

## 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<sup>1-5)</sup>。

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、ウイルス)や、ウシ血清に対する免疫反応<sup>6)</sup>、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<sup>7-8)</sup>、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<sup>9-10)</sup>。

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へパリン加 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<sup>-</sup> 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<sup>-</sup> 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ものも対象とした。

BMMSCs の細胞増殖能は、BMMSCs 培養液中に BrdU (10  $\mu$ 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  $1\alpha$ ・TGF- $\beta$  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。

## プレオマイシン (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  $5 \times 10^5$  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  $1\alpha$  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

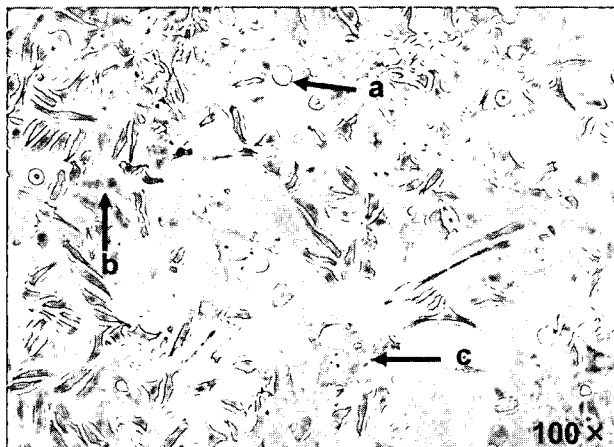


図1 培養骨髄接着細胞は形態学的に3種類に分類される。(培養8日目)  
 先行論文より, a. endothelial stem-cell lineage b. myeloid lineage c. ConBMMSCsである<sup>11)</sup>。

胞様の大型の細胞が骨髄間葉系幹細胞 (ConBMMSCs) であり<sup>11)</sup>、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  $1\alpha$ ・TGF- $\beta$  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。

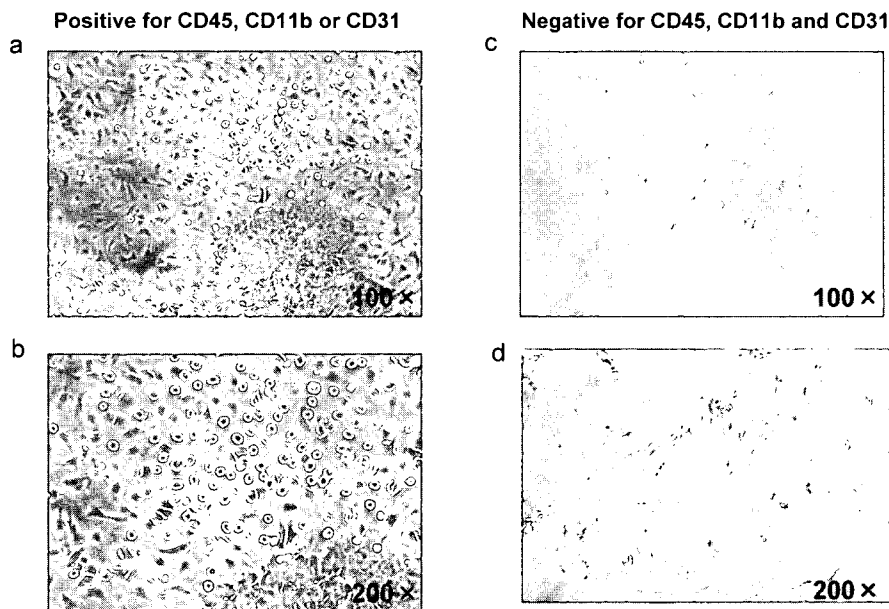


図2 全骨髄細胞培養2時間後の接着細胞を、CD45, CD11b or CD31のいずれかが陽性の群 (a and b) と CD45, CD11b and CD31 (MinBMMSCs について) の全てが陰性 (c and d) の群に分け、それぞれ14日間培養した。MinBMMSCs は培養によって、ConBMMSCs と同様の形態を示した。

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、肺泡出血量・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  $1\alpha$  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

