

臨床病態研究

間質性肺炎における syndecan-4 の役割

谷野 功典 王 新涛 佐藤 俊 石井 妙子
猪腰 弥生 仲川奈緒子 齊藤 香恵 福原 敦朗
斎藤 純平 石田 卓 棟方 充*

プロテオグリカン (PG) は肺細胞外マトリックスの構成成分であり, 炎症や組織の修復過程に重要な役割を果たしている. しかし, 間質性肺炎におけるその役割はよく知られていない. そこで, 我々はヘパラン硫酸プロテオグリカンのひとつである syndecan-4 に着目し, 間質性肺炎におけるその発現と役割を検討した. syndecan-4 は, 特発性間質性肺炎において上皮細胞と肺胞マクロファージに強い発現が認められ, 気道上皮細胞株 BEAS-2B への lipopolysaccharide (LPS) 刺激は syndecan-4 の発現を増加し, 低分子ヘパリンまたは syndecan-4 の BEAS-2B に対する前処置は LPS 刺激後の IL-8 発現の増加を抑制した. 以上より, 間質性肺炎において syndecan-4 が炎症反応を調節することが示唆された.

Role of Syndecan-4 in Idiopathic Interstitial Pneumonia

Yoshinori Tanino, Xintao Wang, Suguru Sato, Taeko Ishii,
Yayoi Inokoshi, Naoko Nakagawa, Kazue Saito, Atsuro Fukuhara,
Jyunpei Saito, Suguru Ishida, Mitsuru Munakata.

Department of Pulmonary Medicine, School of Medicine, Fukushima Medical University

Proteoglycans (PGs) have been reported to play important roles in regulating inflammation and tissue repair processes. To determine the role of proteoglycans in interstitial pneumonia, we focused syndecan-4, a heparan sulfate proteoglycan. The expression of syndecan-4 in idiopathic interstitial pneumonia (IIP) was first examined and *in vitro* experiments were conducted using BEAS-2B, bronchial epithelial cells. In IIP lungs, immunohistochemical analysis showed strong expression of syndecan-4 in epithelial cells and alveolar macrophages. Lipopolysaccharide increased syndecan-4 mRNA expression in BEAS-2B cells, and it was significantly attenuated by pre-incubation with low-molecular weight heparin or recombinant syndecan-4. Taken together, we conclude that syndecan-4 regulates inflammatory responses in IIP lungs.

はじめに

プロテオグリカンは、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマトン硫酸、ケラタン硫酸などのグリコサミノグリカンといわれる硫酸化多糖がコア蛋白に共有結合してできる糖タンパクであり、細胞外マトリックスの構成成分である。近年、プロテオグリカンは組織の構造を維持する単なるglueではなく、肺の発生や炎症、組織の修復過程に重要な役割を担っていることが報告されているが、まだなおその詳細は不明である。

細胞表面に発現するヘパラン硫酸プロテオグリカンである syndecan は、syndecan-1 から-4 の4つの isoform が存在し、syndecan-1 は主に上皮細胞、syndecan-2 は線維芽細胞と血管内皮細胞、syndecan-3 は神経細胞、syndecan-4 は多種類の細胞に発現していることが報告されている。マウスの気管内への syndecan-1 投与が気道のアレルギー性炎症を抑制すること¹⁾ や syndecan-4 が TGF- β を介して IL-1 β の産生を抑制することにより敗血症性ショックを抑制すること²⁾ が報告され syndecan の肺の炎症における役割が示唆されている。

本研究において、我々は syndecan-4 に着目し、間質性肺炎におけるその役割について検討した。

方 法

実験1) 特発性間質性肺炎患者の外科的肺生検標本を使用して、肺における syndecan-4 の発現を免疫染色により検討した。

実験2) 肺気道上皮細胞株 BEAS-2B を使用し、LPS (1 μ g/ml) 投与後の syndecan mRNA の発現を定量的 RT-PCR 法で検討した。

実験3) BEAS-2B における TNF- α (1 ng/ml) 刺激後の IL-8 mRNA の発現を GAG のひとつである低分子ヘパリン (4 mg/ml)、または recombinant syndecan-4 (2.5 μ g/ml) 前処置の有無で比較検討した。

結 果

実験1) 間質性肺炎の肺組織において上皮細胞とマクロファージに Syndecan-4 の強い発現が認められた (Figure 1)。

実験2) 気道上皮細胞株 BEAS-2B では LPS 投与3時間後をピークに syndecan-4 mRNA の発現が増加した (data not shown)。

実験3) 低分子ヘパリンまたは recombinant syndecan-4 の前処置は TNF- α 刺激3時間後の BEAS-2B における IL-8 mRNA の発現を著明に抑制した (Figure 2)。

結論と考察

我々はヘパラン硫酸プロテオグリカンのひとつである syndecan-4 の間質性肺炎における役割を検討した。本研究では、syndecan-4 が特発性間質性肺炎の上皮細胞と肺マクロファージに強く発現し、低分子ヘパリンと syndecan-4 による前処置が気道上皮細胞における LPS 刺激後の IL-8 の発現を抑制することから、間質性肺炎において syndecan-4 が炎症反応を調節することが示された。

これまで、ヒトの肺疾患におけるプロテオグリカンの発現は、ARDS (Acute Respiratory Distress Syndrome)、IPF (Idiopathic Pulmonary Fibrosis)、Sarcoidosis、過敏性肺炎において versican と decorin の発現が増加していること^{3,4)}が報告されているが、syndecan など他のプロテオグリカンの発現についてはよく知られていない。Syndecan は、細胞表面に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンで syndecan-1 から-4 の4つの isoform が存在し、それぞれ主な発現部位は syndecan-1 は上皮細胞、syndecan-2 は線維芽細胞と血管内皮細胞、syndecan-3 は神経細胞であり、syndecan-4 は種々の細胞に発現していると報告されている。Syndecan はコア蛋白とそれに結合するヘパラン硫酸の側鎖からなり、ヘパラン硫酸側鎖が cytokine や growth factor などのメディエーターと結合することにより、局所でのメディエーター濃度を高めその作用を増強したり⁵⁾、また、メディエーターの oligomerization に関与したり⁶⁾、proteolysis から保護することにより作用を増強する⁷⁾と考えられている。また、syndecan-

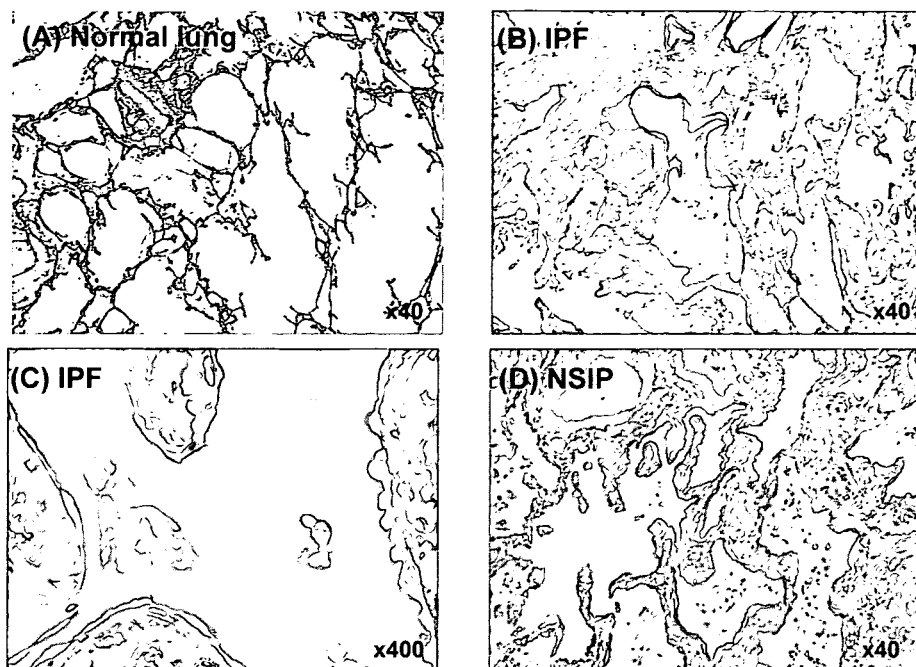


Figure 1 Immunohistochemical Analysis for Syndecan-4 in the lungs. (A) Normal lung, (B) (C) IPF, (D) NSIP. Syndecan-4 is expressed in epithelial cells and alveolar macrophages.

