

図4 本症例の家族歴
本症例 (矢印) の他, 父方叔父とその次男, 母方叔母にサルコイドーシス発症を認めた

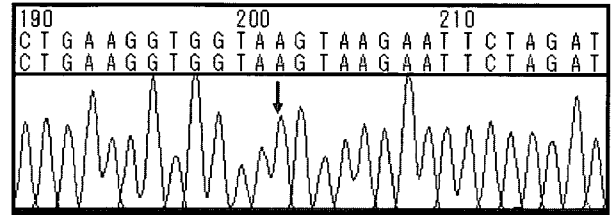


図5 BTNL2 遺伝子解析

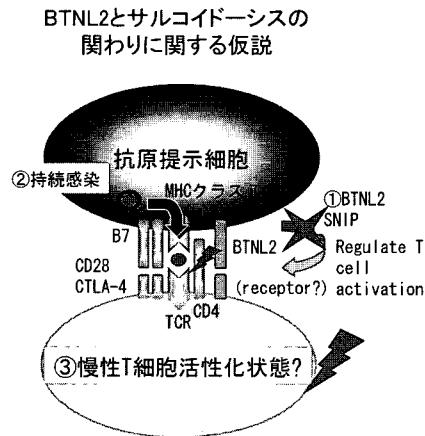
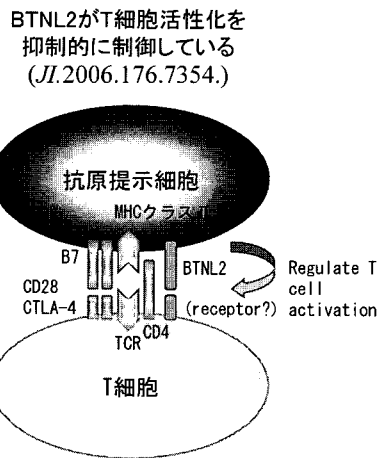


図6 BTNL2 遺伝子変異とサルコイドーシス発症に関する仮説
左: 報告された BTNL2 分子の作用機序. 右: BTNL2 遺伝子変異とサルコイドーシス発症に関する仮説. ① BTNL2 遺伝子に SNP があることにより Th1 細胞抑制的制御の機能不全が生じる. ② さらに病的微生物等による免疫活性化が起こった際に, ③ BTNL2 分子による Th1 細胞の制御機能不全のため慢性 T 細胞活性化状態が生じ, サルコイドーシス病変を生じる.

いう仮説が今のところ最も有力である. しかしながら病原微生物による感染だけの問題でなく, 宿主の内的免疫反応が関与することは疑いもない. サルコイドーシスの宿主因子としては HLA 型や, TNF- α promoter 領域遺伝子, NOD 遺伝子多型との関連を示唆する報告がある³⁻⁵⁾.

また近年, 先述のように BTNL2 遺伝子の Exon5 に存在する SNP がサルコイドーシスの宿主因子である可能性が報告された. この BTNL2 分子は, 遺伝子学的な解析から 2 つの免疫グロブリン可変領域 (IgV) ドメインと免疫グロブリン定常領域 (IgC) ドメインより構成されると推測され, また SNP の存在により IgV ドメインと IgC ドメイン間で切断された spliced form になることが予測されている. さらに 2006 年, 2007 年には, この BTNL2 分子は抗原提示細胞による

Th1 細胞応答における補助刺激分子に類似した構造を有し, 実際に Th1 細胞応答を抑制的に制御している分子であることが報告された^{6,7)}. これらのことは BTNL2 遺伝子に SNP があることにより, 病的微生物等による免疫活性化が起こった際に, BTNL2 分子による Th1 細胞の制御が機能不全に陥り, サルコイドーシス病変が生じてしまう可能性を示唆する (図 6). しかしながら, BTNL2 遺伝子の SNP に関して本邦の研究はなく, 本邦における BTNL2 遺伝子 SNP の病原因子としての役割は不明である. 今後, BTNL2 遺伝子 SNP の疫学的頻度解析を端緒にして, サルコイドーシスの病因解明を目指したい.

文 献

- 1) Valentonyte R, Hampe J, Huse K, Rosenstiel P, Albrecht M, Stenzel A, Nagy M, Gaede KI, Franke A, Haesler R, Koch A, Lengauer T, Seegert D, Reiling N, Ehlers S, Schwinger E, Platzer M, Krawczak M, Muller-Quernheim J, Schurmann M, Schreiber S. Sarcoidosis is associated with a truncating splice site mutation in BTNL2. *Nat Genet.* 2005; 37: 357-64.
- 2) Rybicki BA, Walewski JL, Maliarik MJ, Kian H, Iannuzzi MC; ACCESS Research Group. The BTNL2 gene and sarcoidosis susceptibility in African Americans and Whites. *Am J Hum Genet.* 2005; 77: 491-9.
- 3) Rybicki BA, Maliarik MJ, Poisson LM, Sheffer R, Chen KM, Major M, Chase GA, Iannuzzi MC. The major histocompatibility complex gene region and sarcoidosis susceptibility in African Americans. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003; 167: 444-9.
- 4) Grutters JC, Sato H, Pantelidis P, Lagan AL, McGrath DS, Lammers JW, van den Bosch JM, Wells AU, du Bois RM, Welsh KI. Increased frequency of the uncommon tumor necrosis factor-857T allele in British and Dutch patients with sarcoidosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002; 165: 1119-24.
- 5) Kambe N, Nishikomori R, Kanazawa N. The cytosolic pattern-recognition receptor Nod2 and inflammatory granulomatous disorders. *J Dermatol Sci.* 2005; 39: 71-80.
- 6) Nguyen T, Liu XK, Zhang Y, Dong C. BTNL2, a butyrophilin-like molecule that functions to inhibit T cell activation. *J Immunol.* 2006; 176: 7354-60.
- 7) Arnett HA, Escobar SS, Gonzalez-Suarez E, Budelsky AL, Steffen LA, Boiani N, Zhang M, Siu G, Brewer AW, Viney JL. BTNL2, a Butyrophilin/B7-Like Molecule, Is a Negative Costimulatory Molecule Modulated in Intestinal Inflammation. *J Immunol.* 2007; 178: 1523-33.

びまん性汎細気管支炎 (DPB)

【平成 19 年度】

びまん性汎細気管支炎の疾患感受性遺伝子研究

土方美奈子¹ 松下 育美¹ 伊藤 秀幸² 森田 敬知²
大橋 順³ 徳永 勝士³ 本間 栄⁴ 田口 善夫^{5**}
吾妻安良太^{6*} 工藤 翔二⁶ 慶長 直人^{1*}

びまん性汎細気管支炎 (DPB) の疾患感受性候補領域の中には、ムチン様遺伝子などいくつかの遺伝子が存在しているが、これらの遺伝子のヒト気道上皮細胞での発現については不明の点が多い。ヒト気道上皮細胞を用いて RT/PCR で発現を調べたところ、2つの遺伝子の transcripts が検出できた。候補領域の遺伝的多型と発現量に関連がみられるのかを、今後さらに検討する必要がある。

Expression of candidate genes in the susceptibility region of diffuse panbronchiolitis

Minako Hijikata¹, Ikumi Matsushita¹, Hideyuki Ito², Takatomo Morita², Jun Ohashi³,
Katsushi Tokunaga³, Sakae Homma⁴, Yoshio Taguchi⁵, Arata Azuma⁶,
Shoji Kudoh⁶, and Naoto Keicho¹

¹Department of Respiratory Diseases, Research Institute, ²Department of Thoracic Surgery, International Medical Center of Japan

³Department of Human Genetics, Graduate School of Medicine, University of Tokyo

⁴Department of Respiratory Diseases, Toho University School of Medicine

⁵Department of Respiratory Medicine, Tenri Hospital

⁶Fourth Department of Internal Medicine, Nippon Medical School

Diffuse panbronchiolitis (DPB) is a complex genetic disease affecting East Asians and is strongly associated with the class I human leukocyte antigens (HLA)-B54 in Japan and HLA-A11 in Korea. We recently showed that an HLA-associated major susceptibility gene for DPB is probably located within the 200 kb in the class I region 300 kb telomeric of the HLA-B locus on the chromosome 6p21.3. We cloned two novel mucin-like genes *G2* and *G4* in the candidate region, which form a mucin gene cluster together with two reported genes, *C6orf205* and *DPCR-1*. We investigated their expression in human bronchial epithelial cells and found that *G4* and *C6orf205* were expressed.