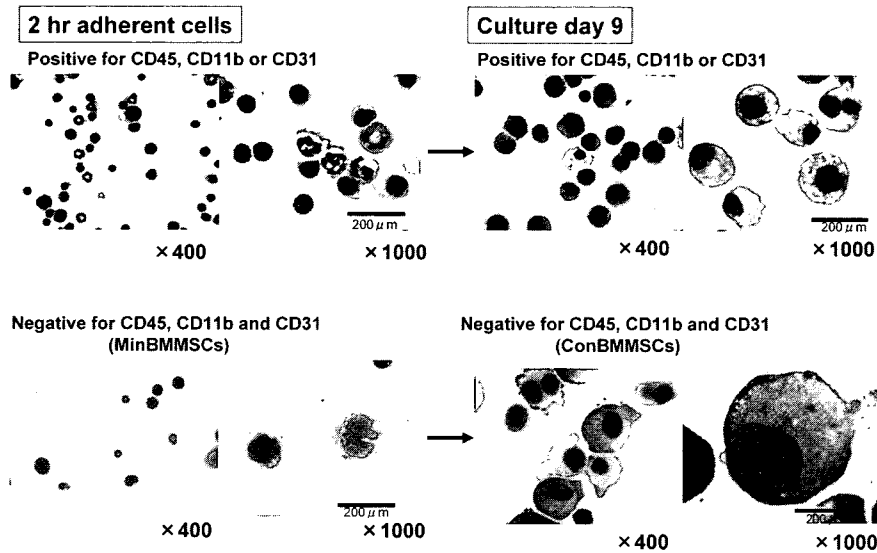


図3 培養による MinBMMSCs, ConBMMSCs の細胞形態の変化。BMMSCs の細胞サイズ・細胞質比率は培養により、とくに CD45, CD11b (, CD31) 陰性群において著明に増大する。

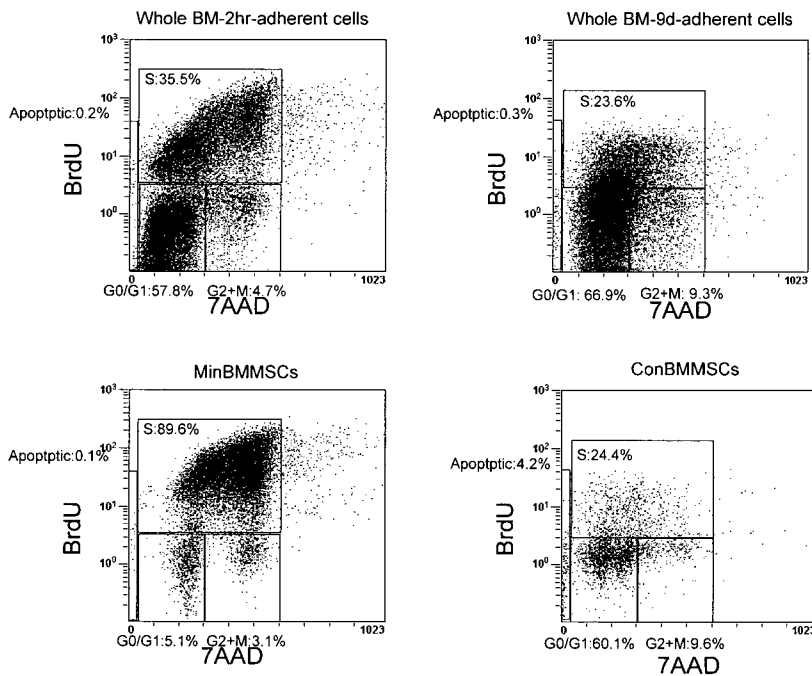


図4 MinBMMSCs は ConBMMSCs に比べて増殖能が高い。細胞を 10 μM の BrdU と共に 45 分間培養することで、BrdU を S 期の細胞に取り込ませ、全 DNA に結合する色素 (7-AAD) との組み合わせで細胞周期を解析した。MinBMMSCs では約 90% の細胞が S 期にあり、活発に増殖していることが分かる。S 期 (DNA 合成期), G0/G1 期 (休止期), G2/M 期 (分裂期)

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 BMMSCs 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 MinBMMSCs を確立し、その細胞特性について ConBMMSCs 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、BMMSCs は培養によって大型化し、細胞内密度が高くなることが示され、細胞治療に際して塞栓を形成する危険性が懸念された。また、ConBMMSCs は MinBMMSCs と比較して、増殖能が著明に低下しており、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

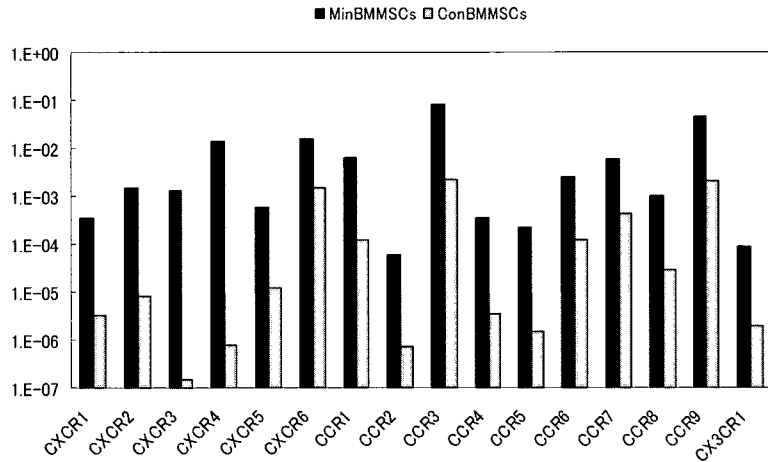


図5 MinBMSCs と ConBMSCs のケモカインレセプター発現の比較  
Real time PCR にて解析した全てのケモカインレセプターは、ConBMSCs に比べ、MinBMSCs においてより強く発現していた。