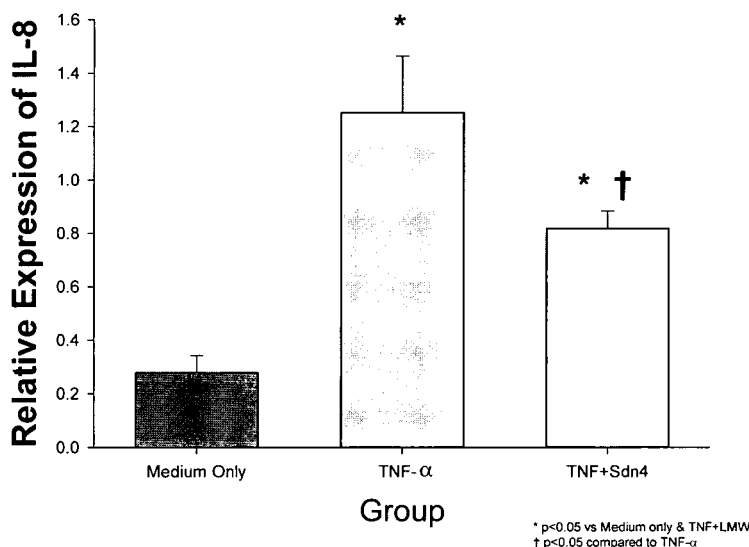


Figure 2 IL-8 mRNA Expression in BEAS-2B Cells. Syndecan-4 (Sdn4) significantly attenuates upregulation of IL-8 3 hr after TNF-α stimulation in BEAS-2B cells.

4はそのコア蛋白を介してPKCαの活性化に関与していると報告され⁸⁾, コア蛋白自体にも生物学的活性があることも示唆された. 更に, syndecanは細胞表面からMMPによってsheddingをうけ, 生物学的活性をもつ可溶性型でも存在することが報告された⁹⁾. 可溶性プロテオグリカンの役割についても現在のところまだ不明の点が多いが, 今回の我々の結果は可溶性syndecan-4はLPSによる気道上皮細胞のIL-8発現の増加を抑制することを示し

ており, 可溶性のsyndecan-4はTNF-αなどの炎症性メディエーターと結合することによって細胞表面のreceptorを競合し, 炎症反応を調節していることが推察される.

Syndecanは, 肺における炎症・修復過程の病態に関与していると考えられ, 今後その機序を更に明らかにすることは, 間質性肺炎など難治性肺疾患の治療に役立つことが期待される.

参考文献

- 1) Xu J *et al.*, Endogenous Attenuation of Allergic Lung Inflammation by Syndecan-1. *J Immunol*, 179: 5758-65, 2005.
- 2) Ishiguro K *et al.*, Syndecan-4 Deficiency Leads to High Mortality of Lipopolysaccharide-injected Mice. *J Biol Chem*, 276: 47483-47488, 2001.
- 3) Bensadoun ES *et al.*, Proteoglycan Deposition in Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*, 154: 1819-1828, 1996.
- 4) Bensadoun ES *et al.*, Proteoglycans in Granulomatous Lung Diseases. *Eur Respir J*, 10: 2731-2737, 1997.
- 5) Nugent MA *et al.*, Kinetics of Basic Fibroblast Growth Factor Binding to its Receptor and Heparan Sulfate Proteoglycan: A Mechanism for Cooperativity. *Biochemistry*. 31: 8876-8883, 1992.
- 6) Frevert CW *et al.*, Tissue-specific Mechanisms Control the Retention of IL-8 in Lungs and Skin. *J Immunol*, 168: 3550-3556, 2002.
- 7) Saksela, O *et al.*, Endothelial Cell-derived Heparan Sulfate Binds Basic Fibroblast Growth Factor and Protects it from Proteolytic Degradation. *J Cell Biol*, 107: 743-751, 1988.
- 8) Oh ES *et al.*, Syndecan-4 Proteoglycan Regulates the Distribution and Activity of Protein Kinase C. *J Biol Chem*, 272: 8133-8136, 1997.
- 9) Fitzgerald ML *et al.*, Shedding of Syndecan-1 and -4 Ectodomains is Regulated by Multiple Signaling Pathways and Mediated by a TIMP-3-sensitive Metalloproteinase. *J Cell Biol*, 148: 811-824, 2000.

慢性鳥関連過敏性肺炎の急性増悪症例における

soluble RAGE の検討

宮崎 泰成 岸 雅人 玉岡 明洋 古家 正
大谷 義夫 稲瀬 直彦 吉澤 靖之*

Receptor for advanced glycation end products (RAGE) は膜結合型のレセプターで (membranous RAGE, mRAGE), HMGB1 (high-mobility group box 1), AGE (advanced glycation end products) や S100A12 などの炎症性蛋白によって活性化される. 一方 soluble RAGE (sRAGE) は mRAGE と競合してこれらの炎症性蛋白と結合して中和作用を有する. 血清 sRAGE の上昇は冠動脈疾患, 高血圧, 糖尿病や関節リウマチのリスクを下げる事が知られている. 一方, 急性増悪は病理組織学的にはびまん性肺傷害であり, 急性肺損傷の病理と共通している. RAGE のリガンドである HMGB1 は, 急性肺損傷後期の重要なメディエーターとして重要である. そこで, Chronic bird-related hypersensitivity pneumonitis (chronic BRHP) の急性増悪症例における HMGB1 と sRAGE の役割を検討した. cBRHP39 例について BALF および血清中 HMGB1 と sRAGE を測定し, 外科的肺生検の免疫染色でその発現を検討した. 急性増悪した症例は 14 例で, 増悪群と非増悪群に分けて比較検討したところ, 診断時における BAL 中の sRAGE は増悪群で有意に低下し HMGB1 の BAL/血清比は有意に上昇していた. 増悪群で HMGB1 の免疫染色は cytoplasmic なパターンが強い傾向にあった. HMGB1 および RAGE が chronic BRHP の急性増悪の病態に関与する可能性が示唆された. BAL 中 sRAGE が増悪群で低下していることが一因と考えられた.

Role of soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) in acute exacerbation with chronic bird-related hypersensitivity pneumonitis

Yasunari Miyazaki¹, Masato Kishi¹, Meiyo Tamaoka¹, Masashi Furuie¹,
Yoshio Ohtani¹, Naohiko Inase¹, Yasuyuki Yoshizawa¹

Department of Integrated Pulmonology, Tokyo Medical and Dental University

“Acute Exacerbation (AE)” was initially reported in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) patients who had an episode of accelerated deterioration during their disease processes. However several reports have recently documented that AE can occur in collagen vascular disease-associated interstitial lung diseases and hypersensitivity pneumonitis. AE in IPF is a critical factor for its clinical course and prognosis. We have experienced acute exacerbation (AE) and poor prognosis consequent to AE in chronic hypersensitivity pneumonitis (chronic HP) as seen in IPF. The histological findings from lung biopsy specimens in AE patients with chronic HP showed diffuse alveolar damage (DAD) with or without hyaline membranes superimposed on usual interstitial pneumonia (UIP)-like lesions as seen in IPF patients with AE. Since the histological finding of acute lung injury is also DAD, we hypothesized similar mechanisms are involved between acute lung injury (ALI) and AE. HMGB1 is known to be a critical mediator for ALI. On the other hand, the receptor for advanced glycation end products (RAGE), which is a receptor for HMGB1, has a critical role for pulmonary fibrosis. Neutralization of the interactions between membranous RAGE (mRAGE) and its ligands via soluble decoy isoform of the receptor (soluble RAGE, sRAGE) has recently emerged as a novel potential target for the experimental therapy, as well as for prevention or reversal, of variety of RAGE-mediated disorders. Therefore we studied HMGB1 and sRAGE in serum and BAL by ELISA, and on lung tissues by immunohistochemistry. BALF to serum ratio of HMGB1 in chronic HP with AE were significantly increased compared to chronic HP without AE ($p < 0.05$), on the contrary BAL sRAGE was lower in AE than NAE at the time of diagnosis ($p < 0.05$). In conclusion, HMGB1 and RAGE may be involved in AE of chronic HP.