はじめに

びまん性汎細気管支炎 (diffuse panbronchiolitis, 以下 DPB と略す) は, アジア人にみられる HLA class I 関連疾患である。日本人では HLA-B54 との関連が非常に強いことはいくつかの報告で確認されているのに対し^{1,2)}, 韓国人では HLA-B54 との関連はなく, かわりに HLA-A11 との関連が強いとされた³⁾。このことから, HLA そのものが DPB に関連しているのではなく, HLA-B 遺伝子座と HLA-A 遺伝子座の間に DPB の疾患感受性遺伝子が存在するという仮説がたてられ, マイクロサテライトマーカーなどの遺伝マーカーを用い, 候補領域はおおよそ S 遺伝子から TFIID 遺伝子までの 200 kb までせめられた⁴⁾。この 200 kb の領域をさらに一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) を用いて検討したところ, 候補領域は 80 kb までせめられたが, この 80 kb の領域は非常に連鎖不平衡の強い領域であるために, 複数の遺伝子多型が同程度に疾患に関連しており, 関連解析によるそれ以上の絞り込みは困難と思われた。一方で我々は候補領域内で新規遺伝子のクローニングを試み, 2つのムチン様遺伝子 (*G2*, *G4*) をクローニングした。データベースに登録されている配列 *C6orf205* と, 既に報告された *DPCR1* 遺伝子⁵⁾ をあわせると, 候補領域内は4つのムチン様遺伝子がクラスターとなっている。ムチンには繰り返し構造があり, そのユニット数が可変である VNTR (variable number of tandem repeat) 領域がある。平成 17 年度に, このムチン様遺伝子のエクソン内の VNTR を中心に解析を加え, DPB との関連を検討したが, 日本人集団では HLA-B*5401 との関連が非常に強く, これを超える強い関連を有する遺伝的多型は VNTR を含めても同定されなかった。平成 18 年度に, 200 kb の領域内ではあるが, 上述 80 kb の範囲ではない HLA-A 側の遺伝子

領域についての検討を加え, B*5401 と B*5504 を有する疾患感受性ハプロタイプ構造を検討したところ, *DPCR1* 遺伝子領域はすでに疾患感受性ハプロタイプに共有されないセグメントに属すると考えられ, 200 kb の候補領域のうち, HLA-A 側の 50 kb は候補領域から除外された。今年度は, 200 kb の候補領域に存在する遺伝子のヒト気道上皮細胞での発現を調べ, 疾患感受性遺伝子としての役割の可能性を検討した。

対象と方法

細胞株としては, NCI-H292, A549, BET1A, BEAS2B, NCI-H441, Calu-3 を用いた。また, human lung total RNA (Stratagene), human trachea total RNA (Stratagene) も用いた。

国立国際医療センターの呼吸器外科において, 同意の上で提供をうけた切除肺・気管支の一部より, 気道上皮細胞を得て, 培養を行った。

Trizol (Invitrogen) にて total RNA を抽出した後, total RNA 5 μ g \cdot SuperScriptIII reverse transcriptase (Invitrogen) \cdot pd (N)₉ (TaKaRa) を用いて逆転写反応を行った。

200 kb の候補領域にある遺伝子, *SFTPG*, *DPCR1*, *C6orf205*, *G4*, *G2*, *STG* について, 増幅産物が約 200 ~ 300 bp の範囲になるような RT/PCR 用のプライマーを作成した。すべてイントロンを間にはさむように設計したので, ゲノム DNA の増幅と cDNA の増幅の区別は可能である。RT/PCR のコントロールとしては, G3PDH Control Amplimer Set (CLONTECH) を使用した。

(倫理面への配慮)「ヒトゲノム・遺伝子解析に関する倫理指針」に準拠した当センターの遺伝子解析に関する倫理委員会の承認を受けている。

結 果

(1) Cell line における発現

図 1 に示すように, 今回検討した cell line および, 肺・気管支の total RNA の中では NCI-H441 細胞が対象とした遺伝子を比較的多く発現していることがわかった。平成 17 年度の関連解析の結果では, これらの遺伝子領域で一番関連が強かったのは, *G4* 遺伝子の SNP (*G4* exon4 SNP, OR 2.27, 95%CI 1.24-4.18) であ

¹ 国立国際医療センター研究所呼吸器疾患研究部

² 同 呼吸器外科

³ 東京大学 大学院医学系研究科人類遺伝学教室

⁴ 東邦大学呼吸器内科

⁵ 天理よろづ相談所病院呼吸器内科

⁶ 日本医科大学第四内科

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 分担研究者

** びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

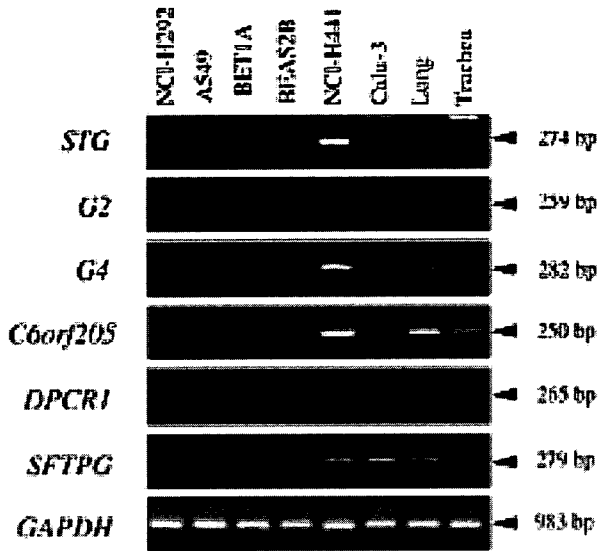


図1 細胞株における候補領域の遺伝子の発現

り、G4遺伝子の発現は特に注目されるため、NCI-H441細胞からG4遺伝子のほぼ全長(約5 kb) cDNAの増幅をlong PCRにて試みたところ、増幅可能であった。塩基配列の確認を行ったところ、上記の一番関連が強かったSNPに関してはTのホモ接合体であった他、特記すべきVNTR多型などは見いだされなかった。

(2) ヒト気道上皮細胞 primary culture における発現

切除気管支から単離培養したヒト気道上皮細胞については、まず passage 1細胞, passage 2細胞, air liquid interface (ALI) culture を行った細胞をいくつか用いて発現の比較を行ったが、対象遺伝子の中にはALI培養を行わないと発現が確認できないものは特になかったため、以後の検討は主に passage 1細胞で行うことにした。また、ヒト気道上皮細胞で発現が確認できたのは、G4遺伝子とC6orf205であったので、この2遺伝子の発現を passage 1細胞で検討することとした。