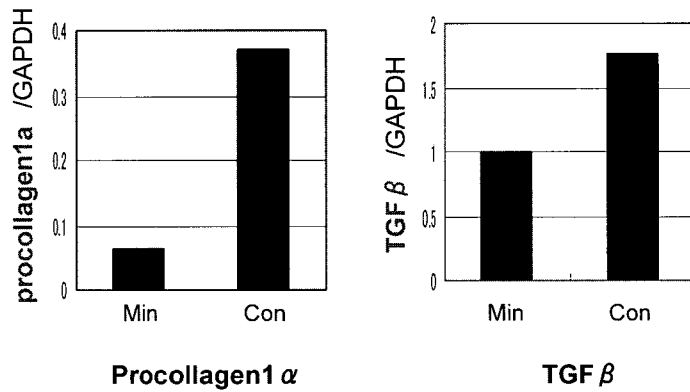


図6 骨髄間葉系幹細胞の培養による線維芽細胞様特性の獲得。BMSCs は培養によりプロコラーゲン1α・TGF-β の mRNA 発現レベルが増強した。

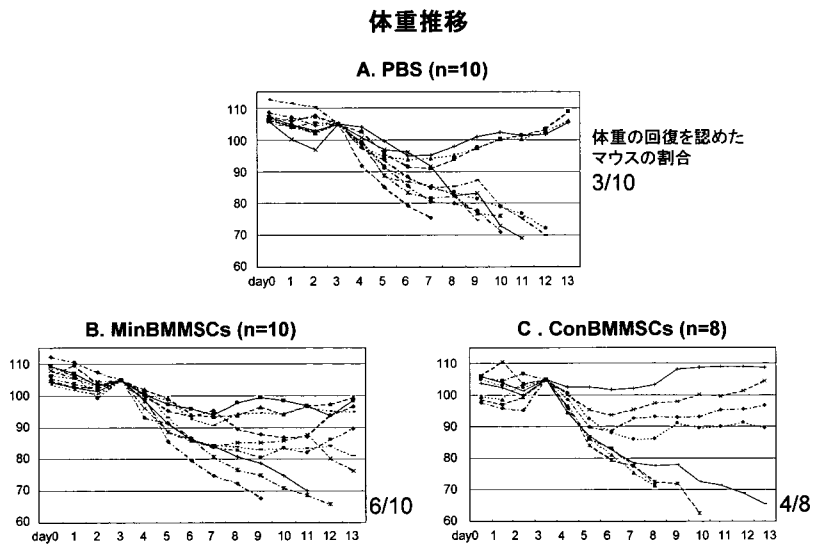


図7 プレオマイシン誘導肺線維症モデルマウスにおける体重の推移。PBS 投与群 (N=10), MinBMSCs 群 (N=10), ConBMSCs 群 (N=8)。

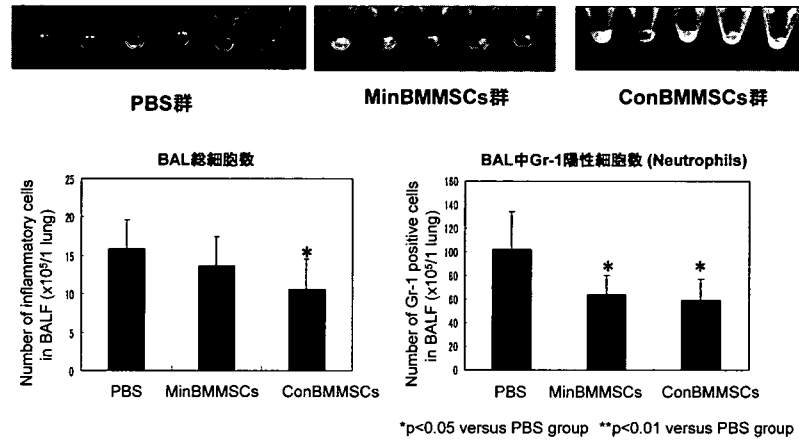


図8 BMSCs 移植後のプレオマイシン誘導肺線維症モデルマウスにおける肺胞出血量 (上段)・BAL 中総細胞数 (下段左)・BAL 中好中球数の減少 (下段右) の改善。PBS 投与群 (N=6), MinBMSCs 群 (N=5), ConBMSCs 群 (N=5)。

