

Fig. 2 Effect of DOXY on TGF-β1-induced PDGF-AA production with ELISA, active MMP-2 with activity assay and collagen-1 by immunocytochemical staining

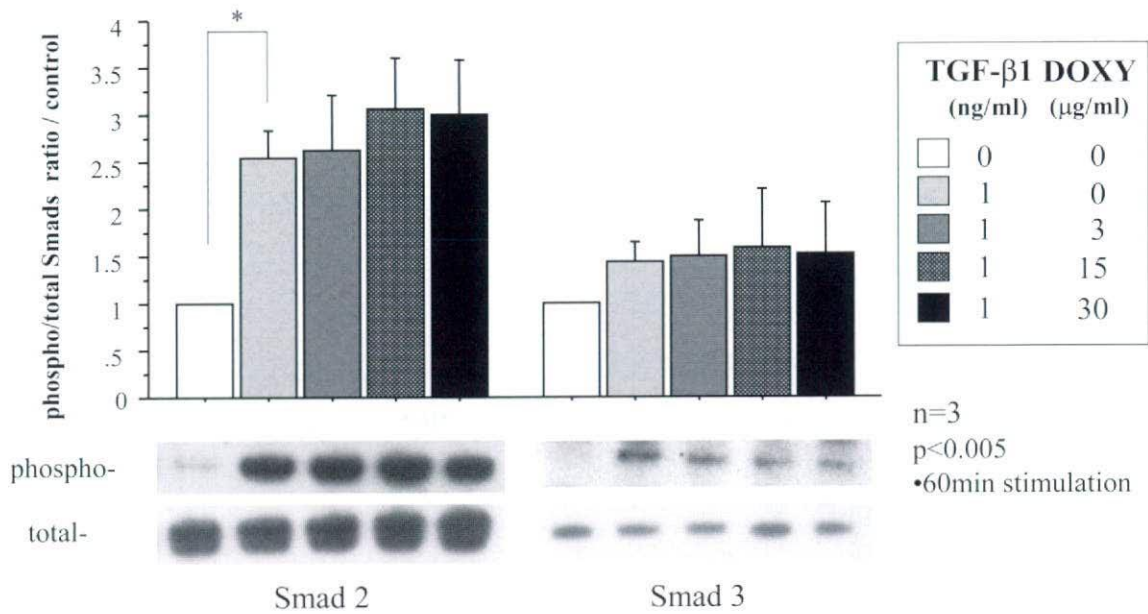


Fig. 3 Effect of DOXY on phospho/total-Smad 2/3 ratio induced by TGF-β1 with western blotting

考 察

これまでに、DOXYはブレオマイシン肺臓炎モデルにおいて、気管支肺胞洗浄液のMMP-9産生を抑制し、線維化を抑制したり¹⁾ほか、A549において、monocyte chemoattractant protein-1の産生を抑制し、炎症抑制に作用した²⁾との報告がある。今回の検討では、DOXYが、各種成長因子やMMPを抑制することで肺線維化の抑制に関与している可能性が示唆された。今後は、DOXYのSmad以外の作用経路やブレオマイシン肺臓炎モデルにおいても同様の検討が必要である。

結 論

DOXYは肺胞上皮細胞からの成長因子やECM蛋白産生を抑制することで、肺線維化を抑制する可能性が示された。

参考文献

- 1) Fujita M, Qing Y, Ouchi H, *et al.* Doxycycline attenuated pulmonary fibrosis induced by bleomycin in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* Feb 2006; 739-743.
- 2) Raza M, Ballering J. G, *et al.* Doxycycline decreases monocyte chemoattractant protein-1 in human lung epithelial cells. *Experimental Lung Research.* 2006; 32: 15-26

HSP47 siRNA を用いた肺線維化抑制効果の検討

研究協力者 高橋弘毅 札幌医科大学医学部内科学第三講座

研究要旨

【背景】 HSP (heat shock protein) 47 はコラーゲン合成に必須の分子であり、その過剰発現が肺線維化に促進的に働いているとされる。肺線維症では線維化の強い部位に筋線維芽細胞の増加が見られ、その筋線維芽細胞では HSP47 を過剰発現している。肺筋線維芽細胞での HSP47 の発現を抑制することにより肺線維化を抑制することができることが予想される。また、肺筋線維芽細胞は Vitamin A (VA) を取り込む性質を有すると報告されている。

【目的】 siRNA による筋線維芽細胞の HSP47 の抑制がラットブレオマイシン肺線維症モデルに有効か検討した。

【方法】 ラットブレオマイシン肺線維症モデルを作成し、尾静脈より HSP47 siRNA を VA とリポソームの複合体で被包化し、週 3 回、3 週間投与した。組織学的検討と肺ハイドロキシプロリン量定量により線維化を評価した。

【結果】 ブレオマイシン投与 21 日目における肺組織所見と肺ハイドロキシプロリン量は HSP47 siRNA 投与により有意に抑制され、肺線維化抑制効果が確認された。

【結論】 HSP47 を標的とする siRNA 投与はブレオマイシン誘発肺線維症を改善すること、VA を用いるドラッグデリバリーシステムが肺筋線維芽細胞を標的とするのに効果的であることが示唆された。

A. 研究目的

VA 存在下で HSP47 を標的とした siRNA 導入が肺線維症にも有効か動物モデルを用いて検討した。

B. 研究方法

雄性 Sprague-Dawley 種ラットに経気道的投与によるブレオマイシン (BLM) 肺線維症モデルを作成した。VA と LipotrustTM を混合してリポソーム (lip) の複合体を作成し HSP47 を標的とする siRNA を被包化した。VA-lip-siRNA を週 3 回投与し、VA-lip-siRNA の線維化に対する効果を、VA を除いた群、HSP47 siRNA の代わりに random RNA を用いた群と組織学的所見、組織中の hydroxyproline 量、肺洗浄液中細胞数の比較検討を行った。血清 SP-D 値は ELISA で測定を

行った。

C. 研究成果

肺組織所見では、BLM & VA-lip-siRNA 群で明らかに線維化の軽減、炎症細胞浸潤の抑制が見られた。BLM & lip-siRNA 群、BLM & VA-lip-random RNA 群と比較しても組織学的変化は軽微であり、効果発現には HSP47 siRNA のみならず VA も必要であった。組織中のハイドロキシプロリン量は BLM & PBS 群では 21 日目に有意に増加していたが、BLM & VA-lip-siRNA 群ではその増加は有意に抑制され ($p \leq 0.05$)、組織所見同様に HSP47 siRNA および VA の両者の存在が必要であることが明らかになった。肺洗浄液中の総細胞数は BLM 投与により有意に増加したが、BLM & VA-lip-siRNA 群ではその増加が有意に

抑制された($p < 0.05$)。間質性肺炎のマーカーである血清 SP-D 濃度は BLM 投与により有意に増加を認めた。BLM & VA-lip-siRNA 群では有意ではなかったが抑制される傾向を認めた。

D. 考 察

HSP47 の発現を siRNA で抑制することで肺線維症モデルにおいても線維化に対する抑制効果を確認することができた。さらに HSP47 siRNA を VA とリポソームの複合体により被包化し投与することで、肺線維化の有意な抑制が認められ、HSP 47 siRNA のみならず VA の存在も有意な線維化抑制に必須であることが確認できた。VA の存在により遺伝子を選択的に標的細胞である肺筋線維芽細胞に導入できる可能性があり、ドラッグデリバリーシステムの検討が重要であると考えられる。

E. 結 論

HSP 47 siRNA は肺線維症における線維化を抑制し、VA を用いることで標的細胞の有する性質を利用した細胞選択的治療の有効性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表：

Yamazoe M, Takahashi H, Kuroki Y. et al. Pulmonary surfactant protein D inhibits lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammatory cell responses by altering LPS binding to its receptors. *J Biol Chem* 283: 35878, 2008.

2. 学会発表：

高橋弘毅. 教育講演：びまん性肺疾患—間質性肺炎とバイオマーカー. 第 48 回日本呼吸器学会学術講演会. 神戸, 2008.

