

# $\alpha v \beta 8$ インテグリンによって活性化される TGF- $\beta$ の肺上皮細胞 アポトーシス及び上皮細胞と線維芽細胞間相互作用における 重要性の検討

荒屋 潤<sup>1</sup> 北村 英也<sup>1</sup> 皆川 俊介<sup>1</sup> 沼田 尊功<sup>1</sup>  
中山 勝敏<sup>1</sup> 野元 吉二<sup>1</sup> 桑野 和善<sup>1\*</sup> Stephen L Nishimura<sup>2</sup>

多機能サイトカインである Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  は肺の発生、創傷治癒、線維化病変の形成に重要な役割を果たしている。TGF- $\beta$  は肺の様々な細胞で産生され、また間質にも豊富に存在しているが、基本的に不活性型であり、その作用発現には種々のメカニズムによる活性化が必須のステップである。インテグリンによる活性化は生理的に非常に重要な機序であり、我々は以前  $\alpha v \beta 8$  インテグリンの肺線維芽細胞における発現と TGF- $\beta$  の活性化を見出した。TGF- $\beta$  の線維化病変の進行に及ぼす影響の一つに上皮細胞アポトーシスに対する作用が挙げられる。アポトーシスは細胞死の一つの形態であり、様々な障害による細胞死の影響を最低限に抑制するための生理的な細胞排除メカニズムの一つである。肺線維症において肺上皮細胞の過剰なアポトーシスがなせ引き起こされているのか、またアポトーシスを起こした上皮細胞がその後引き続き線維化の進展にどのように影響を与えているかについてはその詳細は明らかになっていない。UCSF で行ったプレリミナリーな検討では IPF 患者由来の線維芽細胞では正常患者由来の線維芽細胞と比較して  $\alpha v \beta 8$  インテグリンの発現及び TGF- $\beta$  の活性化が亢進していた。そこで線維芽細胞  $\alpha v \beta 8$  インテグリンにより活性化される TGF- $\beta$  の上皮細胞アポトーシスに及ぼす影響、またアポトーシスを起こした上皮細胞の線維芽細胞に及ぼす影響を上皮-間葉系細胞間相互作用の観点から今後の検討を行う予定である。

## The role of integrin $\alpha v \beta 8$ mediated TGF- $\beta$ activation in apoptosis of lung epithelial cells and in pathologic epithelial-mesenchymal interactions

Jun Araya<sup>1</sup>, Hideya Kitamura<sup>1</sup>, Syunsuke Minagawa<sup>1</sup>, Takanori Numata<sup>1</sup>, Katsutoshi Nakayama<sup>1</sup>,  
Yoshitsugu Nomoto<sup>1</sup>, Kazuyoshi Kuwano<sup>1</sup>, and Stephen L Nishimura<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Division of Respiratory medicine, Department of Internal medicine, The Jikei University School of Medicine

<sup>2</sup>Department of Pathology, University of California, San Francisco

The multifunctional cytokine transforming growth factor (TGF)- $\beta$  has been widely implicated as a master regulatory cytokine in lung development, wound healing, and fibrogenesis. TGF- $\beta$  is ubiquitously expressed in multiple cell types in the lung and stored in extracellular matrix, but almost entirely in an inactive form. The activation of TGF- $\beta$  is a major point of regulation of its function and there is a growing body of evidence that supports the physiological and pathological importance of integrin mediated activation of TGF- $\beta$ . We have recently reported the expression of and TGF- $\beta$  activation by the  $\alpha v \beta 8$  integrin in lung fibroblasts. TGF- $\beta$  has an ability to induce apoptosis in lung epithelial cells, which is implicated in one of the plausible mechanisms in the development of lung fibrosis. However, apoptosis is a physiologic mechanism for cell deletion without inflammatory response. The detailed causal mechanisms of increased apoptosis of lung epithelial cells in IPF patients and the role of apoptotic epithelial cells in subsequent fibrogenic process have not been clearly elucidated. Our preliminary data at UCSF suggests an increased  $\alpha v \beta 8$  integrin expression and TGF- $\beta$  activation in lung fibroblasts from IPF patients compared to the fibroblasts from normal lung. In this context, we will explore the role of  $\alpha v \beta 8$  integrin mediated TGF- $\beta$  activation in lung epithelial cell apoptosis and the effect of apoptotic epithelial cells on the fibroblast phenotypic change in terms of epithelial-mesenchymal interactions by using a co-culture system.

## はじめに

多機能サイトカインである Transforming growth factor (TGF)- $\beta$  はパラクライン、オートクラインファクターとして作用して、肺の発生においてだけでなく、創傷治癒、線維化病変の形成に重要な役割を果たしている<sup>1)</sup>。TGF- $\beta$  は肺の様々な細胞で産生され、また間質にも豊富に存在しているが、基本的に不活性型であり、その作用発現には種々のメカニズムによる活性化が必須のステップでありインテグリンによる活性化が生理的に非常に重要な機序であると考えられている<sup>2)</sup>。

インテグリンは  $\alpha$  と  $\beta$  サブユニットが非共有結合したヘテロダイマーの細胞表面の細胞外基質に対するレセプターとして見い出され、18 個の  $\alpha$  サブユニットと 8 個の  $\beta$  サブユニットからなる合計 24 個の異なる組み合わせが報告されている<sup>3)</sup>。インテグリンからのシグナルは生死、増殖や移動など様々な細胞機能を調節しており、そのうちいくつかのインテグリンは不活性型 TGF- $\beta$  と latency-associated peptide (LAP) 上の RGDtri-peptide を介して結合する。 $\alpha v \beta 6$  と  $\alpha v \beta 8$  インテグリンは、それぞれ異なった機序により効果的に TGF- $\beta$  の活性化を行い様々な肺の病態に関与している可能性が示されてきた<sup>4)</sup>。我々は  $\alpha v \beta 8$  インテグリンにより活性化される TGF- $\beta$  が、線維芽細胞に対してオートクラインファクターとして作用し筋線維芽細胞形質の誘導、また Hepatocyte growth factor (HGF) 産生調節を介して上皮細胞増殖の制御を行っていることを報告した<sup>5)</sup>。さらに  $\alpha v \beta 6$  インテグリンによる TGF- $\beta$  活性化が誘引となる扁平上皮化生細胞が Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) 分泌を介して、線維芽細胞における  $\beta 8$  インテグリンの発現及び TGF- $\beta$  活性化を調節し、筋線維芽細胞の形質を制御し、またさらに  $\beta 8$  インテグリンによる TGF- $\beta$  活性化がパラクラインファクターとして作用して上皮細胞における  $\alpha v \beta 6$  インテグリンの発現を誘導している事を見出した (図 1)<sup>6)</sup>。

TGF- $\beta$  の線維化病変の進行に及ぼす影響は、抗炎

症作用や筋線維芽細胞の誘導含め多岐にわたるが、その一つに上皮細胞アポトーシスに及ぼす作用が挙げられる<sup>7)</sup>。アポトーシスは細胞死の一つの形態であり、様々な障害による細胞死の影響を最低限に抑制するための生理的な細胞排除メカニズムの一つである<sup>8)</sup>。アポトーシスを起こした細胞は、その細胞膜外側への phosphatidylserine 再分布により、“eat-me”シグナルを発生し、様々な細胞に貪食されることにより速やかに処理される<sup>9)</sup>。アポトーシスを起こした細胞が何らかの原因により速やかに処理されない場合には細胞融解が起こり、proinflammatory, proteolytic な様々なメディエーターが放出され、周囲へ障害が進行する事が予測される<sup>10)</sup>。さらには正常な組織修復の妨げとなる可能性も示唆されている<sup>9)</sup>。肺線維症における肺上皮細胞の過剰なアポトーシスがなぜ引き起こされているのか、またアポトーシスを起こした上皮細胞がその後引き続き線維化の進展にどのように影響を与えているかについてはその詳細は明らかになっていない。上皮細胞に対してアポトーシスを誘導する活性化 TGF- $\beta$  のオリジンが明らかになっていない点と病態進展における epithelial-mesenchymal interaction の関与の可能性を考え UCSF で行ったプレリミナリーな検討結果を元に今後の検討を行う予定としている。

## UCSF での検討

### (対象と方法)

UCSF において特発性肺線維症と診断され、肺移植のため摘出された病変肺、もしくは移植不適合正常肺より初代線維芽細胞を樹立したうえで以下の検討を行った。

1. 細胞表面への  $\beta 8$  インテグリンの発現を Flow-cytometry にて検討した。
2. 線維芽細胞における TGF- $\beta$  の活性化を、PAI-1 プロモーターにより制御される luciferase 遺伝子が導入されたリポソーム細胞との共培養にて行った。
3. 正常肺線維芽細胞に発現ベクターで  $\beta 8$  インテグリンを高発現させてやり、TGF- $\beta$  の活性化と筋線維芽細胞への形質転換を type I collagen の発現と Gel contraction assay 等にて検討した。

