanimoto, and Nobuoki Kohno

Department of Molecular and Internal Medicine, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University

Rationale: Mice overexpressing plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) are more susceptible to, and mice deficient in PAI-1 are protected from bleomycin-induced pulmonary fibrosis. PAI-1 is known to be strongly induced in the lung after bleomycin administration, and the high expression of PAI-1 is also shown in the lung of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Based on these data, PAI-1 can be regarded as a good therapeutic target for the treatment of pulmonary fibrosis.

Objectives: We examined whether intrapulmonary administration of small interfering RNA (siRNA) targeting PAI-1 (PAI-1-siRNA) could limit the development of bleomycin-induced pulmonary fibrosis.

Methods: The concentration of PAI-1 in BAL fluid and the levels of collagen contents in the lungs were measured following single or repeated intranasal administrations of siRNA targeting PAI-1 to bleomycin-injured mice.

Measurements and Main Results: Single intranasal administration of PAI-1-siRNA significantly reduced the concentration of PAI-1 in BAL fluid obtained 5 days after intratracheal instillation of bleomycin to mice compared with that in bleomycin-injured mice administered with control siRNA. Repeated intranasal administrations of PAI-1-siRNA successfully limited the increase in collagen contents in the lungs and also improved survival in bleomycin-injured mice.

Conclusions: Intrapulmonary administration of siRNA is shown as a feasible method to inhibit expression of a targeted gene in the lungs. This therapeutic approach targeting PAI-1 can be utilized for the treatment of pulmonary fibrosis.

はじめに

肺線維症は、肺傷害に引き続いて生じる過剰な組織修復により、線維芽細胞の集積をきたし、コラーゲンの異常な沈着を認める状態である。これらの肺組織には、正常では存在しえないフィブリンの沈着が認められ、線溶系の抑制されていることが知られている¹⁾。この線溶系の抑制に最も関わっているのが、この病態において過剰発現する plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) であることがわかっている。

PAI-1 が肺の線維化に大きく関わっていることは、PAI-1 の発現レベルを操作した遺伝子操作マウスにおけるプレオマイシン肺線維症モデルの検討によって明らかにされてきた^{2,3)}。野生型マウスにおける肺線維症の程度に比して、PAI-1 を発現しえない PAI-1 ノックアウトマウスでは、プレオマイシン肺線維症が著明に抑制されているのに対し、PAI-1 を過剰発現するトランスジェニックマウスでは、明らかに肺線維症が増悪していることが示された。この研究成果は、PAI-1 が肺線維化の鍵となる分子の一つであることを証明し、さらに PAI-1 をターゲットとした肺線維症の治療が考慮しうることを示唆する。

RNA 干渉とは、細胞内に産生される small interfering RNA (siRNA) が対応する mRNA を認識・分解し、蛋白質への翻訳を阻害することによって、遺伝子発現を抑制する機構である。生物に元来備わっている遺伝子発現の抑制機能であると考えられているが、近年、siRNA を直接あるいはベクターを使用して間接的に細胞内へ導入することにより、特定の遺伝子発現の抑制 (ノックダウン) が可能となることが判明した。特に、この siRNA を経気道的に直接肺内へ注入することで、遺伝子のノックダウンが得られることが示され^{4,5)}、核酸医薬として利用できる可能性が期待される。本研究においては、この RNA 干渉を利用することで、肺内の PAI-1 の発現レベルを抑制しえるのか、さらに抑制しえた場合には、肺線維症の程度にどのような影響を与えるのかを検討した。

方 法

1) マウス PAI-1 に対する siRNA の作製

マウス PAI-1 に対する siRNA を 3 種類及びコントロール siRNA を 1 種類作製し、それぞれを NIH3T3 細胞に導入した。導入 24 時間後に、細胞を回収、RNA を分離し、real time PCR を行って、最も PAI-1 の発現が抑制されていた siRNA を選定し、これを PAI-1-siRNA と名づけた。また、ローダミンで標識した同配列の siRNA も作製し、TRITC-PAI-1-siRNA とした。

2) TRITC-PAI-1-siRNA の取り込み部位の確認

経気道投与にて、実際にマウス肺内に siRNA が取り込まれるのかどうかをみる目的で、TRITC-PAI-1-siRNA 及び標識されていない PAI-1-siRNA をプレオマイシン経気道投与後 2 週間のマウスへ経鼻投与を行った。経鼻投与 24 時間後にマウス肺を摘出し、OCT コンパウンドに包埋冷凍した。凍結切片を準備し、共焦点顕微鏡にて蛍光部位の確認を行った。

