

## 参考文献

- 1) Bernard GR, Artigas A, Brigham KL, *et al.* The American-European Consensus Conference on ARDS. Definitions, mechanisms, relevant outcomes, and clinical trial coordination. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; **149**: 818-824.
- 2) Bernard GR. Acute respiratory distress syndrome. A historical perspective. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; **172**: 798-806.
- 3) Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000; **342**: 1334-1349.
- 4) Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 1967; **29**: 319-323.
- 5) Tomashefski JF Jr. Pulmonary pathology of the adult respiratory distress syndrome. *Clin Chest Med* 1990; **11**: 593-619.
- 6) Ichikado K, Johkoh T, Ikezoe J, *et al.* Acute interstitial pneumonia: high-resolution CT findings correlated with pathology. *Am J Roentgenol* 1997; **168**: 333-338.
- 7) Ichikado K, Suga M, Gushima Y, *et al.* Hyperoxia-induced diffuse alveolar damage in pigs: correlation between thin-section CT and histopathologic findings. *Radiology* 2000; **216**: 531-538.
- 8) Ichikado K, Suga M, Müller NL, *et al.* Acute interstitial pneumonia: comparison of high-resolution computed tomography findings between survivors and non-survivors. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; **165**: 1551-1556.
- 9) Ichikado K, Suga M, Muranaka H, *et al.* Prediction of prognosis for acute respiratory distress syndrome with thin-section CT: validation in 44 cases. *Radiology* 2006; **238**: 321-329.

## 急性呼吸窮迫症候群 (ARDS) の臨床病理学的解析

福田 悠\* 康 徳東 山元 滋樹 小野美紀子  
中山 智子 石崎 正通

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

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

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

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

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

## 目 的

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

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

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

症例の剖検例において、ARDS 発症時点の病理像について解析した。

## 方 法

日本医大付属病院での剖検例を対照とした。

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

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

## 結 果

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

2) 臨床診断 ARDS 症例は、すべて ARDS 発症時

表 1 Pathologically diagnosed DAD 22 cases

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

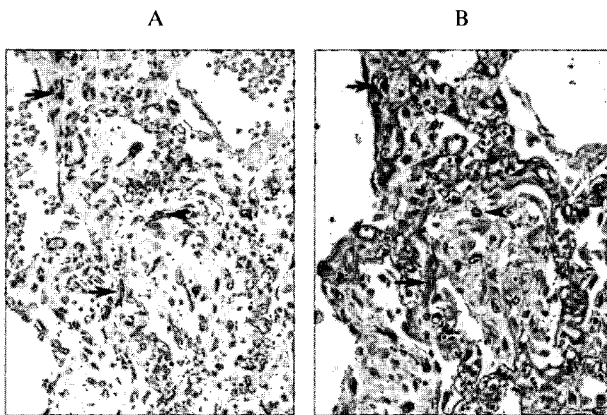


図 1 DAD の増殖期 (肺癌, 化学療法; イレッサ)  
 $\alpha$  平滑筋アクチン陽性の増生筋線維芽細胞は IV 型コラーゲン陽性の上皮基底膜の分布から肺胞腔内(矢頭)および肺胞壁(矢印)にあることを示す。(免疫組織化学, 連続切片 A:  $\alpha$  平滑筋アクチン, B: IV 型コラーゲン)

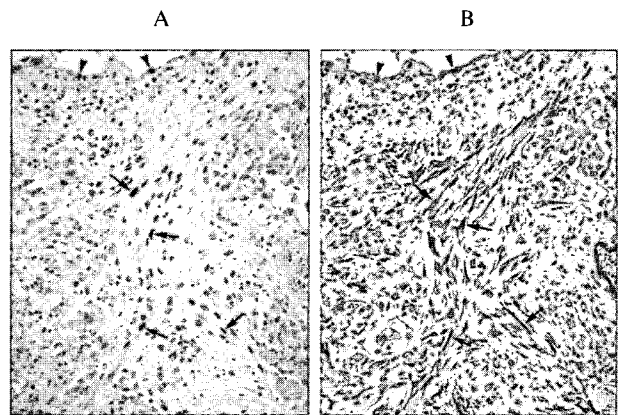


図 2 DAD の増殖期 (悪性中皮腫, 化学療法)  
 細胞増殖のマーカである Mib 1(Ki67) で観察すると, 肺胞上皮(矢頭), 肺胞腔内の  $\alpha$  平滑筋アクチン陽性の筋線維芽細胞(矢印)に陽性であり, 増生が盛んであることを示す。(免疫組織化学, 連続切片 A: Mib 1(Ki67), B:  $\alpha$  平滑筋アクチン)

の  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  は 200 以下であり, ARDS の病態は, 臨床的に気管支肺炎 (5/19 例), アスペルギルス感染症 (2/19), カリニ肺炎 (1/19), 腫瘍浸潤 (1/19) によると考えられていた (表 2)。しかし, 病理学的検索では, ARDS 発症時点での感染症, 腫瘍浸潤などの病理像は確認できなかった。17/19 例で DAD が認められ, ARDS 発症時点に相当する DAD 像は 15/19 例で確認された (図 4)。DAD でなかった 2 例は, それぞれ感染性心内膜炎による心原性肺浮腫と急性骨髄性白血病で化学療法後のサイトメガロウイルス肺炎であった。