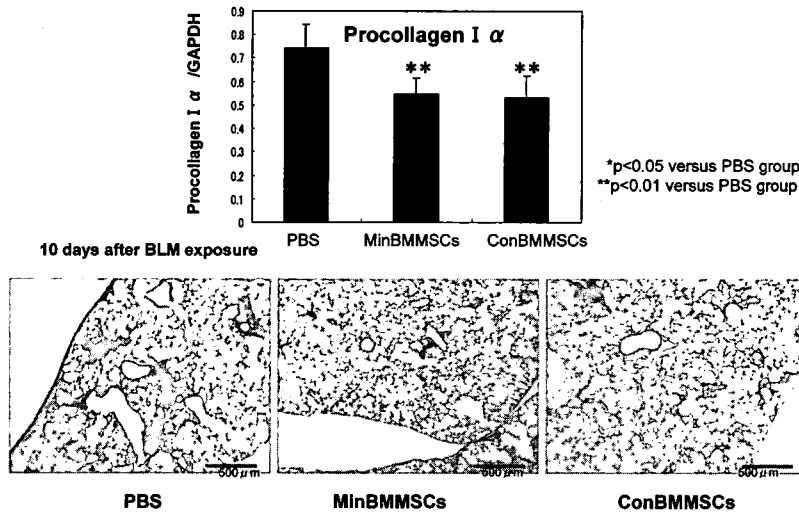


図9 BMSCs 投与7日後 (BLM 投与10日後) のマウス肺におけるプロコラーゲン I α の mRNA 発現量 (上段) および HE 染色像 (下段)。HE 染色像は各群より BAL 細胞数などの4要素のスコア化により、最も病勢の強い個体を選定し、その病理像を示す。PBS 投与群 (N=6), MinBMSCs 群 (N=5), ConBMSCs 群 (N=5)。

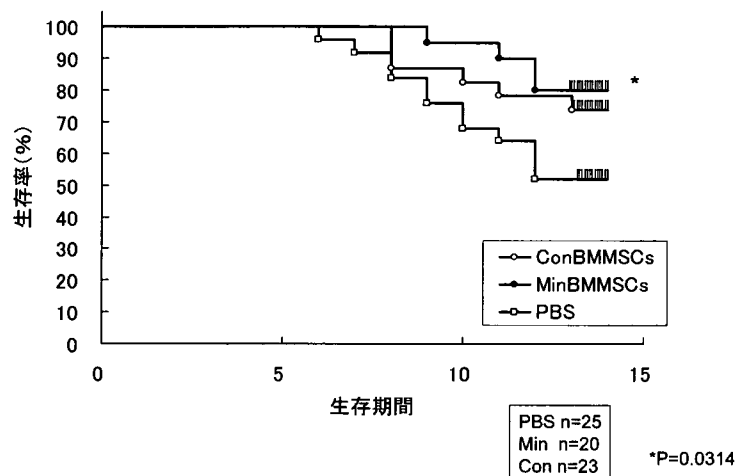


図10 プレオマイシン誘導肺線維症モデルマウスにおける生存曲線。PBS 投与群 (N=25), MinBMSCs 群 (N=20), ConBMSCs 群 (N=23)。

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 $1\alpha$ ・TGF- $\beta$ 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・肺泡出血・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

## Endothelial-mesenchymal transition を介した 血管内皮由来肺線維芽細胞の可能性

橋本 直純 今泉 和良 長谷川好規\*

特発性肺線維症は、fibroblastic foci の病理学的特徴を有する。線維化病変における線維芽細胞は組織リモデリング、細胞外マトリックスの過剰沈着、そして肺胞上皮との相互作用などで重要な役割を担うと考えられている。近年、線維化病変で多様な表現型を示す線維芽細胞の中に、骨髄由来や epithelial-mesenchymal transition (EMT) を介した上皮細胞由来の線維芽細胞が同定された。血管内皮細胞が付加的な線維芽細胞を誘導するかを検討するために、血管内皮細胞株 M1 における活性型 Ras および TGF- $\beta$  の効果を flow cytometry および RT-PCR にて評価した。TGF- $\beta$  投与活性型 Ras 導入細胞株は血管内皮細胞マーカーの有意な発現減少が認められた一方、間葉系細胞マーカーの新たな誘導が認められた。活性型 Ras 導入細胞株は、TGF- $\beta$  の除去によっても発現マーカーの変化は持続した。今回の所見は、EMT と同様に、血管内皮細胞が Endothelial-MT を介して肺線維芽細胞の一部を構成する可能性を示した。

### Possible existence of endothelial-derived lung fibroblasts through endothelial-mesenchymal transition

Naozumi Hashimoto, Kazuyoshi Imaizumi, and Yoshinori Hasegawa

*Department of Respiratory Medicine, Nagoya University Graduate School of Medicine, Japan*

The pathological hallmark lesions in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) are the fibroblastic foci, in which fibroblasts are thought to be involved as key mediators of matrix deposition. Accumulating evidences indicate that some of the heterogeneous fibroblasts in fibrosis may be derived from bone marrow and in part from epithelial cells through epithelial-mesenchymal transition (EMT). Although comprehensive knowledge of the fibroblast origin should lead to new therapeutic strategy for IPF, it has not fully been established. To evaluate whether endothelial cells can give rise to fibroblast phenotype, the effects of activated Ras and TGF- $\beta$  on the endothelial cell line M1 were evaluated by flow cytometry and RT-PCR. Combined treatment with activated Ras and TGF- $\beta$  caused a significant decrease in expression of endothelial-specific markers, while inducing *de novo* expression of mesenchymal-specific markers. The altered expression of these markers in M1 cells with activated Ras persisted after withdrawal of TGF- $\beta$ . These findings indicate that endothelial cells may give rise to some population of the lung fibroblast population through an endothelial-mesenchymal transition process comparable to that seen in EMT.



