

肺線維症における CCN6/WISP3 の役割

西岡 安彦* Batmunkh Rentsenkhand 青野 純典 東 桃代
木下 勝弘 岸 昌美 曾根 三郎

CCN(CYR61, CTGF, NOV)ファミリーにはこれまで6種類の分子が同定されており、その中でもCTGFはTGF- β によって発現誘導される分子として肺線維化における役割が検討されてきた。一方、肺線維化と他のCCNファミリー分子の関係は明らかではない。今回我々はCCN6/WISP3の肺線維化における役割について検討した。その結果、CCN6/WISP3は肺線維芽細胞に対する増殖刺激作用を示した。抗CD29(β 1インテグリン)抗体によりCCN6/WISP3による線維芽細胞増殖刺激効果が部分的に阻害された。一方、CCN6/WISP3には肺線維芽細胞に対するcollagen Iおよびfibronectin産生刺激作用を認めなかった。ブレオマイシン(BLM)肺線維症モデルでは、BLM投与後7~14日目にCCN6/WISP3の発現増加がみられた。以上から、CCN6/WISP3は肺線維化早期において、肺線維芽細胞の増殖刺激作用を介して肺線維化に関与している可能性が示唆された。

Role of CCN6/WISP3 in pulmonary fibrosis

Yasuhiko Nishioka, Batmunkh Rentsenkhand, Yoshinori Aono, Momoyo Azuma,
Katsuhiko Kinoshita, Masami Kishi, and Saburo Sone

*Department of Respiratory Medicine and Rheumatology, Institute of Health Biosciences,
The University of Tokushima Graduate School, Japan*

The CCN (CYR61, CTGF, NOV) family is a group of six secreted proteins that specifically associate with the extracellular matrix. Among them, CTGF is reported to be induced by TGF- β 1, and the role of CTGF in pulmonary fibrosis has been under investigation. Meanwhile, the relationship between other CCN family and pulmonary fibrosis is not fully understood. We investigated the role of CCN6/WISP3 in pulmonary fibrosis. CCN6/WISP3 significantly stimulated the proliferation of mouse lung fibroblasts such as C57BL/6 and Mlg, and that the effects were partially inhibited by the anti-CD29 (β 1 integrin) antibody. On the other hand, production of collagen I and fibronectin was not stimulated by CCN6/WISP3. In the bleomycin lung fibrosis model, the expression of CCN6/WISP3 in the lungs was increased from day 7 to 14 days after instillation of bleomycin. These data suggest that CCN6/WISP3 might have a key role in lung fibrosis through a stimulatory effect on the proliferation of fibroblasts in the early phase of lung fibrosis.

はじめに

特発性肺線維症(IPF)は、原因不明の慢性進行性肺線維化疾患であり、未だ生命予後を延長する治療法は確立されておらず新規治療法の開発が急務となっている¹⁾。一方CCN(CYR61, CTGF, NOV)ファミリーは1990年代に発見されたシステインを豊富に含むタンパク質群で、細胞の分裂、接着、アポトーシスなどに深く関与することがこれまで知られている²⁾。CCNファミリーにはCCN1/CYR61, CCN2/CTGF, CCN3/NOV, CCN4/WISP1, CCN5/WISP2, CCN6/WISP3の6つの分子が同定されているが、中でもCCN2/CTGFがIPF患者のII型肺胞上皮細胞、筋線維芽細胞に発現しているという報告^{3,4)}や、マウスのプレオマイシン肺線維症モデルにおいてCCN2/CTGFのmRNAが発現しているという報告⁵⁾から、肺線維化との関連が検討されてきた。CCN2/CTGFは、TGF- β によって発現誘導される分子であり、直接肺線維芽細胞の筋線維芽細胞への分化やコラーゲン産生刺激作用を有する⁶⁾。さらに、肺においてウイルスベクターを用いて強制発現させると、一過性の線維化を生じることも報告されている⁷⁾。

しかしながら、肺線維化と他のCCNファミリー分子の関係については未だ十分な解明がなされていない。そこで我々はCCN6/WISP3を中心に、肺線維化においてCCNファミリーが果たす役割について検討を行った。

方 法

CCN1～6のレコンビナント蛋白(PeproTech EC Ltd., UK)を使用し、C57BL/6マウスから樹立した肺線維芽細胞株とMlg(マウス正常肺線維芽細胞株—ATCCより購入)を用いて、³H-TdR取り込み試験により細胞増殖を検討した。また、マウスインテグリンに対する抗体(Chemicon Inc., USA)を用いて肺線維芽細胞でのインテグリンの発現をflow cytometryにて評価した。Collagen及びfibronectin産生はreal-time RT-PCRを用いて評価した。FAK[Y397]のリン酸化は、抗FAK抗体(BD Transduction Lab., USA)および抗FAK[pY397]抗体(Invitrogen, USA)を用いたWestern blottingにて評価した。さらに、in vivoにおけるCCN6/WISP3発現を確認するため、マウス肺線維症モデルの肺組織を検討した。肺線維症モデルは

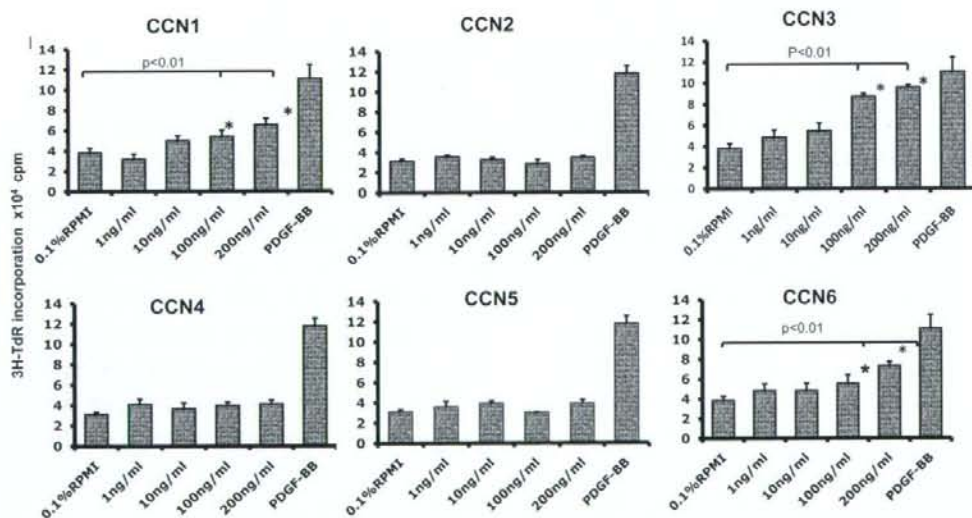


図1 CCNファミリーがマウス肺線維芽細胞株(C57BL/6)の増殖に及ぼす影響
C57BL/6マウスより作成した肺線維芽細胞株を用いて³H-TdR(1 μ Ci/well)を18時間パルスし、増殖能を測定した。CCN1, CCN3, CCN6は濃度依存的にC57BL/6線維芽細胞の増殖を刺激した。

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

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究分担者

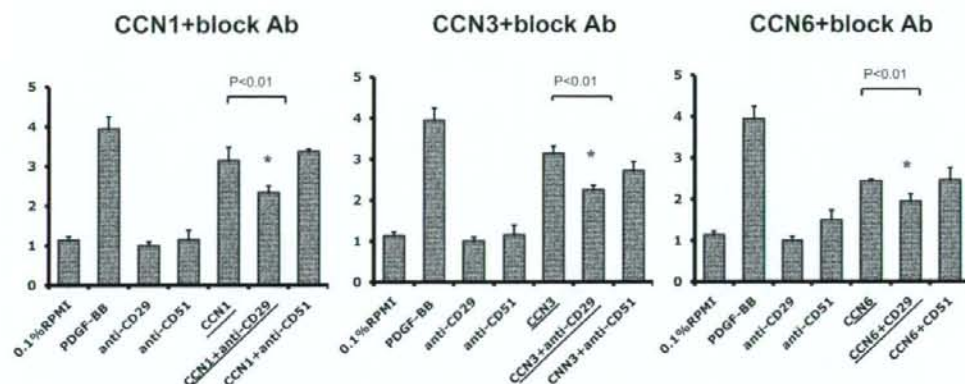


図2 CCN1, CCN3, CCN6によるマウス肺線維芽細胞の増殖刺激効果に及ぼす抗CD29抗体の影響
C57BL/6マウスより作成した肺線維芽細胞株を用いて、PDGF-BB (10 ng/ml)で72時間刺激後 $^3\text{H-TdR}$ (1 $\mu\text{Ci}/\text{well}$)を18時間パルスし、増殖能を測定した。その結果、抗CD29抗体の添加によりCCN1, CCN3, CCN6の線維芽細胞増殖抑制効果は有意に減弱された。