## 考察と結論

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

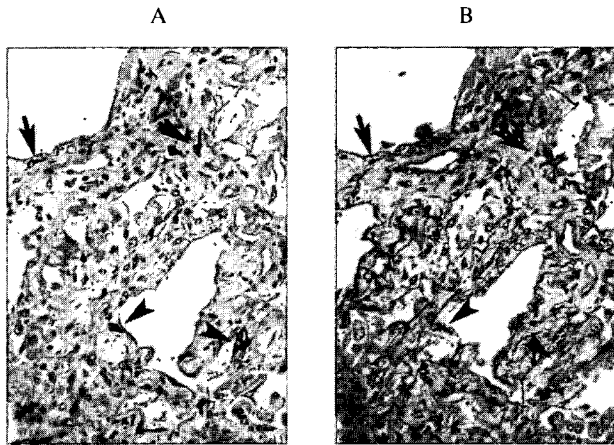


図3 DADの増殖期 (成人T細胞性白血病, 化学療法)  
I型コラーゲン陽性の筋線維芽細胞は, IV型コラーゲン陽性の上皮基底膜の分布から肺胞腔内(矢頭)および肺胞壁(矢印)にあることを示す。(免疫組織化学, 連続切片 A: I型コラーゲン, B: IV型コラーゲン)

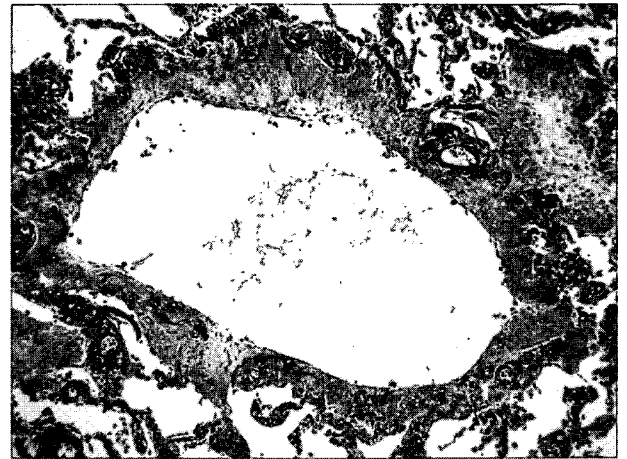


図4 臨床診断ARDS時(死亡の15日前)に, その原因が気管支肺炎と考えられた症例  
剖検では, 一様に硝子膜の器質化, 線維化が見られ, DAD発症後2-3週間を示している。その時期に一致した気管支肺炎像は確認されない。

表2 Clinically diagnosed ARDS 19 cases

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

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

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

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

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

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

## 文 献

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

## 慢性鳥関連過敏性肺炎 (chronic bird-related hypersensitivity : BRHP) の病態解明

—— 肺局所における原因抗原の局在と樹状細胞との関連 ——

宮崎 泰成 見高 恵子 倉持 仁 立石 知也  
大谷 義夫 稲瀬 直彦 吉澤 靖之\*

昨年までの研究で, chronic BRHP の UIP (usual interstitial pneumonia) パターンでは, ケモカインは Th2 にシフトしていることが明らかとなった (Thorax 2008, in press). Th2 に誘導する樹状細胞を検討するために, 外科的肺生検を施行した acute BRHP 1 例, chronic BRHP 5 例および膠原病肺 1 例を比較検討した. 原因抗原 (鳩排泄物抽出物; pigeon dropping extracts, PDE) に対する抗体 (抗 PDE 抗体) で免疫染色をすると, 細気管支上皮の基底膜側に顆粒状に染色され, myeloid dendritic cell (DC) のマーカーである CD1a 陽性細胞の分布と似ており, この樹状細胞が抗原をプロセスしている可能性が考えられた. マウスモデルでの検討では, C57BL/6 (Th1 優位) と A/J (Th2 優位) を使用し Th1 および Th2 の影響を検討した. BRHP モデルにおいては, Th2 優位である A/J マウスは, Th1 優位である C57BL/6 に比較して強く線維化する傾向にあった. マウスモデルにおいても Th2 優位な免疫状態は肺の線維化に関わっていると考えられたが, 樹状細胞の関与は今回の研究では明らかにされなかった. BRHP の肺病変形成における PDE と樹状細胞の役割をさらに検討していく必要があると考えられた.