はじめに

臓器の線維症は、慢性的・断続的な炎症に伴い線維芽細胞の増殖と細胞外マトリックスの過剰産生を呈し、臓器不全をもたらす予後不良の病態として歴史的に把握されている。しかしステロイドを含む抗炎症薬の治療効果は認められず、近年線維芽細胞およびその線維化経路自体への関与の解明が焦点となっている。

臓器線維症のひとつである特発性間質性肺炎は有効な治療法が確立されていない難治性の呼吸器疾患である。この疾患の特徴的な所見として、著しい線維芽細胞の増殖と遠位側の肺泡領域の閉塞をもたらす細胞外マトリックスの沈着と活動性を示す線維化形成所見である fibroblast foci が挙げられる。線維芽細胞は間質での主要な細胞外マトリックス産生細胞とされているが、多くの表現型において多様性を示している。

このような中で、肺外起源由来として骨髄由来線維芽細胞の存在が報告され、肺内起源由来としても肺胞上皮由来線維芽細胞の存在が報告された。これらの知見から肺の微小環境化においてさまざまな細胞が線維芽細胞に分化・形質転換する可能性が示唆されている。このように線維芽細胞の起源を再考することは肺線維症の病態解明への理解と肺線維症への将来的な治療法の開発に対して大いに示唆に富むと考えられる。今回我々は、血管内皮細胞が付加的な線維芽細胞を誘導し得るかどうかを検討した。

方 法

血管内皮細胞株 M1 および活性型 Ras 導入株 M1 細胞 (SR) に対する TGF-β の効果を flow cytometry および RT-PCR にて評価した。さらに、活性型 Ras 導入株 SR をヌードマウスに皮下接種し、結節形成した SR を樹立培養し flow cytometry および RT-PCR で評価した。

結 果

1. 血管内皮細胞株への活性型 Ras と TGF-β の影響

a) 血管内皮特異的表現型への影響

血管内皮細胞への活性型 Ras の導入または TGF-β の投与は、血管内皮細胞特異的のマーカである CD31, CD34, Tie2, および CD144 の発現を有意に抑制させた。活性型 Ras (-) 血管内皮細胞 M1 における TGF-β の血管内皮特異的のマーカの発現抑制は、TGF-β の除去によりその発現レベルは TGF-β 投与前レベルに回復した。一方、活性型 Ras (+) 血管内皮細胞 SR は TGF-β の除去によっても血管内皮特異的のマーカの発現抑制はさらに強まり持続した (Figure 1)。

b) 間葉系細胞特異的表現型の誘導

間葉系細胞特異的表現型の一つである Fibronectin の発現誘導を検討した。活性型 Ras の導入または

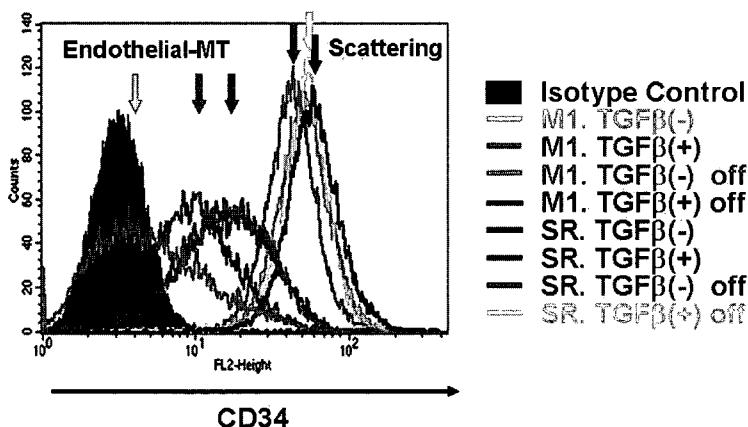


Figure 1

名古屋大学医学部附属病院呼吸器内科

\* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

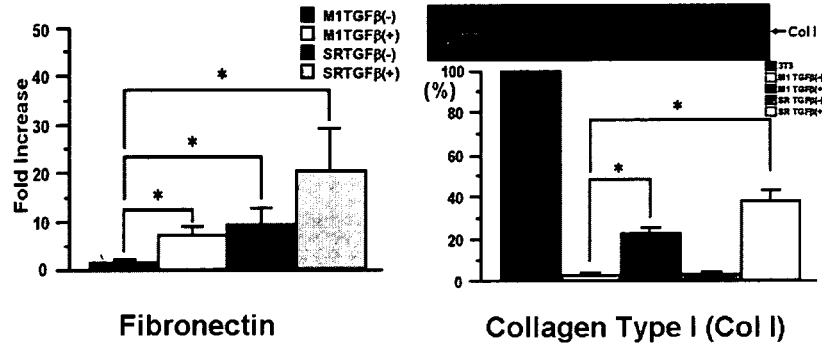


Figure 2

TGF- $\beta$  投与のいずれにおいてもコントロール群と比較し有意な上昇が認められたが、活性型 Ras (+) 細胞への TGF- $\beta$  の投与群における Fibronectin の発現誘導において相乗効果が認められた。さらに、間葉系細胞特異的表現型の一つである collagen type I (ColI) の発現誘導を検討したところ、活性型 Ras の導入のみでは、ColI の発現誘導は認められなかったが、TGF- $\beta$  刺激においてその発現誘導が認められた。さらに活性型 Ras (+) SR への TGF- $\beta$  刺激は活性型 Ras (-) MI への TGF- $\beta$  刺激時と比較してその発現誘導を増幅した (Figure 2)。