はじめに

鳥関連過敏性肺炎 (bird-related hypersensitivity pneumonitis; BRHP) は、鳥関連抗原の反復吸入により免疫学的機序で起こる原因の明らかな間質性肺炎であり、慢性が多く¹⁾、病理組織では、UIP (usual interstitial pneumonia) パターンや fNSIP (fibrotic nonspecific interstitial pneumonia) パターンなど様々な病理パターンを示す。特発性肺線維症 (IPF) の“急性増悪”は、その臨床経過や予後の重要な因子と考えられるが、その概念は最近日本だけでなく欧米でも同様に認められ²⁻⁶⁾、さらに膠原病肺、特発性 NSIP や慢性関連過敏性肺炎を含めた慢性過敏性肺炎においても同様に急性増悪の症例が報告されている⁷⁻¹²⁾。これらの症例は IPF と同様に予後不良であり、びまん性肺胞傷害 (DAD) の病理組織像を呈していた。一方、急性肺損傷の病理像は、DAD であり、HMGB1 は、急性肺損傷後期の重要なメディエーターであり RAGE はそのレセプターの一つである¹³⁾。ブレオマイシンによる肺の繊維化は、RAGE ノックアウトマウスで抑制されており、肺の線維化に重要な役割があることが分かっている¹⁴⁾。また、血清 solubleRAGE の上昇は冠動脈疾患、高血圧、糖尿病や関節リウマチのリスクを下げる事が知られており、慢性の疾患では、solubleRAGE は抑制的に働いており、中和作用のある decoy receptor と考えられている¹⁵⁾。そこで、Chronic bird-related hypersensitivity pneumonitis (chronic BRHP) の急性増悪症例における HMGB1 と sRAGE の役割を検討した。

方法と対象

1994 年 1 月から 2005 年 12 月の間に当科で慢性鳥関連過敏性肺炎と診断した 39 例を対象とし、診断時の血清、気管支肺胞洗浄 (BAL) および外科的肺生検標本、さらに急性増悪時の血清を検討した。観察期間内に急性増悪した症例 14 例 (増悪群, AE 群) と急性増悪していない 25 例 (非増悪群, NAE 群) とに分け、臨床検体の HMGB1 と sRAGE を測定し、

外科的肺生検標本で免疫組織染色施行し HMGB1 および RAGE (膜型+分泌型) の発現を検討した。急性増悪の診断は、IPF 臨床診断基準第 4 次改訂の「IPF の急性増悪の定義」を参考にした。統計は、Mann-Whitney *U* test にて分析を行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

結果と考察

対象 (表 1, 2)

対象の慢性鳥関連過敏性肺炎 39 症例中、14 症例が急性増悪していた。AE 群は 14 症例、NAE 群は、25 症例であった。性別、年齢は、両群で有意差なく、非喫煙者が NAE 群では有意に多かった (表 1)。AE 群で有意に VC% の低下を認めた。BAL 所見では、NAE 群では有意にリンパ球が増加し、AE 群では有意に好中球が増加していた (表 2)。

表 1 対 象

	AE	NAE	p value
症例数	14	25	
女性/男性	5/9	11/14	NS
年齢	64.1±8.1	62.4±8.9	NS
非喫煙者	0	9	0.01
喫煙者	8	5	NS
既喫煙者	5	11	NS
VC%	73.5±29.2	91.0±21.7	0.04
TLC%	69.9±23.7	83.2±19.0	0.01
PaO ₂	77.5±9.3	78.9±12.5	NS
A-aDO ₂	20.0±10.7	16.9±11.0	NS
罹病期間(年)	7.4±2.1	6.4±1.8	NS

表 2 BAL 所見

	AE	NAE	p 値
症例数	9	21	
総細胞数, x10 ⁶	42.5±22.9	40.4±27.7	NS
マクロファージ, %	69.3±16.8	57.3±26.9	NS
リンパ球, %	17.4±5.5	38.3±27.9	0.02
好中球, %	10.7±13.8	2.4±2.8	<0.001
好酸球, %	2.6±4.3	1.9±2.6	NS
CD4/8	4.6±6.7	4.6±4.6	NS

東京医科歯科大学 呼吸器内科

* 分担研究者

HMGB1 (図 1, 2, 3)

血清 HMGB1 値は、個人差がかなりあるので、血清 HMGB1 で補正した BAL 中 HMGB1 を検討したところ、診断時に既に AE 群で低下していた。つまり、肺局所での HMGB1 濃度は上昇している可能性がある (図 1)。ただし、血清あるいは BAL 中の HMGB1 値はそれぞれ両群間では有意差は認めなかった。HMGB1 は、本来、chromosomal protein であり、核内に存在するが、LPS や TNF- α などにより、細胞質へ移動し、炎症性サイトカインの様に作用することが分かっている。つまり、刺激を受けた細胞は免疫染色で核染色パターンから、細胞質染色パターンに変化する¹⁶⁾。そこで、肺局所での HMGB1 の発現を免疫組織科学で検討したとこ

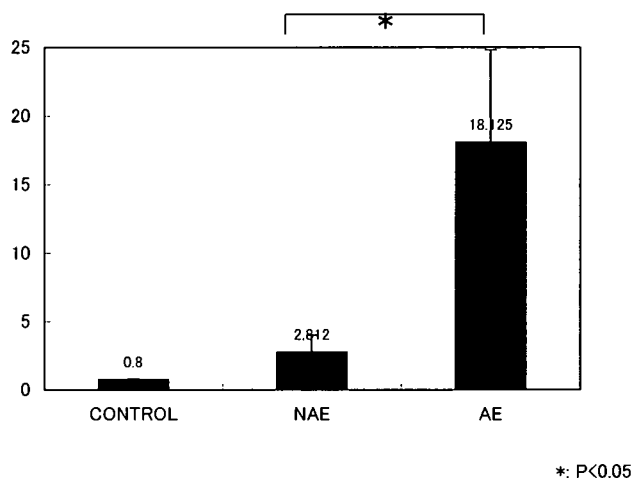


図 1 血清 HMGB1 で補正した BAL 中 HMGB1

ろ、HMGB1 の発現は、AE 群の気道上皮、再生上皮で細胞質パターンになっており、これらの細胞から分泌が亢進している可能性がある (図 2)。さらに診断時と急性増悪時の血清 HMGB1 を 11 症例で比較したところ、有意に増悪時に増加していた (図 3)。HMGB1 は、急性肺損傷後期の重要なメディエーターとして考えられており¹³⁾、急性増悪でも何らかの役割があることが示唆される。

soluble RAGE (図 4, 5, 6, 7)

sRAGE は、mRAGE の細胞外ドメインが切離したものと細胞内ドメインの欠損した分泌型の esRAGE の両者から供給されたものをみていることが分かっている¹⁷⁾ (図 4)。血清 sRAGE の上昇は冠動脈疾患、高血圧、糖尿病や関節リウマチのリスクを下げることで知られており、慢性の疾患では、solubleRAGE は抑制的に働いており、中和作用のある decoy receptor と考えられている (図 4)¹⁵⁾。そこで、BAL 中の sRAGE を検討したところ、診断時にすでに増悪群では sRAGE は非増悪群と比較して有意に低下していた (図 5)。mRAGE と esRAGE の両者を認識する抗体で免疫染色を行ったところ、健常肺に比べ、NAE 群および AE 群の再生上皮でむしろ RAGE の発現が亢進していることが分かり、AE 群では、mRAGE が膜から切離されるのが低下しているか、あるいは esRAGE の分泌が低下している可能性が示唆された (図 6)。