### Characterization of dendritic cells during the fibrotic process in chronic bird-related hypersensitivity pneumonitis

Yasunari Miyazaki, Mitaka Keiko, Jin Kuramochi, Tomoya Tateishi, Yoshio Ohtani  
Naohiko Inase, and Yasuyuki Yoshizawa

*The Department of Integrated Pulmonology, Tokyo Medical and Dental University*

Th2 predominance appears to favor development of pulmonary fibrosis both through the induction of profibrotic events and through the inhibition of Th1 cytokine production with antifibrotic properties. We have reported that a Th2 predominant immune response in chemokine balance may play an important role in the development of UIP (usual interstitial pneumonia)-like lesions of chronic bird-related hypersensitivity pneumonitis (chronic BRHP) as already observed in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) (*Thorax* in press). Recent study suggests pulmonary dendritic cells (DCs) could control Th1 or Th2 responses in local microenvironment. The aim of this study is to determine which pulmonary dendritic cells contribute to the Th2 predominance of immune response.

We analyzed one patient with acute BRHP, 5 patients with chronic BRHP and one patient with Sjögren syndrome who had lung specimens of surgical lung biopsies. We established rabbit anti-PDE (pigeon dropping extracts) antibody and performed immunohistochemistry for PDE and CD1a as a myeloid DC marker. PDE staining was observed as granular staining in membranous epithelial cells and CD1a positive cells resides close to PDE positive granules. In PDE lung models, we compared disease progression between two immunologically different murine strain; C57BL/6 as a Th1-prone mouse and A/J as a Th2-prone mouse. In analysis of collagen content, Th2-biased A/J had a tendency to have more fibrosis compared to Th1-biased C57BL/6. These results suggest Th2-prone in immune response may play an important role in a process of pulmonary fibrosis also in murine BRHP model.

We need more work to determine how pulmonary dendritic cells contribute to the Th2 predominance in chronic BRHP.

## はじめに

過敏性肺炎あるいは外因性アレルギー性胞隔炎は、免疫学的な機序で起こる原因の明らかな間質性肺炎の代表的疾患である。鳥関連過敏性肺炎 (bird-related hypersensitivity pneumonitis; BRHP) は、鳥関連を抗原とする過敏性肺炎で、慢性が多い<sup>1)</sup>。UIP/IPF の BAL の解析では CXCR3+CD4+細胞が CCR4+CD4+細胞に対して相対的に低下し、BALF 中の IP-10(CXCL10) が低下していた。Th1/Th2 ケモカインのバランスが Th2 ヘシフトしていると考えられる<sup>2)</sup>。同様に chronic BRHP の UIP (usual interstitial pneumonia) パターンでは、ケモカインは Th2 にシフトしていることを我々は報告した<sup>3)</sup>。一方、T 細胞に抗原提示する樹状細胞は、ナイーブヘルパー T 細胞を Th1 細胞や Th2 細胞に分化誘導することが知られている<sup>4)</sup>。Chronic BRHP において Th2 に誘導する樹状細胞の役割を外科的肺生検および BRHP マウスモデルで検討した。

## 方法と対象

外科的肺生検を施行した acute BRHP 1例, chronic BRHP 5例および膠原病肺 1例を比較検討した。まず、原因抗原 (鳩排泄物抽出物; pigeon dropping extracts, PDE) に対する抗体 (抗 PDE 抗体) を

作製し、免疫染色を行った。パラフィン包埋された肺標本から 4  $\mu$ m の切片を作成し、脱パラ後、クエン酸にて抗原賦活した。1次抗体として抗 PDE 抗体 (rabbit)、抗 CD1a、抗 S100 抗体を使用し、ビオチン化抗マウス IgG あるいは抗ラビット IgG の 2次抗体を使用し、ABC Kit (Vector) でシグナルを増幅し、DAB あるいは AI-P で発色させ、ヘマトキシリンで核染色を行った。

マウスモデルの作製 (図 3): C57BL6 (Th1) および A/J マウス (Th2) を Th2 アジュバントである Alum<sup>®</sup> および鳩糞抽出物 (PDE) 2  $\mu$ g により皮下注により感作したあと (day-3  $\cdot$  -1), PDE 8  $\mu$ g を週 3 回経鼻吸入させ、6 週後および 12 週後の肺を検討した。

## 結果と考察

## 鳥関連過敏性肺炎の外科的肺生検での検討 (図 1, 2)

まず急性鳥関連過敏性肺炎で検討した。抗 PDE 抗体の免疫組織染色では、膜性細気管支上皮内に顆粒状に染色された。この顆粒状の染色は、non-immune IgG を一次抗体とした陰性コントロールでは発現は認めず、またシェーグレン症候群の fNSIP (fibrotic nonspecific interstitial pneumonia) 病変でも細気管支上皮に発現は認められなかった。一方 CD1a 抗体で染色してみると、急性症例の膜性細気管支の基底膜