## 2. ノードマウスに接種した活性型 Ras (+) SR 細胞株の ex vivo 樹立

生体内環境下での活性型 Ras (+) SR の形質転換への影響を評価するために、ノードマウスに皮下接種し、結節形成した SR を ex vivo にて樹立した。樹立した細胞株 (ex vivo SR) の血管内皮細胞特異的マーカーの発現レベルは、解析した 90% 以上の細胞が Isotype control 反応群と同レベルまで発現抑制が認められた。一方、ex vivo SR の Col I の発現レベルは TGF- $\beta$  非投与時においても活性型 Ras (+) SR の約 2.5 倍の発現レベルを示し、TGF- $\beta$  投与により活性型 Ras (+) SR の約 7 倍の発現増強が認められた。

## 考案・結論

現時点において、COPD や間質性肺炎をはじめとするびまん性肺疾患に対する根治的な治療方法は確立されるに至らず、在宅酸素療法や薬物療法も、生命予後や QOL・運動耐用能の改善にとどまっているのが現状である。呼吸器疾患領域において、特発性肺線維

症、ステロイド治療抵抗性気管支喘息における気道リモデリング、そして閉塞性細気管支炎をはじめとするびまん性肺疾患に共通する線維化所見に対する有効な治療法は確立されておらず、その病態解明は急がれている。現在我々は、びまん性肺疾患に共通する線維化機序解明の試みを線維芽細胞の起源再考という観点から包括的に行い、線維化メカニズムを細胞学的レベルで解明し、将来的にびまん性肺疾患の治療において新たな選択肢として加えられ得る治療標的を導き出し、延いては臓器線維症の治療への応用を探ることに取り組んでいる。

線維化病変における fibroblasts は、組織内の間葉系細胞由来とされてきたが、多くの表現型において多様性を示していることが知られていた。このような背景のなかで、線維芽細胞の起源のひとつとして、2002 年にマウス肺線維症モデルにおいて骨髄由来肺線維芽細胞の存在が報告された<sup>1)</sup>。この報告以来、骨髄由来線維芽細胞の存在を支持する報告が集積されており、2007 年には、特発性肺線維症での骨髄由来肺線維芽細胞の関与を示唆する報告もなされた<sup>2)</sup>。2006 年、Cre-loxP system を用いた肺胞上皮細胞由来特異的 LacZ 発現マウスを用いて、肺胞上皮細胞が epithelial-mesenchymal transition (EMT) の過程を介して線維芽細胞の表現型を呈して線維化形成に関与する可能性を示唆する報告がなされた<sup>3)</sup>。我々は、線維芽細胞と同じ中胚葉由来である血管内皮細胞を起源とする線維芽細胞の存在を検討した (骨髄細胞もやはり中胚葉由来の細胞である)。EMT の過程には、活性型 Ras と TGF- $\beta$  の密な相互作用が重要であるという報告がなされている<sup>4)</sup>。すなわち、TGF- $\beta$  などの成長因子単独での刺激では、EMT で認められる形質変化は維持されにくく、その刺激の消失とともに、元の表現型

に戻る (scattering)。一方、成長因子、特に TGF- $\beta$  の刺激と活性型 Ras を介した Raf/MAPK 経路の相互作用のもとでは、その形質変化は維持されることが知られている。今回の検討においても、成長因子 TGF- $\beta$  単独の刺激において血管内皮特異的マーカーの発現は抑制されるが、その刺激の除去によりその発現レベルが刺激前のレベルに回復した (scattering)。一方、活性型 Ras (+) 血管内皮細胞は TGF- $\beta$  の刺激により血管内皮特異的マーカーは抑制するが、刺激の除去によっても発現抑制は持続した (Endothelial-mesenchymal transition; Endothelial-MT)。活性型 Ras の有無にかかわらず TGF- $\beta$  の刺激により間葉系細胞特異的表現型の発現は誘導された。特に collagen type I の発現は TGF- $\beta$  の刺激により特異的に誘導され、血管内皮細胞と線維芽細胞の表現型を区別するのに有用であると考えられた。この現象は、生体内環境下においても再現された。今回の所見は、EMT と同様に、血管内皮細胞が Endothelial-MT を介して線維芽細胞の一部を構成する可能性を示した。さらに、活性型 Ras と TGF- $\beta$  のシグナル相互作用が上皮細胞および血管内皮細胞の線維芽細胞への分化を誘導し得るといふ知見は、骨髄由来線維芽細胞の線維化病変内での分化機構を解明する上でも重要な知見であると考えられる。

## まとめ

血管内皮細胞株を用いて、活性型 Ras と TGF- $\beta$  のシグナル相互作用による血管内皮細胞から線維芽細

胞への表現型誘導を検討した。活性型 Ras と TGF- $\beta$  の刺激により、血管内皮特異的マーカーの発現は抑制され、間葉系細胞特異的表現型の Fibronectin および Collagen type I の発現誘導が示された。これらの知見は、Endothelial-MT の過程を介した血管内皮由来線維芽細胞の存在の可能性を示唆するものである。