8週齢のC57/BL6マウスにブレオマイシン(bleomycin: BLM)125mg/kgをAlzet mini-osmotic pumpを用いて約7日間かけて持続皮下投与することにより作成し、肺組織内でのCCN6/WISP3発現の経時的な変化をWestern blottingで検討した。

結果

CCN1, CCN3, CCN6は濃度依存的にC57BL/6マウス肺線維芽細胞株の増殖を刺激することが確認された(図1)。一方、CCN2, CCN4, CCN5には肺線維芽細胞増殖刺激作用は認められなかった。次にflow cytometryにてC57BL/6とMlgマウス肺線維芽細胞におけるインテグリン発現を検討したところ、両線維芽細胞において $\beta 1$, $\alpha \nu$, $\alpha 6$, $\alpha 5\beta 1$ インテグリンが発現していることを確認した(data not shown)。そこで、インテグリンの阻害抗体を用いてCCN1, CCN3, CCN6による増殖刺激の阻害効果を検討したところ、抗CD29抗体を加えることによりCCN1, CCN3, CCN6によって誘導される肺線維芽細胞の増殖が部分的に阻害されることを $^3\text{H-TdR}$ 取り込み試験で確認した(図2)。従ってCCN1, CCN3, CCN6はインテグリン $\beta 1$ を介して線維芽細胞に作用していることが推測された。さらにインテグリン下流のシグナル伝達経路について検討したところ、CCN6刺激によりFAKのY397のリン酸化が誘導されることが明らかとなった。以上の結果から、CCN1, CCN3, CCN6による増殖刺激は $\beta 1$ インテグリン-FAKの系を介して起こっていると考えら

れた。

続いてCCN6が肺線維芽細胞のcollagen Iやfibronectin産生を増加させるかどうかについてreal-time RT-PCRを用いて検討を行った。陽性コントロールとしてTGF- $\beta 1$ を用いたが、TGF- $\beta 1$ は経時的にcollagen Iとfibronectinの産生を刺激する一方で、CCN6には同様の効果を認めなかった(図3)。

次にマウスBLM肺線維症モデルの肺内におけるCCN6/WISP3の発現について経時的な検討を行ったところ、BLM投与後7~14日目にCCN6/WISP3の発現増加がみられた(図4)。以上からCCN6/WISP3は肺線維化早期において、肺線維芽細胞の増殖刺激作用を介して肺線維化に関与している可能性が示唆された。

考察

今回我々は各種CCNファミリーの肺線維芽細胞への作用を検討した。その結果、*in vitro*においてCCN1, CCN3, CCN6はマウス肺線維芽細胞の増殖を刺激したが、CCN2, CCN4, CCN5には増殖刺激作用が認められなかった。一方、これまでの報告からCCN2は肺線維芽細胞のコラーゲン産生を増強することが報告されているが、今回検討したCCN6においてはこのような作用は認められなかった。以上の結果は、CCN分子によって線維化に及ぼす効果が異なる可能性を示唆している。CCN1, CCN3, CCN6による肺線維芽細胞の増殖は、 $\beta 1$ インテグリンに対する抗体で阻害され、さらにCCN6刺激は

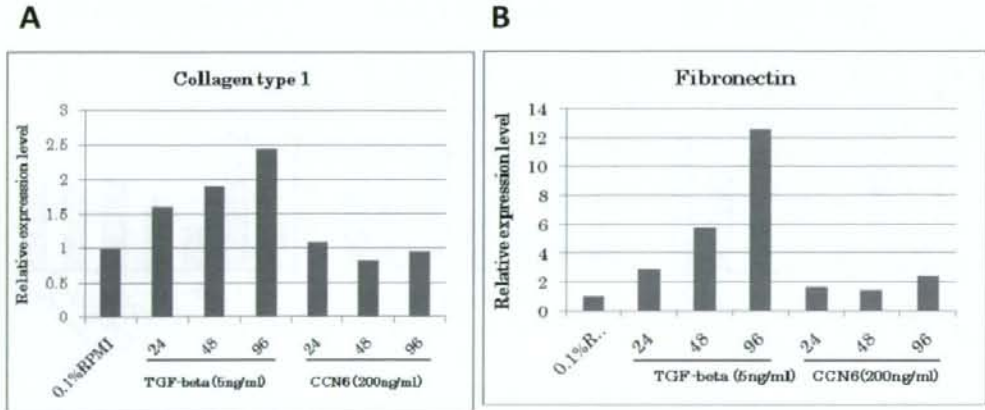


図3 CCN6がcollagenI及びfibronectin産生に及ぼす影響
TGFβ(5ng/ml)とCCN6(200ng/ml)下で培養したC57BL/6マウス肺線維芽細胞を用い、real-time RT-PCRでcollagen I(3A)とfibronectin(3B)産生量の検討を行った。TGF-β1は経時的にcollagenIとfibronectinの産生を刺激する一方で、CCN6には同様の効果を認めなかった。

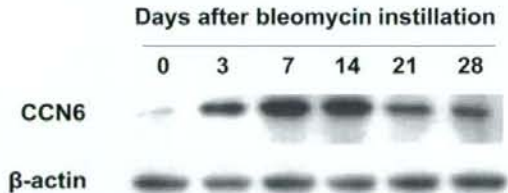


図4 マウスBLM肺線維症モデル肺におけるCCN6/WISP3の発現
マウス肺線維症モデルの肺homogenateを用い、Western blottingにて経時的なCCN6/WISP3の発現について検討を行ったところ、BLM投与後7～14日目にCCN6/WISP3の発現増加がみられた。

FAKのリン酸化を誘導したことから、CCN6は、少なくともインテグリン-FAKのシグナル伝達経路を介して線維芽細胞に作用していることが明らかとなった。一方、BLM肺線維症モデルでは、CCN6はBLM投与後7～14日において発現増強が認められることから、CCN6は肺線維化早期の線維症進展に関わっている可能性があり、発症早期の治療薬開発の上でkey moleculeとなり得ると考えられた。

参考文献

- 1) 西岡安彦, 曾根三郎. 特発性肺線維症. 別冊日本臨床 呼吸器症候群第2版, 日本臨床社, 大阪, pp416-420, 2008.
- 2) Brigstock DR. The CCN family: a new stimulus

package. *J Endocrinol* 2003;178: 169-175.

- 3) Pan L-H, Yamauchi K, Uzuki M et al. Type II alveolar epithelial cells and interstitial fibroblasts express connective tissue growth factor in IPF. *Eur Respir J* 2001;17:1220-1227.
- 4) Allen JT, Knight RA, Bloor CA et al. Enhanced Insulin-Like growth factor binding protein-related protein 2 (connective tissue growth factor) expression in patients with idiopathic pulmonary fibrosis and pulmonary sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1999;21:693-700.
- 5) Lasky JA, Ortiz LA, Tonthat B, et al. Connective tissue growth factor mRNA expression is upregulated in bleomycin-induced lung fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 1998;275:365-371.
- 6) Frazier K, Williams S, Kothapalli D, et al. Stimulation of fibroblast cell growth, matrix production, and granulation tissue formation by connective tissue growth factor. *J Invest Dermatol*. 1996; 107, 404-411.
- 7) Bonniaud P, Margetts PJ, Kolb M et al. Adenoviral gene transfer of connective tissue growth factor in the lung induces transient fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168: 770-778.