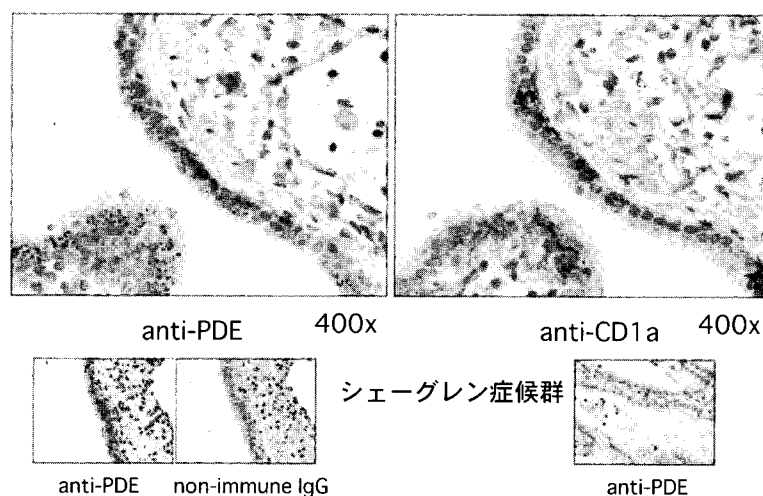


図 1 急性鳥関連過敏性肺炎



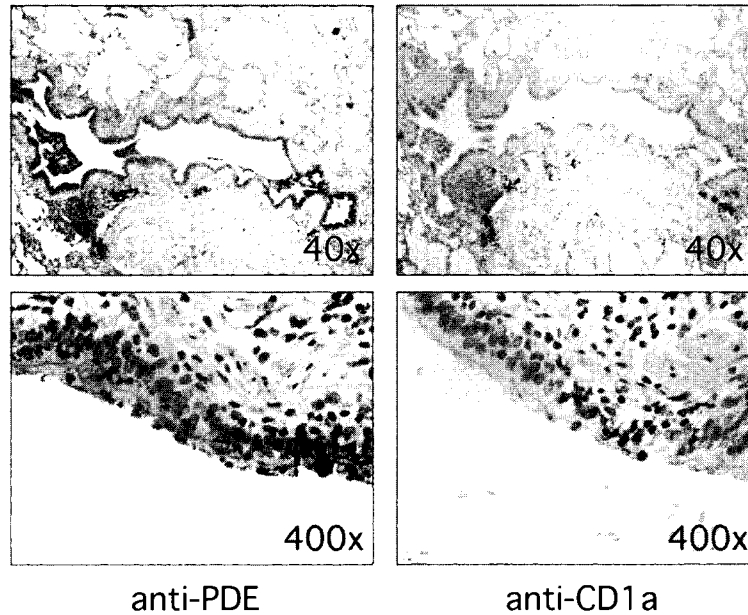


図2 慢性鳥関連過敏性肺炎

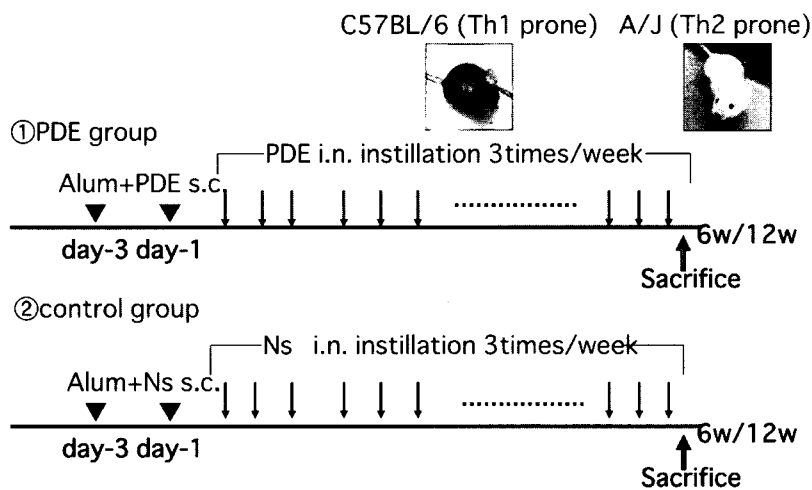


図3 慢性鳥関連過敏性肺炎モデル

側に、四方に突起をのぼす樹状細胞を認め、抗原である PDE と考えられる顆粒状のものと分布が近かった。この樹状細胞が抗原をプロセスしている可能性が考えられた。次に慢性鳥関連過敏性肺炎で検討したが、やはり細気管支上皮の基底膜側に顆粒状に PDE が染色されたが、CD1a の発現は、急性と比較して低い傾向にあるようだったが、症例数が少ないのでもう少し検討が必要である。

鳥関連過敏性肺炎モデルでの検討 (図 3-6)

図 3 に実験プロトコールを示す。6 週吸入後 (図 4) では、両群 (それぞれ  $n=3$ ) とともに腔内に大型のマクローファージの集簇と気管支・血管周囲にリンパ球浸

潤を認め、A/J マウスには肉芽腫や多核巨細胞を認めた。12 週後の検討 (図 5, それぞれ  $n=3$ ) では、A/J マウスにのみ肺泡構造の変化・胞隔の肥厚および肺泡道の拡張を認め、BL6 では 6 週後と変化はほぼ同様であった。6 週, 12 週ともに、マクローファージ内の PDE の取り込みは、BL6 より A/J に強い傾向にあった