H. 知的財産権の出願 なし

HSP47 siRNA を用いた肺線維化抑制効果の検討

高橋 弘毅* 大塚 満雄 白鳥 正典 黒沼 幸治
千葉 弘文 村上 聖司

【背景】 HSP (heat shock protein) 47 はコラーゲン合成に必須の分子であり、その過剰発現が肺線維化に促進的に働いているとされる。肺線維症では線維化の強い部位に筋線維芽細胞の増加が見られ、その筋線維芽細胞では HSP47 を過剰発現している。肺筋線維芽細胞での HSP47 の発現を抑制することにより肺線維化を抑制することができることが予想される。また、肺筋線維芽細胞は Vitamin A (VA) を取り込む性質を有すると報告されている。

【目的】 siRNA による筋線維芽細胞の HSP47 の抑制がラットブレオマイシン肺線維症モデルに有効か検討した。

【方法】 ラットブレオマイシン肺線維症モデルを作成し、尾静脈より HSP47 siRNA を VA とリボソームの複合体で被包化し、週 3 回、3 週間投与した。組織学的検討と肺ハイドロキシプロリン量定量により線維化を評価した。

【結果】 ブレオマイシン投与 21 日目における肺組織所見と肺ハイドロキシプロリン量は HSP47 siRNA 投与により有意に抑制され、肺線維化抑制効果が確認された。

【結論】 HSP47 を標的とする siRNA 投与はブレオマイシン誘発肺線維症を改善すること、VA を用いるドラッグデリバリーシステムが肺筋線維芽細胞を標的とするのに効果的であることが示唆された。

Effects of siRNA targeting heat shock protein 47 on bleomycin-induced pulmonary fibrosis.

Hiroki Takahashi, Mitsuo Otsuka, Masanori Shiratori, Koji Kuronuma,
Hirofumi Chiba, Seiji Murakami

Third Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University School of Medicine

BACKGROUND: The heat shock protein 47 (HSP47) is a specific chaperone in collagen synthesis. Expression of HSP47 increases in parallel with that of collagens during the progression of lung fibrosis. Myofibroblasts are increased in active lung fibrotic areas and overexpress the HSP47. It is expected that inhibition of HSP47 in the cells may reduce pulmonary fibrosis. In addition, it was reported the cells could take up and store vitamin A. **AIM:** To investigate whether inhibition of HSP47 in myofibroblasts with siRNA targeting HSP47 could have beneficial effects in a rat model of bleomycin-induced pulmonary fibrosis. **METHODS:** We prepared the pulmonary fibrosis model of rats by single intratracheal administration of bleomycin and treated them for three weeks, three times a week, with vitamin A-coupled liposomes carrying siRNA targeting HSP47 by tail vein injections. We evaluated the fibrosis histologically and with hydroxyproline contents in the lung tissues. **RESULTS:** In a group of rats treated with vitamin A-coupled liposomes carrying the siRNA, lung fibrosis was markedly inhibited morphologically. The increase of the hydroxyproline in the lungs by bleomycin was significantly inhibited in the treated group. **CONCLUSIONS:** These results suggest that siRNA targeting HSP47 improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis and this drug delivery system using the vitamin A is possibly efficient in targeting myofibroblasts in the lungs.

はじめに

HSP (heat shock protein) 47は、細胞小胞体内でコラーゲン合成に関与する重要な分子シャペロンである。組織線維化を起こす疾患では、過剰なHSP47の発現が確認されており、HSP47の過剰発現がコラーゲンの異常蓄積を促進すると考えられている。肺線維症患者およびブレオマイシン肺線維症動物モデルの肺組織ではHSP47の過剰発現が認められ¹⁾、HSP47アンチセンスの導入により動物モデルでの線維化の抑制が確認されている²⁾。HSP47過剰発現の抑制が肺線維化抑制に有効であり、治療標的のターゲット分子として重要であるといえる。

最近、新たなドラッグデリバリーシステムの開発が、本学内科学第四講座の研究チームによって達成された³⁾。肝硬変治療を目的に施行された研究であり、Vitamin A (VA)を用いてHSP47を標的としたsiRNAを特異的かつ効率的に肝星細胞に取り込ませることを可能にした。VAとリポソームの複合体を作成しHSP47 siRNAを被包化してラット肝硬変モデルに投与したところ、肝星細胞にretinol binding protein (RBP) receptorを介して選択的にHSP47 siRNAが取り込まれ、不可逆的と考えられていた肝硬変の改善が認められた。肝星細胞は、VAを取り込む貯蔵細胞でもあり、VAをRBP receptorを介して細胞内に取り込む特異的な性質がある。同研究チームの成果はsiRNA導入にその特性を応用したものである。

一方、肺筋線維芽細胞にRBP receptorが存在するかどうかはまだ明らかではないが、肺における肝星細胞と同様に考えられている肺筋線維芽細胞においてもVAが貯蔵されることが報告されており⁴⁾、肺筋線維芽細胞にもRBP receptorが存在していると考えられる。同手法を用いることで肺筋線維芽細胞にも特異的にHSP47 siRNAを導入することが可能と考えられ、肺線維症においても線維化抑制効果が期待できる。

今回我々は、上記ドラッグデリバリーシ

ステムを利用したHSP47を標的としたsiRNA導入が肺線維症にも有効か動物モデル(ブレオマイシン肺線維症モデル)を用いて検討した。

方 法

1) ブレオマイシン (BLM) 肺線維症動物モデルの作成

7週齢の雄性Sprague-Dawleyラットに対して、深麻酔下に経気道的にBLM 0.5mgを単回投与し肺線維症モデルを作成した。対照群には経気道的に生理食塩水のみを投与した。

2) HSP47 siRNAの投与(図1)

Satoらの報告⁵⁾と同様に、ヒトHSP47のラットホモログであるgp46を標的とするsiRNAを作成した。VAとcationic liposome (lip)であるLipotrustTMをモル比2:1で混合してVAとリポソームの複合体を作成しsiRNAを被包化した(VA-lip-siRNA)。0.75mg/kgのsiRNAを含むVA-lip-siRNAを週3回尾静脈より投与した(BLM & VA-lip-siRNA群(図1(3)))。また、対照としてPBS & PBS群(同(1))、無治療群としてのBLM & PBS群(同(2))、VAを除いたBLM & lip-siRNA群(同(4))、機能を有さないRNAを用いたBLM & VA-lip-random RNA群(同(5))の5群を作成して比較検討を行った。

3) 肺線維化の評価

ブレオマイシン投与後21日目に肺を摘出し、ホルマリン固定後、hematoxylin-eosin染色により組織学的に線維化を評価した。肺組織のホモジネートを作成し、肺組織中のハイドロロキシプロリン量を測定した。また、肺洗浄を行い、洗浄液中の炎



Five groups prepared:

- | | |
|--|---------------------------|
| (1) PBS it, PBS iv | (PBS & PBS) |
| (2) BLM it, PBS iv | (BLM & PBS) |
| (3) BLM it, HSP47 siRNA-VA-liposome iv | (BLM & VA-lip-siRNA) |
| (4) BLM it, HSP47 siRNA-liposome iv | (BLM & lip-siRNA) |
| (5) BLM it, randomRNA-VA-liposome iv | (BLM & VA-lip-random RNA) |

図1 実験プロトコール

札幌医科大学医学部内科学第三講座

* 研究協力者

症細胞数を計測した。血清中の SP-D は ELISA 法により測定した。

結 果

1) プレオマイシン投与後 21 日目の肺組織 (図 2)

肺組織所見では、BLM & PBS 群と比べて BLM & VA-lip-siRNA 群で明らかに線維化の軽減、炎症細胞浸潤の抑制が見られた。同様に BLM 投与を行った BLM & lip-siRNA 群、BLM & VA-lip-random RNA 群と比較しても組織学的変化は軽微であり、siRNA のみならず VA も効果発現に必要であった。

2) 肺組織中のハイドロキシプロリン量 (図 3)