ヒト気道上皮細胞44検体を用いてG4遺伝子とC6orf205の発現を調べたところ、C6orf205は全例で陽性であったが、G4遺伝子は40検体で陽性、4検体で陰性であった。

(3) 遺伝子型と発現の関係の検討

上記(2)の検討で、G4遺伝子発現が陰性であった4検体について、疾患感受性のアリルを有しているかどうかゲノムDNAのPCRとシーケンスで調べたところ、いずれも疾患感受性アリルは有していなかつ

た。

考案・結論

200 kbのDPB疾患感受性候補遺伝領域にはムチン様遺伝子が存在するが、今年度の検討で、ヒト気道上皮細胞でのmRNA発現が認められるのは、G4遺伝子とC6orf205であることがわかった。今までの疾患関連解析の結果で一番注目されるのはG4遺伝子であるが、その発現には個体差があり、発現が少ない場合があることもわかった。

しかし、疾患感受性アリルの検討を行ったところ、G4遺伝子の発現が少ないものは、疾患感受性アリルを有していないものであった。そうすると、G4遺伝子の発現が少ないことが疾患に関連するのではなく、逆に多い事が疾患に関連するのではないかという推測ができる。DPBの症状としての気道過分泌、また、過去の関連解析結果から dominant を仮定すると最も有意差が出る事とあわせても、疾患感受性アリルでの高発現という仮説には矛盾がないと思われる。今回の方法では、発現量が多いことを検出できる系を組んでいないので、今後は、疾患感受性アリルで発現が多い可能性を検討できる実験系を構築することが必要であり、また、さらに検体数を増やすことも必要と考える。

参考文献

- 1) Sugiyama Y, Ohno S, Kano S, Maeda H, Kitamura S. Diffuse panbronchiolitis and rheumatoid arthritis: a possible correlation with HLA-B54. Intern Med. 1994 Oct; 33(10): 612-4.
- 2) Keicho N, Tokunaga K, Nakata K, Taguchi Y, Azuma A, Bannai M, Emi M, Ohishi N, Yazaki Y, Kudoh S. Contribution of HLA genes to genetic predisposition in diffuse panbronchiolitis. Am J Respir Crit Care Med. 1998 Sep; 158(3): 846-50.
- 3) Park MH, Kim YW, Yoon HI, Yoo CG, Han SK, Shim YS, Kim WD. Association of HLA class I antigens with diffuse panbronchiolitis in Korean patients. Am J Respir Crit Care Med. 1999 Feb; 159(2): 526-9.
- 4) Keicho N, Ohashi J, Tamiya G, Nakata K, Taguchi Y, Azuma A, Ohishi N, Emi M, Park MH, Inoko

H, Tokunaga K, Kudoh S. Fine localization of a major disease-susceptibility locus for diffuse panbronchiolitis. *Am J Hum Genet.* 2000 Feb ; 66(2): 501-7.

5) Matsuzaka Y, Tounai K, Denda A, Tomizawa M,

Makino S, Okamoto K, Keicho N, Oka A, Kulski JK, Tamiya G, Inoko H. Identification of novel candidate genes in the diffuse panbronchiolitis critical region of the class I human MHC. *Immunogenetics.* 2002 Aug ; 54(5): 301-9. Epub 2002 Jul 9.

【平成 17 年度】

ヒト末梢気道上皮細胞のケモカイン発現における エリスロマイシンの効果

滝澤 始* 高見 和孝 田中 満 出崎 真志 幸山 正
高橋 宏行 加藤 順 菊地 和彦 長瀬 隆英

びまん性汎細気管支炎 (DPB) などにおけるエリスロマイシン (EM) の作用機構解明の一環として、前年度までにジーンチップを用いた包括的遺伝子発現解析を行い、いくつかの標的遺伝子を検索した。今回は、そのうちケモカイン、サイトカインに焦点を当て、1) 正常ヒト末梢気道上皮細胞における発現と EM による変動、及び 2) 気道疾患症例の EM 療法前後での発現レベルの変化を検討した。1) 前年度の検討により EM 処理で明らかに発現が低下した CCL5 (RANTES), CXCL6 (Granulocyte Chemotactic Protein-2), IL-17C の発現を RT-PCR で検討したところ、前 2 者が無刺激及び TNF α 刺激下で検出され、EM 処理により低下した。CCL5 ではタンパクレベルでも確認された。2) 既報の方法 (AJRCCM 1997) により採取された EM 療法前後での DPB 3 例、気管支拡張症 3 例、副鼻腔気管支症候群 2 例、及び COPD (bronchitis type) 3 例の末梢気道上皮細胞において、CCL5, CXCL6 の発現レベルは低下する傾向が認められた。以上から、この 2 者はマクロライド療法の標的遺伝子に含まれることが示唆された。

The effects of erythromycin on the cytokines and chemokines transcription in human peripheral bronchial epithelial cells: CCL5 and CXCL6 as the new therapeutic targets

Hajime Takizawa, Kazutaka Takami, Mitsuru Tanaka, Masashi Desaki, Tadashi Kohyama,
Hiroyuki Takahashi, Jun Kato, Kazuhiko Kikuchi, and Takahide Nagase

The Department of Respiratory Medicine, University of Tokyo, Graduate School of Medicine, Tokyo, Japan

To investigate the molecular mechanisms of anti-inflammatory actions of macrolide antibiotics, we explored to utilize the array analysis of mRNA transcripts in normal human peripheral airway epithelial cells, and found that therapeutic dosage of erythromycin (EM, 10^{-6} M) showed inhibitory effects on transcription of several genes. These genes included chemokines such as CCL5 (RANTES) and CXCL6 (granulocyte chemotactic protein-2), and IL-17C. We, therefore, studied the effects of EM on the transcription levels of these three cytokines/chemokines in vitro. EM showed a dose-dependent modulatory effects on mRNA levels of CCL5 and CXCL6. Protein levels of CCL5 also decreased by EM treatment. Furthermore, we found that transcription levels of CCL5 and CXCL6 in peripheral airway epithelium decreased by EM treatment in patients with chronic airway disorders.

These findings suggested that these two chemokines might be the therapeutic targets of macrolide therapy.