### (結果)

1. 特発性肺線維症由来の線維芽細胞は正常組織由

<sup>1</sup> 東京慈恵会医科大学呼吸器内科

<sup>2</sup> Department of Pathology, University of California, San Francisco

\* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

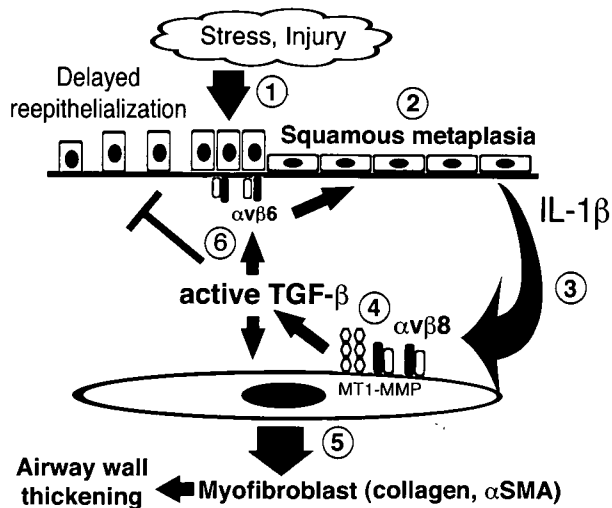


図1 COPD気道リモデリングにおける、扁平上皮化生及びインテグリンによる TGF-β 活性化の重要性に関するモデル (Araya J. et. al. J Clin Invest. 2007)

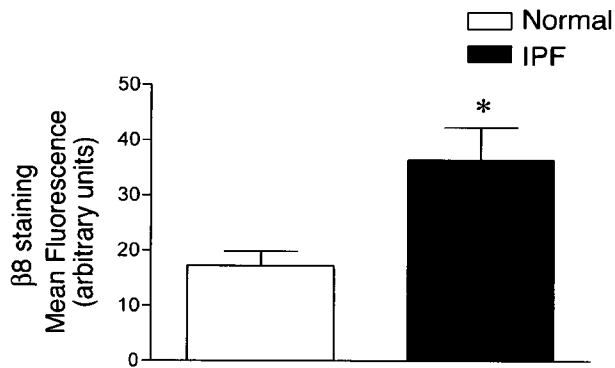


図2 フローサイトメトリーによる線維芽細胞の β8 インテグリンの発現の検討  
IPF 患者由来の分離培養した線維芽細胞において、β8 インテグリンはより高度に発現していた。

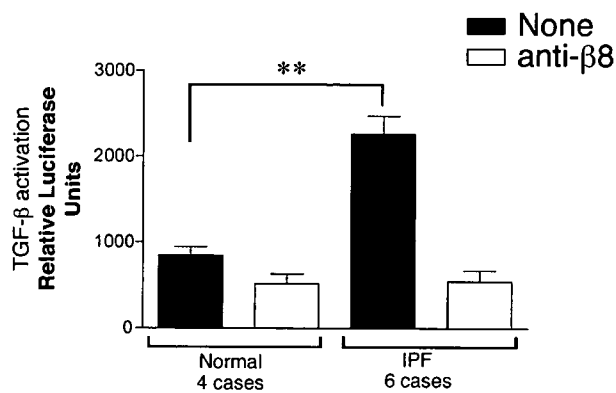


図3 線維芽細胞による TGF-β 活性化の検討  
TMLC レポーター細胞を使用した TGF-β 活性化の検討では、IPF 患者由来の線維芽細胞 β8 インテグリンはより高度に TGF-β を活性化していた。

来の線維芽細胞と比較し約 2 倍の β8 インテグリンを細胞表面に高発現していた。(図 2)

2. 特発性肺線維症由来の線維芽細胞はより高度に TGF-β を活性化していた。(図 3)

3. β8 インテグリンを高発現させると、高度に TGF-β を活性化し、type I collagen の発現が増加し、さらに gel contraction を増強し筋線維芽細胞の形質を誘導した。(図 4)

以上の検討結果を基にした今後の検討課題と方法 (課題)

1. 正常及び IPF 患者由来の肺組織における線維芽細胞 β8 インテグリンと α-SMA 発現、また肺上皮細胞におけるアポトーシスの頻度との関連を検討する。

2. 正常及び IPF 患者から線維芽細胞を分離し、β8

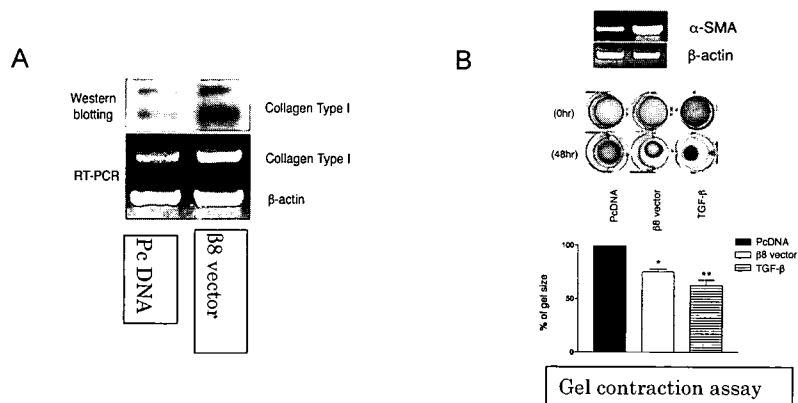


図4 β8 インテグリン高発現による筋線維芽細胞形質の誘導  
A: β8 インテグリンを高発現させた線維芽細胞は、より高度に Type I collagen を発現していた。  
B: β8 インテグリンを高発現させた線維芽細胞はより高度に αSMA を発現し、collagen gel を収縮させた。

インテグリンの発現及び TGF- $\beta$  の活性化を測定し、筋線維芽細胞のマーカー ( $\alpha$ -SMA, collagen) の発現量との関係を明らかにする。

3. 肺線維芽細胞に発現ベクターを使って  $\beta 8$  インテグリンを高発現させたり、また siRNA により発現をノックダウンすることにより TGF- $\beta$  の活性化を制御する。その上で上皮細胞との共培養を行い、活性酸素及び Fas ligand 等による上皮細胞へのアポトーシス誘導に対する影響を検討する。

4. 活性酸素及び Fas ligand 等によりアポトーシスを誘導した上皮細胞と肺線維芽細胞を共培養し、線維芽細胞における  $\beta 8$  インテグリンの発現及び TGF- $\beta$  の活性化を測定し、同時に筋線維芽細胞のマーカーの発現の検討を行う。

#### (方法)

免疫染色：正常及び IPF 患者肺の固定標本を使用し、免疫染色により  $\beta 8$  インテグリンと  $\alpha$ -SMA 発現を定量的に測定する。また肺上皮細胞におけるアポトーシスの頻度を Tunnel 染色により検討する。

細胞培養分離：肺がん手術検体の肺実質正常部位を約 1~2 mm 程度の組織片とし、培養プレート上で培養液とともに培養する。約 2 週間程度で線維芽細胞の増殖が認められる。細胞は 10%FCS を含む DMEM にて培養する。

気道上皮細胞は肺がん手術検体の気管支より、蛋白分解酵素処理により分離する。分離した上皮細胞は 10  $\mu$ g/ml の type I collagen でコートしたプレート上で bronchial epithelial growth medium (BEGM) にて継体培養する。

共培養：気道上皮細胞を transwell filter (1  $\mu$ m pore) の上で約 16 時間培養し、24well dish で培養した線維芽細胞上にフェイルターごと移し変える事により行う。

遺伝子導入と siRNA による knock down：pcDNAneol ベクターに  $\beta 8$  インテグリン cDNA が full length クローニングされた発現ベクター (UCSF Dr. Nishimura) 及び  $\beta 8$  siRNA (Ambion) を Amaxa Neuclofactor system を使用し遺伝子導入する。

遺伝子発現：SYBR green を使用した Real time PCR により検討。

蛋白発現：Western blotting 法及び flowcytometry 法により検討する。

アポトーシスの検討：DNA laddering, Annexin V

と Propidium Iodide の二重染色により検討する。

#### まとめ

これらの検討により IPF 進展のメカニズムにおいて、アポトーシスを起こした上皮細胞がどのように上皮下の線維芽細胞に影響を与え、線維化病変の進展に影響を与えているのか、さらに線維芽細胞の  $\beta 8$  インテグリンにより活性化される TGF- $\beta$  が上皮細胞アポトーシスに対してどのような影響を与えうるかが、Epithelial-mesenchymal interaction の観点から今後明らかに出来る可能性があると考えている。

#### 参考文献

- 1) Piek E, Heldin C-H, ten Dijke P. Specificity, diversity, and regulation in TGF- $\beta$  superfamily signaling. *FASEB J.* 13: 2105-2124, 1999.
- 2) Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, Rifkin DB, Sheppard D. The integrin  $\alpha v \beta 6$  binds and activates latent TGF- $\beta 1$ : a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 96: 319-328, 1999.
- 3) Sheppard D. Functions of pulmonary epithelial integrins: from development to disease. *Physiol. Rev.* 83(3): 673-686, 2003.
- 4) Sheppard D. Transforming growth factor  $\beta$ . *Proc. Am. Thorac. Soc.* 3: 413-417, 2006.
- 5) Araya J, Cambier S, Morris A, Finkbeiner W, Nishimura SL. Integrin mediated TGF- $\beta$  activation regulates homeostasis of the pulmonary epithelial-mesenchymal trophic unit. *Am. J. Pathol.* 169: 405-415, 2006.
- 6) Araya J, Cambier S, Markovics JA, Wolters P, Jablons D, Hill A, Finkbeiner W, Jones K, Broaddus VC, Sheppard D, Barczak A, Xiao Y, Erle DJ, Nishimura SL. Squamous metaplasia amplifies pathologic epithelial-mesenchymal interactions in COPD patients. *J. Clin. Invest.* 117: 3551-3562, 2007.
- 7) Hagimoto N et al. TGF- $\beta$  as an enhancer of fas-mediated apoptosis of lung epithelial cells. *J.*

- Immunol.* 168: 6470-6478, 2002.
- 8) Vandivier RW, Henson PM, Douglas IS. Burying the dead The impact of failed apoptotic cell removal (efferocytosis) on chronic inflammatory lung disease. *Chest.* 129: 1673-1682, 2006.
- 9) Puchelle E, Zahm JM, Tournier JM, Coraux C. Airway epithelial repair, regeneration, and remodeling after injury in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* 3: 726-733, 2006.
- 10) Miwa K, Asano M, Horai R, Iwakura Y, Nagata S, and Suda T. Caspase 1-independent IL-1 $\beta$  release and inflammation induced by the apoptosis inducer Fas ligand. *Nature.* 11: 1287-1292, 1998.