## 参考文献

- 1) Hashimoto N, Jin H, Liu T, Chensue SW, Phan SH. Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary fibrosis. *J Clin Invest* 113: 243-252, 2004
- 2) Mehrad B, Burdick MD, Zisman DA, Keane MP, Belperio JA, Strieter RM. Circulating peripheral blood fibrocytes in human fibrotic interstitial lung disease. *Biochem Biophys Res Commun* 353: 104-108, 2007
- 3) Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D, Chapman HA. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 13180-185, 2006
- 4) Janda E, Lehmann K, Killisch I, Jechlinger M, Herzig M, Downward J, Beug H, Grunert S. Ras and TGF $\beta$  cooperatively regulate epithelial cell plasticity and metastasis: dissection of Ras signaling pathways. *J Cell Biol* 156: 299-313, 2002

【平成 19 年度】

## $\alpha v \beta 8$ 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。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い出した (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を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りポーター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

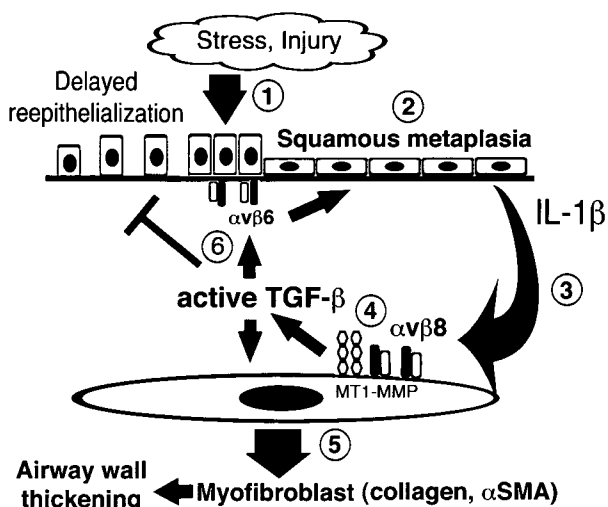


図1 COPD気道リモデリングにおける、扁平上皮化生及びインテグリンによる TGF- $\beta$  活性化の重要性に関するモデル (Araya J. et. al. J Clin Invest. 2007)

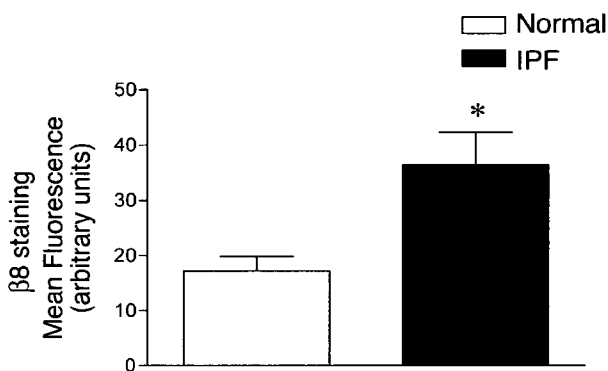


図2 フローサイトメトリーによる線維芽細胞の  $\beta 8$  インテグリンの発現の検討  
IPF 患者由来の分離培養した線維芽細胞において、 $\beta 8$  インテグリンはより高度に発現していた。

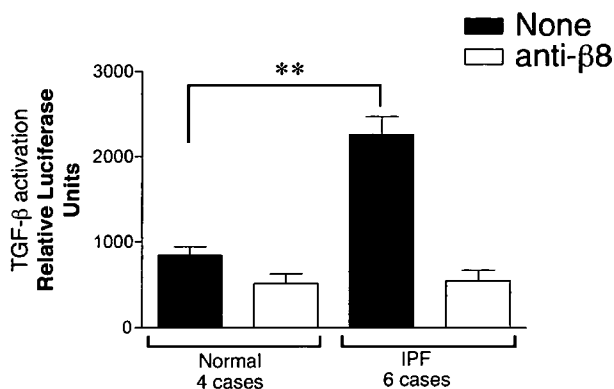


図3 線維芽細胞による TGF- $\beta$  活性化の検討  
TMLC レポーター細胞を使用した TGF- $\beta$  活性化の検討では、IPF 患者由来の線維芽細胞  $\beta 8$  インテグリンはより高度に TGF- $\beta$  を活性化していた。

来の線維芽細胞と比較し約 2 倍の  $\beta 8$  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- $\beta$  を活性化していた。(図 3)

3.  $\beta 8$  インテグリンを高発現させると、高度に TGF- $\beta$  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  $\beta 8$  インテグリンと  $\alpha$ -SMA 発現、また肺胞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、 $\beta 8$