はじめに

エリスロマイシン (EM) をはじめとする 14 員環マクロライド抗生物質の慢性気道炎症性疾患における有効性の機序について、これまでに気道上皮細胞のサイトカイン/ケモカイン、接着分子の発現ないし産生、遊離を抑制することを報告してきた^{1,2,3)}。これらの多くに共通して重要な転写調節因子 (NF κ B, AP-1) の活性化についてもゲルシフトアッセイにより検討し、薬剤と刺激の同時処置では明らかな抑制作用はないが⁴⁾、治療域濃度のエリスロマイシン(EM,10-6M)およびクラリスロマイシン(CAM)を種々の条件で前添加した系においては 24 時間の前処置により、明らかな NF κ B, AP-1 の活性化抑制作用を見出した⁵⁾。さらに、前年度には、マクロライドの抗菌作用を有しない各種誘導体が転写調節因子 (NF κ B, AP-1) の活性化を抑制しうること、I κ B のリン酸化には直接作用しないこと、を示した⁶⁾。マクロライドの作用点のひとつに核内結合過程が存在することを示唆する結果も得られた。

しかし、マクロライド抗生物質には、きわめて多彩な作用があることも判明しており、従来の候補分子を選んだ研究では把握できない網羅的な遺伝子発現解析の必要性が指摘されていた。びまん性汎細気管支炎の特効薬である 14 員環マクロライド系抗生物質の抗炎症作用を包括的に検討するために、3 年間に渡り詳細に検討した結果、ヒト正常末梢気管支上皮細胞の炎症性刺激 (TNF α) 下で、エリスロマイシン (EM) 及びその抗菌作用のない類縁体 EM703 を前処置し、遺伝子発現への作用をジーンチップにより包括的に評価したところ、TNF α で 2 倍以上遺伝子発現が上昇した 420 遺伝子のうち、EM で 30% 以上抑制された遺伝子は 72 個で、そのうち EM703 でも同様に抑制されたものが 45 個 (62.5%) あった。さらに EM703 で 25% 以上抑制されたものは 55 個 (76.4%) にのぼった。既知のもので気道炎症に関連性が推測されるものには、CCL5 (RANTES) や CXCL6 (granulocyte chemotactic protein-2) などのケモカイン、IFNAR2 (interferon 受容体), RAB, RAPIA などの Ras 関連分子, mitogen-activated protein kinase 3 などのシグナル

東京大学医学部呼吸器内科

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 分担研究者

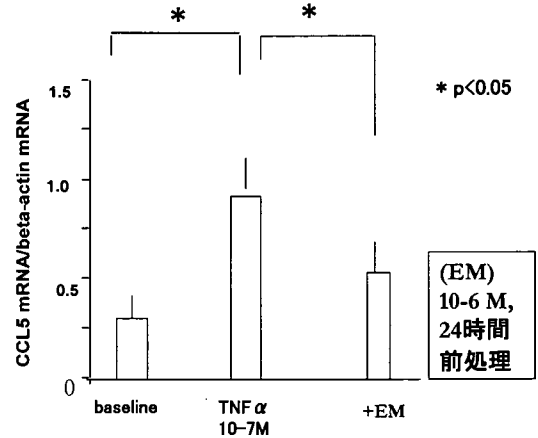


図 1A. ヒト正常末梢気道上皮細胞の CCL5 (RANTES) 発現とエリスロマイシンの効果

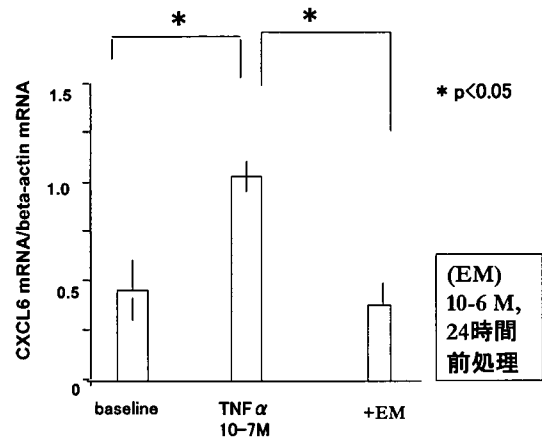


図 1B. ヒト正常末梢気道上皮細胞の CXCL6 (Granulocyte Chemotactic Protein-2) 発現とエリスロマイシンの効果

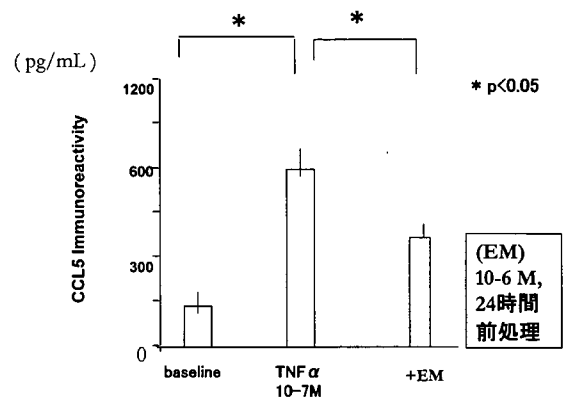


図 2. ヒト正常末梢気道上皮細胞からの CCL5 (RANTES) 産生とエリスロマイシンの効果

関連分子, TCF2 などの転写因子, tissue plasminogen activator や cell death activator CIDE-3 などがあつた^{7,8,9)}。

そこで今年度は、今回は、そのうちケモカイン、サイトカインに焦点を当て、1) 正常ヒト末梢気道上皮

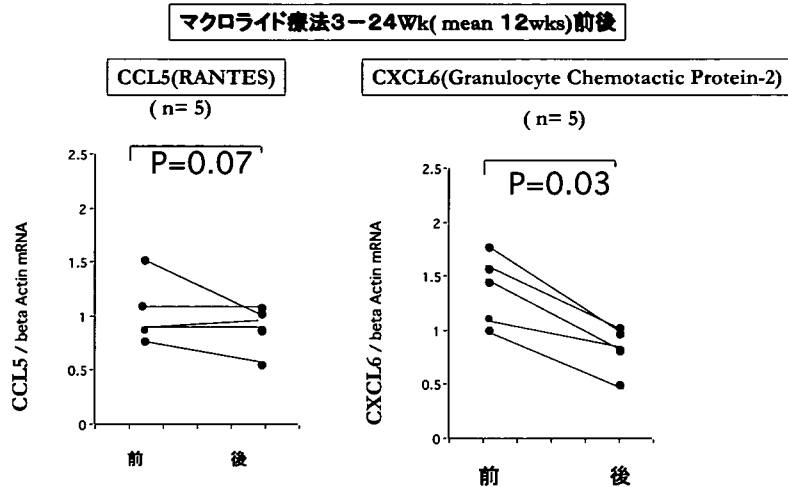


図3. 慢性気道炎症性疾患から得た末梢気道上皮細胞における EM 療法前後のケモカイン発現の変化

細胞における発現と EM による変動、及び 2) 気道疾患症例の EM 療法前後での発現レベルの変化を検討した。

対象と方法

1) ヒト正常末梢気管支上皮 (SAEC, Clonetics-TM) を専用培養液により培養した。コントロール ($TNF\alpha$ のみ), または Erythromycin (EM) 10-6M 24 時間前処理したのち, total RNA を抽出し RT-PCR により CCL5 (RANTES), CXCL6 (Granulocyte Chemotactic Protein-2), IL-17C の発現を検討した。

2) ELISA キットが入手できた CCL5 については EM 処理有り無しの培養上清中の濃度を測定した。

3) 既報の方法 (AJRCCM 1997)²⁾ により施設承認されインフォームドコンセントを得た後採取された EM 療法前後での DPB 3 例, 気管支拡張症 3 例, 副鼻腔気管支症候群 2 例, 及び COPD (bronchitis type) 3 例の末梢気道上皮細胞において, CCL5, CXCL6 の発現レベルを調べた。

結 果

1) CCL5 (RANTES), CXCL6 (Granulocyte Chemotactic Protein-2), IL-17C のうち, 前 2 者が無刺激及び $TNF\alpha$ 刺激下で検出され, EM 処理により低下した (図 1)。CCL5 ではタンパクレベルでも確認された (図 2)。