# 肺胞上皮細胞における上皮間葉転換とその収縮能の 検討について

山内 康宏<sup>1</sup> 幸山 正<sup>1</sup> 滝澤 始<sup>2\*</sup>

背景：特発性肺線維症は、慢性かつ進行性に高度な線維化・拘束性換気障害を来し、不可逆性の蜂巢肺形成を来す予後不良な疾患である。近年、組織線維化において、ある環境下において上皮細胞がその極性を消失し間葉系細胞としての極性を獲得し間葉系細胞へ転換する上皮間葉転換 (Epithelial Mesenchymal Transition: EMT) という概念の関与が着目されてきている。そこで我々は、肺胞上皮細胞における上皮間葉転換に着目し、間葉系細胞の重要な機能である収縮能について検討した。

方法：肺胞上皮細胞株 A549 細胞を用いて、Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 および Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  により 48 時間刺激し、形態学的変化を、免疫染色法にて、上皮細胞マーカーの E-cadherin と間葉系細胞マーカーの Vimentin の発現を検討した。さらに、quantitative PCR 法にて E-cadherin, Vimentin の mRNA の発現を検討した。EMT を経た間葉系細胞の収縮能の獲得について、Gel Contraction 法 (培養細胞を type I collagen により作成された gel に包埋播種し、細胞収縮能を gel size の収縮として評価する) を用いて検討した。

結果：A549 細胞に TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml) で 48 時間刺激したところ、形態学的に丸石様細胞が紡錘型の細胞に転換し、免疫染色では E-cadherin の発現は消失し、Vimentin を発現する細胞へと転換した。また、qPCR では、E-cadherin の発現低下と vimentin の発現増加を認めた。TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml) と TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) との共刺激では、TGF- $\beta$ 1 単独に比べ、上記効果発現の増強を示した。次に、EMT を経て間葉系化した細胞での Gel Contraction 法により収縮能を検討した。TGF- $\beta$ 1 により EMT を経た細胞は、A549 細胞に比べて有意に収縮し、さらに、TGF- $\beta$ 1 と TNF- $\alpha$  により EMT を経た細胞は、その収縮能はさらに大きかった。

まとめ：A549 細胞は、TGF- $\beta$ 1 刺激により上皮間葉転換を経て間葉系細胞に転換した。さらに、TNF- $\alpha$  は TGF- $\beta$ 1 による EMT を促進し、より間葉系細胞への転換を誘導した。EMT を経た間葉系細胞は、収縮能を獲得しており、TNF- $\alpha$  はその効果を増強した。

## Epithelial mesenchymal transition on alveolar epithelial cells

Yasuhiro Yamauchi<sup>1</sup>, Tadashi Kohyama<sup>1</sup>, and Hajime Takizawa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Respiratory Medicine, The University of Tokyo

<sup>2</sup>The 4<sup>th</sup> Department of Internal Medicine, Teikyo University

Recently Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) has been reported to contribute to the pathogenesis of tissue fibrosis through the enhanced TGF- $\beta$  signaling. Alveolar epithelial cells have also been reported to undergo EMT with stimulation by TGF- $\beta$ 1 and to change phenotype of epithelial to mesenchymal cells showing the loss of E-cadherin and the gain of vimentin. Therefore, we investigated whether TNF- $\alpha$  affect TGF- $\beta$ 1-induced EMT and evaluated the function of contractility of cells underwent EMT. Cultured alveolar epithelial cells (A549) were stimulated with TGF- $\beta$ 1 (5ng/ml) with/without TNF- $\alpha$  (10 ng/ml) for 48 hours. Evaluation of morphological change of A549 was done with immunocytochemistry staining. Stimulated cells were cultured in three dimensional collagen gels and floated in medium with/without TGF- $\beta$ 1 and/or interferon- $\gamma$ . Gel size was measured daily using an image analysis system. Co-stimulation with TGF- $\beta$ 1 and TNF- $\alpha$  induced more morphological change of A549 than TGF- $\beta$ 1 alone. The gel that contained cells stimulated with TGF- $\beta$ 1 was contracted in time-dependent manner in the serum free medium. The contraction of gels that contained cells stimulated with both TGF- $\beta$ 1 and TNF- $\alpha$  was enhanced, compared with TGF- $\beta$ 1 alone. Furthermore, the stimulation with TGF- $\beta$ 1 to the gels induced the contraction of the gels. Stimulation with IFN- $\gamma$  had an inhibitory effect on gel contraction, although co-stimulation with TGF- $\beta$ 1 and IFN- $\gamma$  suppressed the inhibitory effect of IFN- $\gamma$ . The addition of TNF- $\alpha$  to TGF- $\beta$ 1 accelerates the TGF- $\beta$ 1-induced EMT and enhances the function of cell contractility. EMT might contribute to the tissue fibrosis via the induction of cell contractility.

## 背景

特発性肺線維症は、慢性かつ進行性の経過をたどり、高度の線維化が進行して不可逆性の蜂巢肺形成を来す予後不良の疾患であり、現時点では有効な治療法に乏しい<sup>1,2)</sup>とされている。病理組織学的には、胸膜側優位に、蜂巢肺形成を伴う密な線維化病変、密な線維化病変と正常肺との境界部に散在する線維芽細胞巣および細胞性胞隔炎を主要所見とし、正常構造の破壊・改築された線維化病巣と活動性の病変と考えられる線維芽細胞巣の共存を認めることが特徴である<sup>1,2)</sup>とされている。線維芽細胞巣における活性化された線維芽細胞が、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産生・沈着が、線維化病巣を引き起こし(組織改築)、組織の機能障害をもたらすと考えられている<sup>3)</sup>。特に間質性肺炎においては、肺胞間質を主座とする胞隔の炎症性疾患とされており、肺胞間質に生じた炎症性細胞から産生される炎症性サイトカインやケミカルメディエーターにより、線維芽細胞の肺胞組織への過剰な遊走・集積・収縮を来し、肺胞における創傷・治癒の過程における線維化が肺胞に形成され、肺の線維化を来すと考えられている。さらに、線維化病巣へ影響する液性因子として、Transforming Growth Factor (TGF)- $\beta$ やTumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$ などの成長因子やサイトカインの肺組織での発現増加が報告<sup>4,5)</sup>されており、TGF- $\beta$ やTNF- $\alpha$ の過剰発現の動物モデルにおいて、肺線維症を生じ、TGF- $\beta$ が、線維芽細胞の増殖・遊走・細胞外器質の増殖を促進することが報告<sup>4-7)</sup>されている。我々も、今までにサイトカインやケミカルメディエーターによる肺線維芽細胞の機能・遊走・収縮について検討してきた。

ところが、近年、線維芽細胞の起源として、潜在していた線維芽細胞 (fibroblast) と、骨髄由来の線維芽細胞 (fibrocyte) に加えて、新たに上皮細胞から上皮間葉転換 (epithelial mesenchymal transition: EMT) を経由した間葉系細胞が、組織線維化に関与していると報告<sup>8,9)</sup>されるようになってきた。EMTは本来、初期胚発生における原腸陥入や器官形成過程における

重要性が認識されていたが、近年、胎生期以外においても、癌の転移のメカニズムにおいて着目され、成人の線維性疾患においても、EMTを経由した上皮由来の間葉系細胞が、組織線維化の発症に関与していることが報告されるようになってきた。特に、EMTはTGF- $\beta$ などの増殖因子などの状況下において誘導されることが報告されている。肺線維症においても、肺局所でのTGF- $\beta$ の産生が亢進している状況下であり、肺胞上皮細胞が、EMTを経由して線維芽細胞および間葉系細胞の起源であることが示唆されている。In vitroにおいて、肺胞上皮細胞がEMTを経て形態学的に間葉系細胞となり、機能的に細胞外器質の増殖を促進することが報告<sup>10)</sup>され、IPF患者からの肺組織において上皮系と間葉系細胞のマーカーの共発現を認める細胞が存在することより、IPFにおいてもEMTの関与を示唆することが報告<sup>11)</sup>されている。また、肺線維症の動物モデルにおいて、上皮由来の間葉系細胞の存在が報告<sup>12)</sup>されている。