間質性肺炎における syndecan-4 の役割

谷野 功典 王 新涛 猪腰 弥生 仲川奈緒子
斉藤 香恵 石井 妙子 佐藤 俊 福原 敦朗
二階堂雄文 斉藤 純平 石田 卓 棟方 充*

Syndecan はヘパラン硫酸プロテオグリカンのひとつで、他のプロテオグリカンと同様、炎症や組織の修復に重要な役割を果たしている。これまで我々は、syndecan-4 は間質性肺炎において上皮細胞やマクロファージに強く発現していることを報告しているが、その役割についてはまだよく知られていない。そこで、間質性肺炎患者の血清・気管支肺胞洗浄 (BAL) 液中の syndecan-4 を測定し、健常者と比較。次に、間質性肺炎における血液中パラメーター、BAL 液細胞分画、呼吸機能検査値との関連を比較検討した。更に、IPF 急性増悪を含む ARDS/ALI 患者の血清・BAL 液中 syndecan-4 濃度を検討した。Syndecan-4 は、BAL 液中で間質性肺炎において健常者より高値であったが、血清では差はみられなかった。BAL 液中の syndecan-4 はリンパ球比率と正の相関を認めたが、血清 syndecan-4 は血液中パラメーター、BAL 液中細胞分画、呼吸機能検査値のいずれとも関連はみられなかった。また、IPF 急性増悪を含む ARDS/ALI では、血清、BAL 液中ともに syndecan-4 は健常者、間質性肺炎患者より高値を示した。以上の結果より、syndecan-4 は間質性肺炎の BAL 液中で上昇し、肺へのリンパ球遊走などの病態に関与していることが示唆された。

Role of Syndecan-4 in Interstitial Pneumonia

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

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

Syndecan-4 is a heparan sulfate proteoglycan which has been reported to play important roles in regulating inflammation and tissue repair processes. To determine if syndecan-4 plays an important role in the pathogenesis of interstitial pneumonia (IP), we first measured the concentrations of syndecan-4 in serum and BAL fluid of patients with IP and healthy volunteers (HV). Next, we compared the concentrations of syndecan-4 in serum and BAL fluid with several clinical parameters in patients with IP. At last, the concentrations of syndecan-4 in serum and BAL fluid were measured in patients with ALI/ARDS including acute exacerbation of IPF, and compared to patients with IP and HV. The concentration of syndecan-4 in BAL fluid was significantly higher in patients with IP than in HV. Syndecan-4 in BAL fluid had significant correlation with % lymphocyte in BAL fluid in patients with IP. On the other hand, there was no difference in serum syndecan-4 between HV and patients with IP. In patients with ALI/ARDS, the concentrations of syndecan-4 in serum and BAL fluid were significantly higher than HV and patients with IP. Taken together, we conclude that syndecan-4 is involved in the recruitment of inflammatory cells into the lungs, and regulates inflammatory responses in IP lungs.

はじめに

Syndecanはヘパラン硫酸プロテオグリカンのひとつで、ヒトではsyndecan-1から-4の4つのisoformがあることが知られている。これらsyndecanは、細胞表面に発現していることが知られ、isoformにより発現細胞が違い、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、syndecan-4は種々の細胞に発現している¹⁾。これまで、我々は間質性肺炎においてsyndecan-4が上皮細胞や肺胞マクロファージに強く発現していることを報告し²⁾、syndecan-4が間質性肺炎の病態に関与していることが示唆された。Syndecanなどのプロテオグリカンは細胞外マトリックスの構成成分であるが、近年、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。Syndecan-4は、これまでに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が報告され³⁾、肺の炎症へ関与していることが示唆されている。

本研究において、我々はsyndecan-4の間質性肺炎における役割を検討するために、血清・BAL液を用い健常者と比較、更に、間質性肺炎における臨床パラメーターと比較検討した。

方 法

当科に入院した間質性肺炎患者を特発性肺線維症(IPF)、IPF以外の特発性間質性肺炎(IIP)と膠原病に伴う間質性肺炎(CVD-IP)の3群に分け(Table)、血清とBAL液中のsyndecan-4濃度を測定し、健常者と比較した。次に、間質性肺炎患者の血清・BAL液中syndecan-4濃度と血液中パラメーター、BAL液細胞分画、呼吸機能検査値との関連を比較検討した。更に、IPF急性増悪を含むARDS/ALI患者の血清・BAL液中syndecan-4濃度を検討した。

Table Clinical Data of Patients with IP

	Healthy	IP	IPF	IIP	CVD-IP	P value (Among IP)
Subjects (n)	32	53	26	12	11	
Age (yrs)	56.8 \pm 1.6	65.3 \pm 1.1	65.3 \pm 1.5	66.8 \pm 2.7	63.7 \pm 2.1	NS
Gender (M/F)	18/13	32/21	21/5	6/6	1/10 [†]	P < 0.05
WBC (/ μ L)	N/A	79634 \pm 427	7530 \pm 304	8350 \pm 727	8464 \pm 1565	NS
CRP (mg/dl)	N/A	0.8 \pm 0.2	0.5 \pm 0.2	0.9 \pm 0.3	1.6 \pm 0.6	NS
ESR (mm/hr)	N/A	32 \pm 3	37 \pm 4	38 \pm 8	48 \pm 11	NS
LDH (U/ml)	N/A	251 \pm 11	247 \pm 11	256 \pm 27	238 \pm 27	NS
KL-6 (U/ml)	N/A	1593 \pm 237	1575 \pm 178	1589 \pm 502	1515 \pm 248	NS
SP-A (ng/ml)	N/A	109.2 \pm 14.6	98.5 \pm 9.5	104.6 \pm 22.3	72.3 \pm 9.5	NS
SP-D (ng/ml)	N/A	262.1 \pm 41.8	232.7 \pm 24.1	192.6 \pm 35.1	214.5 \pm 38.9	NS

Patients with CVD-IP include rheumatoid arthritis (n=1), polymyositis (n=1), polymyositis (n=1), primary Sjögren syndrome (n=4), scleroderma (n=2), and secondary Sjögren syndrome associated with scleroderma (2).

* P < 0.05 vs IPF group, † P < 0.05 vs IIP group

福島県立医科大学呼吸器内科

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究分担者

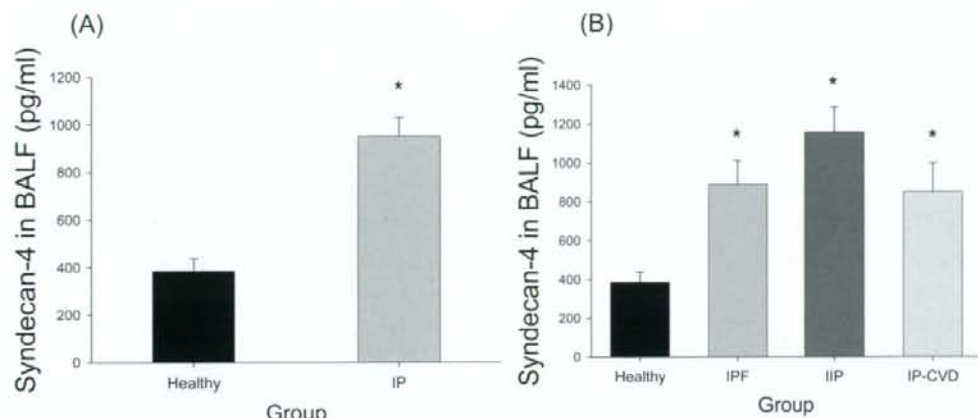


Figure 2 Syndecan-4 in BAL fluid from Patients with Interstitial Pneumonia (IP). (A) Syndecan-4 in BAL fluid is significantly higher in patients with IP than healthy volunteers (Healthy). (B) Syndecan-4 in BAL fluid is significantly higher in patients with IPF, IIP and IP-CVD compared with Healthy. There is no difference in syndecan-4 in BAL fluid among three types of IP (IPF, IIP and IP-CVD). * $p < 0.05$ vs Healthy.