PBS & PBS 群と比べ、BLM & PBS 群では 21 日目にハイドロキシプロリン量は有意に増加していたが、BLM & VA-lip-siRNA 群ではその増加は有意に抑制された ($p < 0.05$)。他の BLM & lip-siRNA 群、BLM & VA-lip-random RNA 群では有意な抑制を認めず、効果発現には siRNA および VA の両者の存在が必要であることが明らかになった。

3) 肺洗浄液中の炎症細胞 (図 4)

肺洗浄液中の総細胞数は PBS & PBS 群と比較し、BLM & PBS 群、BLM & lip-siRNA 群、BLM & VA-lip-random RNA 群で有意に増加したが、BLM &

VA-lip-siRNA 群ではその増加が有意に抑制された ($p < 0.05$)。細胞分画ではほとんどがマクロファージであった。

4) 血清 SP-D 濃度 (図 5)

21 日目の血清 SP-D は、PBS & PBS 群と比べ、BLM & PBS 群、BLM & lip-siRNA 群で有意に増加を認めた ($p < 0.05$)。BLM & VA-lip-siRNA 群ではその増加は統計学的には有意な差を認めなかったが抑制される傾向であった。

考 察

今回、Sato らが報告した肝硬変モデルでの線維化に対する抑制効果と同様に³⁾、HSP47 の発現を siRNA で抑制することで肺線維症モデルにおいても線維化に対する抑制効果を確認することができた。さらに HSP47 siRNA を VA とリボソームの複合体により被包化し投与することで、肺線維化の有意な抑制が認められ、HSP siRNA のみならず VA の存在も有意な線維化抑制に必須であることが確認できた。この複合体を用いることで、肺線維症においても、肝硬変と同様なメカニズムで線維化を抑制するものと考えられた。

今回のこの VA を用いたドラッグデリバリーシステムは、肝星細胞をターゲットとして特異的に

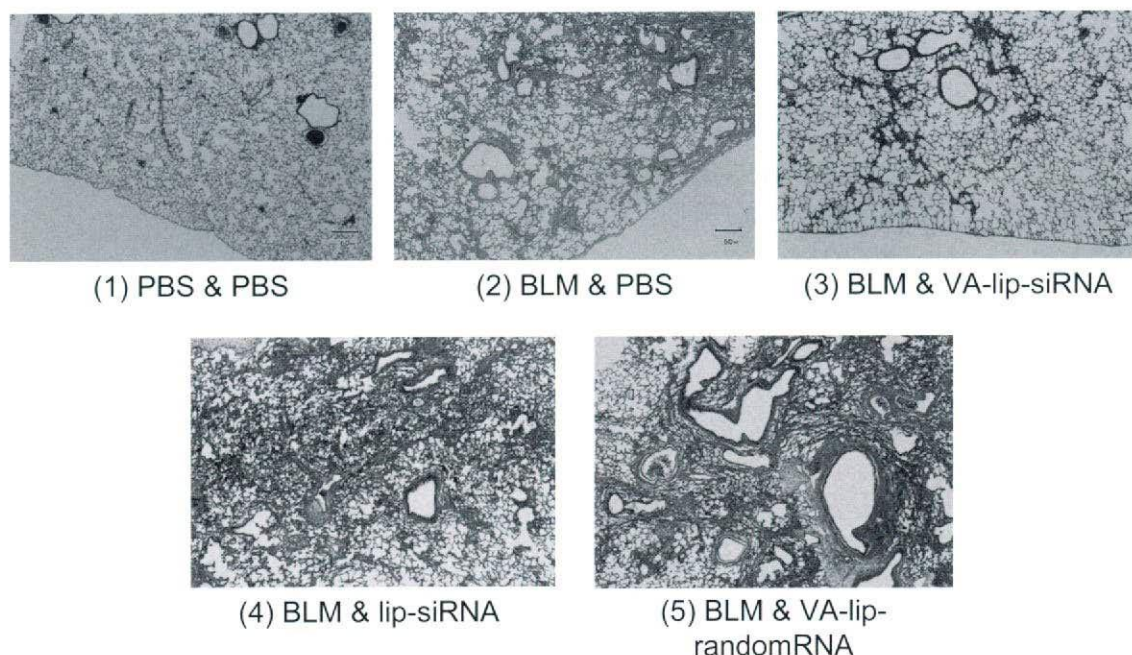


図 2 プレオマイシン投与 21 日目の肺組織像 (hematoxylin-eosin 染色)

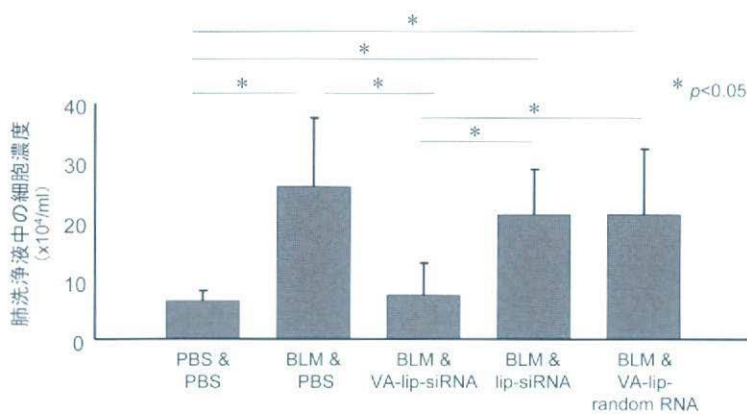


図3 プレオマイシン投与21日目の気管支肺胞洗浄液中の総細胞数

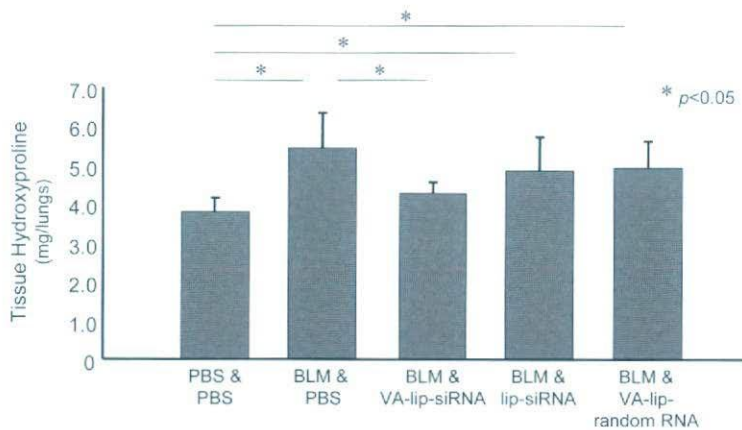


図4 プレオマイシン投与21日目の肺ハイドロキシプロリン量

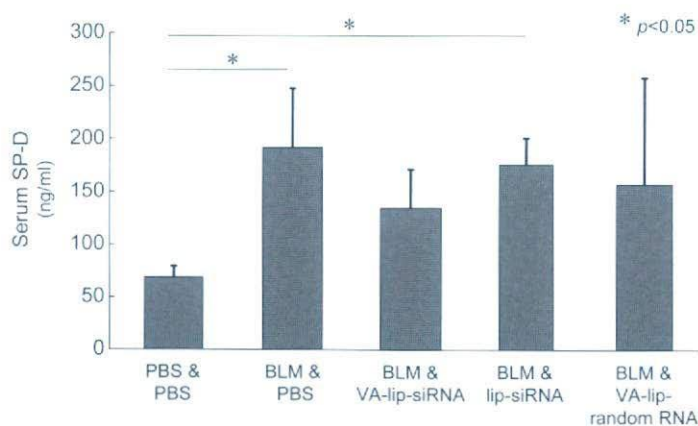


図5 プレオマイシン投与21日目の血清 SP-D 値

siRNA を導入するその細胞特異性を利用した方法である。今回の課題はこの方法を肺の線維化に対しても応用できるかどうかである。肺における肝星細胞に相当する細胞は肺筋線維芽細胞と考えられている。肺筋線維芽細胞は肺線維化の過程で、線維芽細胞の性質が変化して増殖してくる。肺において肝星細胞と同様に考えられている肺筋線維芽細胞にVAが貯蔵されることが報告されており⁴⁾、今回の検討結果もVAが肝星細胞同様にVAを選択的に取り込む性質があることが十分に推測される。今後 *in vitro* での確認を行いたい。