3) プレオマイシンの投与

C57BL/6 マウスに対して、プレオマイシンを 2.0 mg/kg の投与量として、経気管投与を行った。

4) PAI-1-siRNA の投与

気管支肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度をみる実験では、マウスへのプレオマイシン経気管投与 3 日後に PAI-1-siRNA 及びコントロール siRNA (2 nM) 50 μ l を経鼻投与を行い、その 2 日後 (プレオマイシン投与 5 日後) に気管支肺胞洗浄を行った。肺線維症の程度をみる実験では、マウスへのプレオマイシン経気管投与 1, 4, 8, 11 日後に PAI-1-siRNA 及びコントロール siRNA (2 nM) 50 μ l を経鼻投与を実施した。

5) 気管支肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度の測定

気管支肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度の測定は、ELISA キット (Innovative Research, Southfield, MI, USA) を用いて行った。

6) 肺線維化の評価

肺のコラーゲン量を Sircol collagen assay kit (Biocolor, Newtownabbey, UK) を用いて測定し、肺線維症の程度を評価した。

7) 生存率の評価

プレオマイシン経気管投与 1, 4, 8, 11 日後に、PAI-1-siRNA 及びコントロール siRNA (2 nM) 50 μ l の経鼻投与を行い、生存率を Kaplan-Meier 法にて検

討した。

結 果

1) siRNA の取り込み部位

TRITC-PAI-1-siRNA の投与により、気管支内腔及び線維化部位の気道表面側にローダミンの発色が認められ、これらの部位に siRNA が取り込まれることが判明した。(本稿中にはデータを示していない。)

2) PAI-1-siRNA 投与による肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度の低下

図 1 に示すように、単回の PAI-1-siRNA の経鼻投与により、プレオマイシン投与 5 日目の肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度が、コントロール siRNA 投与に比して、有意に低下することがわかった。

3) PAI-1-siRNA の複数回投与によるプレオマイシン肺線維症の抑制

プレオマイシン投与 1, 4, 8, 11 日後に、PAI-1-siRNA を複数回の経鼻投与を行うことにより、コントロール siRNA 投与群に比して、有意な肺内コラーゲン量の低下を認めることがわかった (図 2)。

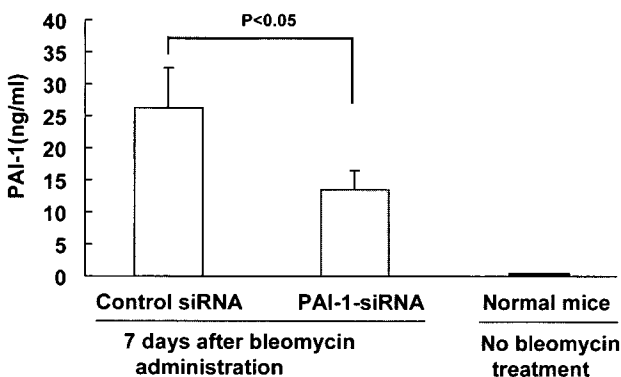


図 1 肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度

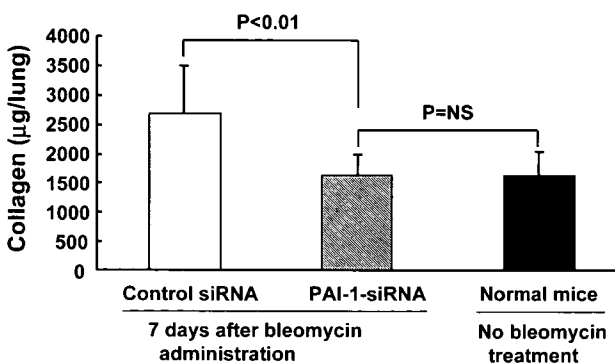


図 2 肺内のコラーゲン量

4) プレオマイシン肺線維症モデルマウスにおける生存率の改善

PAI-1-siRNA の複数回投与により、プレオマイシン肺線維症モデルマウスにおける生存率が、コントロール siRNA 投与群に比して、有意に改善されることが明らかとなった (図 3)。

考 察

本研究において、1) siRNA 自体を経気道投与することによって、気管支・肺胞上皮に siRNA が取り込まれる、2) PAI-1 に対する siRNA の単回投与により、プレオマイシンを経気道投与したマウスの肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度を低下させる、3) プレオマイシン肺線維症モデルマウスに PAI-1 に対する siRNA を複数回投与することにより、肺線維症の程度が抑制され、生存率の改善を認める、ことが明らかとなった。遺伝子改変マウスを用いた研究から、いろいろな分子の肺線維症の病態進展への関与が明らかになってきている。PAI-1 ノックアウトマウスにおいて、プレオマイシンによる肺線維症誘発の程度が明らかに抑制されていること、さらに、PAI-1 トランスジェニックマウスにおいてプレオマイシン肺線維症が増悪することから、PAI-1 は肺線維症の病態に関わる鍵となる分子であることが証明された。PAI-1 は、肺線維症患者の肺において上皮細胞に非常に強く発現していることがわかり、また、プレオマイシン肺線維症モデルマウスにおいても大量に誘導されることも示されており、その発現を抑制することが肺線維症の治療に応用できる可能性がある。