結 果

Syndecan-4は、BAL液中で間質性肺炎において健常者より高値であったが、間質性肺炎の3群では差がみられなかった (Figure)。血清では間質性肺炎と健常者に差はみられなかった (1.42 ± 0.88 vs 1.38 ± 1.00 ng/ml, NS)。BAL液中では、syndecan-4はリンパ球比率と正の相関 ($r = 0.361$, $p < 0.05$) を認めたが、血清syndecan-4は血液中パラメーター、BAL液中細胞分画、呼吸機能検査値のいずれとも関連はみられなかった。IPF急性増悪を含むARDS/ALIでは、血清 (1.42 ± 0.88 vs 3.90 ± 0.68 ng/ml, $p < 0.05$)、BAL液中 (385.3 ± 53.0 vs 372.8 ± 833.9 pg/ml, $p < 0.05$) ともにsyndecan-4は健常者より高値を示した。

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が間質性肺炎のBAL液中で健常者より高値を示し、BAL液中リンパ球比率と正の相関があること、また、IPF急性増悪を含むARDS/ALIでは血清およびBAL液中でsyndecan-4が上昇していることを示し、間質性肺炎においてsyndecan-4が、肺へのリンパ球遊走などの病態に関与している可能性を示した。

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, IPF, 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^{4,6)}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⁸⁾、また、メディエーターのoligomerizationに関与したり⁷⁾、proteolysisから保護することにより作用を増強する⁹⁾と考えられている。また、syndecan-4はそのコア蛋白を介してPKC α の活性化に関与していると報告され⁹⁾、コア蛋白自体にも生物学的活性があることも示唆されている。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¹⁰⁾。

今回、測定した血清・BAL液中syndecan-4は可溶性syndecan-4であり、我々の以前の検討では間質性肺炎の肺組織に対する免疫染色で、上皮細胞と肺胞マクロファージにsyndecan-4の強い発現が認めら

れていることより、間質性肺炎においては、膜型と可溶性の両方のsyndecan-4が肺内で増加していることが示された。今回の検討では、BAL液中の可溶性syndecan-4がBAL液中リンパ球比率を正の相関を示していることから、可溶性のsyndecan-4は肺へのリンパ球などの炎症細胞の遊走に関与することによって、炎症反応を調節していることが推察された。

以上の結果から、syndecanは、間質性肺炎における炎症・修復反応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、間質性肺炎に対する治療に有用であると考えられる。

参考文献

- 1) Fears CY, Woods A : The role of syndecans in disease and wound healing. *Matrix Biol* 2006 ; 25 : 443-56.
- 2) 谷野功典, 王新涛, 佐藤俊, 他 : 厚生労働科学研究「特発性肺線維症の予後改善を目指したサイクロスポリン+ステロイド療法ならびにNアセチルシステイン吸入療法に関する臨床研究」班平成19年度研究報告書 2007 : 125-128.
- 3) Ishiguro K, Kadomatsu K, Kojima T, et al : Syndecan-4 deficiency leads to high mortality of lipopolysaccharide-injected mice. *J Biol Chem* 2001 ; 276 : 47483-47488.
- 4) Bensadoun ES, Burke AK, Hogg JC, et al : Proteoglycan deposition in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996 ; 154 : 1819-1828.
- 5) Bensadoun ES, Burke AK, Hogg JC, et al : Proteoglycans in granulomatous lung diseases. *Eur Respir J* 1997 ; 10 : 2731-2737.
- 6) Nugent MA, Edelman ER : Kinetics of basic fibroblast growth factor binding to its receptor and heparan sulfate proteoglycan: A mechanism for cooperativity. *Biochemistry*. 1992 ; 31 : 8876-8883.
- 7) Frevert CW, Goodman RB, Kinsella MG, et al : Tissue-specific mechanisms control the retention of IL-8 in lungs and skin. *J Immunol* 2002 ; 168 : 3550-3556.
- 8) Saksela, O, Moscatelli D, Sommer A, et al : Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J Cell Biol* 1988 ; 107 : 743-751.
- 9) Oh ES, Woods A, Couchman JR, et al : Syndecan-4 proteoglycan regulates the distribution and activity of protein kinase C. *J Biol Chem* 1997 ; 272 : 8133-8136.
- 10) Fitzgerald ML, Wang Z, Park PW, 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* 2000 ; 148 : 811-824.

TGF- β による肺上皮細胞老化とその影響

荒屋 潤¹ 皆川 俊介¹ 沼田 尊功¹ 野尻さと子¹
弓野 陽子¹ 小島 淳¹ 濱田 直樹¹ 木下 陽¹
河石 真¹ 野元 吉二¹ 中山 勝敏¹ Stephen L. Nishimura² 桑野 和善^{1*}

特発性肺線維症(IPF)は加齢によりその頻度が増加し、細胞老化がその病態に関与する可能性がある。事実細胞老化の指標である telomere 長が IPF 患者で短縮していることが報告されている。transforming growth factor (TGF)- β は多機能サイトカインであり、線維化病態進展の中心的役割を果たすが、上皮細胞に対しては replicative 及び premature の老化促進作用も併せ持つ。近年哺乳類において寿命延長に関わりうる因子として sirtuin family (SIRT1-7) が同定され、そのうち SIRT6 が telomere の代謝と機能を調整する事が報告された。そこで我々は TGF- β の上皮細胞老化に及ぼす影響を SIRT6 の関与の点から検討を行った。TGF- β は気道上皮細胞に細胞老化 (senescence associated (SA) β -gal 染色, propidium iodide (PI) 染色) を誘導した。発現ベクターによる SIRT6 高発現は TGF- β による細胞老化を抑制した。また逆に siRNA による SIRT6 ノックダウンは細胞老化を亢進させた。TGF- β により誘導された老化上皮細胞培養液は線維芽細胞における α v β 8 インテグリンの発現を亢進させた。TGF- β による上皮細胞老化が epithelial-mesenchymal interaction の点から IPF 病態に関与し、SIRT6 がその制御にかかわる可能性が示唆された。

TGF- β -induced lung epithelial cell senescence

Jun Araya¹, Shunsuke Minagawa¹, Takanori Numata¹, Satoko Nojiri¹, Yoko Yumino¹,
Jun Kojima¹, Naoki Hamada¹, Akira Kinoshita¹, Makoto Kawaishi¹, Yoshitsugu Nomoto¹,
Katsutoshi Nakayama¹, Stephen L. Nishimura², and Kazuyoshi Kuwano¹

¹Division of Respiratory medicine, Department of Internal medicine, The Jikei University School of Medicine

²Department of Pathology, University of California, San Francisco

Aging is an important risk factor for the development of IPF and the involvement of cellular senescence in the pathogenesis of fibrosis progression has been postulated. Indeed, telomere shortening, a feature of replicative cellular senescence, has been demonstrated in IPF cases. The multifunctional cytokine TGF- β has been widely implicated as a profibrotic regulatory factor in lung pathology, and also implicated in the induction of premature and replicative cellular senescence in epithelial cells linked to telomerase transcriptional suppression. Some mammalian Sir2 homologs (SIRT family) are known as potential regulators of life span and cellular senescence, and SIRT6 has been identified as a nuclear, chromatin-associated protein that modulates telomere function by its ability to deacetylate histones. Therefore, we investigated the effect of TGF- β on human bronchial epithelial cell (HBEC) senescence induction in association with SIRT6 expression. TGF- β induced HBEC senescence was determined by senescence-associated (SA) β -gal staining and flowcytometric cell cycle analysis with propidium iodide staining. Overexpression of SIRT6 protein with plasmid vector transfection reduced TGF- β induced cellular senescence, conversely, knock down with SIRT6 siRNA increased senescent cell count. Conditioned medium of senescent HBEC enhanced β 8 integrin expression in lung fibroblasts. These data suggests the involvement of TGF- β induced epithelial cell senescence in IPF pathogenesis in terms of epithelial-mesenchymal interaction and the regulatory role of SIRT6 in accelerated cellular senescence by TGF- β .