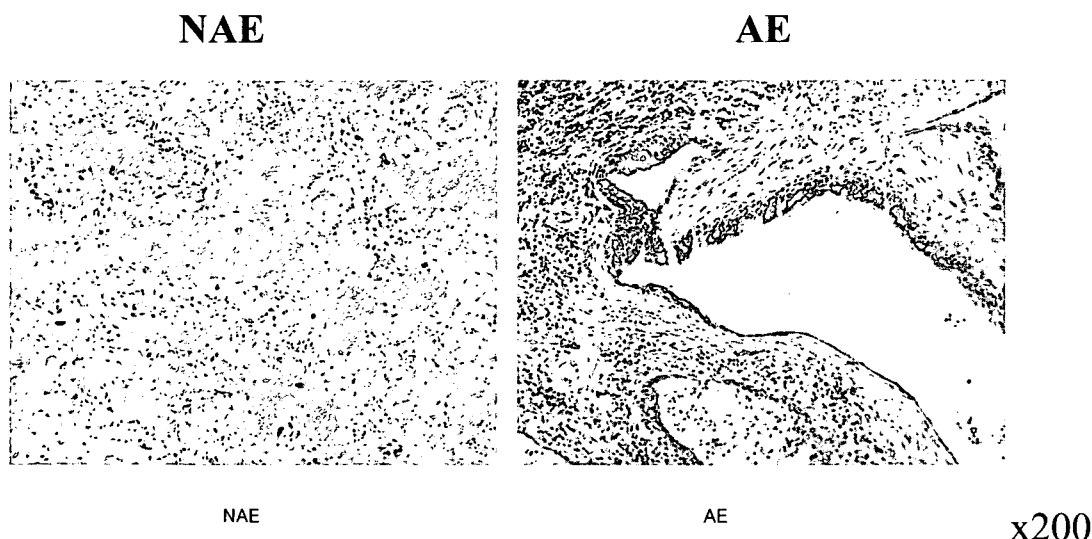


図 2 HMGB1 の免疫染色

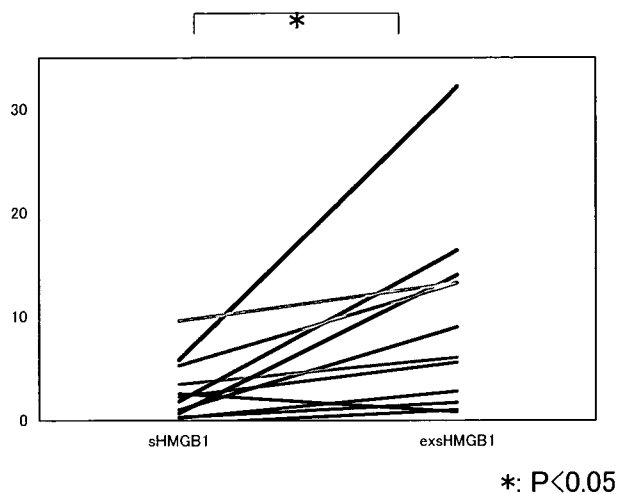


図3 診断時と急性増悪時の血清 HMGB1 の比較

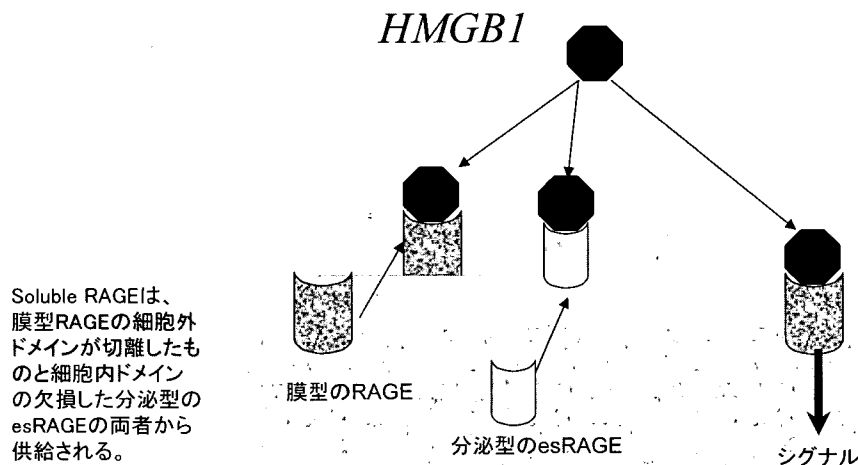


図4 Soluble RAGE は HMGB1 の decoy receptor である。

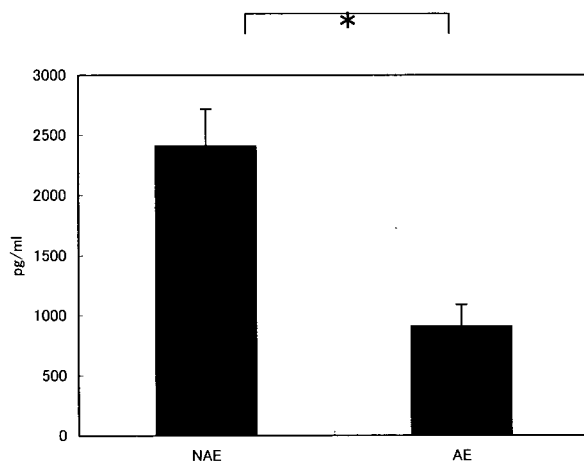


図5 BAL 中 soluble RAGE

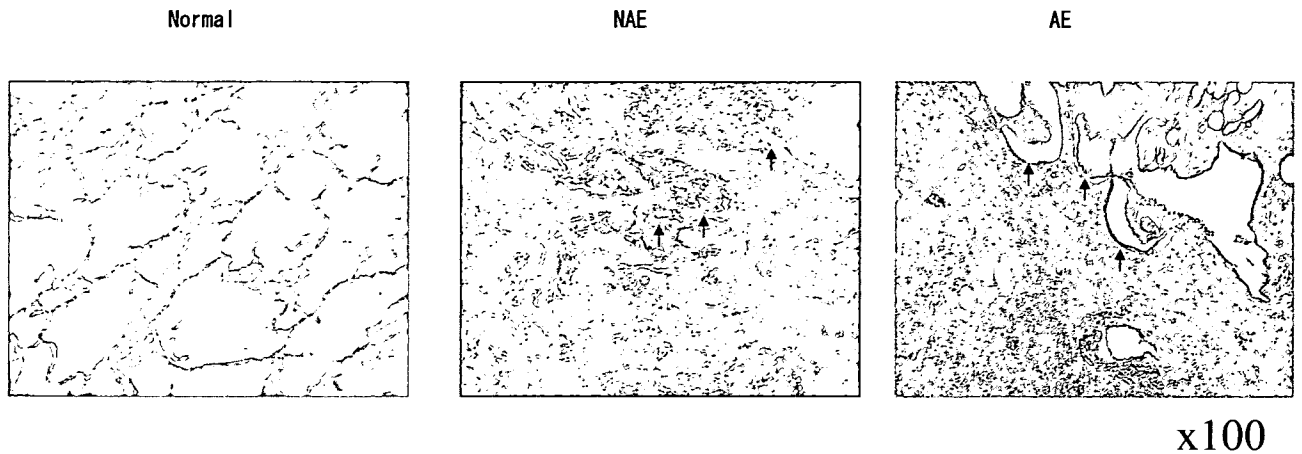


図6 RAGE の免疫染色

結 論

HMGB1 および RAGE が慢性鳥関連過敏性肺炎の急性増悪に至る病態に関与する可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Fink JN, Sosman AJ, Barboriak JJ, Schlueter DP, Holmes RA. Pigeon breeders' disease. A clinical study of a hypersensitivity pneumonitis. *Ann Intern Med.* 1968; 68: 1205-19.
- 2) Kondoh Y, Taniguchi H, Kawabata Y, Yokoi T, Suzuki K, Takagi K. Acute exacerbation in idiopathic pulmonary fibrosis. Analysis of clinical and pathologic findings in three cases. *Chest.* 1993; 103: 1808-12.
- 3) American Thoracic Society/European Respiratory Society International Multidisciplinary Consensus Classification of the Idiopathic Interstitial Pneumonias. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2002; 165: 277-304.
- 4) Martinez FJ, Safrin S, Weycker D, Starko KM, Bradford WZ, King TE Jr, Flaherty KR, Schwartz DA, Noble PW, Raghu G, Brown KK; IPF Study Group. The clinical course of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Ann Intern Med.* 2005; 21; 142: 963-7.
- 5) Kim DS, Park JH, Park BK, Lee JS, Nicholson AG, Colby T. Acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis: frequency and clinical features. *Eur Respir J.* 2006; 27: 143-50.
- 6) Collard HR, Moore BB, Flaherty KR, Brown KK, Kaner RJ, King TE Jr, Lasky JA, Loyd JE, Noth I, Olman MA, Raghu G, Roman J, Ryu JH, Zisman DA, Hunninghake GW, Colby TV, Egan JJ, Hansell DM, Johkoh T, Kaminski N, Kim DS, Kondoh Y, Lynch DA, Müller-Quernheim J, Myers JL, Nicholson AG, Selman M, Toews GB, Wells AU, Martinez FJ; Idiopathic Pulmonary Fibrosis Clinical Research Network Investigators. Acute exacerbations of idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 176: 636-43.
- 7) Park IN, Kim DS, Shim TS, Lim CM, Lee SD, Koh Y, Kim WS, Kim WD, Jang SJ, Colby TV. Acute exacerbation of interstitial pneumonia other than idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest.* 2007; 132: 214-20.
- 8) Churg A, Müller NL, Silva CI, Wright JL. Acute exacerbation (acute lung injury of unknown cause) in UIP and other forms of fibrotic interstitial pneumonias. *Am J Surg Pathol.* 2007; 31: 277-84.
- 9) Inase N, Sakashita H, Ohtani Y, Sogou Y, Sumi Y, Umino T, Usui Y, Yoshizawa Y. Chronic bird fancier's lung presenting with acute exacerbation due to use of a feather duvet. *Intern Med.* 2004; 43: 835-7.
- 10) Inase N, Harimoto A, Endo J, Sogo Y, Kuramochi H, Ohtani Y, Sumi Y, Umino T, Usui Y, Yoshizawa Y, Ohtsuka M. Chronic summer-type hypersensitivity pneumonitis presenting with acute

- exacerbation. (Japanese). *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi*. 2004; 42:347-52.
- 11) Tasaka S, Kanazawa M, Kawai C, Soejima K, Yamaguchi K, Takata A, Torikata C, Hata J. Fatal diffuse alveolar damage from bird fancier's lung. *Respiration*. 1997; 64: 307-9.
- 12) Ohtani Y, Inase N, Miyake S, Yoshizawa Y, Saiki S. Fatal outcome in chronic bird fancier's lung. *Am J Med*. 2002; 112: 588-90
- 13) Wang H, Bloom O, Zhang M, Vishnubhakat JM, Ombrellino M, Che J, Frazier A, Yang H, Ivanova S, Borovikova L, Manogue KR, Faist E, Abraham E, Andersson J, Andersson U, Molina PE, Abumrad NN, Sama A, Tracey KJ. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*. 1999; 9; 285: 248-51.
- 14) He M, Kubo H, Ishizawa K, Hegab AE, Yamamoto Y, Yamamoto H, Yamaya M. The role of the receptor for advanced glycation end-products in lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2007; 293: L1427-36.