マウス肺のコラーゲン量を測定したところ (図 6) 12 週では、A/J マウスにコラーゲン量が多い傾向にあった。

過敏性肺炎の動物モデルは農夫肺モデルでよく研究されている。Th1 細胞がその病変形成に関与して

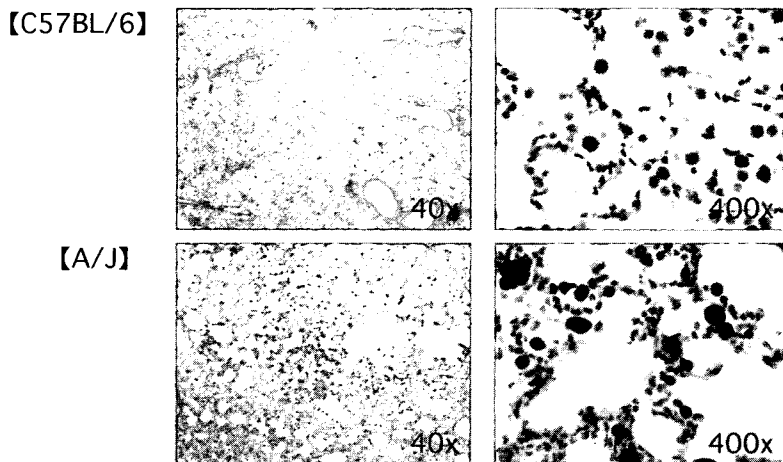


図4 抗PDE抗体による免疫染色(6週)

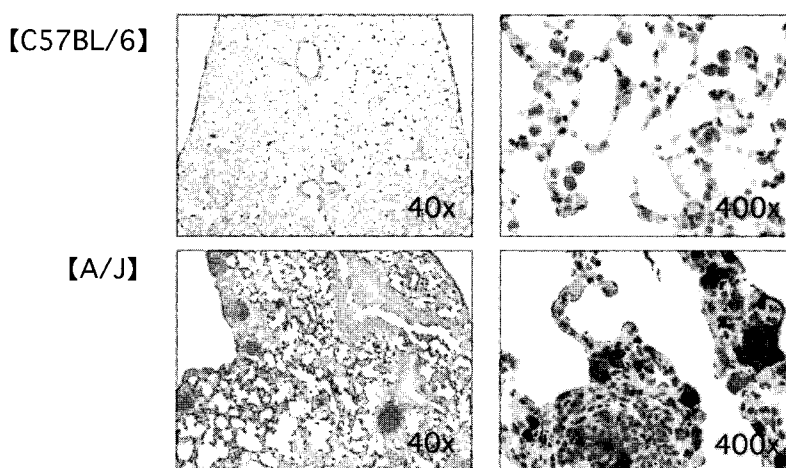


図5 抗PDE抗体による免疫染色(12週)

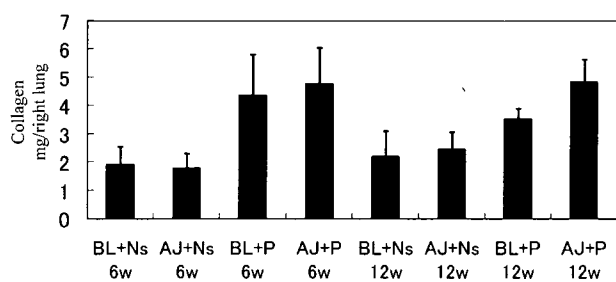


図6 マウス右肺コラーゲン量

おり<sup>5)</sup>, Th1 優位である C57BL/6 マウスにおいて, 病変形成が強いことが分かっている<sup>6)</sup>. しかしこれらの検討はすべて急性モデルである. 我々のヒトでの検討では Th2 優位な状態が慢性特に UIP パターンの形成に関与していると考えられる<sup>3)</sup>. そこで2種類の免疫学的に違う Th1 優位であるマウスと Th2 優位で

あるマウスで Th2 アジュバントを使用して感作し検討したところ, 仮説通り Th2 優位な A/J マウスで, 線維化が強い傾向であった.

## 結 論

鳥関連過敏性肺炎の外科的肺生検の検討では, PDE と樹状細胞を特定することは可能であった. T 細胞との関連はこれからの課題である. マウスモデルにおいても, Th2 優位な免疫状態は肺の線維化に関わっていると考えられたが, 樹状細胞の関与は今回の研究では明らかにされなかった. BRHP の肺病変形成における PDE と樹状細胞の役割をさらに検討していく必要があると考えられた.

参考文献

- 1) Fink JN, Sosman AJ, Barboriak JJ, Chlueter DP, Holmes RA. Pigeon breeders' disease. A clinical study of a hypersensitivity pneumonitis. *Ann Intern Med.* 1968 ; 68 : 1205-19.
- 2) Pignatti P, Brunetti G, Moretto D, Yacoub MR, Fiori M, Balbi B, Antonella B, Cervio G, Nava S, Moscato G. Role of the chemokine receptors CXCR3 and CCR4 in human pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 ; 173 : 310-7
- 3) Kishi M, Miyazaki Y, Jinta T, Furusawa H, Ohtani Y, Inase N, Yoshizawa Y. Pathogenesis of cBFL in common with IPF? Correlation of IP-10/TARC ratio with histological patterns. *Thorax.* 2008 in press.
- 4) Holt PG. Pulmonary dendritic cells in local immunity to inert and pathogenic antigens in the respiratory tract. *Proc Am Thorac Soc.* 2005 ; 2 : 116-20.
- 5) Schuyler M, Gott K, Edwards B. Th1 cells that adoptively transfer experimental hypersensitivity pneumonitis are activated memory cells. *Lung.* 1999 ; 177 : 377-89.
- 6) Gudmundsson G, Monick MM, Hunninghake GW. IL-12 modulates expression of hypersensitivity pneumonitis. *J Immunol.* 1998 Jul 15 ; 161 : 991-9.