(はじめに)

老化とはすべての生物に加齢に伴い起こる不可逆性変化である。一般的に細胞老化は、細胞分裂によるテロメア長の短縮により増殖が制限される結果起こる replicative senescence と、酸化ストレスや過度の増殖刺激などにより誘導される stress-induced premature senescence とに大きく分けられる¹⁾。ただ酸化ストレスが細胞分裂と無関係にテロメア長を短縮する事も知られており²⁾、そのクロストークが伺える。代表的呼吸器疾患の COPD, IPF などは加齢とともにその頻度が増加する老化関連肺疾患といえる。事実 IPF は 50 歳以上の患者に多く、加齢はその発症の最も重要なリスクファクターの一つとされている³⁾。老化細胞は、不可逆性の細胞増殖の停止、アポトーシスへの抵抗性を示し、さらには種々の炎症性サイトカインや growth factor を分泌する事が知られており、正常な治癒過程の遅延や、炎症惹起などにより種々の病態への関与が考えられている。

多機能サイトカインである transforming growth factor (TGF)- β はパラクライン、オートクラインファクターとして作用して、肺の発生においてだけでなく、創傷治癒、線維化病変の形成に重要な役割を果たしており、事実 IPF では、その線維化進展において中心的役割を果たすと考えられている⁴⁾。TGF- β は肺の様々な細胞で産生され、また間質にも豊富に存在しているが、基本的に不活性化型であり、その作用発現には種々のメカニズムによる活性化が必須のステップである。我々はインテグリンによる TGF- β 活性化が生理的また呼吸器病態に非常に重要な機序であることを報告してきた⁵⁾。TGF- β は上皮細胞に対して replicative 及び premature senescence を誘導する事が知られており、さらに TGF- β がその細胞内 signal transducer protein である Smad3 を介して telomerase のコンポーネントである human telomerase reverse transcriptase (hTERT) 発現を抑制することが報告されている⁶⁾。近年 IPF の病態とテロメア機能との関連性が示唆されており、家族歴のある IPF 患者の 8-15% に telomerase コンポーネントの hTERT

及び hTR の遺伝子異常があり⁷⁾、さらにテロメア長の短縮が IPF の危険因子である事が報告された⁸⁾。これらの事は TGF- β がテロメア機能制御を介して上皮細胞の老化及び IPF 病態に関与している可能性を示唆している。

近年酵母の寿命延長に関わる因子として silent information regulator 2 (Sir2) 遺伝子が同定され、哺乳類にも sirtuin family (SIRT1-7) として存在する事が示された。sirtuin family は NAD 依存性 histone deacetylase (HDAC) であり、histone 及び p53 や NF- κ B など転写因子の脱アセチル化により代謝、炎症、老化などの細胞機能を調整している⁹⁾。SIRT1,6 のノックアウトマウスにおいて炎症や早老の表現型が認められており、COPD 患者由来肺組織での SIRT1 の発現低下と炎症との関連性が明らかにされ、呼吸器病態への関与が示唆された¹⁰⁾。SIRT6 には活性酸素 (ROS) による DNA 傷害を修復する base excision repair (BER) 活性があり¹¹⁾、replicative senescence の制御機構である telomere の代謝と機能調整をする事がさらに報告された¹²⁾。しかしながら IPF 含め肺の病態における SIRT6 の役割はこれまで明らかになっていない。

今回我々は TGF- β が肺上皮細胞に細胞老化を誘導し、その老化が SIRT6 により制御されている可能性。また老化上皮細胞が上皮-間葉系細胞相互作用の観点から線維化進展に影響を与えている可能性を考え検討を行った。

(対象と方法)

東京慈恵会医科大学において施行された、肺癌手術検体の癌進展の認められない気道と肺の一部を使用した。(学内倫理委員会承認済み)

細胞培養分離: 肺癌手術検体の肺実質正常部位を約 1~2mm 程度の組織片とし、培養プレート上で培養液とともに培養した。約 2 週間程度で線維芽細胞の増殖が認められ、細胞は 10% FCS を含む DMEM にて培養した。

気道上皮細胞は肺癌手術検体の気管支より、蛋白分解酵素処理により分離した。分離した上皮細胞は 10 μ g/ml の type I collagen でコートした培養プレート上で bronchial epithelial growth medium (BEGM) にて継体培養した。

¹⁾ 東京慈恵会医科大学呼吸器内科

²⁾ University of California, San Francisco

³⁾ びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

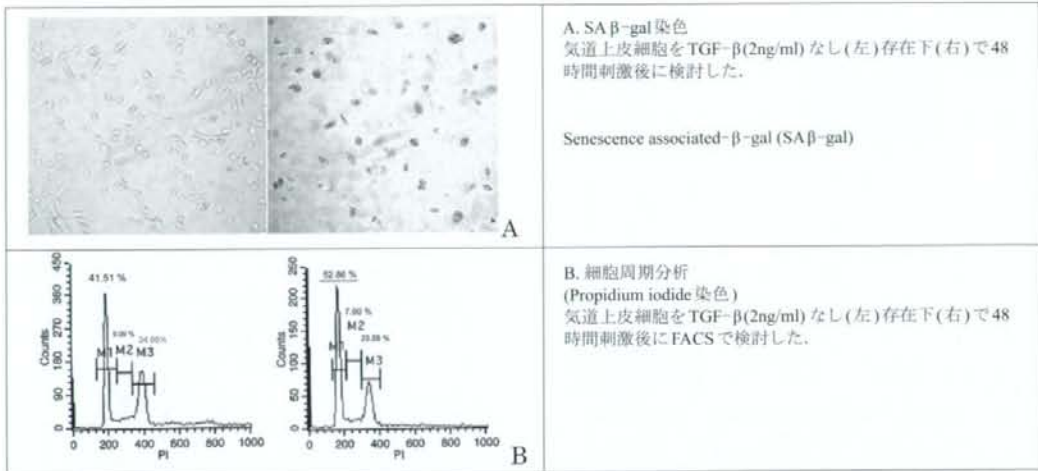


図1 TGF- β による気道上皮細胞老化誘導

発現遺伝子導入と siRNA による knock down : SIRT6 wild type 発現プラスミド (Chua KF Stanford 大学より供与) 及び SIRT6 siRNA (Ambion) を Amaxa Neucleofector system を使用し遺伝子導入した。

遺伝子発現 : semiquantitative RT-PCR により半定量的に行った。

蛋白発現 : Western blotting 法及び flow cytometry 法により検討した。

細胞周期検討 : propidium iodide (PI) 染色による DNA 含量の検討により行った。(flow cytometry 法)

細胞老化の検討 : senescence associated (SA) β -gal (β -galactosidase staining kit: Biovision Research Products) 染色で検討した。

(結 果)

1. TGF- β は気道上皮細胞に細胞老化を誘導する。

正常気道から分離培養した気道上皮細胞を TGF- β (2ng/ml) で48時間刺激後に細胞老化を SA β -gal 染色により検討した。TGF- β は約50%の細胞に老化を誘導した(図1-A)。同時にPI染色により細胞周期分析を行ったところG1/G0期の細胞分画が41.51%から52.86%に増加しgrowth arrestをきたしていると考えられた(図1-B)。

2. SIRT6はTGF- β による気道上皮細胞老化を制御する。

wild type SIRT6 発現プラスミド及び SIRT6 siRNA を遺伝子導入し SIRT6 発現への影響を検討した結

果、それぞれ効率よく発現が誘導または knock down された(図2-A)。さらにこれらの細胞で TGF- β (2ng/ml) 48時間刺激後に細胞老化を検討した。SIRT6 高発現細胞では TGF- β による老化誘導が抑制され、また knock down 細胞では老化がさらに亢進する傾向を認めた(図2-B)。

3. TGF- β により老化が誘導された気道上皮細胞は線維芽細胞 β 8インテグリン発現を亢進させる。

気道上皮細胞培養液(48時間培養)で線維芽細胞を刺激(48時間)したところ、線維芽細胞 β 8インテグリン発現を亢進させた。TGF- β により老化が誘導された気道上皮細胞培養液はより強く線維芽細胞 β 8インテグリン発現を誘導した。抗TGF- β 抗体存在下で培養した気道上皮細胞培養液ではその効果を認めなかった(図3)。

(考 察)

TGF- β が気道上皮細胞に細胞老化を誘導し、老化が誘導された気道上皮細胞培養液は強く線維芽細胞 β 8インテグリン発現を亢進させた。我々は線維芽細胞 β 8インテグリンが効率よくTGF- β を活性化しオートクライン又はパラクラインファクターとして呼吸器病態に関与する可能性を報告してきた⁹⁾。オートクライン作用としては筋線維芽細胞の誘導、パラクラインファクターとしては気道上皮細胞 phenotype の制御である。TGF- β の上皮細胞に対する影響としてはアポトーシスや細胞増殖停