以上より、肺線維症の病態・機序において、線維芽細胞が大きな役割を担っていると考えられ、その線維芽細胞の役割・機能を解明することにより、肺線維症の病態の解明および新たな治療への戦略となると考えられる。さらに、その線維芽細胞の起源として、EMTによる肺胞上皮細胞が深く関与していることが示唆されるため、EMTの機序を検討することは、肺線維症をはじめとする線維化病巣の治療戦略につながると考えられる。そこで我々は、肺胞上皮細胞を用いて、肺胞上皮細胞のEMTとその間葉系細胞の機能について、検討を行った。特に、肺線維症で発現が亢進しているとされるTGF- $\beta$ およびTNF- $\alpha$ のEMTへの影響について検討した。さらに、上述の如く、線維化病巣の形成に関わるとされている間葉系細胞の重要な機能の1つである収縮能について、EMTを経た間葉系細胞の収縮能の獲得について検討した。加えて、収縮能の評価においては、肺線維症についての治療薬としても着目されているIFN- $\gamma$ やsteroid (Dexamethasone) による収縮能への影響について検討した。

## 対象と方法

1) 細胞は、肺胞上皮細胞株であるA549細胞を用いた。A549細胞は、10%FCS-DMEMで培養・継代を

<sup>1</sup> 東京大学医学部附属病院呼吸器内科学

<sup>2</sup> 帝京大学医学部附属溝口病院第四内科

\* びまん性肺疾患に関する調査研究班 分担研究者

行った。A549細胞が、50%コンフルエント位の状況で、TGF- $\beta$  5 ng/ml, TNF- $\alpha$  10 ng/mlで刺激を行い、48時間incubatorで培養した。48時間後に、形態学的な変化と、免疫染色法により、上皮系マーカーとしてAnti-E-Cadherinを、間葉系マーカーとしてAnti-Vimentin antibodyを用いて、DAB法でE-cadherinおよびVimentinの発現を検討した。次にEMTの評価として、E-Cadherin, VimentinのmRNAレベルでの発現を検討した。上述の如く、A549細胞を各々の条件で48時間培養を行い、培養細胞からRNAを採取した。qPCR法を用いて、個々の条件下におけるmRNAの発現量を検討した。実験は少なくとも少なくとも3回以上繰り返して、内部コントロールとしてGAPDHのmRNAを用いて、E-cadherinおよびVimentinのmRNAの発現を相対比で解析した。

2) 収縮能の評価として、Gel contraction法を用いた。Gel contraction法の概略を下記に記す。RatのTailから抽出した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 $3 \times 10^5$  cells/mlをゲルとして作成する。実際には、24 wellプレートに0.5 ml/wellになるようゲルを入れ20分静置し固相化させる。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、毎日CCDカメラでゲルのサイズを計測することにより、Type I collagenゲル内で三次元的に培養される線維芽細胞の収縮能として評価し、解析した。実験は少なくとも3回以上繰り返して、CCDカメラで計測したゲルの面積を用いて、相対比で解析した。

## 結 果

### 1) TGF- $\beta$ 1刺激によるA549細胞のEMT

A549細胞にTGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1+TNF- $\alpha$ 刺激にて48時間培養した細胞を図1に示す。刺激(-)のA549細胞は、上皮細胞としての特徴である敷石状概観を呈しているが、TGF- $\beta$ 1刺激にて紡錘形の間葉系細胞の概観に転換している。各種サイトカインのTNF- $\alpha$ の単独刺激では、上皮細胞の概観に変化は認められない。しかし、TGF- $\beta$ 1+TNF- $\alpha$ 刺激では、TGF- $\beta$ 1刺激に比較して、より紡錘型の細胞へと転換している。さらに免疫染色において、E-cadherinの消失とVimentinの発現の増加を認める。

次に、E-cadherin, VimentinのmRNA発現について、同様の刺激で48時間刺激した状態でtotal RNAを採取し、quantitative PCR法にて検討した。図2に示す如く、E-cadherinのmRNA発現は、TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1+TNF- $\alpha$ の順に有意に抑制された。また、VimentinのmRNAの発現については、TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1+TNF- $\alpha$ の順に促進された。以上より、TGF- $\beta$ 1による48時間の刺激にて、上皮細胞のマーカーであるE-cadherinの発現が抑制され、間葉系細胞のマーカーであるVimentinの発現が誘導され、A549細胞は、EMTを経由し、間葉系細胞の形態に変化した。さらに、TNF- $\alpha$ との共刺激では、E-cadherinの抑制、Vimentinの誘導と共に、TGF- $\beta$ 1によるEMTを相加的に促進し、形態学的にも、さらに強くEMTを促進した。

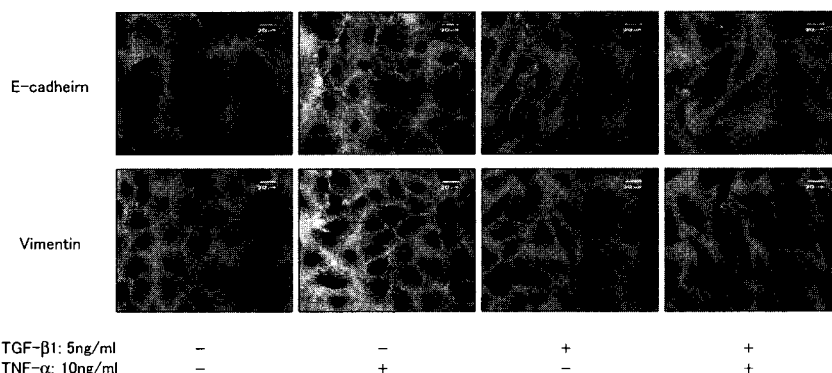


図1 TGF- $\beta$ 1 および TNF- $\alpha$  による A549 細胞の形態学的変化  
培養液に TGF- $\beta$ 1: 5 ng/ml および TNF- $\alpha$ : 10 ng/ml を添加して 48 時間培養を行い、48 時間後に形態学的変化を検討した。左から順に TGF- $\beta$ 1: 5 ng/ml および TNF- $\alpha$ : 10 ng/ml の有無の 4 条件で、上段は、Anti-E-cadherin を用いて、下段は Anti-Vimentin を用いて、DAB 法による免疫染色を行った。



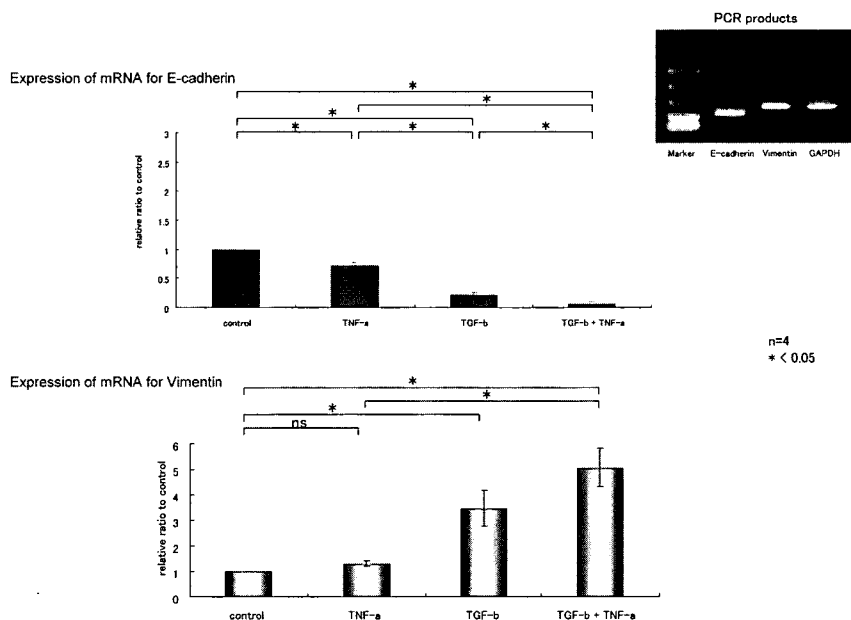


図2 TGF- $\beta$ 1 および TNF- $\alpha$  による上皮間葉転換の A549 細胞での E-cadherin, vimentin の mRNA の発現の検討  
 TGF- $\beta$ 1 および TNF- $\alpha$  刺激による各条件 (X 軸) での E-cadherin mRNA の発現 (上段), vimentin mRNA の発現 (下段), A549 細胞の無刺激状態での各 mRNA の発現をコントロールとして, 各々の条件で, 相対的比 (Y 軸) で比較. データは独立した 4 回の実験の平均, means+SEM. \* $p < 0.05$

## 2) EMT を経由した間葉系細胞の収縮能

まず, 「A549 細胞 (無刺激)」と「TGF- $\beta$ 1 単独刺激による EMT を経由した間葉系細胞」と, 「TGF- $\beta$ 1 と TNF- $\alpha$  との共刺激による EMT を経由した間葉系細胞」との細胞収縮能について, 図 3 に示す. 上述のごとく, 個々の細胞を含む three-dimensional な培養と考えられる Gel を, Serum free-DMEM (無刺激の状況) で培養 (2 日間) し, 培養前と 48 時間後の Gel の size で評価を行った. 「A549 細胞 (無刺激)」では, ほとんど収縮能を有していなかったが, 「EMT を経由した間

葉系細胞」では, 有意に収縮能を有していた. さらに「TGF- $\beta$ 1 単剤での EMT」に比して, 「TGF- $\beta$ 1 + TNF- $\alpha$  での EMT を経由した細胞」で収縮能が高い傾向があった.