肺線維症などの難治性疾患の病態生理が解明されていくにつれ、それらの治療に分子標的治療が選択されていくものと考えられる。そのひとつとして遺伝子治療が注目されている。しかし、遺伝子治療を臨床応用していく過程には多くの難題が山積している。アンチセンス、siRNA など遺伝子治療が実用化される際の問題点としては、1) 遺伝子自体がもつ物質としての不安定性、2) 高額の作成費用、3) 全身投与時の副次的作用の発現、などが挙げられる。今後、遺伝子導入治療の実用化を考慮した場合、siRNA による遺伝子ノックアウトによる効果だけではなく、いかに遺伝子を安定した状態で投与できるか、さらに副作用や使用量を考えた場合、いかに選択的に標的臓器および標的細胞に導入できるかが重要であり、ドラッグデリバリーシステムの選択が重要な鍵となる。今回の検討で用いた手法は標的細胞の有する性質を利用したものであり、細胞選択性において有効な手法であったと考える。今後、臨床応用における課題を克服することが期待される。

今回肺線維化の抑制が確認できたが、さらに肺筋線維芽細胞のVA貯蔵作用、コラーゲン産生抑制などの *in vitro* での分析、完成した肺線維症に対する治療効果などを検討していく予定である。

参考文献

- 1) Ishii H, Mukae H, Kakugawa T, Iwashita T, Kaida H, Fujii T, Hayashi T, Kadota J, Kohno S. Increased expression of collagen-binding heat shock protein 47 in murine bleomycin-induced pneumopathy. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003, 285: L957-963.
- 2) Hagiwara S, Iwasaka H, Matsumoto S, Noguchi T. Antisense oligonucleotide inhibition of heat shock protein 47 improves bleomycin-induced pulmonary fibrosis in rats. *Respir Res* 2007, 8: 37.
- 3) Sato Y, Murase K, Kato J, Kobune M, Sato T, Kawano Y, Takimoto R, Takada K, Miyanishi K, Matsunaga T, Takayama T, Niitsu Y. Resolution of liver cirrhosis using vitamin A-coupled liposomes to deliver siRNA against a collagen-specific chaperone. *Nat Biotechnol* 2008, 26: 431-442.
- 4) Nagy NE, Holven KB, Roos N, Senoo H, Kojima N, Norum KR, Blomhoff R. Storage of vitamin A in extrahepatic stellate cells in normal rats. *J Lipid Res* 1997, 38: 645-658.

ブレオマイシン肺線維症モデルに対する PAI-1 標的治療の抗線維化効果の検討

研究分担者 河野修典 広島大学大学院・分子内科学 教授

研究要旨

【目的】 Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) の発現量を人為的に操作した遺伝子改変マウスを用いた研究から、PAI-1 が肺線維症の進展の鍵となる分子であることが示されてきた。特に、PAI-1 ノックアウトマウスでは、ブレオマイシンによる肺線維症が制限されることから、PAI-1 の発現を抑制することが肺線維症の治療に応用できる可能性が示唆される。PAI-1 を標的分子とした治療が、ブレオマイシン肺線維症モデルにおける線維化進展を制限できるのかを検討することが本研究の目的である。

【方法】ブレオマイシンの経気管内投与を行ったマウスへ、マウス PAI-1 に対する siRNA (PAI-1-siRNA) 経鼻投与し、肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度を測定するとともに、肺線維症の程度を肺内コラーゲン量によって評価した。さらに、ブレオマイシンの経気管内投与を行ったマウスへ、某製薬会社が開発した PAI-1 の選択的阻害薬の飲水への混入投与を行うことで、肺線維症の程度に変化を認めるのかも検討した。

【結果】 PAI-1-siRNA の単回経鼻投与は、ブレオマイシン投与後 5 日目の肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度を有意に低下させることがわかった。また、PAI-1-siRNA の複数回経鼻投与により、ブレオマイシン投与後 14 日目の肺内コラーゲン量を有意に低下させ、生存率も改善することが明らかとなった。さらに、PAI-1 選択的阻害薬の投与は、ブレオマイシン投与マウスの肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度を低下させ、炎症期を過ぎた時点からの開始により、肺内のコラーゲン量を有意に低下させることも判明した。

【結論】 PAI-1 が肺線維症の進展を制限する治療手段の標的分子となりうることが証明され、その手段として siRNA の経気道投与、さらに選択的阻害薬の経口投与が候補となる可能性が示唆された。

A. 研究目的

PAI-1 が肺の線維化に関わる鍵となる分子であることは既に証明されている。本研究の目的は、PAI-1 を標的分子として、RNA 干渉をきたす small interfering RNA (siRNA) を直接経気道的に肺内へ注入することでの PAI-1 の発現抑制、さらに、PAI-1 の選択的阻害薬の経口投与が、ブレオマイシンにより惹起された肺線維症の程度にどのような影響を与えるのかを検討することである。

B. 研究方法

1) ブレオマイシンの投与

C57BL/6 マウスに対して、ブレオマイシンを 2.0mg/kg の投与量として、経気管投与を行った。

2) マウス PAI-1 に対する siRNA の作製

マウス PAI-1 に対する siRNA を 3 種類及びコントロール siRNA を 1 種類作製し、それぞれを NIH3T3 細胞に導入した。導入 24 時間後に、細胞を回収、RNA を分離し、real time PCR を行って、最も PAI-1 の発現が抑制されていた siRNA を選定し、これを PAI-1-siRNA と名づけた。また、ローダミンで標識した同配列の siRNA も作製し、TRITC-PAI-1-siRNA とした。

3) TRITC-PAI-1-siRNA の取り込み部位の確認
経気道投与にて、実際にマウス肺内に siRNA が取り込まれるのかどうかをみる目的で、TRITC-PAI-1-siRNA 及び標識されていない PAI-1-siRNA をブレオマイシン経気道投与後 2 週間のマウスへ経鼻投与を行った。経鼻投与 24 時間後にマウス肺を摘出し、OCT コンパウンドに包埋冷凍した。凍結切片を準備し、共焦点顕微鏡にて蛍光部位の確認を行った。

4) PAI-1-siRNA の投与

気管支肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度をみる実験では、マウスへのブレオマイシン経気管投与 3 日後に PAI-1-siRNA 及びコントロール siRNA (2nM) 50 l の経鼻投与を行い、その 2 日後 (ブレオマイシン投与 5 日後) に気管支肺胞洗浄を行った。肺線維症の程度をみる実験では、マウスへのブレオマイシン経気管投与 1, 4, 8, 11 日後に PAI-1-siRNA 及びコントロール siRNA (2nM) 50 l の経鼻投与を実施した。

5) PAI-1 選択的阻害薬の投与実験

マウスへのブレオマイシン経気管投与後、i) day0-day 20 まで全期間投与する群、ii) day0-day7 まで前期のみ投与する群、iii) day8-day20 まで後期のみ投与する群、iv) 薬剤非投与群に分けた。PAI-1 選択的阻害薬は、1000ppm の濃度で、飲水へ混入した。

6) 気管支肺胞洗浄液中 PAI-1 濃度の測定

気管支肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度の測定は、ELISA キット (Innovative Research, Southfield, MI, USA) を用いて行った。

7) 肺線維化の評価

肺のコラーゲン量を Sircol collagen assay kit (Biocolor, Newtownabbey, UK) あるいは hydroxyproline assay を用いて測定し、肺線維症の程度を評価した。

C. 研究結果

1) siRNA の取り込み部位

TRITC-PAI-1-siRNA の投与により、気管支内腔及び線維化部位の気道表面側にローダミンの発色が認められ、これらの部位に siRNA が取り込まれることが判明した。

2) PAI-1-siRNA 投与による肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度の低下

単回の PAI-1-siRNA の経鼻投与により、ブレオマイシン投与 5 日目の肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度が、コントロール siRNA 投与に比して、有意に低下することがわかった。