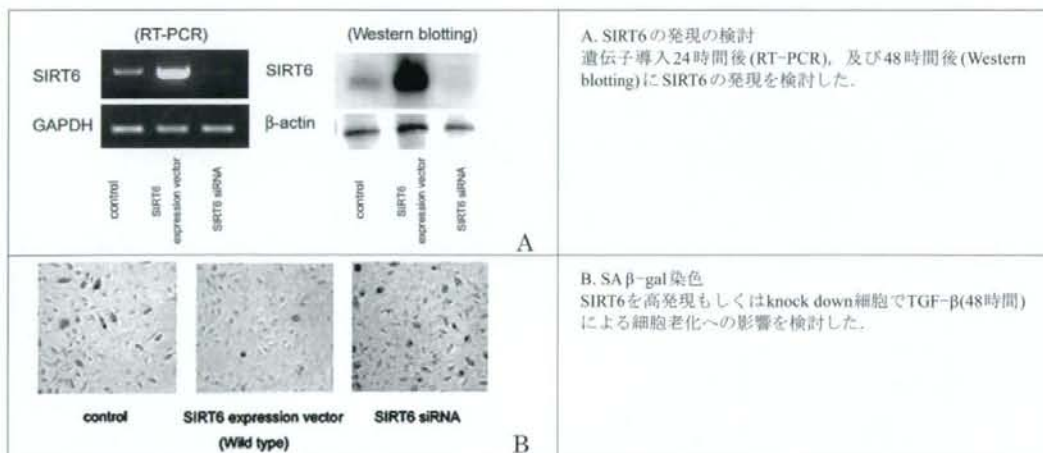


図2 SIRT6によるTGF- β 誘導気道上皮細胞老化の制御

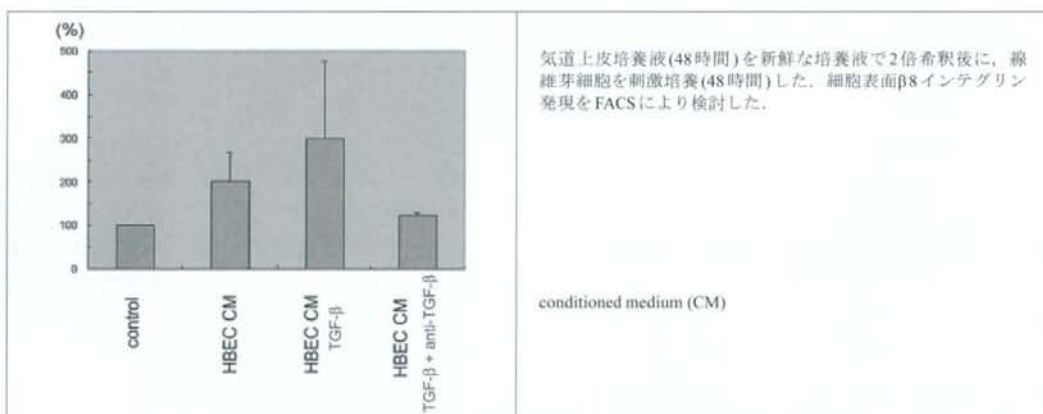


図3 TGF- β 老化誘導気道上皮細胞による線維芽細胞 β 8インテグリン発現亢進

止だけでなく, epithelial-mesenchymal transition や squamous metaplasia などへの関与が報告されている。本検討結果はさらに上皮細胞に対する老化促進作用が, 老化上皮細胞からの何らかのパラクラインファクター産生を介して線維芽細胞 β 8インテグリン発現を亢進させ, 線維化病態に関与している可能性を示唆するものである。現在老化が誘導された気道上皮細胞から分泌される種々のサイトカインに関して, 線維芽細胞 β 8インテグリン発現誘導の観点から検討中である。

sirtuin familyの呼吸器病態への関与はほとんど明らかとなっていないが, 今回新たにSIRT6が, TGF- β による気道上皮細胞老化誘導を制御している可能性が示唆された。SIRT6とTGF- β がそれぞれテロメア機能に関与し, IPF病態にテロメアが関与す

る可能性が報告されている点からは非常に興味深い知見と言える。現在SIRT6とTGF- β のそれぞれテロメア長, telomerase発現への影響を細胞老化制御の観点から検討中である。またIPF患者由来の肺組織におけるSIRT6発現状況を免疫組織学的に検討中であり, その実際の病態への関与を明らかにしたいと考えている。ただ今回のin vitroでの検討に気道上皮細胞を使用した点を考慮すれば, IPF病態にこの機序を当てはめるには今後肺胞上皮を使用した検討はさらに必要であろう。

(結 論)

TGF- β が気道上皮細胞にSIRT6で制御される細胞老化を誘導した。老化上皮細胞が線維芽細胞の β

8 インテグリン発現を介して線維化病態に関与している可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Passos JF, Saretzki G, von Zglinicki T. DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection? *Nucleic Acids Res.* 2007; 35:7505-13.
- 2) von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends Biochem Sci.* 2002; 27: 339-44.
- 3) American Thoracic Society. Idiopathic pulmonary fibrosis: diagnosis and treatment. International consensus statement. American Thoracic Society (ATS), and the European Respiratory Society (ERS). *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2000; 161: 646-64.
- 4) Sheppard D. Transforming growth factor beta: a central modulator of pulmonary and airway inflammation and fibrosis. *Proc Am Thorac Soc.* 2006; 3:413-7.
- 5) Araya J, Cambier S, Markovics JA, Wolters P, Jablons D, Hill A, Finkbeiner W, Jones K, Broaddus VC, Sheppard D, Barczak A, Xiao Y, Erle DJ, and Nishimura SL. Squamous metaplasia amplifies pathologic epithelial-mesenchymal interactions in COPD patients. *J. Clin. Invest.* 2007; 117:3551-3562.
- 6) Li H, Xu D, Li J, Berndt MC, Liu JP. Transforming growth factor beta suppresses human telomerase reverse transcriptase (hTERT) by Smad3 interactions with c-Myc and the hTERT gene. *J Biol Chem.* 2006; 281:25588-600.
- 7) Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, Xing C, Raghu G, Weissler JC, Rosenblatt RL, Shay JW, Garcia CK. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104:7552-7.
- 8) Alder JK, Chen JJ, Lancaster L, Danoff S, Su SC, Cogan JD, Vulto I, Xie M, Qi X, Tudor RM, Phillips JA 3rd, Lansdorp PM, Loyd JE, Armanios MY. Short telomeres are a risk factor for idiopathic pulmonary fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105:13051-6.
- 9) Haigis MC, Guarente LP. Mammalian sirtuins—emerging roles in physiology, aging, and calorie restriction. *Genes Dev* 2006; 20:2913-21.
- 10) Rajendrasozhan S, Yang SR, Kinnula VL, Rahman I. SIRT1, an antiinflammatory and antiaging protein, is decreased in lungs of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008; 177:861-70.
- 11) Mostoslavsky R, et. al. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell.* 2006;124:315-29.
- 12) Michishita E, McCord RA, Berber E, Kioi M, Padilla-Nash H, Damian M, Cheung P, Kusumoto R, Kawahara TL, Barrett JC, Chang HY, Bohr VA, Ried T, Gozani O, Chua KF. SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature.* 2008; 27: 492-6.

特発性肺線維症肺組織中の amphiregulin 発現に関する検討

前山 隆茂 福元重太郎 河口 知允
原田 知佳 末次 彩子 中西 洋一*

epidermal growth factorファミリーに属する amphiregulin は、上皮細胞、角化細胞、線維芽細胞などの増殖を刺激する。腸管や肝臓などでは組織の損傷修復過程において amphiregulin が重要な働きをもつことが報告されており、組織の損傷・線維化過程への関与が推定される。特発性肺線維症患者では血清中 amphiregulin 濃度が、健常対照者と比べて有意に上昇していることを我々は平成 19 年度の本会議で報告した。そこで特発性肺線維症の肺組織中における amphiregulin の発現を検討した。特発性肺線維症の肺組織を用いて amphiregulin の発現を免疫組織化学染色法で検討した。対照群として肺腫瘍性疾患で切除された肺組織の非病変部を用いた。Amphiregulin の発現は肺胞上皮細胞および間質に認められ、肺線維症肺組織で増強していた。特発性肺線維症の病態に amphiregulin が関与していることが示唆された。

Expression of amphiregulin in lung tissue from patients with idiopathic pulmonary fibrosis

Takashige Maeyama, Jyutaro Fukumoto, Tomonobu Kawaguchi,
Chika Harada, Saiko Suetugu, and Yoichi Nakanishi

Research Institute for Disease of the Chest, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

Amphiregulin is transmembrane glycoprotein, which is a member of epidermal growth factor family. Soluble forms of amphiregulin are released by proteolytic cleavage, and act as an autocrine/paracrine factor. There are reports that suggest amphiregulin may play important role in tissue repair or remodeling processes after injury in skin, liver and intestinal tract. In the previous year, we reported that serum amphiregulin level was elevated in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF). The purpose of this study was to investigate whether expression of amphiregulin is upregulated in lung tissue of IPF. The immunohistochemistry for amphiregulin was performed in lung tissues from 10 patients with IPF. The immunoreactivity grade for amphiregulin was significantly increased in epithelial cells and interstitial cells of IPF compared with control. The result suggests that amphiregulin may be involved in the pathogenesis of IPF.