次に, 最も収縮能があると思われる「TGF- $\beta$ 1 と TNF- $\alpha$  との共刺激による EMT を経由した間葉系細胞」を用いて, 3D-gel 内に包埋・培養 (2 日間) し, 培養液中に TGF- $\beta$ 1 および TNF- $\alpha$  で刺激を行い, その収縮能へのサイトカインの影響を検討した. 2 日間刺激しないで培養した Gel size に対しての, TNF- $\alpha$ ,

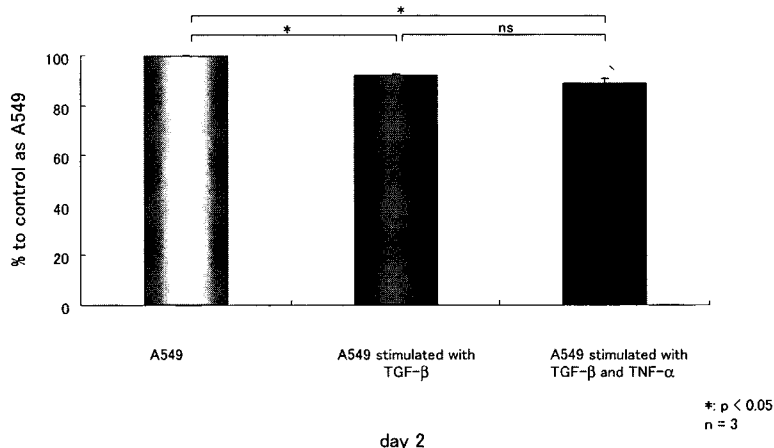


図3 皮間葉転換を経由した A549 細胞の収縮能  
 Y 軸: 2 日目の gel size で 0 日目の gel size を control として 100 % として表記. X 軸: 無刺激, TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 1+TNF- $\alpha$  による刺激で 48 時間培養 (EMT を経由) した A549 細胞. データは独立した 3 回の実験の平均. means+SEM. \* $p < 0.05$

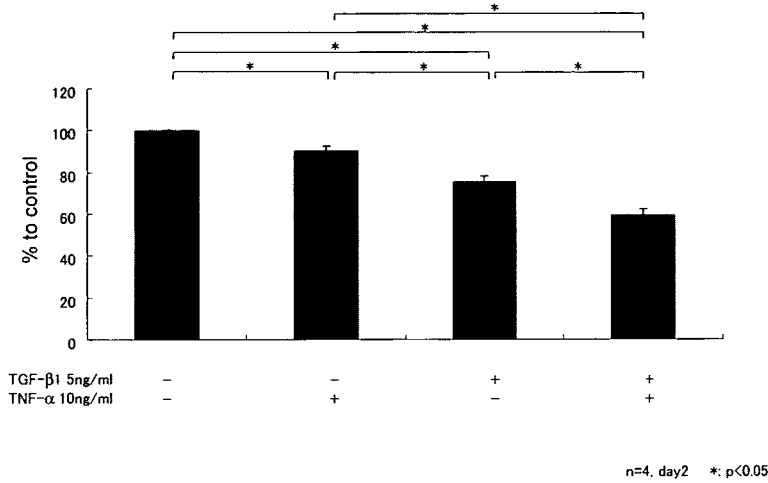


図4 TGF-β1+ TNF-α による上皮間葉転換を経由した A549 細胞の収縮能  
Y 軸：2 日目の gel size で無刺激の gel size を control として 100% として表記。X 軸：無刺激, TNF-α, TGF-β1, TGF-β1+TNF-α による刺激。データは独立した 4 回の実験の平均, means+SEM, \*p<0.05

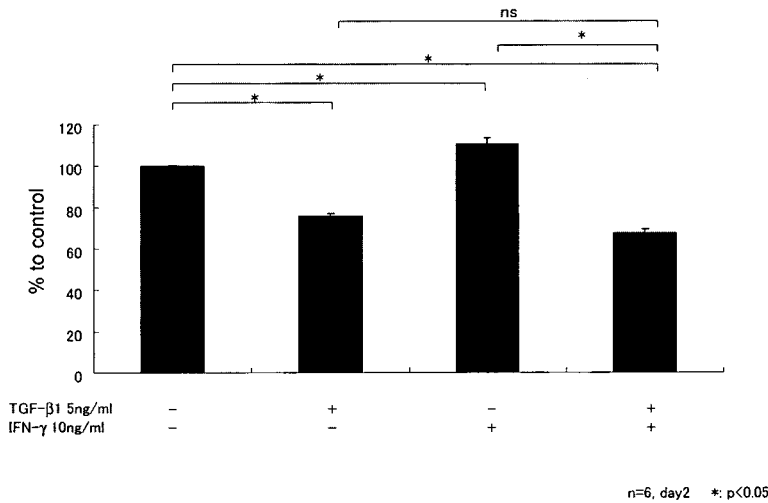


図5 IFN-γ による細胞収縮能への影響  
Y 軸：2 日目の gel size で無刺激の gel size を control として 100% として表記。X 軸：無刺激, TGF-β1, IFN-γ, TGF-β1+IFN-γ による刺激。データは独立した 6 回の実験の平均, means+SEM, \*p<0.05

TGF-β1, TGF-β1+TNF-α で刺激した Gel size と比較し解析した。図 4 に示すように, TNF-α, TGF-β1, TGF-β1+TNF-α で刺激した順に, 有意に高い収縮能を有していた。

最後に, EMT により獲得した収縮能へ与える影響を検討する目的にて, 肺線維症の治療薬としている着目されている IFN-γ や Dexamethasone (Dex) で刺激して収縮能を検討した。図 5 に IFN-γ の gel contraction への影響を示す。IFN-γ 単剤刺激では, 2 日後の gel size は, 無刺激に比べて, 大きく, gel の収縮が抑制されており, IFN-γ は, EMT により獲得した細胞収縮能を抑制する作用が認められた。しかし, TGF-

β1 との共刺激 (TGF-β1 が存在する中での治療薬であるので, より病態に近いモデルと考える) では, EMT を経由した細胞の収縮の抑制は認められなかった。図 6 に Dex の gel contraction への影響を示す。IFN-γ と同様に, Dex 単剤では, control と差はなかったが, Dex と TGF-β1 との存在下では, 同様に収縮の抑制が認められなかった。

## 結 論

肺胞上皮細胞である A549 細胞は, TGF-β1 および TNF-α の存在下で, 上皮間葉転換を経由して間葉系

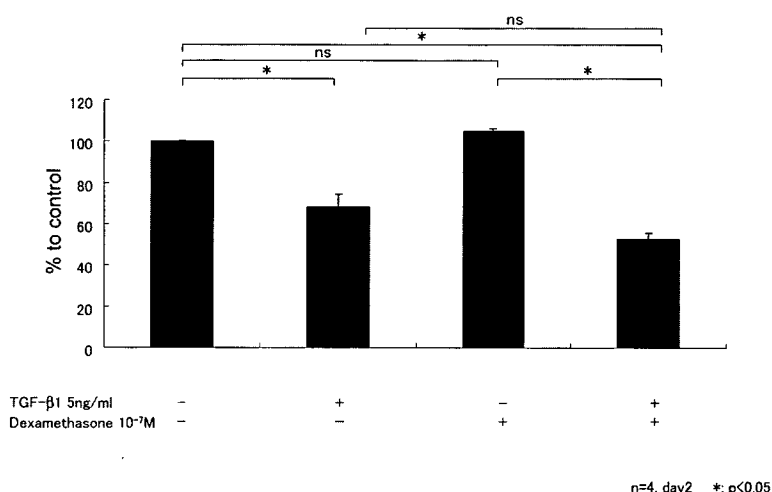


図6 Dexamethasone による細胞収縮能への影響

Y 軸：2 日目の gel size で無刺激の gel size を control として 100% として表記。X 軸：無刺激, TGF-β1, Dexamethasone, TGF-β1+Dex-amethasone による刺激。データは独立した 4 回の実験の平均, means+SEM, \*p<0.05

細胞となり、間葉系細胞の重要な機能の 1 つである細胞収縮能を獲得した。

### 考 案

肺胞上皮細胞株である A549 細胞は、TGF-β1 の存在下において、上皮間葉転換 (EMT) を経由し間葉系細胞の特徴を持つ細胞に転換した。さらに、TNF-α と TGF-β1 との共存下では、EMT において、形態学的にも、また、その機能である収縮能にも、その効果を増強した。従来報告で IPF 患者の肺組織において TGF-β および TNF-α の発現が亢進しており、また、TGF-β および TNF-α の overexpression の動物モデルにおいても、肺線維症を来すことが知られており、TGF-β および TNF-α は、肺線維症において重要な役割を果たす成長因子・サイトカインであることが認識<sup>4,7)</sup>されている。今回の我々の検討において、TGF-β および TNF-α の併用においてより強い EMT による細胞形態学的な変化が認められ、その機能である収縮能の亢進が認められ、肺線維症の機序において、EMT による肺胞上皮細胞からの線維芽細胞への変化および線維化病巣の形成に、EMT による間葉系細胞が関与している可能性が示唆されていると考えられる。