2) 治療前後の末梢気道上皮細胞において, CCL5,

CXCL6 の発現レベルはマクロライド療法により低下する傾向が認められた (図 3)。

考 案

びまん性汎細気管支炎に対する特効的な効果を示す 14 員環マクロライド療法 (15 員環も有効) は, 最近では従来からの慢性副鼻腔炎, 副鼻腔気管支症候群, 気管支拡張症への応用に加え, 欧米ではのう胞線維症の標準的治療選択になり, またわが国では COPD の急性増悪を減少するなど, さらに広範囲かつ重要な治療法として注目されつつある。一方で, 肺炎球菌をはじめとする呼吸器感染症起炎菌のマクロライド抗生物質への耐性も問題となっており, 本療法の標的分子の解明, さらに抗菌作用のない誘導体のスクリーニングに期待が集まっている。

これまでの研究により, 14 員環マクロライド抗生物質が, 炎症の局面で重要な各種の分子, すなわち IL-8, IL-1 β , IL-6 などの炎症性サイトカイン, ケモカイン, や接着分子の発現を遺伝子レベルで抑制ないし正常化することがあきらかにされてきた。さらに, これら炎症性サイトカインなどの発現に重要な転写調節因子 ($NF\kappa B$, AP-1) の活性化を抑制することが明らかになり, びまん性汎細気管支炎の気道炎症を改善する 1 機序として推定されるに到っている。この作用は, 気道上皮細胞のみならずマクロファージ, リンパ球, 線維芽細胞においても認められ¹⁰⁻¹²⁾, 生体に対するかなり普遍的な作用である可能性がある。一方, マクロライドには, 気道分泌抑制作用, 細胞のアポトー

シスへの作用, リンパ球の増殖抑制作用など, きわめて多面的な作用も示されており, 以上述べた機構だけで薬効を説明しきることはできない。

そこで近年応用が行われているマイクロアレー法により, マクロライド療法の標的遺伝子の抽出を試みた。初年度は, ヒト気管支上皮細胞株である BET-1A 細胞を用いて, さまざまな条件で検討を行い, Affymetrix 社のジーンチップを用いて, 約 2 万以上の遺伝子についてその発現への影響を検討できた。

2 年目では, 既報の報告同様炎症性サイトカインによる刺激をせず, EM を添加したためか, 細胞の生存率は比較的長時間保たれたが, 72 時間を越えると明らかに生存率や細胞数の減少を認めた。また, EM の処理により, 発現が増強する遺伝子が 11 個みられ, 一方減弱する遺伝子が 12 個存在した。どちらも BET-1A で行った昨年度の結果よりも大幅に少ない数であった。最終年度は, 炎症性刺激として $TNF\alpha$ を用いて, マクロライドの前処理での検討を行った。さらに, 従来の検討で抗炎症作用が認められ, かつ抗菌作用やモチリン様作用をもたない誘導体 EM703 も同様に検討を行った。そして, 解析にあたっては, 昨年度までのものより多数の遺伝子について解析可能な Gene Chip Human Genome U133 Plus 2.0 Array を用いた。

その結果, $TNF\alpha$ で 2 倍以上遺伝子発現が上昇した 420 遺伝子のうち, EM で 30% 以上抑制された遺伝子は 72 個で, そのうち EM703 でも同様に抑制されたものが 45 個 (62.5%) あった。さらに EM703 で 25% 以上抑制されたものは 55 個 (76.4%) にのぼった。EM と抗菌作用のない誘導体 EM703 に共通する遺伝子は特に有望と思われた。既知のもので気道炎症に関連性が推測されるものには, CCL5 (RANTES) や CXCL6 (granulocyte chemotactic protein-2) などのケモカイン, IFNAR2 (interferon 受容体), RAB, RAPIA などの Ras 関連分子, mitogen-activated protein kinase 3 などのシグナル関連分子, TCF2 などの転写因子, tissue plasminogen activator や cell death activator CIDE-3 などがあった。マクロライドの作用機構を解明する上で, 今回のアプローチは, 同時にほぼ全部の遺伝子発現への影響を網羅的に検出できる点が最大の利点と思われる。

今年度は, EM による発現の減弱がとくに顕著であったサイトカイン, ケモカインとして 3 者を選んで, その検証を行い, CCL5, CXCL6 がマクロライド

療法の標的遺伝子に含まれることが示唆された。

結 論

昨年度までのジーンチップによる包括的遺伝子発現の検討により見出されたいくつかの候補遺伝子について, とくにサイトカイン, ケモカインについて見当を行い, CCL5, CXCL6 がマクロライド療法の標的遺伝子に含まれることが示唆された。

謝 辞

共同研究者として本研究の遂行にご協力いただいた国立成育医療センター研究所 免疫アレルギー研究部 中島敏治先生, 月舘利治先生, 斉藤博久先生, 北里研究所 大村 智先生, 砂塚敏明先生に深謝いたします。

参考文献

- 1) H. Takizawa, M. Desaki, T. Ohtoshi, et al.: Erythromycin suppresses interleukin 6 expression by human bronchial epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210: 781-786, 1995.
- 2) H. Takizawa, M. Desaki, T. Ohtoshi et al.: Erythromycin modulates IL-8 expression in human bronchial epithelial cells: Studies with normal and inflamed airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 266-271, 1997.
- 3) Kawasaki S, Takizawa H, Ohtoshi T, et al.: Roxithromycin inhibits cytokine production and neutrophil attachment with human bronchial epithelial cells in vitro. *Antimicrob. Agents Chemother.* 42: 1499-1502, 1998.
- 4) 滝沢 始, 出崎真志, 河崎 伸, 他: エリスロマイシン療法の機序解明: ヒト気道上皮細胞の転写調節に対するマクロライド抗生物質の作用. 厚生省特定疾患呼吸器系疾患調査研究班びまん性肺疾患分科会平成 10 年度研究報告書, 124-127.
- 5) Desaki M, Takizawa H, Ohtoshi T, et al. Erythromycin suppresses nuclear factor-kappa B and activator protein-1 activation in human bronchial epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*

- 267: 124-128, 2000.
- 6) Desaki M, Okazaki H, Sunazuka T, Omura S, Yamamoto K, Takizawa H: Molecular mechanisms of an anti-inflammatory action of erythromycin in human bronchial epithelial cells: a possible role in the signaling pathway that regulates nuclear factor-kappa B activation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; May; 48(5): 1581-5.
- 7) 滝澤 始, 中島敏治, 斎藤博久, 梅田 啓: エリスロマイシンの抗炎症作用: 包括的遺伝子発現解析から (第一報). 厚生労働科学研究 特定疾患対策研究事業 びまん性肺疾患研究班 平成 14 年度研究報告書, 203-206.
- 8) 月館利治, 中島敏治, 斎藤博久, 滝澤 始: エリスロマイシンの抗炎症作用: 包括的遺伝子発現解析から (第二報). 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 びまん性肺疾患調査研究班 平成 15 年度研究報告書, 193-196.
- 9) 滝澤 始, 月館利治, 中島敏治, 斎藤博久: エリスロマイシンの抗炎症作用: 包括的遺伝子発現解析から (第三報) 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業 びまん性肺疾患調査研究班 平成 16 年度研究報告書, 243-248.
- 10) Miyanohara T, Ushikai M, Matsune S, et al. Effects of clarithromycin on cultured human nasal epithelial cells and fibroblasts. *Laryngoscope* 110: 126-131, 2000.
- 11) Aoki Y, Kao PN: Erythromycin inhibits transcriptional activation of NF-kappa B, but not NFAT, through calcineurin-independent signaling in T cells. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2678-2684, 1999.
- 12) Kikuchi T, Hagiwara K, Honda Y, et al. Clarithromycin suppresses lipopolysaccharide-induced interleukin-8 production by human monocytes through AP-1 and NF-kappa B transcription factors. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 49(5): 745-55, 2002.