はじめに

肺線維症の病態はなんらかの刺激により繰り返される肺上皮傷害と、それに引き続き生じるリモデリング及び線維化がその本体と考えられている。上皮傷害が正常に修復されていくか、あるいは不適切な修復過程をとるかは、上皮細胞と線維芽細胞の相互作用が重要とされている。アポトーシスを主体とした肺上皮細胞の損傷の後、生存した上皮細胞あるいは線維芽細胞は活性化し、様々なサイトカインや増殖因子を産制する。増殖因子としては epidermal growth factor をはじめとする EGF 受容体 ligand が上皮細胞や線維芽細胞から産制され、autocrine あるいは paracrine 的に作用する。EGF 受容体の活性化によって肺上皮細胞の再生が促されると考えられるが、一方で線維芽細胞の増殖や matrix の合成を促進する側面も併せ持つ。

Amphiregulin は EGF ファミリーの一つであり、分子量 18kD の膜型糖タンパク質である。当初は MCF-7 ヒト乳ガン細胞の培養液中から単離され、in vitro では正常な上皮細胞、線維芽細胞、角化細胞の増殖を刺激することが知られている¹⁾。皮膚、消化管、肝臓といった臓器で、組織損傷からの修復過程

に amphiregulin が関与していることが報告されている^{2), 3), 4)}。昨年度本研究班において我々は特発性肺線維症患者の血清中で amphiregulin 濃度が上昇していることを報告した。Amphiregulin が肺損傷・線維化に関与している可能性が示唆されたため、今回は肺組織中での amphiregulin の発現を検討した。

対象と方法

九州大学病院で外科的肺生検あるいは剖検を施行され、特発性肺線維症と最終診断された検体を用いた。対照群として肺腫瘍切除肺の非病変組織を用いた。amphiregulin の免疫組織化学染色は、抗ヒト amphiregulin 抗体 (R&D 社) を用い、SAB-PO kit (ニチレイ社) を使用した。肺上皮細胞と間質の細胞に注目して陽性程度を 0=negative, 1=weak, 2=moderate, 3=strong の 4段階で判定的に評価した。

結 果

amphiregulin の発現は IPF 肺組織で認められた (図 1A)。発現は肺上皮細胞に強く認められ、間質の紡錘型細胞にも認められた (図 1C)。対照肺組織で

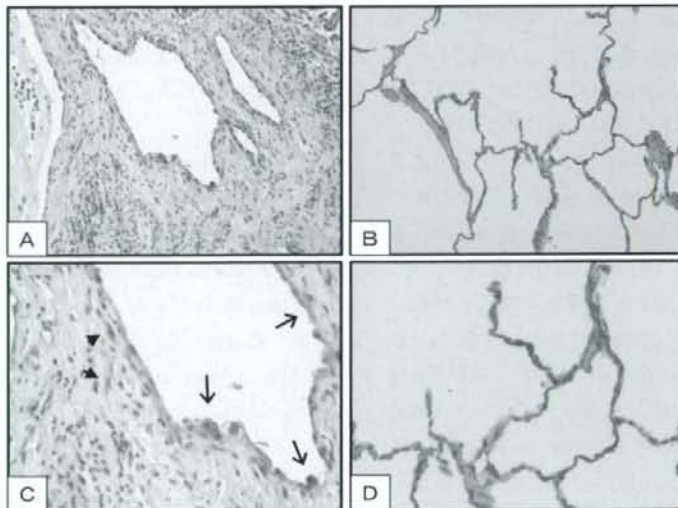


図1 amphiregulin に対する免疫組織化学染色結果。IPF 肺組織では肺上皮に陽性所見を認め (A, C 矢印)、間質の紡錘形の細胞にも陽性所見を認めるものも有った (C 矢頭)。腫瘍性疾患肺の非病変部を対照組織として用いたが陽性所見は目立たなかった (B, D)。

九州大学大学院医学研究院附属胸部疾患研究施設

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

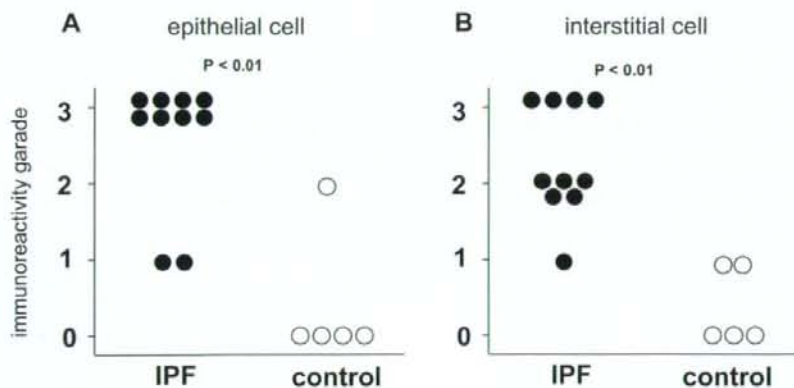


図2 Amphyregulin発現の判定量結果. 発現程度: 0=negative, 1=weak, 2=moderate, 3=strong.

は肺胞上皮細胞, 間質細胞に弱い発現を認める例もあったが, ほとんどの例では陰性であった(図1B, D).

図2に示すように, 肺胞上皮細胞, 間質細胞でのamphyregulinの発現程度は, 対照組織と比べてIPF組織で有意に強かった。

考 察

amphyregulinは, 上皮細胞, 角化細胞, 線維芽細胞などの増殖をautocrine/paracrineに刺激する2). 組織損傷の修復過程で重要な働きをもつと考えられている. 肝障害ではamphyregulinは急性期から発現が増強し, 肝硬変へと至る慢性期にも発現が持続していることが知られている5),6). PerugorriarらはCCl₄誘導性肝硬変の線維化がamphyregulin欠損マウスでは軽減することを報告した7). amphyregulinは肝障害初期には損傷に対して組織保護的に作用するが, 修復が不十分なまま遷延すると線維芽細胞の増殖やコラーゲン産生を刺激して線維化を進行されると推測される. 肺損傷・線維化に関しては, LPS肺損傷マウスモデルでの発現増強が報告されているが8), 報告は多くない. 今回の検討では, amphyregulin発現はIPF肺組織中の肺胞上皮および間質細胞に認められた. IPF組織中の肺胞上皮細胞ではapoptosis誘導因子の発現増強が報告されているが9),10), 上皮細胞におけるamphyregulinは上皮増殖と組織修復を促す目的で発現が増強しているのかもしれない. 一方, 間質細胞でのamphyregulin発現増強は線維芽細胞

の増殖や細胞外基質産生を促し, 線維化に関わっているかもしれない.

肺損傷・線維化におけるamphyregulinの働きは不明であるが, 今後動物モデルあるいはin vitroでの検討が必要と考えられる.