その遺伝子発現を抑制する手段として、今回は RNA 干渉という最近明らかとなった元来生体に備

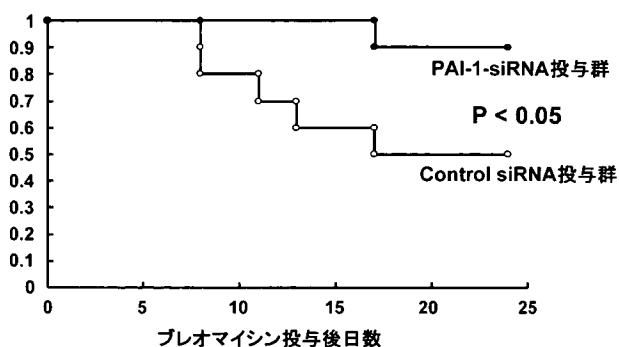


図 3 プレオマイシン気管内投与マウスの生存率曲線

わっている遺伝子の発現抑制機構を応用した。siRNA 自体を経気道投与することで、気管支・肺胞上皮、さらに線維化巣の上皮にも取り込まれることが判明したことは、今後、肺・気道における遺伝子の発現抑制を試みる方法として重要な手段となりうる可能性を示唆する。また、PAI-1 に対する siRNA の単回投与にて、PAI-1 が強発現しているブレオマイシン投与マウスにおける肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度を有意に低下させたことは、経気道投与という方法でも、遺伝子発現のノックダウンが可能であることを示すものであり、今後他の遺伝子ノックダウンを試みる上での重要な示唆が得られたと考える。

今回の重要な知見として、PAI-1 に対する siRNA の複数回投与によって、ブレオマイシン肺線維症の程度が明らかに軽減され、また、ブレオマイシン投与マウスの生存率を改善したことが挙げられる。PAI-1 ノックアウトマウスという遺伝子改変マウスを用いた実験から得られた結果を、RNA 干渉という機構を応用した治療手段によって追試できたことが強調されるべき点であり、治療応用への希望が示されたと考えられる。

結 語

肺線維症の進展を制限する治療手段の一つの可能性として、RNA 干渉を起こす siRNA が核酸医薬として応用できる可能性が示され、そのターゲット分子として、PAI-1 が挙げられることが示唆された。

参考文献

- 1) Imokawa S, Sato A, Hayakawa H, Kotani M, Urano T, Takada A. Tissue factor expression and fibrin deposition in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and systemic sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 156: 631-6.
- 2) Eitzman DT, McCoy RD, Zheng X, Fay WP, Shen T, Ginsburg D, Simon RH. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in transgenic mice that either lack or overexpress the murine plasminogen activator inhibitor-1 gene. *J Clin Invest.* 1996; 97: 232-7.
- 3) Hattori N, Degen JL, Sisson TH, Liu H, Moore BB, Pandrangi RG, Simon RH, Drew AF. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in fibrinogen-null mice. *J Clin Invest.* 2000; 106: 1341-50.
- 4) Massaro D, Massaro GD, Clerch LB. Noninvasive delivery of small inhibitory RNA and other reagents to pulmonary alveoli in mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004; 287: L1066-70.
- 5) Perl M, Chung CS, Lomas-Neira J, Rachel TM, Biffi WL, Cioffi WG, Ayala A. Silencing of Fas, but not caspase-8, in lung epithelial cells ameliorates pulmonary apoptosis, inflammation, and neutrophil influx after hemorrhagic shock and sepsis. *Am J Pathol.* 2005; 167: 1545-59.

アポリポ蛋白 E 欠損マウスにおけるシリカ肺傷害の減弱

長瀬 洋之 小島 康弘 大田 健*

【背景・目的】 様々な原因による肺傷害や、続発する線維化に関与する分子は広く探索されているが、その治療戦略は完全には確立していない。新たな治療標的を見出すことを目的とし、シリカ肺傷害モデルにおいて発現増強する分子を、cDNA アレイを用いて検索し、生体内での役割を検討した。

【方法と結果】 1. 6週齢の C57/BL6 マウスにシリカ粒子 16 mg を点鼻し、14 日後に肺組織 total RNA を抽出した。Gene Navigator cDNA Array System を用いて、約 600 種の遺伝子発現をシリカ投与群と生理食塩水投与群で比較したところ、ApoE 発現が 2.02 倍に上昇していた。