- 15) Myint KM, Yamamoto Y, Sakurai S, Harashima A, Watanabe T, Li H, Takeuchi A, Yoshimura K, Yonekura H, Yamamoto H. Blockade of diabetic vascular injury by controlling of AGE-RAGE system. *Curr Drug Targets*. 2005; 6: 447-52.
- 16) Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. The cytokine activity of HMGB1. *J Leukoc Biol*. 2005; 78: 1-8.
- 17) Geroldi D, Falcone C, Emanuele E. Soluble receptor for advanced glycation end products: from disease marker to potential therapeutic target. *Curr Med Chem*. 2006; 13: 1971-8.

特発性肺線維症および膠原病における 抗増殖因子受容体抗体の検討

西岡 安彦 青野 純典 東 桃代 曾根 三郎*

【目的】我々は血小板由来増殖因子 (PDGF) に注目し, そのレセプター阻害薬であるイマチニブの抗線維化効果について検討してきた. 一方, Baroni らは, 強皮症 (SSc) 患者血清中に PDGF 受容体に対する刺激抗体が存在することを報告した (N Engl J Med: 2006). そこで特発性肺線維症 (IPF) および膠原病患者における抗 PDGF 受容体抗体について検討した. 【方法】健常人 (10 例) を対象に, SSc 10 例, 全身性エリテマトーデス (SLE) 10 例, 多発性筋炎 / 皮膚筋炎 (PM/DM) 11 例, IPF 14 例の血清を用い, 可溶性 PDGF α 受容体蛋白を固相化した ELISA 法および Western blotting 法にて抗 PDGF 受容体抗体の有無について検討した. 【結果】ELISA 法では健常人に比較し, SSc : 50% (5/10 例), SLE : 40% (4/10 例) PM/DM : 27% (3/11 例), IPF : 21% (3/14 例) で抗体価の上昇を認めた. Western blotting 法でも抗 PDGF 受容体抗体の存在が示唆された.

Autoantibodies to the growth factor receptors in idiopathic pulmonary fibrosis and collagen diseases

Nishioka Y, Aono Y, Azuma M, and Sone S

Department of Internal Medicine and Molecular Therapeutics, Institute of Health Biosciences, University of Tokushima Graduate School

Introduction : We previously reported that imatinib mesylate prevented Bleomycin (BLM)- induced pulmonary fibrosis in mice by inhibiting autophosphorylation of platelet-derived growth factor receptors (PDGFRs). On the other hand, Baroni reported that stimulatory antibodies to the PDGFR were found in all patients with scleroderma (N Engl J Med: 2006). We examined whether autoantibodies to the PDGFR were found in the patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) or collagen diseases. **Method:** Autoantibodies to the PDGFR were measured in the serum of patients with systemic sclerosis (SSc) (10 cases), systemic lupus erythematosus (SLE) (10 cases), polymyositis/ dermatomyositis (PM/DM) (11 cases), or IPF (14 cases) as compared with healthy volunteers (10 cases) using the sandwich ELISA system with soluble PDGFR protein. We also performed the immunoprecipitation and western blotting to detect autoantibodies.

Conclusion: Autoantibodies to the PDGFR were found in the patients with 50% (5/10 cases) of SSc, 40% (4/10 cases) of SLE, 27% (3/11 cases) of PM/DM, 21% (3/14 cases) of IPF by ELISA system. Autoantibodies to the PDGFR were also found in the patients with SSc, PM/DM, IPF by Western blotting

はじめに

我々は血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor : PDGF) に注目し, そのレセプター阻害薬であるイマチニブの肺線維症における抗線維化効果について検討してきた^{1,2)}. 一方, Baroni らは, 強皮症 (systemic sclerosis: SSc) 患者血清中には PDGF 受容体に対する刺激抗体が存在することを報告した (N Engl J Med: 2006)³⁾. そこで我々は, 膠原病関連間質性肺炎ならびに特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF) の原因としても自己抗体が関与している可能性に着目し, 膠原病および IPF 患者における血清中の抗増殖因子受容体抗体の存在について検討した.

方 法

健常人 10 例 (男性 / 女性 (M/F) : 4/6 例) を対象に, SSc 10 例 (M/F : 2/8 例), 全身性エリテマトーデス (systemic lupus erythematosus: SLE) 10 例 (M/F : 1/9 例), 多発性筋炎 / 皮膚筋炎 (polymyositis/ dermatomyositis PM/DM) 11 例 (M/F : 2/9 例), IPF 14 例 (M/F : 11/3 例) の血清を用い抗増殖因子受容体抗体の有無を検討した. SSc 患者は全例間質性肺炎を合併していた. 可溶性 PDGFR α 蛋白および可溶性 TGF- β 受容体 II (TGF- β RII) 蛋白を固相化した ELISA 法にて抗 PDGF 受容体抗体および抗 TGF- β RII 抗体の有無を検討した. OD405nm で測定し, 計測値を健常人の平均値で割った値を OD index とし, ODindex がコントロールの 2SD 以上を陽性とした. また可溶性 PDGFR α 蛋白に対して患者血清で免疫沈降を行い, ヤギ抗ヒト PDGF 受容体 α 抗体を用いた Western Blotting 法による可溶性 PDGFR α 蛋白の検出により, 抗 PDGF 受容体抗体の有無を検討した.