次に、EMT を経由した間葉系細胞の収縮能において、IFN-γ 単独では、細胞の収縮能を抑制したが、TGF-β1 の存在下では、IFN-γ による収縮の抑制効果は、認められなかったことは、臨床面において、

IFN-γ が効果に乏しいことに合致している可能性がある。同様にステロイドについても同様と考えられる。以上よりも、EMT による間葉系細胞が肺線維症の線維化病態に関与している可能性も考えられる。今後、さらに、EMT の機序および収縮能の解明とともに、EMT やその収縮を制御するような種々の薬剤についても検討したいところである。

以上より、肺線維症の機序の解明・戦略的な新たな治療においては、EMT の機序の解明が重要な役割を果たすとも考えられる。さらには、EMT を抑制することや EMT の逆の過程である線維芽細胞を上皮細胞へ転換させる間葉上皮転換 (mesenchymal epithelial transition: MET) について検討することが、肺線維症への新たな治療への手がかりになる可能性も秘めていると思われる。

### 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) 特発性間質性肺炎 診断と治療の手引き 編集 日本呼吸器学会びまん性肺疾患 診断・治療ガイドライン作成委員会 2006 年 4 月 南江堂。
- 2) American Thoracic Society: Idiopathic pulmonary Fibrosis: diagnosis and treatment. Interna-

- tional consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am J Respir Crit Care Med.* **165**: p. 277-304, 2002
- 3) Evans, J.N., et al., Increased contractility of isolated lung parenchyma in an animal model of pulmonary fibrosis induced by bleomycin. *Am Rev Respir Dis* **125**: 89-94, 1982
- 4) Khalil, N., et al., Increased production and immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **5**(2): p. 155-62, 1991.
- 5) Piguet, P.F., et al., Expression and localization of tumor necrosis factor-alpha and its mRNA in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* **143** (3): p. 651-5, 1993.
- 6) Sime, P.J., et al., Adenovector-mediated gene transfer of active transforming growth factor-beta1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung. *J Clin Invest* **100**(4): p. 768-76, 1997.
- 7) Allen, J.T. and M.A. Spiteri, *Growth factors in idiopathic pulmonary fibrosis: relative roles.* *Respir Res.* **3**: p. 13, 2002.
- 8) Thiery, J.P., Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol.* **15**(6): p. 740-6, 2003.
- 9) Kalluri, R. and E.G. Neilson, Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest.* **112**(12): p. 1776-84, 2003.
- 10) Kasai, H., et al., TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir Res.* **6**: p. 56, 2005.
- 11) Willis, B.C., et al., Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol.* **166** (5): p. 1321-32, 2005.
- 12) Kim, K.K., et al., Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **103**(35): p. 13180-5, 2006.

# ブレオマイシン肺線維症モデルにおける imatinib の 抗線維化メカニズム

## ～ $\alpha$ 1-acid glycoprotein と fibrocyte の役割～

西岡 安彦 東 桃代 青野 純典 曾根 三郎\*

我々は BLM 肺線維症マウスにおける分子標的治療薬 imatinib (Gleevec<sup>®</sup>) の肺線維化抑制効果を報告してきた。一方, imatinib の投与スケジュールによる検討においては早期 14 日間投与では抗線維化効果を認めたが, 後半 14 日間の投与では抗線維化効果が認められなかった。今回このメカニズムを明らかにすることを目的に検討を行った。その結果, BLM 肺線維症マウスで上昇する  $\alpha$ 1-acid glycoprotein (AGP) が imatinib の阻害作用を有する一方, imatinib 後半投与にマクロライドを併用することで AGP の阻害作用が解除され, imatinib の抗線維化効果が回復することが明らかとなった。また近年, 骨髄由来の fibrocyte が肺へ遊走し肺線維化に関与している報告がなされている。Imatinib は *in vitro* において PDGF 刺激による fibrocyte の遊走を阻害し, BLM 肺線維症マウスにおいて imatinib 前半投与は肺 fibrocyte の割合を減少させた。以上のことから早期投与の効果は fibrocyte の遊走を阻害することで発揮された可能性が示唆された。

## Anti-fibrotic effects of imatinib in bleomycin-induced pulmonary fibrosis ～Role of $\alpha$ 1-acid glycoprotein and fibrocyte～

Yasuhiko Nishioka, Momoyo Azuma, Yoshinori Aono, and Saburo Sone<sup>1</sup>

*Departments of Internal Medicine and Molecular Therapeutics, Institute of Health Biosciences,  
The University of Tokushima Graduate School*

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) is a progressive and lethal pulmonary disorder. We reported the anti-fibrotic effects of imatinib using a bleomycin-induced lung fibrosis model in mice. Antifibrotic effect of imatinib was observed when imatinib was administered in the early phase of fibrosis but not in late phase. To clarify this mechanism, we examined the role of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein (AGP) and fibrocyte in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. The elevated level of AGP was detected serum and lung homogenates in BLM-exposed mice and reached a plateau on day 14. Addition of AGP abrogated imatinib-mediated inhibition of the growth of fibroblasts. However, treatment with erythromycin (EM) or clarithromycin (CAM) restored the growth-inhibitory effects of imatinib *in vitro*. The combined therapy of imatinib with EM significantly reduced the fibrogenesis via inhibition of growth fibroblasts *in vivo*, even when these were administered in the late phase. We demonstrated that AGP is an important regulatory factor modulating the ability of imatinib to prevent pulmonary fibrosis in late phase.

On the other hand, we found that imatinib inhibited the migration of fibrocyte stimulated by PDGF *in vitro*. Furthermore, imatinib reduced the number of fibrocytes in the lungs of BLM-treated mice in early phase. These data suggest that the early treatment of imatinib inhibits the migration of circulating fibrocytes into the lungs and prevents the development 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、プレオマイシン (BLM) 誘発肺線維症モデルにおける抗線維化効果について検討してきた。その結果、imatinib 投与 (day0-28) は強力な抗線維化効果を有することが明らかとなった。一方、imatinib の投与スケジュールによる検討においては早期投与 (day0-14) では、抗線維化効果が認められたが、後半投与 (day15-28) では抗線維化効果が認められなかった。そこで、(1) なぜ早期の 14 日間のみ投与で抗線維化効果が認められるのか？ (2) なぜ後半 14 日間の投与では効果が認められないのか？ の 2 点を明らかにすることを目的とし検討を行った。

方 法

肺線維症モデルは 8 週齢の C57/BL6 マウスにプレオマイシン (bleomycin: BLM) 125 mg/kg を 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 (Novartis 社より供与) は 50 mg/kg/day を腹腔内投与し、エリスロマイシ (EM) 5 mg/kg/day, クラリスロマイシ (CAM) 20 mg/kg/day は各々 imatinib と同時に皮下投与した。28 日後にマウスを sacrifice し、Sircol Collagen Assay を用いた肺コラーゲン含量の定量と HE 染色による組織学的な線維化の評価 (Ashcroft score) を行った。AGP は Western blotting と radial immunodiffusion assay にて検討した。C57/B6 から樹立した線維芽細胞株を用いて imatinib による増殖抑制効果を <sup>3</sup>H-TdR 取り込み試験を用いて測定した。また in vivo における肺線維芽細胞の増殖抑制効果を検討するため抗 Ki-67 抗体と S100/FSP-1 抗体の免疫染色を行った。一方、ヒト fibrocyte は末梢血単核球から fibronectin コートフラスコによる培養で誘導した。また PDGF レセプター発現を FACS にて検討した。

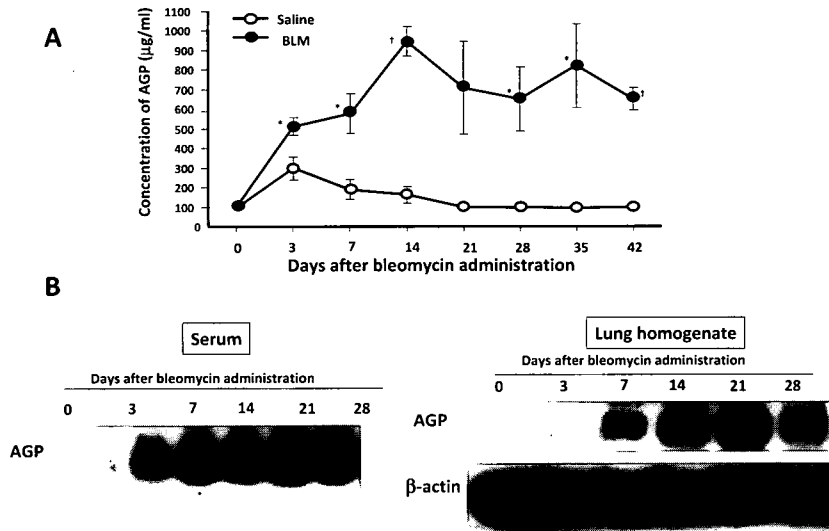


図 1 プレオマイシン (BLM) 肺線維症モデルマウスにおける AGP の推移。  
 A: BLM 肺線維症モデルマウスの血清 AGP 濃度。血清 AGP 濃度は radial immunodiffusion assay を用い検討した。コントロールマウスで 90~110 µg/ml, BLM 肺線維症モデルでは 3 日目より上昇し、14 日目以降は 650 ~1,000 µg/ml であった。  
 B: 血清および肺における AGP の推移—Western blotting による検討—マウス肺ホモジェナイズとマウス血清を用い Western blotting にて発現の検討を行った。血清では図 1A と同様に 3 日目より発現亢進を認め肺組織では 7 日目以降に強い発現の亢進を認めた。