2. 次に、ApoE 欠損マウスである B6.KOR-Apoe^{shl} マウス、及びコントロール群として C57/BL6 マウスにシリカ粒子を点鼻し、14 日後に解析した。ApoE 欠損マウスでは、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の総細胞数、好中球数、リンパ球数、マクロファージ数は有意に減少しており、BALF における TNF- α 、G-CSF、IL-12 p40、MCP-1 濃度も有意に減少していた。

【結論】 ApoE は、脂質代謝に関与する分子として位置づけられているが、肺傷害における役割は殆ど検討されていない。シリカ肺傷害モデルにおいては、ApoE が向炎症作用を有していることが示唆された。

Diminished Lung Inflammation in Silica-induced Lung Injury in Apolipoprotein E-deficient Mice

Hiroyuki Nagase, Yasuhiro Kojima, and Ken Ohta

Department of Medicine, Teikyo University School of Medicine

【Background】 Although the pathogenesis of lung fibrosis has been extensively investigated, effective treatment strategy has not yet been fully established. The aim of the present study is to find out the novel treatment target molecule by using DNA array system in silica-induced lung injury model and to clarify the role of selected target in *in vivo* experiment.

【Methods and Results】 Six weeks old male C57/BL6 mice were intranasally administered 16 mg of silica particle and total RNA was extracted from treated lung after 14 days. Using DNA array techniques, the transcriptional levels of various genes were compared between silica-treated and control mice by using Gene Navigator cDNA Array System (TOYOBO). Among ~600 genes, the expression level of Apolipoprotein E (Apo E) was 2.02 times higher in silica-treated mice as compared to control mice.

In the next place, we compared the effect of silica administration in between six weeks old male ApoE-deficient B6.KOR-Apoe^{shl} mice (Japan SLC) and C57/BL6j mice. Fourteen days after intranasal silica administration, total cell counts, the number of neutrophils, lymphocytes and macrophages in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were significantly decreased in B6.KOR-Apoe^{shl} mice compared to control mice. We also compared the protein levels of cytokines and chemokines in BALF by Luminex system (Hitachi) and the levels of TNF- α , G-CSF, IL-12 p40, and MCP-1 in BALF were significantly suppressed in B6.KOR-Apoe^{shl} mice.

【Conclusions】 The accumulation of inflammatory cells and the levels of cytokines and chemokines were significantly decreased in Apo E-deficient mice in silica-induced lung injury model. Although the precise roles of Apo E in inflammatory lung diseases has not been clarified, our results suggest the potential pro-inflammatory roles of Apo E in silica-induced lung injury model.

はじめに

様々な原因による肺傷害、及び続発する線維化に関与する分子は広く探索されてきているが、その治療戦略は完全には確立していない。本研究では、肺傷害や線維化の新たな治療標的を探索することを目的とし、シリカ肺傷害モデルにおいて発現増強する分子を、cDNA アレイを用いて明らかにした。さらに、発現増強した分子の中で、アポリポ蛋白 E (ApoE) に注目し、生体内での役割を ApoE 欠損マウスを用いて検討した。

方法

cDNA アレイ

6週齢の C57/BL6 マウス♂ (日本チャールズ・リバー) に、16 mg のシリカ粒子を単回点鼻し、肺傷害モデル群を作成した。生理食塩水点鼻群をコントロール群とした。14日後に、各群3匹由来の肺組織由来 total RNA を、ISOGEN[®] を用いて抽出し、MagExtractor[®]-mRNA-(TOYOBO) を用いて、mRNA を抽出した。Gene Navigator cDNA Array System[®] (TOYOBO) を用いて、約 600 種の mRNA 発現をシリカ投与群と生理食塩水投与群で比較した。システムの概要としては、mRNA から、ビオチン化 dUTP を含む cDNA を合成し、フィルター上にスポットされた約 600 種のプローブにハイブリダイズさせ、ストレプトアビジン、さらにビオチン化アルカリフォスファターゼを結合後に、基質である CDP-Star[®] で発光させ、BioRad Fluor-MAXII で検出した。各遺伝子の発現は、同一の増減傾向をとる 9 種の house keeping gene (β -actin, G3PDH, α -tubulin, Phospholipase A2, ALAS1, endonuclease G, Ubiquitin, Ribosomal Protein A52, Elongation factor 1 α) を選択し、その発光強度の平均値に対する比で求めた。

試薬と動物

6週齢の C57BL/6 ♂マウス及び、ApoE 欠損マウスである B6.KOR-Apoe^{shl} マウス (Japan SLC) を用いた。郡山市由来の KOR マウスの中で、毛並みの