結 果

抗 PDGF 受容体抗体に関しては, ELISA 法では SSc : 50% (5/10 例), SLE 40% (4/10 例), PM/DM : 27% (3/11 例), IPF : 21% (3/14 例) で抗体価の上昇を認めた. ELISA 法にて陽性であった患者血清を用いて Western blotting を施行したところ, SSc, PM/DM, IPF 患者では可溶性 PDGFR α 蛋白が強く検出され抗 PDGF 受容体抗体の存在が示唆されたが, SLE では健常人と同程度であった. 一方, 抗 TGF- β RII 抗体に関しては, ELISA 法にて SSc : 55% (6/11 例), SLE : 36% (4/11 例), PM/DM : 0% (0/7 例), IPF : 0.83% (1/12 例) で抗体価の上昇を認めた. SSc 患者において, KL-6, SP-D の上昇と抗 PDGF 受容体抗体および抗 TGF- β RII 抗体における ELISA 法での ODindex 上昇との相関はみられなかった.

考 察

SSc, SLE, PM/DM, IPF 患者血清中に抗 PDGF 受容体抗体が検出された. また SSc, SLE 患者血清中に抗 TGF- β RII 抗体が検出された.

SSc 患者において PDGFR を刺激する血清自己抗体があり, 内因性 PDGFR を認識し, チロシンリン酸化と ROS の蓄積を促しコラーゲン遺伝子の発現と筋線維芽細胞への表現型の変換を促進し強皮症の発症に対する病因的役割があることが強く示唆されると報告されている³⁾. さらには chronic graft-versus-host disease (GVHD) においても抗 PDGF 受容体抗体の発現がみられ, 病因に関与している可能性が示唆されている⁴⁾. これらのことから様々な線維化をきたす疾患において PDGF やその他の増殖因子の受容体に対する自己抗体が発現し病因に関与している可能性がある.

今回の我々の結果から膠原病関連間質性肺炎ならびに特発性間質性肺炎において PDGF や TGF- β などの増殖因子の受容体に対する自己抗体が存在し, 肺の線維化形成に関与している可能性が示唆された. 今後の課題として, 検出された抗増殖因子受容体抗体が受容体刺激抗体としての機能を有しているかどうかの検討が必要である. また膠原病患者における抗増殖因子受容体抗体の出現と間

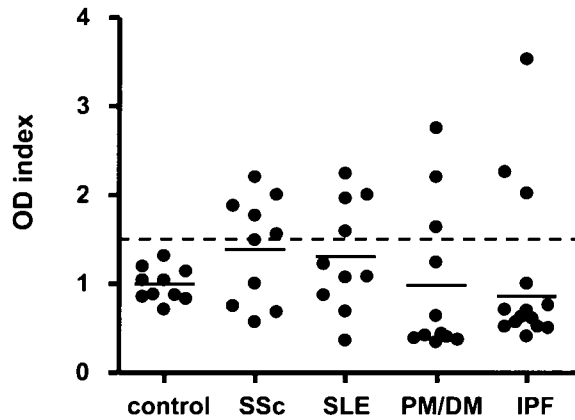
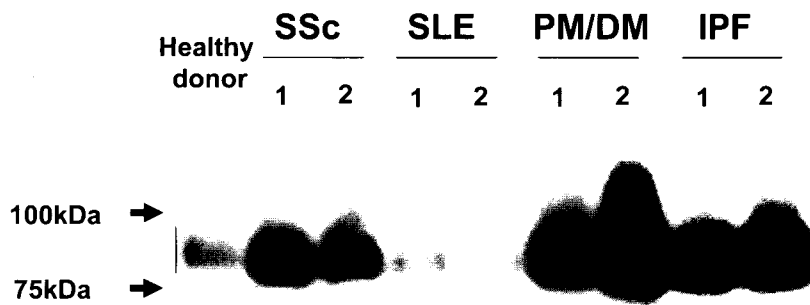


図1 膠原病および特発性肺線維症患者における抗 PDGF 受容体抗体
SSc : 60% (6/10), SLE : 40% (4/10), PM/DM : 36% (4/11), IPF : 21% (3/14) で抗体価の上昇を認めた。



抗PDGFR抗体価 0.88 2.20 2.00 2.22 2.25 2.20 2.75 2.02 2.26

図2 Western blotting による抗 PDGF 受容体抗体の同定
SSc, PM/DM, IPF 患者では健常人と比較し可溶性 PDGFR α 蛋白が強く検出され抗 PDGF 受容体抗体の存在が示唆された。

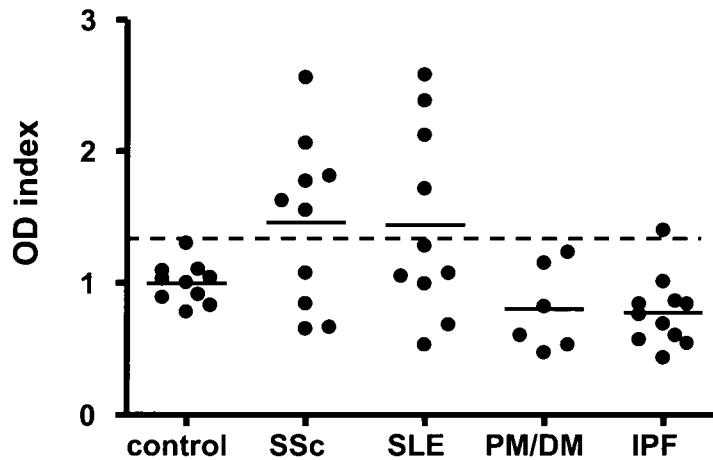


図3 膠原病および特発性肺線維症患者における抗 TGF- β II 型受容体抗体
SSc : 55% (6/11), SLE : 36% (4/11), PM/DM : 0% (0/7), IPF : 0.83% (1/12) で抗体価の上昇を認めた。

質性肺炎の合併の関連について、IPF患者における抗増殖因子受容体抗体の出現と臨床的特徴について、さらに idiopathic nonspecific interstitial pneumonia (NSIP) における抗増殖因子受容体抗体の出現の有無についても検討する予定である。

参考文献

- 1) Aono Y, Nishioka Y, Inayama M, Ugai M, Kishi J, Uehara H, Izumi K, Sone S. Imatinib as a Novel Antifibrotic Agent in Bleomycin-induced Pulmonary Fibrosis in Mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171: 1279-85.
- 2) Azuma M, Nishioka Y, Aono Y *et. al.* Role of alpha1-acid glycoprotein in therapeutic antifibrotic effects of imatinib with macrolides in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007; 176(12) : 1243-50.
- 3) Baroni SS, Santillo M, Bevilacqua F *et. al.* Stimulatory autoantibodies to the PDGF receptor in systemic sclerosis. *N Engl J Med*. 2006;354 (25) :2667-76
- 4) Svegliati S, Olivieri A, Campelli N *et. al.* Stimulatory autoantibodies to PDGF receptor in patients with extensive chronic graft-versus-host disease. *Blood*. 2007; 110 (1) : 237-41.

間質性肺炎患者における 呼気中一酸化窒素 (NO) 測定の臨床的意義

千田 金吾* 加藤 真人 中村祐太郎 乾 直輝
貝田 勇介 須田 隆文

呼気 NO 濃度 (Fractional exhaled nitric oxide, 以下 FeNO) の間質性肺炎における臨床的意義は確定していない。我々は間質性肺炎患者において FeNO 値を測定し、肺機能、動脈血ガス分析、血液生化学検査及び気管支肺胞洗浄 (Bronchoalveolar Lavage, 以下 BAL) 所見との関連を評価検討した。対象は、男性 17 例、女性 2 例の計 19 例で、平均年齢は 66.5 歳、間質性肺炎の診断は、特発性間質性肺炎 (IPs) 15 例 (IPF/UIP 8 例, NSIP 1 例, DIP 2 例, RB-ILD 2 例, 分類不能 2 例), 膠原病肺 4 例 (DM 2 例, SjS 1 例, RA 1 例)。FeNO 値は平均 39.2 ppb と、気管支喘息 (平均 40.1 ppb) と同程度に上昇していた。FeNO 値は血液生化学検査の各値との相関は認められなかったが、肺機能で V25, MMF と相関が認められた (各々 $p = 0.017, 0.028$)。また、BAL 所見との検討では FeNO 値と BAL 液中 CD8 陽性リンパ球数との間に相関が認められた ($p < 0.001$)。更に、治療前に FeNO 値が測定された 4 例の検討では、3 例において治療により PaO₂ 値、及び VC 値の改善と共に FeNO 値が低下した。以上より間質性肺炎において FeNO 値は臨床的に有用である可能性が示唆された。

Measurement of exhaled nitric oxide in patients with interstitial pneumonia.