狭窄性細気管支炎 (CBO)

【平成 17 年度】

「アマメシバ」関連閉塞性細気管支炎の全国調査結果と その臨床像および肺病理組織所見

大中原研一 東元 一晃 松山 航 納 光弘*
長谷川好規¹* 下方 薫¹ 小倉 高志²

平成 15 年我々は健康食品「アマメシバ」摂取後に発症した閉塞性細気管支炎の本邦初発例を報告した。その後行われた全国的な疫学調査の結果、アマメシバ摂取に関連して、臨床診断として 8 例の閉塞性細気管支炎と 1 例の気管支炎の症例が報告された。2 年経過した後、追跡調査を行ったところ、生体肺移植 1 例、呼吸不全による死亡 1 例、その他 3 例が低酸素血症のため在宅酸素療法を要していたという結果が得られた。移植および剖検の 2 例より得られた肺組織については病理組織学的検討がなされたが、2 例とも病理学的にも閉塞性細気管支炎と確定診断がなされた。肺移植例の摘出肺組織に関しては免疫組織化学的検討も行い、その結果、matrix metalloproteinase (MMP)-2 が、気管支上皮細胞、肺胞マクロファージに陽性、MMP-9 は気管支上皮細胞、肺線維芽細胞、組織に浸潤する炎症細胞に陽性、また、tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 は、肺線維芽細胞に、TIMP-2 は気管支上皮細胞に強く、肺線維芽細胞にわずかに陽性に染色されるという結果であった。この検討により、MMP/TIMP の不均衡はアマメシバ閉塞性細気管支炎の病態に関与している可能性があると考えられた。

National Research of *Sauropus androgynus* associated pulmonary disorder in Japan and immunohistochemical analysis of *Sauropus androgynus* associated bronchiolitis obliterans

Kenichi Oonakahara, Wataru Matsuyama, Ikkou Higashimoto, Mitsuhiro Osame
Kaoru Shimokata¹, Yoshinori Hasegawa¹, and Takashi Ogura²

Third Department of Internal Medicine, Kagoshima University Faculty of Medicine, Kagoshima, Japan

¹*Respiratory Department of Internal Medicine, Nagoya University Faculty of Medicine, Nagoya, Japan*

²*Kanagawa Cardiovascular and Respiratory Center, Yokohama, Japan*

Two years ago, we reported a case of *Sauropus androgynus* associated bronchiolitis obliterans (BO) in Japan and proposed the necessity of national research about *Sauropus androgynus* associated pulmonary disorder in Japan. Here, we report the result about the national research of *Sauropus androgynus* associated pulmonary disorder in Japan. Eight BO cases and one bronchitis case have been discovered. All cases are female and one BO case underwent living-donor lobar lung transplantation and one BO case died because of respiratory failure. Two BO cases were confirmed pathologically. One BO case is suffering from pulmonary aspergillosis and 3 BO cases received home oxygen therapy. No medication, except for living-donor lobar lung transplantation, was effective. We also performed immunohistochemical analysis about matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9, tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 using *Sauropus androgynus* associated BO lungs. Bronchoepithelial cells, pulmonary fibroblasts and alveolar macrophages stained positive for MMP-2. Bronchoepithelial cells, pulmonary fibroblasts and tissue infiltrating inflammatory cells stained positive for MMP-9. Only pulmonary fibroblasts in the lesion stained positive for TIMP-1. Bronchoepithelial cells stained strongly positive for TIMP-2 and pulmonary fibroblasts weakly stained positive for TIMP-2. Imbalance of MMP/TIMP might be associated with the pathogenesis of *Sauropus androgynus* associated BO.

はじめに

平成 15 年、健康食品「アマメシバ」摂取後に発症したアマメシバ関連閉塞性細気管支炎 (*Sauropus Androgynus* associated Bronchiolitis Obliterans) の本邦初発例を緊急報告し¹⁾、2 年が経過した。しかし本邦におけるアマメシバ閉塞性細気管支炎の疫学・臨床像などの実態、また、発症機序などの病態は、未だ明らかではない部分も残されている。疫学調査の結果とその臨床像の追加報告及び当科症例摘出肺組織での免疫組織学的検討について報告する。

対象・方法

1) 疫学 (全国調査) および症例の臨床像についての追跡調査

病床数が 200 床以上で呼吸器内科及び外科を標榜する全国の医療機関 1,823 施設を対象に症例調査 (一

次、二次) を実施した。症例調査によって報告された 8 例の閉塞性細気管支炎 (臨床診断) 症例に関して、初回報告から 2 年が経過した平成 17 年 9 月から 12 月にかけて、各担当医に対してその後の臨床症状経過に関する追跡調査を行った。

2) 病理組織学および免疫組織学的検討

8 症例のうち生体肺移植手術を行った症例および死亡剖検症例の 2 例より得られた肺組織について病理組織学的検討がなされた。

また、肺移植に伴って摘出された 1 症例の肺組織に関しては、免疫組織化学的検討も行った。

摘出肺をホルマリン固定し (4% paraformaldehyde/0.1 M PBS pH 7.4 固定・パラフィン包埋), avidin biotin immunoperoxidase technique (ABC 法) により免疫染色を行った。(使用抗体; 抗 Matrix Metalloproteinases-2 (MMP-2) 抗体, 抗 MMP-9 抗体, 抗 tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) 抗体, 抗 TIMP-2 抗体, (DAIICHI Fine Chemical Co., Ltd.))

表 1 本邦での「アマメシバ」関連 BO 症例の転帰

症 例	転 帰
1 (鹿児島: 当科) 40 歳代 女性	部分生体肺移植
2 (神奈川: 母) 50 歳代 女性	死亡, 剖検施行
3 (神奈川: 娘) 20 歳代 女性	肺アスペルギルス症
4 (名古屋: 母) 70 歳代 女性	在宅酸素療法
5 (名古屋: 娘) 50 歳代 女性	在宅酸素療法
6 (沖縄) 60 歳代 女性	公表時と著変なし
7 (沖縄) 50 歳代 女性	公表時と著変なし
8 (愛知) 50 歳代 女性	公表時と著変なし

結 果

1) 疫学調査および臨床追跡調査

既報のように、アマメシバ摂取に関連したと考えられる肺障害は 9 例。それらの臨床診断は閉塞性細気管支炎が 8 例, 気管支炎 (軽度) が 1 例であった。閉塞性細気管支炎は全例が女性 (気管支炎例は男性) で年齢は 20 歳代から 70 歳代。肺機能検査ではすでに 1 秒量 0.45~1.00 L と低値であった。発見時の報告から 2 年

表 2 組織学的所見が得られた 2 例の比較

症 例	アマメシバ 総摂取量 (乾燥粉末(g))	アマメシバ 摂取期間 (日)	摂取開始から 発症までの 期間 (月)	治療経過	病理所見
1 (鹿児島) 40 歳代 女性	1,000	130	3	生体 肺移植 (症状 出現から 1 年 1ヵ月後)	BO (摘出肺)
2 (神奈川県) 50 歳代 女性	1,440	360	4	死亡, 剖検 (症状出現から 2 年 5ヵ月 後)	BO (剖検)

鹿児島大学病院呼吸器内科

¹ 名古屋大学医学部付属病院呼吸器内科

² 神奈川県立循環器呼吸器病センター呼吸器科

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

後の臨床症状の転帰を表1に示す。症例1は、呼吸不全が進行したため生体肺移植手術を行った。移植後の経過は良好で現在の肺機能は1秒量2Lを超え、軽い運動もできるまでに改善している。症例2は経過中、