3) PAI-1-siRNA の複数回投与によるブレオマイシン肺線維症の抑制

ブレオマイシン投与 1, 4, 8, 11 日後に、PAI-1-siRNA を複数回の経鼻投与を行うことにより、コントロール siRNA 投与群に比して、有意な肺内コラーゲン量の低下を認めることがわかった。

4) PAI-1 選択的阻害薬投与による肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度の低下

ブレオマイシン投与後より PAI-1 選択的阻害薬を投与することにより、ブレオマイシン投与 5 日目の肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度が、非投与群に比し有意に低下することがわかった。

5) PAI-1 選択的阻害薬投与によるブレオマイシン肺線維症の抑制

PAI-1 選択的阻害薬の後期投与群において、非投与群に比して、有意に肺内コラーゲン量の低下を認めることがわかった。

D. 考察

本研究において、1) siRNA 自体を経気道投与することによって、気管支・肺胞上皮に siRNA が取り込まれ、ブレオマイシン肺線維症モデルマウスに PAI-1 に対する siRNA を複数回投与することにより、肺線維症の程度が軽減されること、2) ブレオマイシン肺傷害モデルの線維化期における PAI-1 選択的阻害薬の投与により、肺線維症の程度が軽減されることが明らかとなった。

遺伝子改変マウスを用いた研究から、いろいろな分子の肺線維症の病態進展への関与が明らかとなってきている。PAI-1 ノックアウトマウスにおいて、ブレオマイシンによる肺線維症誘発の程度が明らかに抑制されていること、さらに、PAI-1 トランスジェニックマウスにおいてブレオマイシン肺線維症が増悪することから、PAI-1 は肺線維症の病態に関わる鍵となる分子であることが証明された。PAI-1 は、肺線維症患者の肺

において上皮細胞に非常に強く発現していることがわかり、また、プレオマイシン肺線維症モデルマウスにおいても大量に誘導されることも示されており、その発現を抑制することが肺線維症の治療に応用できる可能性がある。

その遺伝子発現を抑制する手段として、今回はRNA干渉という最近明らかとなった元来生体に備わっている遺伝子の発現抑制機構を応用した。siRNA自体を経気道投与することで、気管支・肺胞上皮、さらに線維化巣の上皮にも取り込まれることが判明したことは、今後、肺・気道における遺伝子の発現抑制を試みる方法として重要な手段となりうる可能性を示唆する。また、PAI-1に対するsiRNAの単回投与にて、PAI-1が強発現しているプレオマイシン投与マウスにおける肺胞洗浄液中のPAI-1濃度を有意に低下させたことは、経気道投与という方法でも、遺伝子発現のノックダウンが可能であることを示すものであり、今後他の遺伝子ノックダウンを試みる上での重要な示唆が得られたと考える。

さらに、PAI-1選択的阻害薬の経口投与により、肺胞洗浄液中のPAI-1濃度が低下し、線維化期に投与を開始することでプレオマイシン肺線維症モデルにおける肺線維化を抑制しえたことは、経口薬によるPAI-1を標的とした治療も考慮できるという点で、より臨床応用への道が近づいたと認識される。

今回の重要な知見として、PAI-1に対するsiRNAの複数回投与によって、プレオマイシン肺線維症の程度が明らかに軽減され、また、プレオマイシン投与マウスの生存率を改善したことが挙げられる。PAI-1ノックアウトマウスという遺伝子改変マウスを用いた実験から得られた結果を、RNA干渉という機構を応用した治療手段によって追試できたことが強調されるべき点であり、治療応用への希望が示されたと考えられる。

E. 結論

PAI-1が肺線維症の進展を制限する治療手段の標的分子となりうることが証明され、その手段としてsiRNAの経気道投与、さらに選択的阻

害薬の経口投与が候補となる可能性が示唆された。

G. 研究発表

- 1) Nakashima T, Yokoyama A, Ohnishi H, Hamada H, Ishikawa N, Haruta Y, Hattori N, Tanigawa K, Kohno N. Circulating KL-6/MUC1 as an independent predictor for disseminated intravascular coagulation in acute respiratory distress syndrome. *J Intern Med.* 2008; 263: 432-9.
- 2) Ishikawa N, Hattori N, Yokoyama A, Tanaka S, Nishino R, Yoshioka K, Ohshimo S, Fujitaka K, Ohnishi H, Hamada H, Arihiro K, Kohno N. Usefulness of monitoring the circulating Krebs von den Lungen-6 levels to predict the clinical outcome of patients with advanced nonsmall cell lung cancer treated with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *Int J Cancer* 2008; 122: 2612-20
- 3) Nakashima T, Yokoyama A, Onari Y, Shoda H, Haruta Y, Hattori N, Naka T, Kohno N. Suppressor of cytokine signaling 1 inhibits pulmonary inflammation and fibrosis. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; 121:1269-76.
- 4) Iwamoto H, Yokoyama A, Shiota N, Shoda H, Haruta Y, Hattori N, Kohno N. Tiotropium bromide is effective for severe asthma with noneosinophilic phenotype. *Eur Respir J.* 2008; 31: 1379-80.

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

ブレオマイシン肺線維症モデルに対する

PAI-1 標的治療の抗線維化効果の検討

服部 登 妹尾 直 河瀬 成徳 風呂中 誠
石川 暢久 藤高 一慶 春田 吉則 村井 博
河野 修興*

【目的】 Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) の発現量を人為的に操作した遺伝子改変マウスを用いた研究から、PAI-1 が肺線維症の進展の鍵となる分子であることが示されてきた。特に、PAI-1 ノックアウトマウスでは、ブレオマイシンによる肺線維症が制限されることから、PAI-1 の発現を抑制することが肺線維症の治療に応用できる可能性が示唆される。PAI-1 を標的分子とした治療が、ブレオマイシン肺線維症モデルにおける線維化進展を制限できるのかを検討することが本研究の目的である。

【方法】ブレオマイシンの経気管内投与を行ったマウスへ、マウス PAI-1 に対する siRNA (PAI-1-siRNA) 経鼻投与し、肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度を測定するとともに、肺線維症の程度を肺内コラーゲン量によって評価した。さらに、ブレオマイシンの経気管内投与を行ったマウスへ、某製薬会社が開発した PAI-1 の選択的阻害薬の飲水への混入投与を行うことで、肺線維症の程度に変化を認めるのかも検討した。

【結果】 PAI-1-siRNA の単回経鼻投与は、ブレオマイシン投与後 5 日目の肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度を有意に低下させることがわかった。また、PAI-1-siRNA の複数回経鼻投与により、ブレオマイシン投与後 14 日目の肺内コラーゲン量を有意に低下させ、生存率も改善することが明らかとなった。さらに、PAI-1 選択的阻害薬の投与は、ブレオマイシン投与マウスの肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度を低下させ、炎症期を過ぎた時点からの開始により、肺内のコラーゲン量を有意に低下させることも判明した。

【結論】 PAI-1 が肺線維症の進展を制限する治療手段の標的分子となりうることが証明され、その手段として siRNA の経気道投与、さらに選択的阻害薬の経口投与が候補となる可能性が示唆された。

はじめに

肺線維症は、肺傷害に引き続いて生じる過剰な組織修復により、線維芽細胞の集積をきたし、コラーゲンの異常な沈着を認める状態である。これらの肺組織には、正常では存在しないフィブリンの沈着が認められ、線溶系の抑制されていることが知られている¹⁾。この線溶系の抑制に最も関わっているのが、この病態において過剰発現する plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) であることがわかっている。

PAI-1 が肺の線維化に大きく関わっていることは、PAI-1 の発現レベルを操作した遺伝子操作マウスにおけるプレオマイシン肺線維症モデルの検討によって明らかにされてきた^{2,3)}。野生型マウスにおける肺線維症の程度に比して、PAI-1 を発現しえない PAI-1 ノックアウトマウスでは、プレオマイシン肺線維症が著明に抑制されているのに対し、PAI-1 を過剰発現するトランスジェニックマウスでは、明らかに肺線維症が増悪していることが示された。この研究成果は、PAI-1 が肺線維化の鍵となる分子の一つであることを証明し、さらに PAI-1 をターゲットとした肺線維症の治療が考慮しうることを示唆する。