Kingo Chida, Masato Kato, Yutaro Nakamura, Naoki Inui
Yusuke Kaida, Takafumi Suda

Second division, department of internal medicine, Hamamatsu university school of medicine

BACKGROUND AND AIM: Measurement of exhaled nitric oxide (NO) is useful in the diagnosis and management of asthma. However it is not clear if NO is available for those of interstitial pneumonia (IP). The aim of this study was to investigate the usefulness of measurement of exhaled nitric oxide (NO) in IP patients. **METHODS:** Fractional exhaled NO (Fe (NO)) was measured in 19 IP patients of 55 to 79 years with a chemiluminescence analyzer using the single breath online technique and an exhalation flow of 50 mL/s. Clinical parameters of disease including laboratory findings, pulmonary function test, and bronchoalveolar lavage were also measured. **RESULT:** The mean FE (NO) was 39.2 ppb in IP patients, which is comparable with that in asthma patients (40.1 ppb). The levels of FE (NO) were correlated with V25 and MMF in pulmonary function tests ($p=0.017, 0.028$), and the count of CD8+T cells in BAL fluid ($p<0.001$). Furthermore the levels of FE (NO) had reduced in 3 out of 4 IP patients with some other clinical parameters in response to treatment. In IP patients, FE (NO) might be a useful tool in understanding the pathogenesis, and monitoring the effects of treatment of disease.

はじめに

NOは、生体内で血管弛緩因子や免疫調整因子として作用する微量ガスであり、気管支喘息においては、好酸球、気道上皮においてNO産生が過剰に亢進し、呼気NO濃度(Fractional exhaled Nitric Oxide, 以下FeNO)が上昇する¹⁾。FeNO値の増加は、%FEV₁の低下と相関し重症度と関連するとされている²⁾。またFeNO値は、治療反応性を予想する因子となる可能性も示唆されており³⁾、気管支喘息患者の管理に有用とされている。

一方、間質性肺炎でもFeNO値が上昇する⁴⁾との報告がみられものの、その臨床的意義は未だ不明である。そこで我々は、間質性肺炎症例においてFeNO値を測定し、基礎疾患、疾患活動性および既存検査値との関連を調査し、FeNO値測定の意義について検討した。

対象と方法

無治療観察中もしくは治療前の間質性肺炎患者で、同意が得られた19例を対象とした。但し、アレルギー性鼻炎や気管支喘息の病歴がある患者、明らかな肺高血圧を指摘されている患者は除外した。

FeNO値は、SIEVERS社製NOA280iを使用し測定した。測定条件は、ATSガイドライン⁵⁾に従い(呼気流速50ml/s, 呼気圧17cmH₂O)、REB systemにより基準を満たす測定値のみを用いた。臨床検査として、肺機能、動脈血ガス分析、血液生化学検査(KL-6, SP-Dを含む)、及び気管支肺胞洗浄(Bronchoalveolar Lavage, 以下BAL)を行い、FeNO値との関連を検討した。

結 果

症例は、男性17例、女性2例の計19例で、平均年齢は66.5歳。現喫煙者はなく、喫煙経験者が10例、非喫煙者が9例。間質性肺炎の診断は、特発性間質性肺炎(IIPs)が15例で、うちIPF/UIP 8

例、NSIP 1例、DIP 2例、RB-ILD 2例、分類不能2例であった。膠原病肺が4例で、うち皮膚筋炎2例、シェーグレン症候群1例、関節リウマチ1例であった。IPF 2例と膠原病肺2例を除く15例で、外科的肺生検により確定診断がなされていた。

(表1)

表1 患者背景

症 例	19例(男17, 女2)	
年 齢	66.5 (55-79)歳	
喫煙歴	喫煙経験者	10例
	非喫煙者	9例
診 断	IIPs	15例
	IPF/UIP	8例
	NSIP	1例
	DIP	2例
	RB-ILD	2例
	分類不能	2例
	膠原病肺	4例
	DM	2例
	SjS	1例
RA	1例	
診断方法	外科的肺生検	15例
	臨床診断	4例

FeNO値測定の結果、間質性肺炎患者のFeNOの平均値は、39.2 ppbと文献の健常者平均⁷⁾と比較して上昇しており、気管支喘息患者のFeNO 40.1 ppbと同程度であった。(図1) IPF, IPFを除くIIPs, 膠原病肺の3群の比較では、いずれの群においてもFeNO値は上昇し、3群間において差を認めなかった。(図2)

次に臨床指標とFeNO値との相関を検討したが、生化学検査との検討では、KL-6, SP-Dを含め、有意な相関は認めなかった。肺機能との検討では、V25, MMFとの相関係数が各々、0.57, 0.49(各p = 0.017, 0.028)であり、有意な相関を認めた。FeNOの測定とほぼ同時期にBALが施行された9例(IIPs 5例, 膠原病肺4例)について、BAL所見との相関を検討したところ、総リンパ球数との相関は認めなかったものの、CD8陽性リンパ球数との相関係数が0.94 (p<0.01)であり、有意な相関を認めた。(表2)

対象19例のうち、治療前にFeNO値が測定され

ていた4例について、治療1ヶ月後のFeNO、肺機能、生化学検査の各値の変化を検討した。これらの症例の診断はIIPs 3例 (NSIP 1例, DIP 1例, 分類不能 1例), 膠原病肺 1例 (皮膚筋炎 1例) で、治療内容はステロイドパルス療法 (メチルプレドニゾン 1g/日 3日間) に続いてPSL 後療法とCyAの併用が2例, PSL 単独が2例であった。治療前のFeNO値が比較的低値であった症例では、治療によるFeNO値の変化、及びPaO₂値、VC値の改善とともに乏しかったが、他の3例では、治療によりPaO₂値、VC値の改善に伴いFeNO値は低下した。(図3)

考 察

間質性肺炎とNOの関連については、1997年Salehら⁷⁾により肺の免疫組織学的検討で、IPFにおいてNOが過剰に産生されることが報告されている。また、1999年にはParediら⁴⁾が、IPFや強皮症肺においてFeNO値が上昇していることを報告し、この中で、強皮症患者のうち、BAL所見で好酸球3>%、好中球4>%、もしくはリンパ球14>%のいずれかを満たす症例を活動性BAL群とし、活動性BAL群で有意にFeNO値が上昇していることを示している。今回我々は、間質性肺炎患者においてFeNO値を測定し、現在臨床で用いられてい

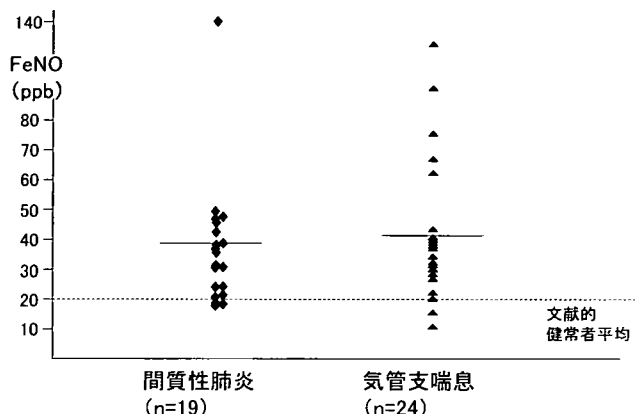


図1 FeNOの測定結果。間質性肺炎患者のFeNOは、気管支喘息患者と同程度に上昇していた。(健常者平均は文献6)より引用.)