【平成 19 年度】

## 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、ブレオマイシン (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 日間のみの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 マウスにブレオマイシン (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, クラリスロマイシン (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。

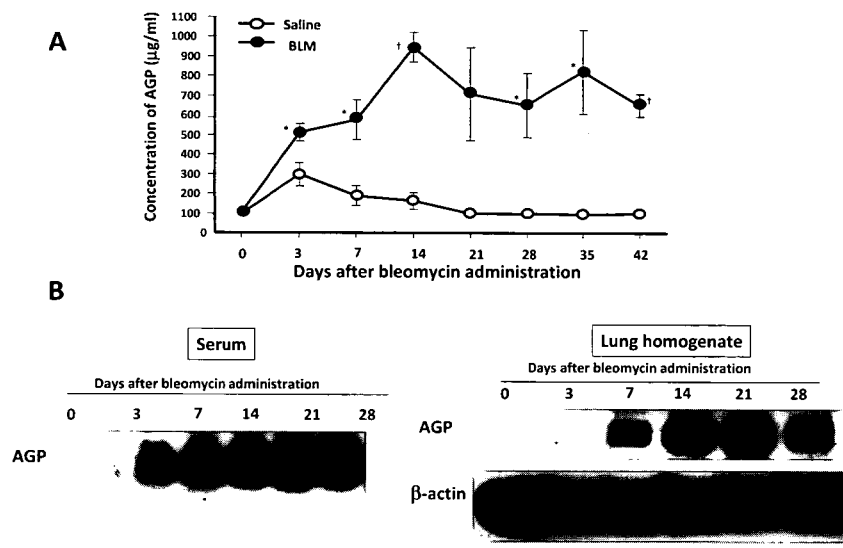


図1 ブレオマイシン (BLM) 肺線維症モデルマウスにおける AGP の推移。  
 A: BLM 肺線維症モデルマウスの血清 AGP 濃度。血清 AGP 濃度は radial immunodiffusion assay を用い検討した。コントロールマウスで 90~110 µg/ml, BLM 肺線維症モデルでは 3 日目より上昇し、14 日目以降は 650 ~1,000 µg/ml であった。  
 B: 血清および肺における AGP の推移—Western blotting による検討—  
 マウス肺ホモジネイズとマウス血清を用い Western blotting にて発現の検討を行った。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パー法にて解析した。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  $\mu\text{g/ml}$  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)。

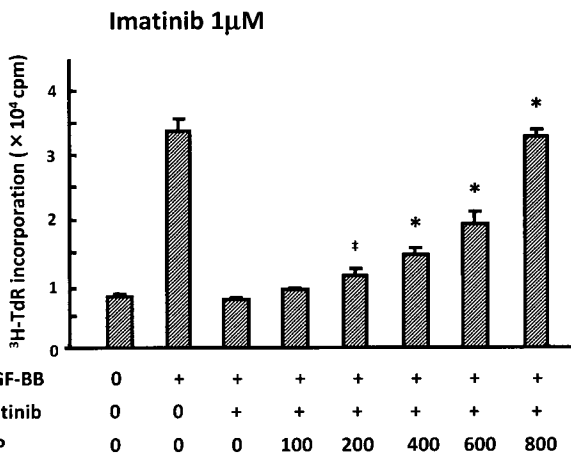


図 2 Imatinib によるマウス肺線維芽細胞の増殖抑制効果に及ぼす AGP の影響。  
C57BL/6 マウスより作成した肺線維芽細胞株を用いて、PDGF-BB (10 ng/ml) で 72 時間刺激後  $^3\text{H-TdR}$  (1  $\mu\text{Ci/well}$ ) を 18 時間パルスし、増殖能を測定した。1  $\mu\text{M}$  の imatinib に対し AGP を 100~800  $\mu\text{g/ml}$  の濃度で添加しその効果を検討した。その結果、AGP 添加により imatinib の線維芽細胞増殖抑制効果は有意に減弱され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