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

\* びまん性肺疾患に関する調査研究班 分担研究者

fibrocyte の PDGF による遊走能はボイデンチャンバー法にて解析した。また BLM 肺線維症マウスモデルの肺組織中 fibrocyte 数の検討は、肺をトリプシン処理後、付着細胞に対して抗 CD45 抗体、抗 CXCR4 抗体、抗 Collagen I 抗体による 3 重染色法を行い、フローサイトメトリー法にて行った。

結 果

BLM 肺線維症マウスモデルでは血清 AGP 濃度は 3 日目より上昇し、14 日目以降は 650 ~ 1,000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  であった。また肺組織では 7 日目より明らかな上昇を認めた (図 1A, 1B)。In vitro で AGP は濃度依存性に imatinib の増殖抑制効果を阻害した (図 2)。一方、

EM, CAM の添加は AGP の作用を解除し imatinib の増殖抑制効果を回復させた (図 3A, 3B)。また BLM マウスモデルにおいて imatinib と EM および CAM の併用は後期投与のみで 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 4A, 4B)。またこの効果が線維芽細胞の増殖抑制によるものかどうかを検討するため 21 日目の肺切片を用い Ki-67 の免疫染色を行った。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 5A)。また蛍光抗体法にて Ki-67 陽性細胞は、同時に線維芽細胞のマーカーである S100A4/FSP1 も陽性であることが確認された (図 5B)。一方、分離されたヒト、マウス fibrocyte は抗 CD45 抗体、抗 CXCR4 抗体、抗 Collagen I 抗体による 3 重染色法が陽性であることを確認し実験に使用した。ヒト fibrocyte には PDGF レセプターが発現し (図 6)、PDGF 刺激で遊走することが確認された (図 7)。また imatinib は PDGF 刺激による fibrocyte の遊走を阻害した (図 8)。BLM 肺線維症マウスモデルに imatinib を早期投与 (day0-14) し肺 fibrocyte 数を検討したところ、day7 で有意に fibrocyte 数の割合を減少させた (図 9)。

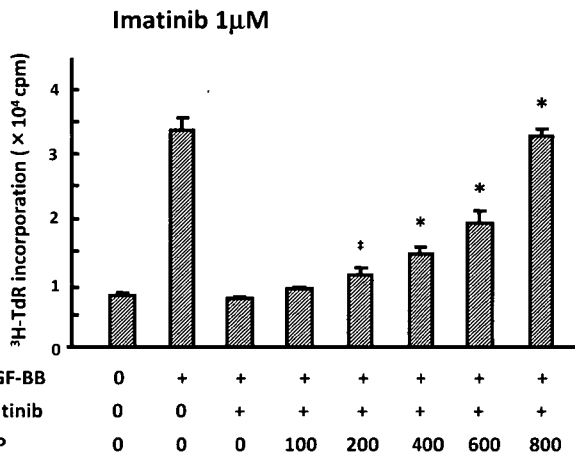


図 2 Imatinib によるマウス肺線維芽細胞の増殖抑制効果に及ぼす AGP の影響。  
C57BL/6 マウスより作成した肺線維芽細胞株を用いて、PDGF-BB (10 ng/ml) で 72 時間刺激後 <sup>3</sup>H-TdR (1  $\mu\text{Ci}/\text{well}$ ) を 18 時間パルスし、増殖能を測定した。1  $\mu\text{M}$  の imatinib に対し AGP を 100~800  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で添加しその効果を検討した。その結果、AGP 添加により imatinib の線維芽細胞増殖抑制効果は有意に減弱された。

考 察

今回、我々は BLM 肺線維症マウスにおける imatinib の投与期間による抗線維化効果の差異に注目し検討を行った。これまでに imatinib 早期投与は気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞浸潤抑制効果を認めなかったことから、早期の imatinib の抗線維化効果は抗炎症作用、また線維芽細胞増殖抑制以外の何らかの理

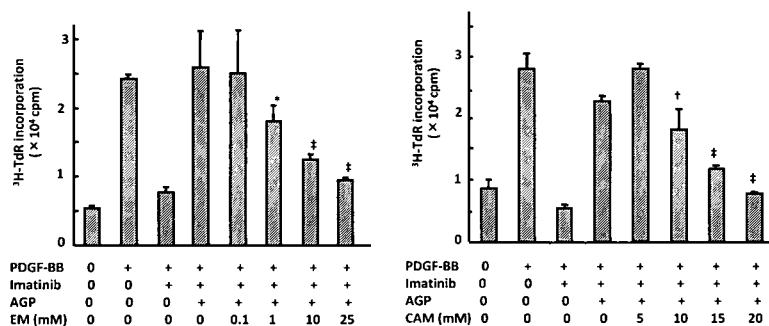


図 3 Erythromycin, Clarithromycin による AGP の作用抑制。  
C57BL/6 マウスより作成した肺線維芽細胞株を用いて、PDGF-BB (10 ng/ml) で 72 時間刺激後 <sup>3</sup>H-TdR (1  $\mu\text{Ci}/\text{well}$ ) を 18 時間パルスし、増殖能を測定した。1  $\mu\text{M}$  の imatinib と 800  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の AGP に対し、Erythromycin (EM) を 0.01~25  $\mu\text{M}$ 、Clarithromycin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

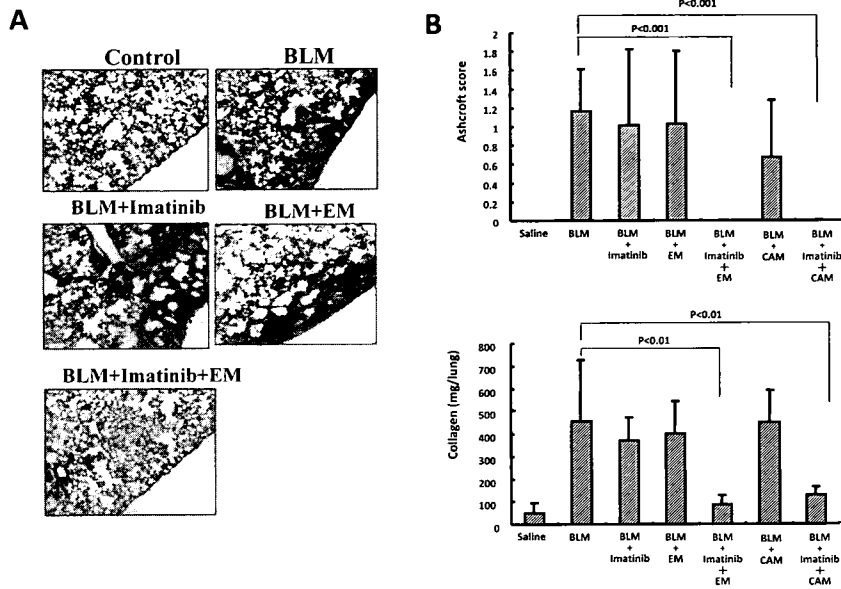


図4 BLM誘発肺線維症モデルにおける imatinib と EM および CAM の併用効果。C57BL/6 マウスに osmotic mini-pump を用いて 125 mg/kg の BLM を持続皮下投与した。BLM 投与開始 14 日目から、imatinib (50 mg/kg) 単独投与、EM (5 mg/kg) 単独投与、CAM (20 mg/kg) 単独投与 imatinib と EM または CAM の併用投与を行った。左肺組織の HE 染色で EM、CAM 単独では肺線維化を抑制しなかったが併用投与において抗線維化効果を認めた (A)。28 日後の右肺を用いてコラーゲン量を 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 (B)。