PAI-1 の発現を抑制する手段として RNA 干渉の応用、さらにその作用を阻害する手段として PAI-1 の選択的な阻害薬の利用が考慮される。本研究では、RNA 干渉をきたす small interfering RNA (siRNA) を直接経気道的に肺内へ注入することでの PAI-1 の発現抑制、さらに、PAI-1 の選択的阻害薬の経口投与が、プレオマイシンにより惹起された肺線維症の程度にどのような影響を与えるのかを検討した。

方 法

1) プレオマイシンの投与

C57BL/6 マウスに対して、プレオマイシンを 2.0mg/kg の投与量として、経気管投与を行った。

2) マウス PAI-1 に対する siRNA の作製

マウス PAI-1 に対する siRNA を 3 種類及びコントロール siRNA を 1 種類作製し、それぞれを NIH3T3 細胞に導入した。導入 24 時間後に、細胞を回収、RNA を分離し、real time PCR を行って、最も PAI-1 の発現が抑制されていた siRNA を選定し、これを PAI-1-siRNA と名づけた。また、ローダミンで標識した同配列の siRNA も作製し、TRITC-PAI-1-siRNA とした。

3) TRITC-PAI-1-siRNA の取り込み部位の確認

経気道投与にて、実際にマウス肺内に siRNA が取り込まれるのかどうかをみる目的で、TRITC-PAI-1-siRNA 及び標識されていない PAI-1-siRNA をプレオマイシン経気道投与後 2 週間のマウスへ経鼻投与を行った。経鼻投与 24 時間後にマウス肺を摘出し、OCT コンパウンドに包埋冷凍した。凍結切片を準備し、共焦点顕微鏡にて蛍光部位の確認を行った。

4) PAI-1-siRNA の投与

気管支肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度をみる実験では、マウスへのプレオマイシン経気管投与 3 日後に PAI-1-siRNA 及びコントロール siRNA (2nM) 50 μ l の経鼻投与を行い、その 2 日後 (プレオマイシン投与 5 日後) に気管支肺胞洗浄を行った。肺線維症の程度をみる実験では、マウスへのプレオマイシン経気管投与 1, 4, 8, 11 日後に PAI-1-siRNA 及びコントロール siRNA (2nM) 50 μ l の経鼻投与を実施した。

5) PAI-1 選択的阻害薬の投与実験

マウスへのプレオマイシン経気管投与後、i) day0-day 20 まで全期間投与する群、ii) day0-day7 まで前期のみ投与する群、iii) day8-day20 まで後期のみ投与する群、iv) 薬剤非投与群に分けた。PAI-1 選択的阻害薬は、1000ppm の濃度で、飲水へ混入した。

6) 気管支肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度の測定

気管支肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度の測定は、ELISA キット (Innovative Research, Southfield, MI, USA) を用いて行った。

7) 肺線維化の評価

肺のコラーゲン量を Sircol collagen assay kit (Biocolor, Newtownabbey, UK) あるいは hydroxyproline assay を用いて測定し、肺線維症の程

度を評価した。

結 果

1) siRNA の取り込み部位

TRITC-PAI-1-siRNA の投与により、気管支内腔及び線維化部位の気道表面側にローダミンの発色が認められ、これらの部位に siRNA が取り込まれることが判明した。(本稿中にはデータを示していない。)

2) PAI-1-siRNA 投与による肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度の低下

図 1 に示すように、単回の PAI-1-siRNA の経鼻投与により、プレオマイシン投与 5 日目の肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度が、コントロール siRNA 投与に比して、有意に低下することがわかった。

3) PAI-1-siRNA の複数回投与によるプレオマイシン肺線維症の抑制

プレオマイシン投与 1, 4, 8, 11 日後に、PAI-1-siRNA を複数回の経鼻投与を行うことにより、コントロール siRNA 投与群に比して、有意な肺内コラーゲン量の低下を認めることがわかった(図 2)。

4) PAI-1 選択的阻害薬投与による肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度の低下

プレオマイシン投与後より PAI-1 選択的阻害薬を投与することにより、プレオマイシン投与 5 日目の肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度が、非投与群に比して有意に低下することがわかった(図 3)。

5) PAI-1 選択的阻害薬投与による

プレオマイシン肺線維症の抑制

PAI-1 選択的阻害薬の後期投与群において、非投与群に比して、有意に肺内コラーゲン量の低下を認めることがわかった(図 4)。

考 察

本研究において、1) siRNA 自体を経気道投与することによって、気管支・肺胞上皮に siRNA が取り込まれ、プレオマイシン肺線維症モデルマウスに PAI-1 に対する siRNA を複数回投与することにより、肺線維症の程度が軽減されること、2) プレオマイシン肺傷害モデルの線維化期における PAI-1 選択的阻害薬の投与により、肺線維症の

程度が軽減されることが明らかとなった。

遺伝子改変マウスを用いた研究から、いろいろな分子の肺線維症の病態進展への関与が明らかになってきている。PAI-1 ノックアウトマウスにおいて、プレオマイシンによる肺線維症誘発の程度が

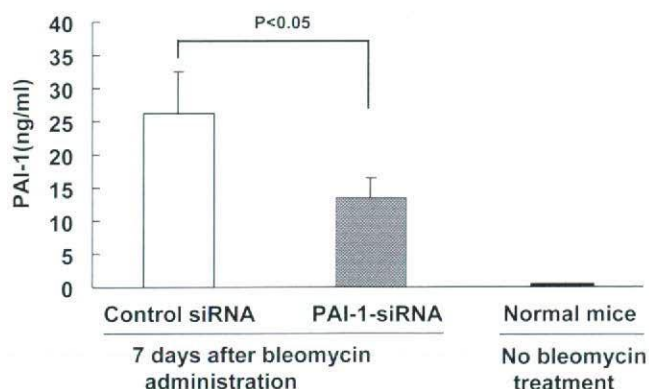


図 1 肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度

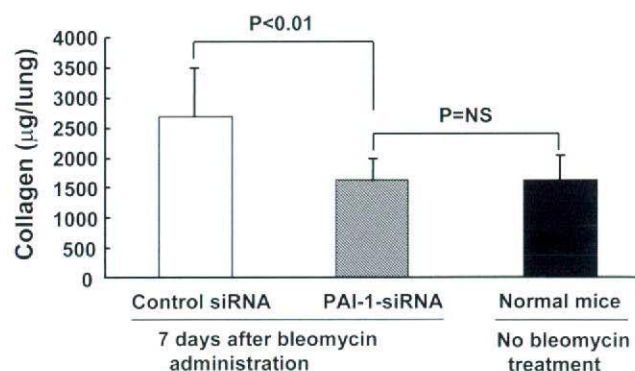


図 2 肺内のコラーゲン量

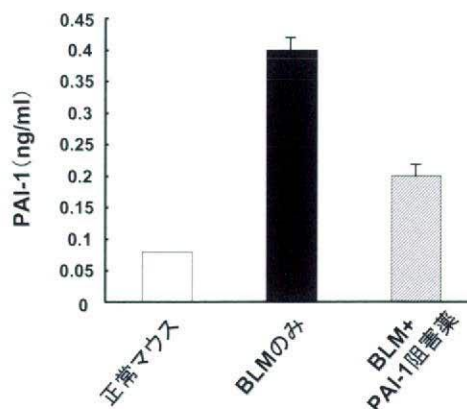


図 3 PAI-1 阻害薬投与による肺胞洗浄液中 PAI-1 濃度への影響

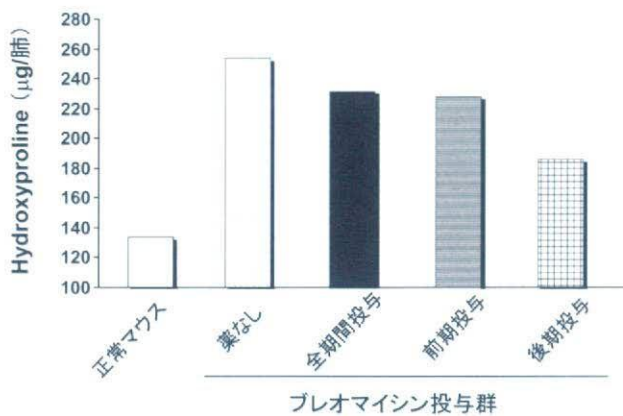


図4 PAI-1 阻害薬投与による肺コラーゲン量 (Hydroxyproline assay) への影響

明らかに抑制されていること、さらに、PAI-1 トランスジェニックマウスにおいてプレオマイシン肺線維症が増悪することから、PAI-1 は肺線維症の病態に関わる鍵となる分子であることが証明された。PAI-1 は、肺線維症患者の肺において上皮細胞に非常に強く発現していることがわかり、また、プレオマイシン肺線維症モデルマウスにおいても大量に誘導されることも示されており、その発現を抑制することが肺線維症の治療に応用できる可能性がある。