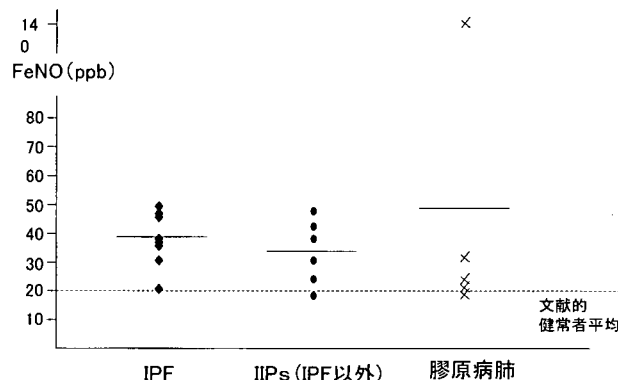


図2 FeNOの測定結果。IPF、IPF以外のIIPs、及び膠原病肺の間でFeNOに差は認められなかった。(健常者平均は文献6)より引用.)

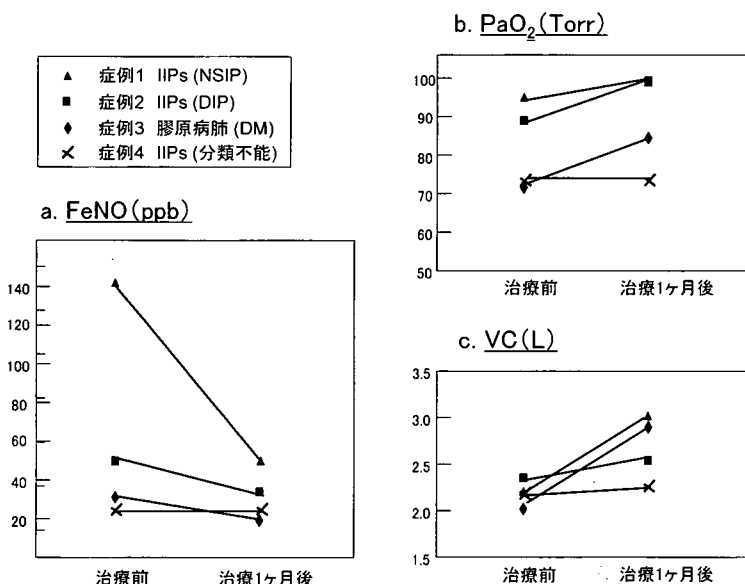


図3 治療前後でFeNOを測定した4例の経過。治療によりVC値、PaO₂値の改善とともにFeNOは低下した。

表2 臨床検査及び気管支肺胞洗浄液所見

		全症例	r	p
FeNO	(ppb)	39.2±26.4	-	-
LDH	(U/L)	240±58	0.15	n.s.
KL-6	(IU/ml)	1483±1149	-0.13	n.s.
SP-D	(ng/ml)	196±107	-0.12	n.s.
PaO ₂	(Torr)	86±11	0.32	n.s.
VC	(L)	2.61±0.73	-0.15	n.s.
%VC	(%)	76.6±19.0	-0.30	n.s.
FEV ₁	(L)	2.14±0.59	-0.03	n.s.
V50	(L/S)	2.74±1.04	0.44	n.s.
V25	(L/S)	0.73±0.36	0.57	0.017
PEF	(L/S)	7.5±1.9	0.32	n.s.
MMF	(L/S)	2.2±0.8	0.49	0.028
BAL (n=9)				
TCC (×10 ⁵ /mlBALF)		2.75±1.05	-0.01	n.s.
リンパ球数		0.58±0.58	0.62	n.s.
CD4/8比		1.9±1.3	-0.23	n.s.
CD4 ⁺ リンパ球数		0.33±0.44	-0.03	n.s.
CD8 ⁺ リンパ球数		0.30±0.40	0.94	<0.01

る臨床検査や経過との関連を検討することで間質性肺炎診療におけるFeNO値測定的位置づけをより明確にするため本研究を行った。

我々の検討でもIIPs症例、膠原病肺症例のいずれ群においてもFeNO値の上昇を認めた。

次に肺機能との検討では、FeNO値はV25値、MMF値と正の相関を認めた。重度の間質性肺炎では、VC値の低下に伴い末梢気道呼気流速は低下するが、初期の患者では肺弾性収縮圧の上昇を反映し、正常もしくは上昇する⁸⁾。本研究における対象は、平均%VCが76.6%と拘束性障害が軽度であり、FeNO値の上昇と相関して末梢気道呼気流速が速いことは、むしろ肺コンプライアンスの低下や弾性収縮圧の亢進を示唆している可能性も考えられた。末梢気道呼気流速とFeNO値の関連の評価については、今後肺コンプライアンスの測定等の追加評価を行っていく予定である。

BAL所見との検討では、BAL液中のCD8陽性リンパ球数と正の相関を認めた。間質性肺炎患者の肺におけるNO産生にCD8陽性リンパ球がどのように関与しているかは現在のところ不明である。しかし、CD8陽性リンパ球は、間質性肺炎以外の病態では、移植片の動脈硬化におけるNO産生に関

与しているとの報告がある⁹⁾。また、CD8陽性リンパ球は、IPFにおいて疾患の重症度と関連し、%VC、%TLC、%DL_{CO}の低下に伴い肺組織への浸潤が増加しているとの報告もあり¹⁰⁾、CD8リンパ球がNO産生を介して間質性肺炎の病態に関与している可能性も示唆される。FeNO値測定はBALに比べて非侵襲的な検査であり、BALの施行が困難な症例においても測定できることから、間質性肺炎の病態の解明により有用である可能性が示唆された。

治療例の検討では、治療前のFeNO値が比較的低値であった症例を除き、他の3例では治療によりPaO₂値、VC値の改善とともにFeNO値は低下した。NOが過剰に産生されると、炎症部位で同時に生成されるO₂-と反応することで、より細胞傷害性の高いperoxynitrite (ONOO-)に変化する。それらがIPF患者の肺胞上皮細胞に作用し傷害をきたす可能性が示唆されている⁷⁾。ステロイドを含む治療により過剰なNO産生が制御され、こうした細胞傷害作用を抑えている可能性が示唆される。しかし、今回の検討では治療例は4例と少なく、またこの中にはIPFが含まれていないことから、治療反応性とFeNO値の関連についても今後の検討が必要である。

以上、IPFを含む間質性肺炎においてFeNO値測定の臨床的意義を検討した。FeNO値は、肺機能では末梢気道呼気流速と、またBALF所見との検討ではCD8陽性細胞数と正の相関を認めた。ステロイドを含む治療が行われた症例では、治療によりFeNO値が低下していた。これらによりFeNO値は間質性肺炎の診断および治療に有用である可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Ricciardolo FL, Sterk PJ, Gaston B, *et al.* Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev* 2004; 84: 731-765
- 2) Ichinose M, Sugiura H, Yamagata S, *et al.* Increase in reactive nitrogen species production in chronic obstructive pulmonary disease airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 162: 701-706
- 3) Little SA, George WC, MacLeod KJ, *et al.* Non-invasive markers of airway inflammation as

- predictors of oral steroid responsiveness in asthma. *Thorax* 2000; 55: 232-234
- 4) Paredi P, Kharitonov SA, Loukides S, *et al.* Exhaled nitric oxide is increased in active fibrosing alveolitis. *Chest* 1999; 115: 1352-1356
- 5) American Thoracic Society and European Respiratory Society. ATS/ERS recommendations for standardized procedures for the online and offline measurement of exhaled lower respiratory nitric oxide and nasal nitric oxide, 2005. *Am J Respir Crit Care Med* 2005 ; 171:912-930
- 6) Anasarin K, Chatkin JM, Ferreira IM, *et al.* Exhaled nitric oxide in chronic obstructive pulmonary disease: relationship to pulmonary function. *Eur Respir J* 2001; 17: 939-945
- 7) Saleh D, Barnes PJ, Giaid A. Increased production of the potent oxidant peroxynitrite in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Med* 1997; 155: 1763-1769
- 8) Jayamanne DS, Epstein H, Goldring RM. The influence of lung volume on expiratory flow rates in diffuse interstitial lung disease. *Am J Med Sci* 1978; 275: 329-336
- 9) Choy JC, Wang Y, Tellides G, *et al.* Induction of inducible NO synthase in bystander human T cells increases allogeneic responses in the vasculature. *PNAS* 2007; 104: 1313-1318
- 10) Daniil Z, Kitsanta P, Kapotsis G, *et al.* CD8+T lymphocytes in lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Respir Res* 2005; 24: 81