## 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

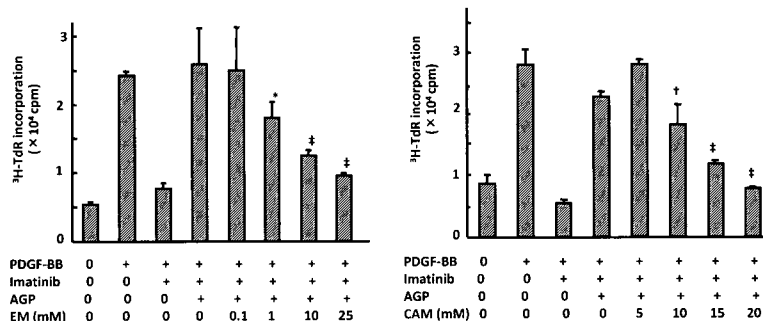


図 3 Erythromycin, Clarithromycin による AGP の作用抑制。  
C57BL/6 マウスより作成した肺線維芽細胞を用いて、PDGF-BB (10 ng/ml) で 72 時間刺激後  $^3\text{H-TdR}$  (1  $\mu\text{Ci/well}$ ) を 18 時間パルスし、増殖能を測定した。1  $\mu\text{M}$  の imatinib と 800  $\mu\text{g/ml}$  の AGP に対し、Erythromycin (EM) を 0.01~25  $\mu\text{M}$ 、Clarithromycin (CAM) 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  $\mu\text{g/ml}$  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。

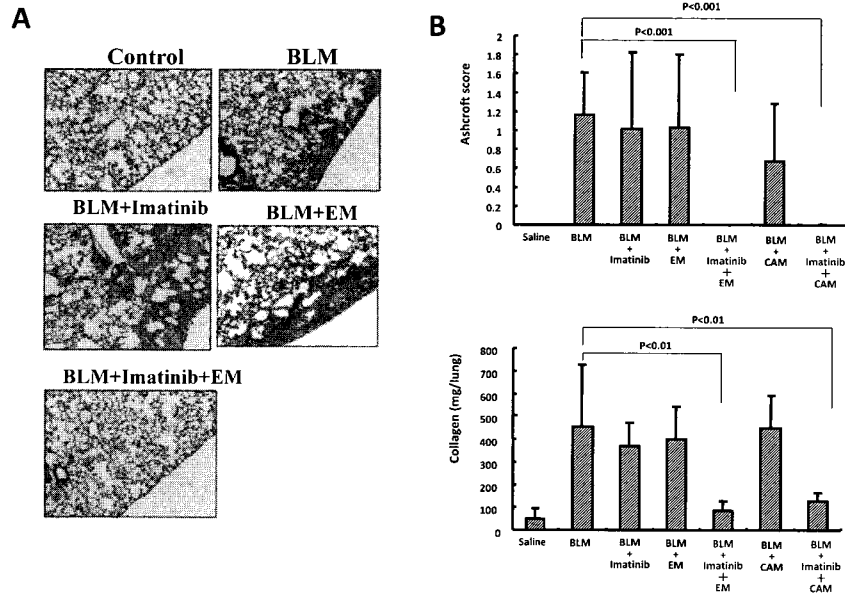


図4 BLM誘発肺線維症モデルにおける imatinib と EM および CAM の併用効果。  
C57BL/6 マウスに osmotic mini-pump を用いて 125 mg/kg の BLM を持続皮下投与した。BLM 投与開始 14 日目から、imatinib (50 mg/kg) 単独投与、EM (5 mg/kg) 単独投与、CAM (20 mg/kg) 単独投与 imatinib と EM または CAM の併用投与を行った。左肺組織の HE 染色で EM, CAM 単独では肺線維化を抑制しなかったが併用投与において抗線維化効果を認めた (A)。28 日後の右肺を用いてコラ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

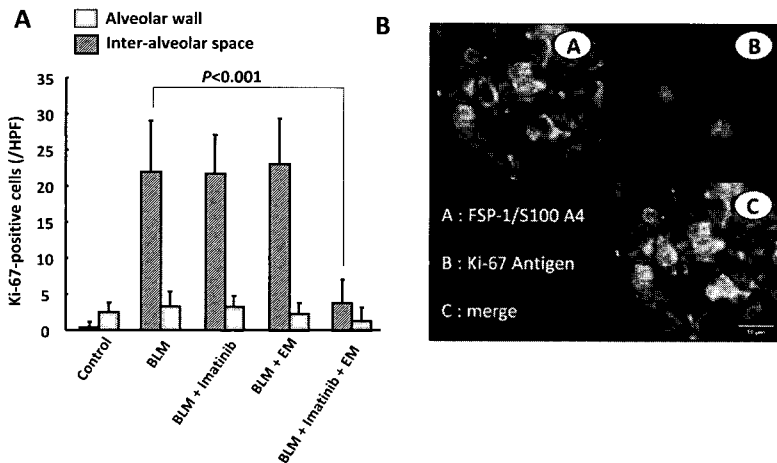


図5 Imatinib と EM 併用による in vivo での肺線維芽細胞増殖抑制効果。  
Ki-67 の抗体を用い免疫染色を行った。その結果、間質に存在する Ki-67 陽性細胞は Imatinib と EM 併用群で著明に抑制されていることが確認された (A)。蛍光抗体法にて、この間質に存在する Ki-67 陽性細胞は、同時に S100A4/FSP1 も陽性であり、線維芽細胞であることが確認された (B)。