異常マウスが発見され、その原因がアポ E 欠損による自然発症高脂血症であることが明らかとなり、SHL (Spontaneously Hyperlipidemic mouse) マウスと命名された。B6.KOR-Apoe^{shl} マウスは、SHL マウスと C57BL/6 マウスの交配を繰り返して得られたコンジェニックマウスであり、SHL マウスの遺伝的背景は 0.02% 以下とされている¹⁾。B6.KOR-Apoe^{shl} マウスでは、8-51 週齢において、総コレステロール値が、350-480 mg/dL、中性脂肪値が、140-230 mg/dL と高脂血症を呈するとされている¹⁾。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。

実験プロトコル

C57BL/6 マウス及び、B6.KOR-Apoe^{shl} マウスに 16 mg のシリカ粒子を単回点鼻し、14日後に解析した。評価項目として、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の細胞数、細胞分画、BALF 中サイトカイン・ケモカイン濃度を検討した。BAL は、マウスの気管内に 28 G のカニューレを挿入し、生理食塩水 0.7 ml を注入、回収することを繰り返し 5 ml の BALF を採取した。遠心分離後、凍結した上清は Freeze dry 処置後に -80°C で保存し、測定時に 10 倍濃縮となるように、PBS で溶解した。BALF 中サイトカイン・ケモカイン濃度は、Mouse Cytokine 17-Plex Panel Kit (BIO-RAD, Hercules, USA) を用い、蛍光マイクロビーズアレイシステムである Luminex[®] (Hitachi, Tokyo) で測定し、G-CSF, GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-17, monocyte chemotactic protein (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α), MIP-1 β , RANTES, keratinocyte chemoattractant (KC) の 17 ターゲットの濃度を測定した。各ターゲットに対する特異的二次抗体には、ターゲット毎に異なる蛍光強度で標識された 17 種類のビーズが結合しており、ビオチン結合特異的二次抗体、ストレプトアビジン-PE でターゲットの濃度を検出した。すなわち、Freeze dry 後の BALF 上清 50 μ l をビーズ結合一次抗体と 30 分反応させ、洗浄後二次抗体と 30 分反応、さらに洗浄後、ストレプトアビジン-PE と 10 分反応させ、Luminex[®] で測定した。

統計

C57BL/6 マウス及び、B6.KOR-Apoe^{shl} マウスにおける群間比較は、Student の t 検定で行った。

結果

cDNA アレイ

シリカ投与後の肺組織における mRNA 発現変化を cDNA アレイで検討した。シリカ投与によって、47 種の肺組織由来 mRNA 発現が 1.5 倍以上に増強した。47 種の内訳は、ケモカイン・サイトカイン・成長因子が 10 種、調節性転写因子が 9 種、タンパクリン酸化酵素、受容体関連分子が各 6 種、プロテアーゼである cathepsin ファミリー、及び細胞表面マーカー・分子が各 5 種、シグナル中間代謝産物が 4 種、アポトーシス関連蛋白が 2 種であった。表 1 に、mRNA 発現が 1.8 倍以上に増強した分子 15 種を示

表 1 シリカ点鼻後の肺組織 mRNA 発現変化

	シリカ	生理食塩水	発現比
PU.1	20.0	4.6	4.32
Cathepsin K	14.3	3.8	3.74
Cathepsin D	42.9	14.5	2.95
Cathepsin S	58.8	20.2	2.92
Macrosialin	36.9	12.9	2.87
IP10	5.3	2.2	2.43
CD14	7.7	3.2	2.43
Cathepsin L	36.8	15.6	2.35
FSHR	2.2	1.0	2.34
Apo-E	123.8	61.3	2.02
ATF-3	4.9	2.5	1.98
EGF	4.0	2.1	1.87
CD38 (T10)	3.4	1.9	1.84
FAS (CD95)	4.3	2.4	1.83
TGF-β	13.6	7.6	1.80

9種のhouse keeping gene の発光強度の平均値を100とし、各々の相対的発光強度を示した。

す。PU.1 に次いで、Cathepsin ファミリーが上位を占めた。ケモカイン・サイトカイン・成長因子としては、IP10, EGF, TGF-β が、表面発現マーカー・分子として、CD14, CD38, アポトーシス関連蛋白として、Fas (CD95) の発現増強比が高値であった。また、アポリポ蛋白 E (ApoE) 発現が、シリカ投与群において、2.02 倍に増強していた。

Apo E 欠損マウスにおけるシリカ肺傷害の検討

肺傷害における役割が不明であった ApoE に注目し、生体内での役割を明らかにするために、ApoE 欠損マウスを用いて検討を行った。ApoE 欠損マウスである B6.KOR-Apoe^{shl} マウス、及びコントロール