その遺伝子発現を抑制する手段として、今回は RNA 干渉という最近明らかとなった元来生体に備わっている遺伝子の発現抑制機構を応用した。siRNA 自体を経気道投与することで、気管支・肺胞上皮、さらに線維化巣の上皮にも取り込まれることが判明したことは、今後、肺・気道における遺伝子の発現抑制を試みる方法として重要な手段となりうる可能性を示唆する。また、PAI-1 に対する siRNA の単回投与にて、PAI-1 が強発現しているプレオマイシン投与マウスにおける肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度を有意に低下させたことは、経気道投与という方法でも、遺伝子発現のノックダウンが可能であることを示すものであり、今後他の遺伝子ノックダウンを試みる上での重要な示唆が得られたと考える。

さらに、PAI-1 選択的阻害薬の経口投与により、肺胞洗浄液中の PAI-1 濃度が低下し、線維化期に投

与を開始することでプレオマイシン肺線維症モデルにおける肺線維化を抑制しえたことは、経口薬による PAI-1 を標的とした治療も考慮できるという点で、より臨床応用への道が近づいたと認識される。

今回の重要な知見として、PAI-1 に対する siRNA の複数回投与によって、プレオマイシン肺線維症の程度が明らかに軽減され、また、プレオマイシン投与マウスの生存率を改善したことが挙げられる。PAI-1 ノックアウトマウスという遺伝子改変マウスを用いた実験から得られた結果を、RNA 干渉という機構を応用した治療手段によって追試できたことが強調されるべき点であり、治療応用への希望が示されたと考えられる。

結 語

PAI-1 が肺線維症の進展を制限する治療手段の標的分子となりうることが証明され、その手段として siRNA の経気道投与、さらに選択的阻害薬の経口投与が候補となる可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Imokawa S, Sato A, Hayakawa H, Kotani M, Urano T, Takada A. Tissue factor expression and fibrin deposition in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis and systemic sclerosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997; 156: 631-6.
- 2) Eitzman DT, McCoy RD, Zheng X, Fay WP, Shen T, Ginsburg D, Simon RH. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in transgenic mice that either lack or overexpress the murine plasminogen activator inhibitor-1 gene. *J Clin Invest.* 1996; 97: 232-7.
- 3) Hattori N, Degen JL, Sisson TH, Liu H, Moore BB, Pandrangi RG, Simon RH, Drew AF. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in fibrinogen-null mice. *J Clin Invest.* 2000; 106: 1341-50.

ブレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスにおける PDGF レセプター α , β 阻害抗体の抗線維化効果

研究分担者 西岡安彦 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部呼吸器・膠原病内科学分野 准教授

研究要旨

【目的】 イマチニブは PDGF レセプター α , β 両者のリン酸化阻害を介して抗線維化作用を発揮する。一方、肺線維症において PDGFR- α , β のいずれがより重要な役割を果たしているかは明らかでない。今回我々は肺線維症における PDGFR- α , β の役割をより詳細に検討するため、PDGFR- α , β に特異的阻害抗体を用いてブレオマイシン肺線維症モデルにおける抗線維化効果を検討した。

【方法】 マウス肺線維芽細胞を培養し、PDGFR α , β の特異的阻害抗体である APA5, APB5 が PDGF-AA, BB の増殖作用を抑制することを確認した。ブレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスを用いて、APA5, APB5 の抗線維化効果を検証した。

【結果】 マウス肺線維芽細胞に PDGFR α , β は同等に発現していた。マウス肺線維芽細胞の PDGF-AA, BB による増殖作用を、APA5, APB5 は特異的に抑制した。ブレオマイシン誘発肺線維症は、APB5 投与群で有意に抑制された。

A. 研究目的

我々は血小板由来増殖因子（platelet-derived growth factor: PDGF）に注目し、PDGF 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。イマチニブは PDGF レセプター α , β 両者のリン酸化阻害を介して抗線維化作用を発揮する。一方、肺線維症において PDGFR- α , β のいずれがより重要な役割を果たしているかは明らかでない。今回我々は肺線維症における PDGFR- α , β の役割をより詳細に検討するため、PDGFR- α , β に特異的な阻害抗体を用いてブレオマイシン肺線維症モデルにおける抗線維化効果を検討した。

B. 研究方法

PDGF レセプター α , β の特異的阻害抗体である APA5, APB5（理化学研究所西川先生より供与）を使用した。ハイブリドーマ細胞の培養上清から APA5, APB5 を精製した。肺線維芽細胞の PDGFR- α , β の発現をフローサイトメトリーで確認した。マウス肺線維芽細胞を培養し、APA5,

APB5 が PDGFR- α , β のリン酸化阻害効果を持つことを Western blotting で確認し、PDGF-AA, BB による増殖作用を特異的に阻害することを ³H-thymidine incorporation assay を用いて検証した。最後にブレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスを用いて、APA5, APB5 の抗線維化効果を比較した。モデルマウスは7週齢の C57/BL6 マウスにブレオマイシン 125mg/kg を約7日間かけて持続皮下投与することにより作成した。APA5, APB5 は1週間に2回、500 μ g ずつ腹腔内投与した。28日目にマウスを sacrifice し、HE 染色による組織学的な線維化の評価（Ashcroft score）を行った。

C. 研究結果

マウス肺線維芽細胞に PDGFR α , β は同等に発現していた。APA5, APB5 は PDGF-AA, BB による PDGFR- α , β のリン酸化を抑制する効果があった。マウス肺線維芽細胞の PDGF-AA, BB による増殖作用を、APA5, APB5 は特異的に抑制した。APB5 は APA5 より強く、容量依存的な

抑制効果を示した。ブレオマイシン誘発肺線維症は、APB5で有意に抑制された。

D. 考察

胎生期におけるPDGFの役割には違いがあり、PDGFAAをノックアウトしたマウスでは肺気腫様の変化が生じる。またヒト線維化肺で肺胞上皮細胞にPDGFR α が優位に発現しているという報告があり肺胞上皮障害の修復過程にPDGFR α が関与している可能性がある。以上から、PDGFR- α とPDGFR- β では、肺線維症において異なる役割を果たしており、PDGFRを標的とした抗線維化療法を考慮する場合、PDGFR- β のみを抑制するアプローチがより有効である可能性がある。実際APB5を用いた群で有意に線維化を抑制する傾向があり、抗線維化効果を考えた場合、PDGFR- β を標的とする方がより強力な抗線維化効果が期待できると考えられる。

E. 結論

肺線維症においてPDGFR- α 、 β の役割は異なっており、抗線維化療法においてはPDGFR- β の抑制がより有効である可能性が示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Sugita A, Ogawa H, Nishioka Y, et al: Antiallergic and Anti-Inflammatory Effects of a Novel IkappaB Kinase beta Inhibitor, IMD-0354, in a Mouse Model of Allergic Inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 148: 186-198.
- 2) Wang W, Nishioka Y, Ozaki S, et al: Chimeric and humanized anti-HM1.24 antibodies mediate antibody-dependent cellular cytotoxicity against lung cancer cells. *Lung Cancer* 2009; 63: 23-31.