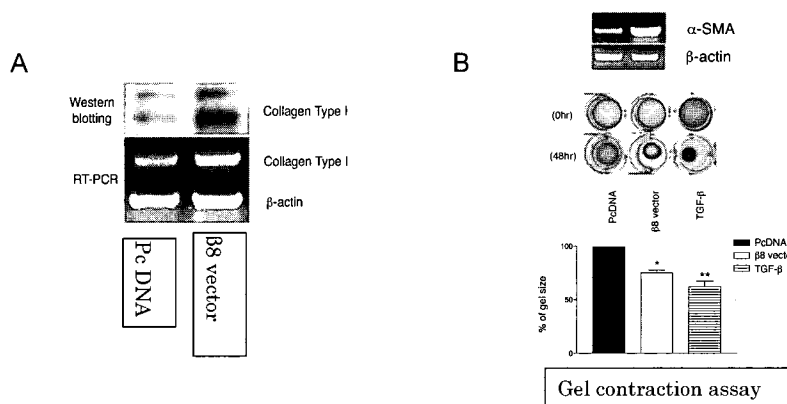


図4  $\beta 8$  インテグリン高発現による筋線維芽細胞形質の誘導  
A:  $\beta 8$  インテグリンを高発現させた線維芽細胞は、より高度に Type I collagen を発現していた。  
B:  $\beta 8$  インテグリンを高発現させた線維芽細胞はより高度に  $\alpha$ SMA を発現し、collagen gel を収縮させた。

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。また肺胞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 Amara 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 remode-

ling 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.



## 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と比較したところ、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<sup>shl</sup> 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- $\alpha$ 、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<sup>shl</sup> 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<sup>shl</sup> 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- $\alpha$ , G-CSF, IL-12 p40, and MCP-1 in BALF were significantly suppressed in B6.KOR-Apoe<sup>shl</sup> 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検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<sup>®</sup> を用いて抽出し、MagExtractor<sup>®</sup>-mRNA-(TOYOBO) を用いて、mRNA を抽出した。Gene Navigator cDNA Array System<sup>®</sup> (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<sup>®</sup> 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 ( $\beta$ -actin, G3PDH,  $\alpha$ -tubulin, Phospholipase A2, ALAS1, endonuclease G, Ubiquitin, Ribosomal Protein A52, Elongation factor 1 $\alpha$ ) 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<sup>shl</sup> 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 ApoE 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<sup>shl</sup> 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ュ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<sup>1)</sup>。B6.KOR-ApoE<sup>shl</sup> 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<sup>1)</sup>。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<sup>shl</sup> 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<sup>®</sup> (Hitachi, Tokyo) で測定し、G-CSF, GM-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-17, monocyte chemotactic protein (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ), MIP-1 $\beta$ , 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  $\mu$ 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<sup>®</sup> で測定した。

帝京大学内科学講座呼吸器・アレルギー学

\* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

統計

C57BL/6 マウス及び、B6.KOR-Apoe<sup>shl</sup> 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<sup>shl</sup> マウス、及びコントロール

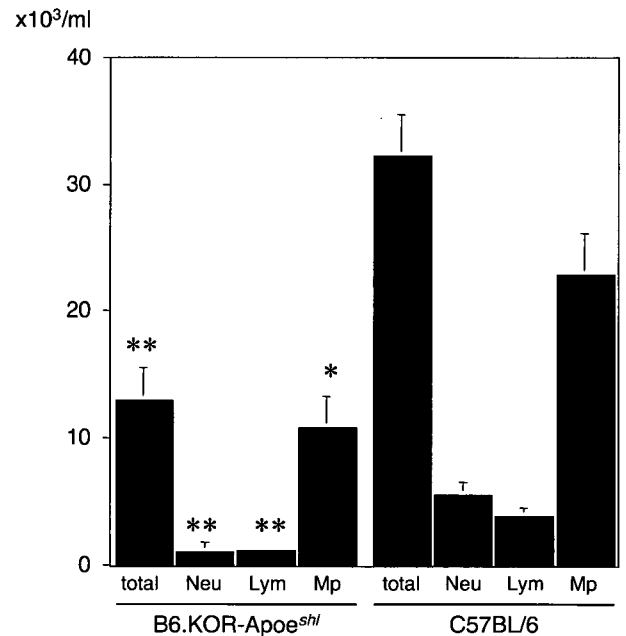


図 1 気管支肺胞洗浄液中の細胞分画  
データは、B6.KOR-Apoe (n=5), C57/BL6 (n=4) の平均値±SEM で示した。\*p<0.05, \*\*p<0.01 vs C57/BL6.

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 <sup>shl</sup>	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- $\alpha$  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<sup>2,3)</sup>。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<sup>4)</sup>、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- $\beta_1$  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<sup>5)</sup>、NSIP 患者の BALF で濃度上昇が報告されている IP10<sup>6)</sup> 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<sup>7)</sup>。また、産生細胞としては、肝細胞<sup>8)</sup>の他に、マウスやラットの腹腔由来マクロファージ<sup>7)</sup>、神経由来線維芽細胞<sup>9)</sup>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<sup>10)</sup>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<sup>11)</sup>。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<sup>12,13)</sup>、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<sup>14,15)</sup>、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<sup>16)</sup>、炎症細胞の活性化を抑制するという報告が多い。