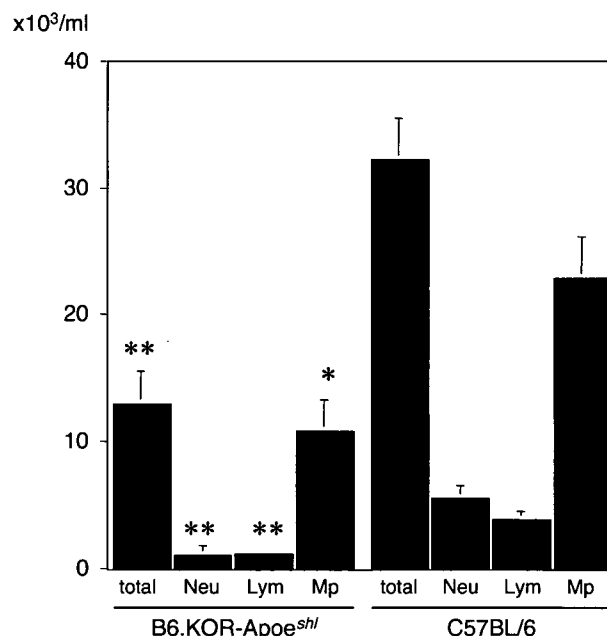


図 1 気管支肺胞洗浄液中の細胞分画データは、B6.KOR-Apoe (n=5), C57/BL6 (n=4) の平均値±SEM で示した。*p<0.05, **p<0.01 vs C57/BL6.

表 2 気管支肺胞洗浄液中のサイトカイン・ケモカイン濃度

	(pg/ml)	B6.KOR-Apoe ^{shl}	C57/BL6
Cytokine/Growth Factor	TNF-α	7.2±2.5*	48.9±19.5
	G-CSF	1.2±0.7*	10.7±4.2
	IL-6	1.6±1.4	17.1±7.4
	IL-12 (p40)	36.3±12.3**	153.7±14.9
	IL-9	8.8±6.5	2.5±1.5
	IL-13	54.9±12.9	24.9±12.7
Chemokine	MCP-1	76.5±38.6**	2101.6±449.4
	RANTES	2.8±1.7	19.6±10.0
	KC	25.7±17.5	141.5±53.9

データは、B6.KOR-Apoe (n=5), C57/BL6 (n=4)の平均値±SEMで示した。*p<0.05, **p<0.01 vs C57/BL6

ル群として、同一の遺伝的背景をもつ C57/BL6 マウスにシリカを点鼻投与し、14日後に解析した。ApoE 欠損マウスでは、BALF 中の総細胞数が有意に低値であり、細胞分画としては、好中球数、リンパ球数、マクロファージ数がいずれも有意に減少していた (図 1)。さらに、これらの機構を明らかにするために、炎症細胞浸潤や活性化に関連する 17 種の BALF 中ケモカイン、サイトカイン濃度を測定した。表 2 に示すように、9 種の濃度を測定可能であった。サイトカイン・成長因子としては、IL-12 p40, G-CSF, TNF- α の濃度が、ケモカインとしては、MCP-1 の濃度が ApoE 欠損マウスで有意に減少していた。

考 察

本研究では、肺傷害や線維化の新たな治療標的を探索することを目的とし、シリカ肺傷害モデルにおいて発現増強する分子を、cDNA アレイを用いて同定した。発現増強した分子の中で、これまで肺傷害における役割が不明であった ApoE に注目し、生体内での役割を検討した。ApoE 欠損マウスではシリカ投与で惹起される炎症細胞浸潤や、肺局所でのサイトカイン・ケモカイン濃度が減少していることが明らかとなった。これらのことから、ApoE はシリカ肺傷害モデルにおいて、向炎症作用を有していることが示唆された。

cDNA チップテクノロジーを用いて、肺傷害関連分子を同定しようとするアプローチは、ブレオマイシンによるモデルで行われている^{2,3)}。これらの検討では、コラーゲンや Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1) 等の細胞外マトリックスや線維化に関連する遺伝子の発現増強が共通して同定されている。これらの分子は今回の我々の検討ではターゲットとして含まれておらず、刺激もブレオマイシンとシリカで異なるが、既報の 2 報と共通して、Cathepsin D の発現増強を今回我々も検知しており、Cathepsin D は両病態に共通して関与する分子であることが示唆された。また、Cathepsin K に関しては、シリカによる肺傷害で発現増強していることが報告されており⁴⁾、その産生細胞は肺泡マクロファージや線維芽細胞であること、TGF- β_1 で発現が抑制されることが報告されている。さらに、Cathepsin K はコ

ラーゲン分解プロテアーゼであること、シリカによる肺線維化に抵抗性の BALB/c マウスでは感受性の C57BL/6 マウスに比較して発現が強いことから、線維化抑制因子であると推定している。我々の検討でも、Cathepsin K の発現はシリカ点鼻によって 3.74 倍に増強しており (表 1)、今回の実験系の再現性が確認された。この他にも、GM-CSF によるマクロファージの最終分化に関連する PU.1 や⁵⁾、NSIP 患者の BALF で濃度上昇が報告されている IPI10⁶⁾ などの発現増強が今回の検討で確認された。