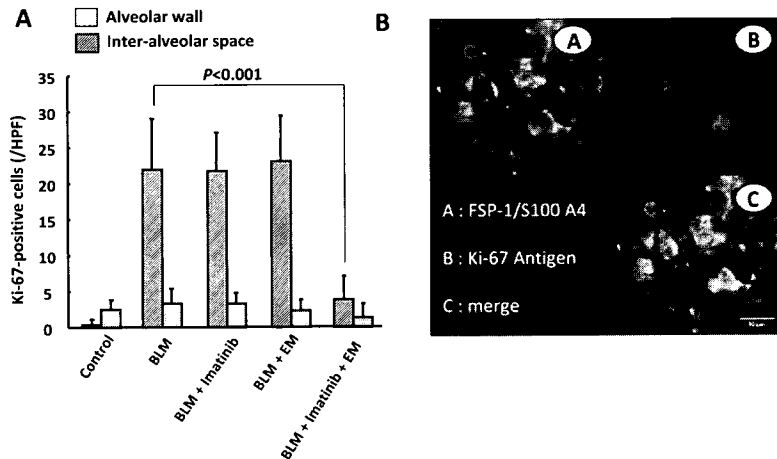


図5 Imatinib と EM 併用による in vivo での肺線維芽細胞増殖抑制効果。Ki-67 の抗体を用い免疫染色を行った。その結果、間質に存在する Ki-67 陽性細胞は Imatinib と EM 併用群で著明に抑制されていることが確認された (A)。蛍光抗体法にて、この間質に存在する Ki-67 陽性細胞は、同時に S100A4/FSP1 も陽性であり、線維芽細胞であることが確認された (B)。

由が存在すると考えた。近年、骨髄由来の fibrocyte が CXCL12 依存性に肺へ遊走し肺線維化に関与している報告がなされている。そこで我々は早期の段階では imatinib が fibrocyte の肺への遊走阻止に関与しているという仮説を立て検討を行った。その結果、imatinib は PDGF による fibrocyte の遊走を阻害し、BLM 肺線維症マウスモデルにおいても imatinib 前半投与は肺 fibrocyte の割合を減少させたことから、imatinib 早期

投与の効果は fibrocyte の遊走を阻害することにより発揮された可能性が示唆された。

また imatinib は後期においては肺線維芽細胞の増殖を抑制することにより抗線維化効果を発揮すること、AGP 濃度によりその作用が影響を受けることが明らかとなった。また後半の imatinib 耐性はマクロライドを併用することで線維芽細胞増殖抑制効果が回復することが明らかとなった。我々の検討で IPF 患者



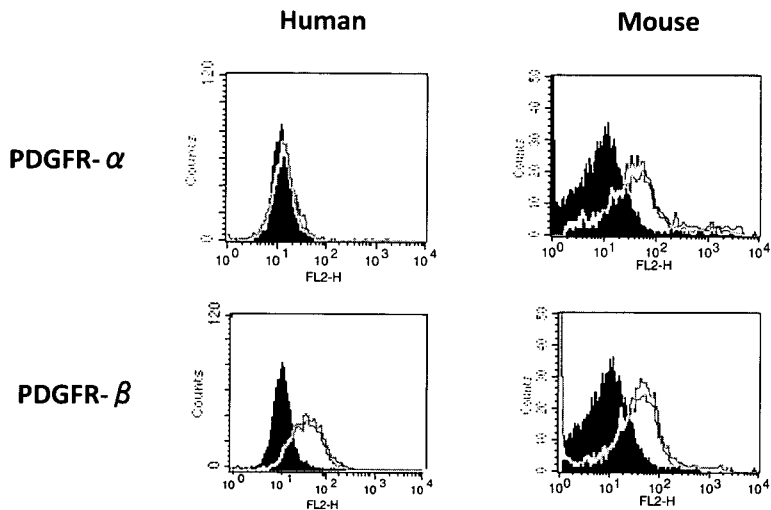


図6 マウス fibrocyte, ヒト fibrocyte における PDGF レセプターの発現。  
マウス, ヒト fibrocyte の PDGF レセプターの発現を FACS にて解析した結果マウスでは PDGF $\alpha$  と  $\beta$ , ヒトでは PDGF $\beta$  の強い発現を認めた。

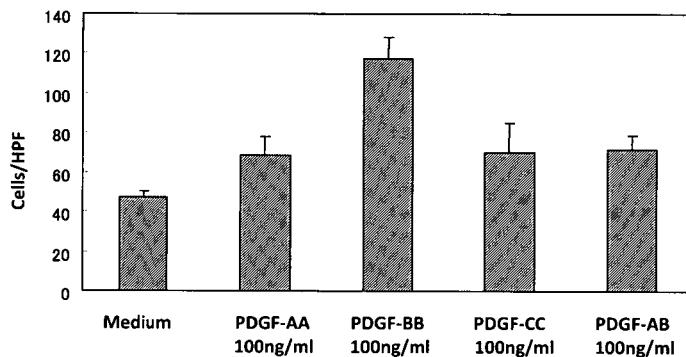


図7 ヒト fibrocyte の PDGF 刺激による遊走能の検討。  
fibrocyte の PDGF による遊走能はポインテンチャンパー法にて解析した。結果, PDGF-BB100 ng/ml で有意な遊走能を示した。

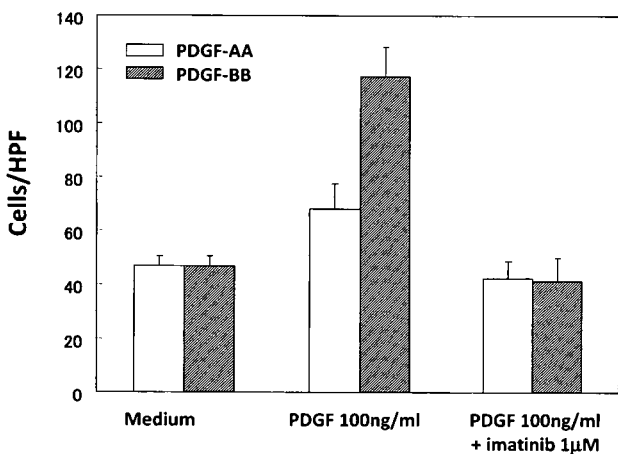


図8 Imatinib の PDGF 刺激による fibrocyte の遊走阻害の検討。  
PDGF-BB100 ng/ml 刺激による fibrocyte の遊走を imatinib は有意に抑制し, PDGF-AA100 ng/ml による fibrocyte の遊走も阻害した。

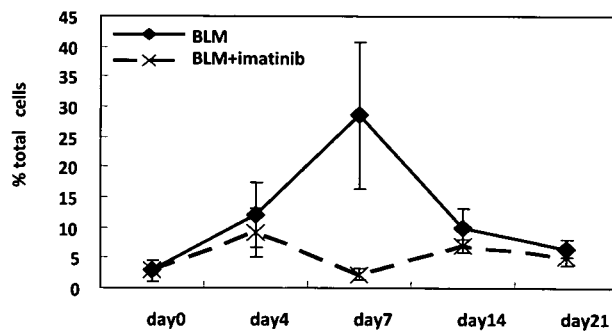


図9 BLM 肺線維症モデルにおける imatinib 投与による肺 fibrocyte の検討。  
BLM モデルマウスに imatinib 50 mg/kg/day を連日腹腔内投与し, 7 日目の肺 fibrocyte の割合を検討した結果, コントロール群に比し有意に減少していた。

の約 50% において AGP 濃度は 1,000  $\mu\text{g/ml}$  以上と高値であった。図 2 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。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。以上のことから IPF に対する抗線維化薬として imatinib の臨床応用を考慮する際には、fibrocyte の遊走阻害の観点からの検討も重要であり、また実際に投与する際には血清 AGP 濃度に考慮した投与法の工夫や EM, CAM との併用療法の導入がより効果的である可能性が示唆された。

#### 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): 1641-1650, 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. Role of alpha1 acid glycoprotein binds to imatinib (STI571) and substantially alters its pharmacokinetics in chronic myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res* 9: 625-632, 2003.
- 4) Azuma M, Nishioka Y, Aono Y, Inayama M, Makino H, Kishi J, Shono M, Kinoshita K, Uehara H, Ogushi F, Izumi K, Sone S. Role of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein in therapeutic antifibrotic effects of imatinib plus macrolides in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 176(12): 1243-1250, 2007.
- 5) Naozumi Hashimoto, Hong Jin, Tianju Liu, Stephen W. Chensue, Sem H. Phan. Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 113(2): 243-252, 2004 January 15.

# サルコイドーシス

# サルコイドーシス重症度分類 (試案)

折津 愈<sup>1\*</sup> 千田 金吾<sup>2\*</sup> 杉崎 勝教<sup>3\*</sup>

従来のサルコイドーシスにおける重症度分類案は機能障害を中心とした分類であったが、今回われわれは治療効果と機能障害の両側面からの重症度分類を検討した。すなわち治療効果を治療反応性サルコイドーシスと治療抵抗性サルコイドーシスに分け、これに軽い機能障害から身障者認定基準までの範囲を含めた重症度分類を提案した。

## The disease severity classification plan in sarcoidosis

Masaru Oritsu<sup>1</sup>, Kingo Chida<sup>2</sup>, and Katsunori Sugisaki<sup>3</sup>

<sup>1</sup>*Department of Respiratory Medicine Japanese Red Cross Medical Center*

<sup>2</sup>*Second Division, Department of Internal Medicine Hamamatsu University School of Medicine*

<sup>3</sup>*Department on Internal Medicine National Nishibeppu Hospital*

Up to this time, the disease severity classification in sarcoidosis was mainly functional disorder.

We examined severity classification from curative effect and functional disorder. We divided curative effect into two types; treatment reactivity sarcoidosis and treatment resistance sarcoidosis.

We tried disease severity classification in sarcoidosis from matched two types and functional disorder.