ステロイド吸入および内服治療中に肺アスペルギルス症を発症。その後呼吸不全が徐々に進行し死亡、剖検が行われた。その他全例、発見診断時より、アマメシバ摂取は中止したものの、少なくとも8例中3例については、呼吸不全症状の悪化が認められ、在宅酸素療法が必要となっている症例は5例に上った。3例については発症時とほぼ変化なしと報告されている。

2) 病理組織学および免疫組織学的検討

肺組織が得られた症例1,2の比較を表2に示す。いずれも図1に示すとおり細気管支上皮の剥離及び、線維芽細胞と泡沫細胞の浸潤による細気管支内腔の狭窄が見られ、病理組織学的にも閉塞性細気管支炎の確定診断がなされた。

症例1に関して行った免疫組織学的検討では、Matrix metalloproteinases-2 (結果 MMP-2) は細気管支上皮細胞、上皮下の線維芽細胞様細胞、泡沫大食細胞全てに同程度に発現 (図2a)。MMP-9 は細気管支上



図1 肺病理組織像 (a) 症例1移植時摘出肺 (b) 症例2剖検

表3 摘出組織の免疫組織化学的検討のまとめ

	MMP-2	MMP-9	TIMP-1	TIMP-2
細気管支上皮細胞	+	++	+	++
上皮下の線維芽細胞様細胞	+	++	++	+
泡沫大食細胞	+	+	-	-
小型炎症細胞	-	+	-	-

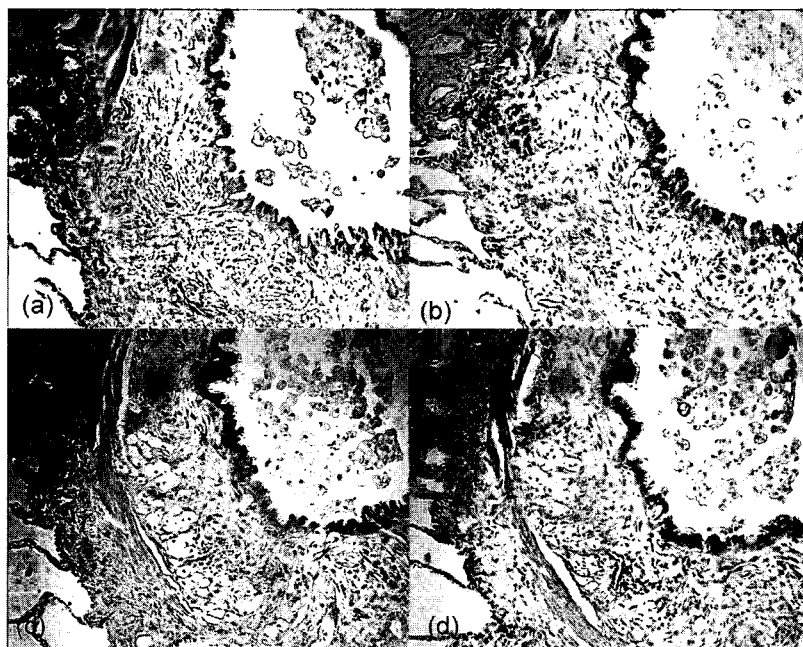


図2 症例1の肺免疫組織化学染色所見 (a) MMP-2 (b) MMP-9 (c) TIMP-1 (d) TIMP-2

皮細胞、上皮下の線維芽細胞様細胞に強く発現し、病巣部細気管支周囲の小型炎症細胞にも発現するものが見られた (図 2b)。Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) は閉塞部細気管支上皮下の線維芽細胞様細胞のみが強陽性、細気管支上皮細胞は弱陽性 (図 2c)。TIMP-2 は細気管支上皮細胞、上皮下の線維芽細胞様細胞に発現が見られ、上皮細胞に発現が強かった (図 2d)。それぞれの発現の比較は表 3 に示す。

考 察

本邦におけるアマメシバ関連閉塞性細気管支炎は、全国集計の結果、当初発表された 8 例以降、増加してはいない。これは初発例報告以後の早急な発売禁止措置など、厚生労働省の迅速な対応に寄与するところが大きいと思われる。

初発例報告後に行った全国調査によって判明した 8 例の閉塞性細気管支炎症例は、報告の時点で肺機能上 1 秒量が 800 ml 以下となっている症例が 5 例存在し、発見時すでに重症化していた。さらにこれら症例について 2 年を経た時点で追跡調査を行ったところ、肺移植 1 例、死亡 1 例のほか、在宅酸素を必要としていた例が 3 例であり、保存的治療で ADL が確保されているものは 3 例に過ぎなかった。臨床的には、少なくとも 8 例中 3 例において、アマメシバ服用中止にもかかわらず呼吸不全の進行が見られ、その他の症例も診断時とほぼ同等の症状が持続しており、改善がみられたものはなかった。これは、Lai らによる約 20% の患者でアマメシバ服用中止後も肺機能の低下が進行したという台湾症例 115 例の追跡調査の結果報告とも一致しており²⁾、通常の薬剤性肺障害と異なる機序が関与していることをうかがわせた。

また、肺移植を受けた当科症例は外来通院中であるが、これまでのところ経過は良好である。台湾ではこれまでに十数例の肺移植症例が報告されているが、移植後一時的に改善しても、反復感染などによる早期死亡例や、中長期的には再び閉塞性細気管支炎を発症し、再移植を必要とする例も少なくないことが示されており^{2,3)}、今後注意深い観察が必要と考えられる。

また、本症の病理所見については、これまでに蓄積された台湾症例に関して詳細な検討がなされている⁴⁾。それによると発症初期には細気管支内腔の粘膜・

粘膜下の炎症、多核白血球 (細気管支内)・リンパ球および形質細胞 (細気管支周囲の間質) の浸潤 (Proliferative BO) が見られ、中期には細気管支壁への泡沫大食細胞の浸潤、細気管支周囲から気管支内腔に及ぶ線維化、後期では線維化の進行に伴う細気管支内腔の狭窄 (Constrictive BO) が見られるとの報告がある。今回、我々が検討しえた 2 例の肺検体は中期以降の病変と考えられ、その病理所見も Constrictive BO として矛盾しないものであった。

このように閉塞性細気管支炎の組織学的特徴は、気道上皮細胞及び上皮下組織の傷害や炎症に伴う気道上皮の不十分な再生と異常な組織修復による過剰な線維増殖であるとされる。そこで、われわれは本症の病態に関して、近年組織再生やリモデリングに関与するものとして注目されている Matrix metalloproteinases (MMPs) に着目し、検討することとした。

肺移植を行った症例の摘出肺組織を用いて、MMP-2 MMP-9 とその組織内因性阻害因子 TIMP-1 TIMP-2 について免疫染色を行ったが、その結果、MMP-2 は気管支上皮細胞、肺泡マクロファージに陽性、MMP-9 は気管支上皮細胞、肺線維芽細胞、組織に浸潤する炎症細胞に陽性であった。また、TIMP-1 は、肺線維芽細胞に、TIMP-2 は気管支上皮細胞に強く、肺線維芽細胞にはわずかに陽性に染色された。

これらの結果がアマメシバとどのように関連しているかは、いまだ不明な部分が多いが、アマメシバ摂取によって細気管支上皮細胞の抗原性が変化する可能性や、T リンパ球などの免疫細胞の反応性に変化を与えることなどが考えられている。その結果として、細気管支局所において MMP/TIMP の不均衡が生じ、上皮下組織の線維化などアマメシバ閉塞性細気管支炎の病態形成に関与しているのかもしれない。今後、さらに得られた肺組織に関して、他の原因による閉塞性細気管支炎との比較なども含めた詳細な検討が必要である。

参考文献

- 1) 大中原研一, 堂地ゆかり, 町田健太郎, 東元一晃, 川畑政治, 有村公良, 納 光弘「アマメシバ」摂取によると思われる閉塞性細気管支炎の本邦での発症 台湾での惨事を繰り返さないための緊急報告 日本医事新報. 4141, 27-30, 2003.