今回、mRNA 発現増強が確認された ApoE の脂質代謝における役割は広く知られているが、肺傷害における役割は殆ど明らかにされていない。ApoE はコレステロール、中性脂肪、リン脂質などの脂質と結合するアポ蛋白のひとつであり、アポ蛋白と結合した脂質は水溶性となり、リポ蛋白と呼ばれる。脂質は ApoE と結合することで、LDL 受容体を介して肝細胞への取り込みが可能となる。従って、ApoE を欠損すると脂質の細胞内取り込みが障害され、高脂血症を呈するため、ApoE ノックアウトマウスや欠損マウスは実験的な高脂血症モデルとして用いられている。

ApoE の主要産生臓器は肝であるが、ラットでは腎、肺、脾臓での mRNA 発現も確認されており、肝外の臓器でも何らかの役割を担っていることが示唆されている⁷⁾。また、産生細胞としては、肝細胞⁸⁾ の他に、マウスやラットの腹腔由来マクロファージ⁷⁾、神経由来線維芽細胞⁹⁾ での発現が報告され、ヒト線維芽細胞では核内に優位に局在すること¹⁰⁾ が報告されている。さらに近日、DNA マイクロアレイを用いて、ラット I 型肺胞上皮細胞と II 型肺胞上皮細胞の遺伝子発現の比較を行った検討から、I 型肺胞上皮細胞での選択的 ApoE 蛋白発現が報告された¹¹⁾。このような多彩な産生細胞のレパートリーに加えて、血清中の ApoE は、脂質代謝にはその総量の 2-10% で十分であることから^{12,13)}、ApoE の脂質代謝以外における役割が示唆されてきている。

そのひとつの側面として、ApoE が免疫系の細胞に及ぼす影響が検討されている。ApoE は、PHA 刺激によるリンパ球活性化を抑制すること^{14,15)}、urate による好中球活性化を抑制することが報告されており¹⁶⁾、炎症細胞の活性化を抑制するという報告が多い。

また、いかなる状況下で、ApoE発現が増強するかに関しては、神経由来線維芽細胞に対する冷却ストレス⁹⁾、LPSの静脈内注射⁷⁾、スタウロスポリンによるヒト線維芽細胞のアポトーシス誘導時¹⁰⁾などにおいて、ApoE発現が増強することが報告されている。さらに近日、高濃度酸素による肺傷害で、肺組織におけるApoE蛋白発現が増強することも示されており¹¹⁾、種々のストレス下でApoE発現が増強することが示されているが、ApoEがストレス保護的に働くのか、あるいは起炎物質として働くのかに関しては不明な点が多い。

この点に関しては、ApoEノックアウトマウスに対するリステリア腹腔内感染モデルで、菌体排除が障害され、血清TNF- α も上昇し、致死率が高いことが報告されており¹⁸⁾、ApoEは正常な免疫反応形成に必要な、保護的分子として働いていることが示唆されている。

また、Chenらは、野生型ラットにおける高濃度酸素による肺傷害が、ApoE2の気管内先行投与で抑制されたことを報告している¹¹⁾。ApoE2投与で、胸水量、肺の水分含有量、血管透過性亢進が抑制されたとしており、肺傷害保護的作用が示唆されている。これは、ApoE欠損マウスで肺局所の炎症が抑制された我々の結果とは異なっている。興味深い報告として、ApoEが、マクロファージによるアポトーシス細胞貪食を促進し、ApoE欠損マウスではアポトーシス細胞の処理障害が出現することが示されている¹⁹⁾。今回の我々の結果を考察すると、ApoE欠損マウスでは、シリカによってアポトーシスに陥ったマクロファージ²⁰⁾やシリカ粒子自体の貪食・処理が減弱した結果、局所の炎症が減弱したことが仮説として想定されるが、今後の検証が必要である。Chenらの報告は、肺傷害のトリガーとして、高濃度酸素を用いており、シリカによる肺傷害においてはApoEが異なる役割を果たす可能性もある。今後は、様々なトリガーによる肺傷害におけるApoEの発現動態及び、その役割を明らかにしていくことが必要と考えられる。

結 論

本研究では、シリカ肺傷害モデルにおいて発現増強する分子を、cDNAアレイを用いて同定した。さ

らに、これまで肺傷害における役割が不明であったApoEに注目し、ApoE欠損マウスではシリカ投与で惹起される炎症細胞浸潤や、肺局所でのサイトカイン・ケモカイン濃度が減少していることから、ApoEはシリカ肺傷害モデルにおいて、向炎症作用を有していることが示唆された。