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

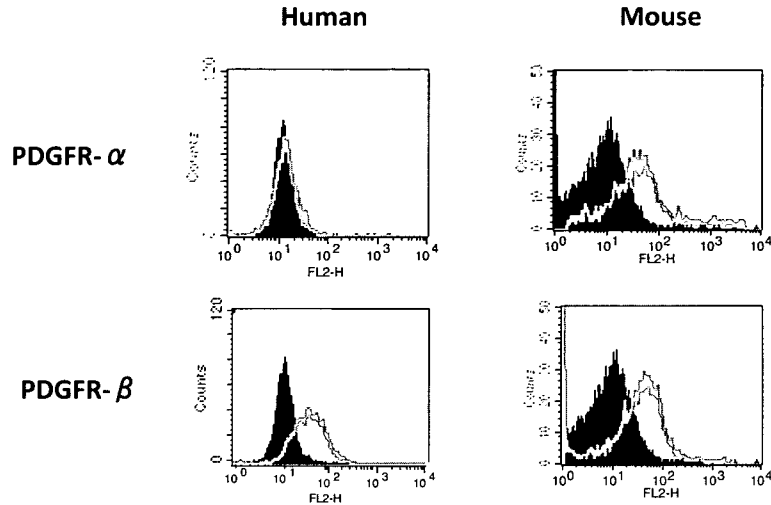


図6 マウス fibrocyte, ヒト fibrocyte における PDGF レセプターの発現。  
マウス, ヒト fibrocyte の PDGF レセプターの発現を FACS にて解析した結果マウスでは PDGF $\alpha$  と  $\beta$ , ヒトでは PDGF $\beta$  の強い発現を認めた。

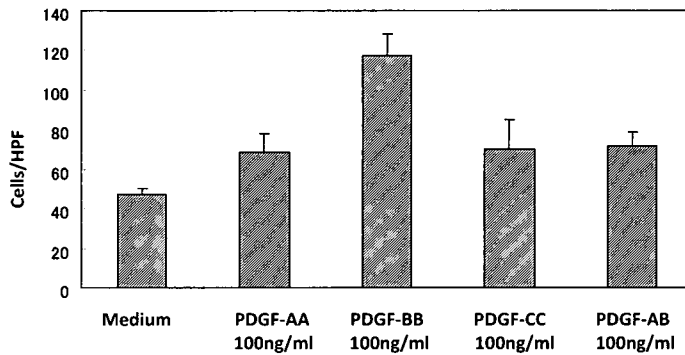


図7 ヒト fibrocyte の PDGF 刺激による遊走能の検討。  
fibrocyte の PDGF による遊走能はポインテンチャンパー法にて解析した。結果, PDGF-BB100 ng/ml で有意な遊走能を示した。

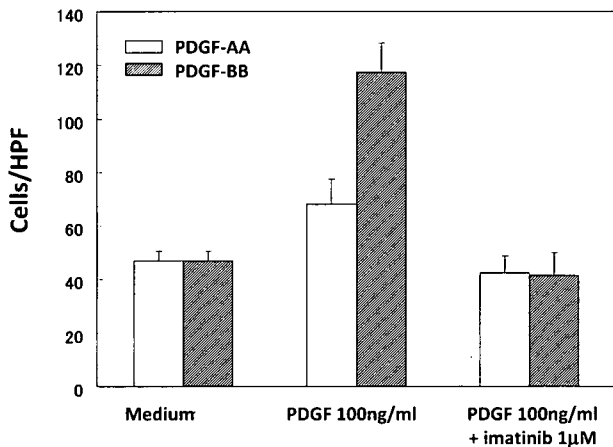


図8 Imatinib の PDGF 刺激による fibrocyte の遊走阻害の検討。  
PDGF-BB100 ng/ml 刺激による fibrocyte の遊走を imatinib は有意に抑制し, PDGF-AA100 ng/ml による fibrocyte の遊走も阻害した。

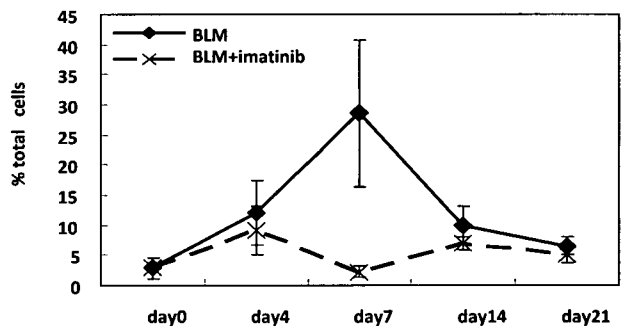


図9 BLM 肺線維症モデルにおける imatinib 投与による肺 fibrocyte の検討。  
BLM モデルマウスに imatinib 50 mg/kg/day を連日腹腔内投与し, 7日目の肺 fibrocyte の割合を検討した結果, コントロール群に比し有意に減少していた。



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からも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.

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

石井 芳樹\*

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

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

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

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

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

Yoshiki Ishii

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

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

## はじめに

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

## 対象と方法

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

獨協医科大学 呼吸器・アレルギー内科

\* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

## 結 果

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

## 考 察

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

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

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

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

## 文 献

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

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

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

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

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