- 2) Lai RS, Chiang AA, Wu MT, Wang JS, Lai NS, Lu JY, Ger LP, Roggli V. Outbreak of bronchiolitis obliterans associated with consumption of *Sauropus androgynus* in Taiwan. *Lancet*. 1996 Jul 13; 348 (9020): 83-5.
- 3) Luh SP, Lee YC, Chang YL, Wu HD, Kuo SH, Chu SH. Lung transplantation for patients with end-stage *Sauropus androgynus*-induced bronchiolitis obliterans (SABO) syndrome. *Clin Transplant*. 1999 Dec; 13(6): 496-503.
- 4) Wang JS, Tseng HH, Lai RS, Hsu HK, Ger LP. *Sauropus androgynus*-constrictive obliterative bronchitis/bronchiolitis — histopathological study of pneumonectomy and biopsy specimens with emphasis on the inflammatory process and disease progression. *Histopathology*. 2000 Nov; 37(5): 402-10.

ラット移植肺へのインターロイキン-10 経気道的遺伝子導入が 同種免疫反応に伴うグラフト細気管支上皮細胞傷害に 及ぼす影響

大石 久¹ 岡田 克典¹ 菊地 利明²
松村 輔二¹ 貫和 敏博^{2*} 近藤 丘^{1**}

【背景・目的】肺移植後にみられる閉塞性細気管支炎は、レシピエントの長期予後を規定する合併症である。本症の発症には、同種免疫反応に伴う細気管支上皮細胞傷害とこれに引き続き起こる細気管支内腔への反応性の線維性結合組織増生が関与することが推測されているものの、発症機序の詳細は未だ不明であり、治療法も確立されていないのが現状である。我々は、摘出ドナー肺へのインターロイキン-10 (IL-10) 経気道的遺伝子導入が、移植肺の急性拒絶反応を抑制することをラット肺移植モデルを用いて示してきた。我々が用いた経気道的遺伝子導入法により、目的遺伝子は I 型肺胞上皮細胞、マクロファージに加え、細気管支上皮細胞にも導入される。今回は、本法が、ラット移植肺の細気管支上皮細胞傷害を抑制するか否かにつき病理学的に検討した。【方法】BN ラットより左肺を摘出し、あらかじめ作成した遺伝子 (IL-10 群: pCMVh-IL10, コントロール群: pCMV β) をカチオン性脂質とともに経気道的に注入した後、MHC 不適合 Lew ラットに同所性左片肺移植を行った。移植後 6 日目に移植肺を摘出して病理標本を作成し、切片中のすべての細気管支をその上皮細胞脱落の割合にしたがって、「脱落なし」=上皮細胞脱落なし, 「中等度脱落」=全周の 1-50% の上皮細胞脱落, 「重度脱落」=全周の 51-100% の上皮細胞脱落 3 つのカテゴリーに分類しそれぞれの個数を記録した。上皮細胞脱落の程度の分布に両群間で差があるかどうかを χ^2 検定を用いて検討した。【結果】コントロール群 ($n=6$) の切片中の総細気管支数は 180 個で、「脱落なし」を示したのは 47 (26.1%), 「中等度脱落」は 60 (33.3%), 「重度脱落」は 73 (40.6%) であった。一方, IL-10 群 ($n=7$) の切片中の総細気管支数は 212 であり、「脱落なし」は 124 (58.5%), 「中等度脱落」は 57 (26.9%), 「重度脱落」は 31 (14.6%) であった。気道上皮細胞脱落の程度の分布に両群間で有意差を認め ($p<0.001$), IL-10 群で気道上皮細胞の脱落が有意に抑制されていた。【結論】摘出肺への IL-10 遺伝子の経気道的子導入が、同種免疫反応に伴うグラフト細気管支上皮細胞傷害を有意に抑制することが明らかとなった。本法は閉塞性細気管支炎の予防・治療へつながる可能性がある。

Cationic liposome-mediated interleukin-10 gene transfer to the airway prevents bronchiolar epithelial cell injury in a rat model of lung allograft rejection

Hisashi Oishi¹, Yoshinori Okada¹, Toshiaki Kikuchi², Yuji Matsumura¹, Toshihiro Nukiwa², and Takashi Kondo¹

¹*Department of Thoracic Surgery, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University*

²*Department of Respiratory Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine*

【Background】 Bronchiolitis obliterans (BO) is a complication that limits a long term survival of lung transplant recipients. Although the pathogenesis of BO remains unclear, the most plausible explanation is that BO develops as a result of tissue repair and remodeling in response to bronchiolar epithelial injury, which is primarily caused by alloimmune response. We have previously reported that cationic liposome-mediated trans-bronchial interleukin-10 (IL-10) gene transfer to the lung allograft significantly improved parameters of inflammation associated with acute rejection in a rat model of lung transplantation. In this model, we found that a target gene was transferred into type I alveolar cells, alveolar macrophages and bronchiolar epithelial cells. Here, we examined whether trans-bronchial IL-10 gene transfer prevented bronchiolar epithelial cell injury in a rat model of lung transplantation.

【Methods】 The left lung was extracted from the donor BN rat and intrabronchially instilled with 50 μ g of pCMVIL-10 (IL-10 group) or pCMV β (control group) mixed with 20 μ g of cationic liposome. The lung graft was transplanted to the histoincompatible recipient Lew rat. The lung allograft was harvested on day 6 post-transplant, fixed in formalin and a hematoxylin-eosin-stained section was made from a cut surface through the hilum. All bronchioles in the section were examined and assigned to one of the following categories according to the degree of the epithelial cell injury; “no epithelial loss”: all circumferential epithelial cells are retained, “moderate epithelial loss”: 1 to 50% of circumferential epithelial cells are lost, “severe epithelial loss”: 51 to 100% of circumferential epithelial cells were lost.

【Results】 Among the 180 bronchioles counted in the control group ($n=6$), 47 (26.1%) were assigned to “no epithelial loss”, 60 (33.3%) to “moderate epithelial loss”, and 73 (40.6%) to “severe epithelial loss”. In marked contrast, among the 212 bronchioles counted in the IL-10 group ($n=7$), 124 (58.5%) were assigned to “no epithelial loss”, 57 (26.9%) to “moderate epithelial loss”, and 31 (14.6%) to “severe epithelial loss”. The distribution of the categories of epithelial cell loss was significantly different between the both groups ($p<0.001$ with χ^2 test) and the epithelial cell injury was significantly improved in the IL-10 group.

【Discussion and Conclusion】 Cationic liposome-mediated IL-10 gene transfer to the airway prevented bronchiolar epithelial cell injury in a rat model of lung allograft rejection. Whether this therapeutic method prevents or treat BO has to be further determined.