文 献

- 1) Matsushima Y, Sakurai T, Ohoka A, Ohnuki T, Tada N, Asoh Y, et al. Four strains of spontaneously hyperlipidemic (SHL) mice: phenotypic distinctions determined by genetic backgrounds. *J Atheroscler Thromb* 2001; 8: 71-9.
- 2) Katsuma S, Nishi K, Tanigawara K, Ikawa H, Shiojima S, Takagaki K, et al. Molecular monitoring of bleomycin-induced pulmonary fibrosis by cDNA microarray-based gene expression profiling. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 288: 747-51.
- 3) Kaminski N, Allard JD, Pittet JF, Zuo F, Griffiths MJ, Morris D, et al. Global analysis of gene expression in pulmonary fibrosis reveals distinct programs regulating lung inflammation and fibrosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 1778-83.
- 4) van den Brule S, Misson P, Buhling F, Lison D, Huaux F. Overexpression of cathepsin K during silica-induced lung fibrosis and control by TGF- β . *Respir Res* 2005; 6: 84.
- 5) Shibata Y, Berclaz PY, Chroneos ZC, Yoshida M, Whittsett JA, Trapnell BC. GM-CSF regulates alveolar macrophage differentiation and innate immunity in the lung through PU.1. *Immunity* 2001; 15: 557-67.
- 6) Nakayama S, Mukae H, Ishii H, Kakugawa T, Sugiyama K, Sakamoto N, et al. Comparison of BALF concentrations of ENA-78 and IP10 in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and nonspecific interstitial pneumonia. *Respir Med* 2005; 99: 1145-51.
- 7) Driscoll DM, Getz GS. Extrahepatic synthesis of apolipoprotein E. *J Lipid Res* 1984; 25: 1368-79.
- 8) Zannis VI, Breslow JL, SanGiacomo TR, Aden DP, Knowles BB. Characterization of the major

- apolipoproteins secreted by two human hepatoma cell lines. *Biochemistry* 1981; 20: 7089-96.
- 9) Saada A, Dunaevsky-Hutt A, Amar A, Reichert F, Rotshenker S. Fibroblasts that reside in mouse and frog injured peripheral nerves produce apolipoproteins. *J Neurochem* 1995; 64: 1996-2003.
- 10) Quinn CM, Kagedal K, Terman A, Stroikin U, Brunk UT, Jessup W, et al. Induction of fibroblast apolipoprotein E expression during apoptosis, starvation-induced growth arrest and mitosis. *Biochem J* 2004; 378: 753-61.
- 11) Chen J, Chen Z, Chintagari NR, Bhaskaran M, Jin N, Narasaraju T, et al. Alveolar type I cells protect rat lung epithelium from oxidative injury. *J Physiol* 2006; 572: 625-38.
- 12) Van Eck M, Herijgers N, Yates J, Pearce NJ, Hoogerbrugge PM, Groot PH, et al. Bone marrow transplantation in apolipoprotein E-deficient mice. Effect of ApoE gene dosage on serum lipid concentrations, (beta) VLDL catabolism, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 3117-26.
- 13) Linton MF, Atkinson JB, Fazio S. Prevention of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation. *Science* 1995; 267: 1034-7.
- 14) Avila EM, Holdsworth G, Sasaki N, Jackson RL, Harmony JA. Apoprotein E suppresses phytohemagglutinin-activated phospholipid turnover in peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem* 1982; 257: 5900-9.
- 15) Laskowitz DT, Lee DM, Schmechel D, Staats HF. Altered immune responses in apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res* 2000; 41: 613-20.
- 16) Terkeltaub RA, Dyer CA, Martin J, Curtiss LK. Apolipoprotein (apo) E inhibits the capacity of monosodium urate crystals to stimulate neutrophils. Characterization of intraarticular apo E and demonstration of apo E binding to urate crystals in vivo. *J Clin Invest* 1991; 87: 20-6.
- 17) Van Oosten M, Rensen PC, Van Amersfoort ES, Van Eck M, Van Dam AM, Breve JJ, et al. Apolipoprotein E protects against bacterial lipopolysaccharide-induced lethality. A new therapeutic approach to treat gram-negative sepsis. *J Biol Chem* 2001; 276: 8820-4.
- 18) Roselaar SE, Daugherty A. Apolipoprotein E-deficient mice have impaired innate immune responses to *Listeria monocytogenes* in vivo. *J Lipid Res* 1998; 39: 1740-3.
- 19) Grainger DJ, Reckless J, McKilligin E. Apolipoprotein E modulates clearance of apoptotic bodies in vitro and in vivo, resulting in a systemic proinflammatory state in apolipoprotein E-deficient mice. *J Immunol* 2004; 173: 6366-75.
- 20) Sarih M, Souvannavong V, Brown SC, Adam A. Silica induces apoptosis in macrophages and the release of interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta. *J Leukoc Biol* 1993; 54: 407-13.