2. 学会発表

- 1) Aono Y, Nishioka Y, Kishi J, et. al. Human fibrocytes express PDGF receptor and migrate in response to PDGF. 103th American thoracic society. 2007 May.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

ブレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスにおける PDGF レセプター α , β 阻害抗体の抗線維化効果

西岡 安彦* 岸 昌美 青野 純典 東 桃代
曾根 三郎

我々は、がん分子標的治療薬であるイマチニブの肺線維症抑制効果について報告してきた。イマチニブは PDGF レセプター (PDGFR) のリン酸化阻害を介して抗線維化効果を発揮するが、肺線維症およびイマチニブの抗線維化効果における PDGFR- α , β の個々の役割は不明な点が多い。そこで肺線維症における PDGFR- α , β の役割を明らかにするため、PDGFR- α , β に対する特異的阻害抗体を用いて、その抗線維化効果について検討した。まず、マウス肺線維芽細胞の PDGFR α , β 発現をフローサイトメトリーで確認した。マウス肺線維芽細胞を培養し、PDGFR α , β の特異的阻害抗体である APA5, APB5 が PDGF-AA, BB の増殖作用を抑制することを確認した。ブレオマイシン誘発肺線維症モデルマウスを用いて、APA5, APB5 の抗線維化効果を検証した。その結果、マウス肺線維芽細胞に PDGFR- α , β は同等に発現していた。マウス肺線維芽細胞の PDGF-AA, BB による増殖作用を、APA5, APB5 は特異的に抑制した。ブレオマイシン誘発肺線維症は、APB5 投与群で有意に抑制された。以上より、肺線維化形成には PDGFR- β がより重要な役割を果たしていることが推測され、抗 PDGFR- β 抗体による抗線維化療法の可能性が示唆された。

Anifibrotic Effects of Blocking Antibody Specific for PDGF Receptor α or β on Bleomycin-Induced Pulmonary Fibrosis in Mice

Yasuhiko Nishioka, Masami Kishi, Momoyo Azuma, Yoshinori Aono,
and Saburo Sone

Department of Respiratory Medicine and Rheumatology The University of Tokushima Graduate School

Idiopathic pulmonary fibrosis is a progressive and lethal pulmonary disorder. We reported that imatinib prevented bleomycin (BLM)-induced pulmonary fibrosis in mice via inhibiting phosphorylation of platelet-derived growth factor receptor (PDGFR). Since imatinib can inhibit both PDGFR α and β , the role of inhibition of PDGFR α or β in antifibrotic effects of imatinib is still unclear. To clarify the role of each PDGFR, we used the blocking antibody specific for PDGFR α or β in BLM-induced pulmonary fibrosis model in mice. First we confirmed the expression of PDGFRs in murine lung fibroblasts by a flow cytometric analysis. Next we examined inhibitory effects of APA5 and APB5 on the growth of lung fibroblasts stimulated with PDGF by using ^3H -thymidine incorporation assay. Then we investigated whether APA5 and APB5 could prevent lung fibrosis in BLM-model of C57BL/6 mice. Mice were treated i. p. with 500 μg of APA5 or APB5 twice a week, and assessed pulmonary fibrosis by Ashcroft score on day28.

Expressions of PDGFR α and β in murine lung fibroblasts were similar. Addition of APA5 and APB5 inhibited the growth of fibroblasts generated by PDGF-AA and BB, respectively. APB5 prevented the growth of fibroblasts more strongly than APA5. In addition, administration of APB5 was more effective in inhibiting pulmonary fibrosis than APA5 in BLM-induced pulmonary fibrosis in mice. It is likely that the PDGFR α and β plays a different role in BLM-induced pulmonary fibrosis in mice. Furthermore, the specific approach using the blocking antibody for PDGFR- β might be more useful for treatment of pulmonary fibrosis.

はじめに

特発性肺線維症は慢性進行性の肺疾患であり、いまだ生命予後を延長する治療法が確立されておらず新規治療法の開発が望まれている。我々は血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor: PDGF) に注目し、PDGF 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⁾。その結果、線維化後期ではイマチニブによる抗線維化効果が AGP により阻害されるが、マクロライドとの併用により AGP の抑制効果が解除され、抗線維化効果が増強すること、線維化早期においてもイマチニブは PDGFR 阻害作用を介して fibrocyte の遊走抑制作用を示し、抗線維化効果を発揮することを報告した^{2,3)}。

一方、肺線維症において PDGFR- α 、 β のいずれがより重要な役割を果たしているかは明らかでない。肺胞上皮にも PDGFR- α が発現していることが報告されており⁴⁾、肺胞上皮の再生・増殖においても PDGFR- α は重要な役割を果たしている可能性が示唆される。以上から、今回我々は肺線維症における PDGFR- α 、 β の役割をより詳細に検討するため、PDGFR- α 、 β に特異的阻害抗体を用いてプレオマイシン肺線維症モデルにおける抗線維化効果を検討した。

方 法

PDGF レセプター α 、 β の特異的阻害抗体 APA5、APB5 (理化学研究所 西川先生より供与) を使用した⁵⁾。APA5、APB5 はハイブリドーマ細胞の培養上清から硫酸沈殿あるいは ProteinG カラムにより精製した。肺線維芽細胞の PDGFR- α 、 β の発現をフローサイトメトリーで確認した。マウス肺線維芽細胞を培養し、APA5、APB5 が PDGFR- α 、 β のリン酸化阻害効果を持つことを Western blotting で確認し、PDGF-AA、BB による増殖作用を特異的に阻害することを ³H-thymidine incorporation assay を用いて検証した。最後にプレオマイシン誘発肺線

維症モデルマウスを用いて、APA5、APB5 の抗線維化効果を比較した。モデルマウスは7週齢の C57/BL6 マウスにプレオマイシン 125mg/kg を Alzet Osmotic Minipump を用いて約7日間かけて持続皮下投与することにより作成した。APA5、APB5 は1週間に2回、500 μ g ずつ腹腔内投与した。28日目にマウスを sacrifice し、HE 染色による組織学的な線維化の評価 (Ashcroft score) を行った。

結 果

フローサイトメトリーによる解析から、C57BL/6 由来および CCL-206 マウス肺線維芽細胞には、PDGFR- α 、 β が同等に発現していた (図1)。一方、PDGF-AA、BB (10ng/ml) はそれぞれ PDGFR- α 、 β のリン酸化を誘導し、APA5 および APB5 (10 μ g/ml) は、PDGFR- α 、 β のリン酸化を抑制した (図2)。次に、マウス肺線維芽細胞の PDGF-AA、BB (10ng/ml) による増殖作用に対する APA5、APB5 の効果を検討したところ、APA5、APB5 はそれぞれ特異的に PDGF-AA および BB による肺線維芽細胞の増殖を抑制した。APB5 は APA5 より強く、容量依存的な抑制効果を示した (図3)。最後に、プレオマイシン誘発肺線維症モデルを用いて、APA5 および APB5 の抗線維化効果を検討した。肺線維症は、APB5 の投与で有意に抑制されたが、APA5 には抑制効果を認めなかった (図4、5)。

考 察

胎生期における PDGF の役割には違いがあり、PDGF-AA をノックアウトしたマウスでは肺気腫様の変化が生じるが、PDGF-BB のノックアウトマウスでは肺形成に及ぼす効果は報告されていない⁶⁾。また、ヒト線維化肺で肺胞上皮細胞に PDGFR- α が優位に発現しているという報告があり、肺胞上皮障害の修復過程に PDGFR- α が関与している可能性がある⁶⁾。以上から、PDGFR- α と PDGFR- β では、肺線維症において異なる役割を果たしている可能性がある。従って、PDGFR- α の阻害は、肺修復に影響を及ぼす可能性があり、PDGFR を標的とした抗線維化療法を考慮する場合、PDGFR- β のみを抑制するアプローチがより有効である可能性もある。

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
呼吸器・膠原病内科学分野

* 研究分担者