参考文献

- 1) Syoyab M, McDonald VL, Bradley JG, Todaro G. Amphyregulin, a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:6528-6532.
- 2) Schelfhout VR, Coene ED, Delaey B, Waeytens AA, De Rycke L, Deleu M, De Potter CR. The role of heregulin-alpha as a motility factor and amphyregulin as a growth factor in wound healing. *J Pathol*. 2002 Dec;198(4):523-33.
- 3) Keates S, Han X, Kelly CP, Keates AC. Macrophage-inflammatory protein-3alpha mediates epidermal growth factor receptor transactivation and ERK1/2 MAPK signaling in Caco-2 colonic epithelial cells via metalloproteinase-dependent release of amphyregulin. *J Immunol*. 2007 Jun 15;178(12):8013-21.
- 4) Berasain C, Garcia-Trevijano ER, Castillo J, Erroba E, Santamaria M, Lee DC, Prieto J, Avila MA. Novel role for Amphyregulin in protection from liver

- injury. *J Biol Chem* 2005;May 13;280(19):19012-2011.
- 5) Berasain C, Garcia-Trevijano ER, Castillo J, Erroba E, Santamaría M, Lee DC, Prieto J, Avila MA. Novel role for amphiregulin in protection from liver injury. *J Biol Chem*. 2005 May 13;280(19):19012-20.
- 6) Berasain C, Castillo J, Prieto J, Avila MA. New molecular targets for hepatocellular carcinoma: the ErbB1 signaling system. *Liver Int*. 2007 Mar;27(2):174-85.
- 7) Perugorria MJ, Latasa MU, Nicou A, Cartagena-Lirola H, Castillo J, Goñi S, Vespasiani-Gentilucci U, Zagami MG, Lotersztajn S, Prieto J, Berasain C, Avila MA. The epidermal growth factor receptor ligand amphiregulin participates in the development of mouse liver fibrosis. *Hepatology*. 2008 Oct;48(4):1251-61.
- 8) Dolinay T, Kaminski N, Felgendreher M, Kim HP, Reynolds P, Watkins SC, Karp D, Uhlig S, Choi AM. Gene expression profiling of target genes ventilator-induced lung injury. *Physiol Genomics* 2006 Jun 16;26(1):68-75.
- 9) Maeyama T, Kuwano K, Kawasaki M, Kunitake R, Hagimoto N, Matsuba T, Yoshimi M, Inoshima I, Yoshida K, Hara N. Upregulation of Fas-signalling molecules in lung epithelial cells from patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Eur Respir J*. 2001 Feb;17(2):180-9.
- 10) Plataki M, Koutsopoulos AV, Darivianaki K, Delides G, Siafakas NM, Bouros D. Expression of apoptotic and antiapoptotic markers in epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest*. 2005 Jan;127(1):266-74.

Endothelial-mesenchymal transitionにおける 線維化関連増殖因子の関与

橋本 直純 今泉 和良 長谷川好規*

特発性肺線維症は、fibroblastic fociの病理学的特徴を有する。線維化病変における線維芽細胞は組織リモデリング、細胞外マトリックスの過剰沈着、そして肺胞上皮との相互作用などで重要な役割を担うと考えられている。我々は、線維化病変で多様な表現型を示す線維芽細胞の中に、新たに微小血管内皮細胞由来の線維芽細胞の存在を同定した。また、血管内皮細胞におけるEndothelial-mesenchymal transition (Endothelial-MT)のprocessにRasの活性化とTGF β の共刺激が重要であることも明らかにした。今回、Rasの直接の活性化シグナルであり肺線維症の病態形成において重要な増殖因子とされるPDGFとTGF β の共刺激によるEndothelial-MT processの成立の可能性を検討した。PDGFとTGF β の共刺激は、血管内皮細胞特異的表現型の有意な発現抑制を誘導した。さらに、1) Endothelial-MTにおけるRasシグナルの直接的な重要性と2) Rasシグナルの制御による血管内皮細胞由来線維芽細胞(Complete Endothelial-MT derived Fibroblasts)の表現型の回復の可能性を検討するために、Ras inhibitorを用いて血管内皮細胞特異的表現型の発現を評価した。興味深いことに、Ras inhibitorの投与は血管内皮細胞のEndothelial-MT processの誘導を抑制したが、形質転換したComplete Endothelial-MT derived Fibroblastsにおける血管内皮細胞の表現型の回復は認めなかった。これらの知見は、早期のRasの活性化とTGF β の共刺激に対する制御がEndothelial-MTを介した血管内皮細胞由来線維芽細胞の成立とそれによる線維化病変の形成に対する治療戦略の糸口になる可能性を示した。

The involvement of fibrosis-related growth factors in endothelial-mesenchymal transition

Naozumi Hashimoto, Kazuyoshi Imaizumi, and Yoshinori Hasegawa

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

The pathological hallmark lesions in idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) are the fibroblastic foci, in which fibroblasts are thought to be involved as key mediators of matrix deposition. Our study suggested that endothelial cells may give rise to some population of the lung fibroblast population through an endothelial-mesenchymal transition process comparable to that seen in epithelial-mesenchymal transition (Epithelial-MT). The underlying mechanism might be suggested by the findings that combined treatment with activated Ras and TGF β could cause endothelial-mesenchymal transition (Endothelial-MT) in endothelial cells. To evaluate whether combined treatment with PDGF, as an activator of Ras, through PDGF receptor (PDGFR), and TGF β can alter the expression of endothelial specific markers on endothelial cells, we examined the effect of the combined treatment in microvascular endothelial cells by flow cytometry. Combined treatment significantly repressed endothelial markers. To examine the direct involvement of Ras in endothelial-MT, the treatment with Ras inhibitor was performed for endothelial cells with activated Ras. Although pre-treatment with Ras inhibitor modulated the restoration of endothelial markers, Ras inhibitor failed to restore the repressive expression of endothelial marker in complete Endothelial-MT cells. These findings suggested that early regulation of Ras signaling and TGF β signaling might be involved in the inhibition of endothelial mesenchymal transition.

はじめに

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

そうした中、肺外起源由来として骨髄由来線維芽細胞の存在が報告され(1)、肺内起源由来としても肺動脈由来線維芽細胞の存在も報告された(2)。我々は、プレオマイシン肺線維症モデルにおいて肺微小血管内皮細胞由来線維芽細胞の存在を同定した。今回我々は、endothelial-mesenchymal transition (Endothelial-MT) 過程における活性化 Ras signal と TGF β signal の関与を検討した。

方 法

血管内皮細胞株 MS1 に対する PDGF と TGF β の共刺激による血管内皮細胞特異的表現型に対する抑制効果を flow cytometry にて評価した。また、Endothelial-MT 過程における直接的な活性化 Ras の関与を評価するために活性化 Ras 導入株 MS1 細胞 (SVR) に対して Ras の inhibitor である FTI277 の抑制効果を検討した。また、Endothelial-MT が完成した細胞 (complete Endothelial-MT cells; cEMT cells) における Ras の制御効果を検討した。

結 果

血管内皮細胞株への活性化 Ras と TGF β の影響a) PDGF と TGF β の共刺激の血管内皮特異的表現型への影響

血管内皮細胞への活性化 Ras と TGF β のシグナル相互作用は、血管内皮細胞特異的表現型である CD31, CD34, Tie2, および CD144 の発現を有意に抑

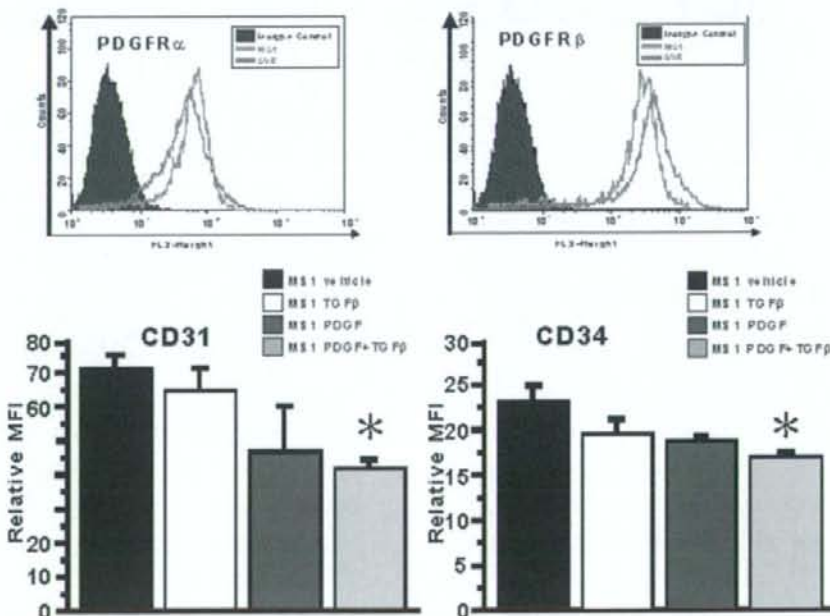


Figure 1

名古屋大学大学院医学研究科呼吸器内科学

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

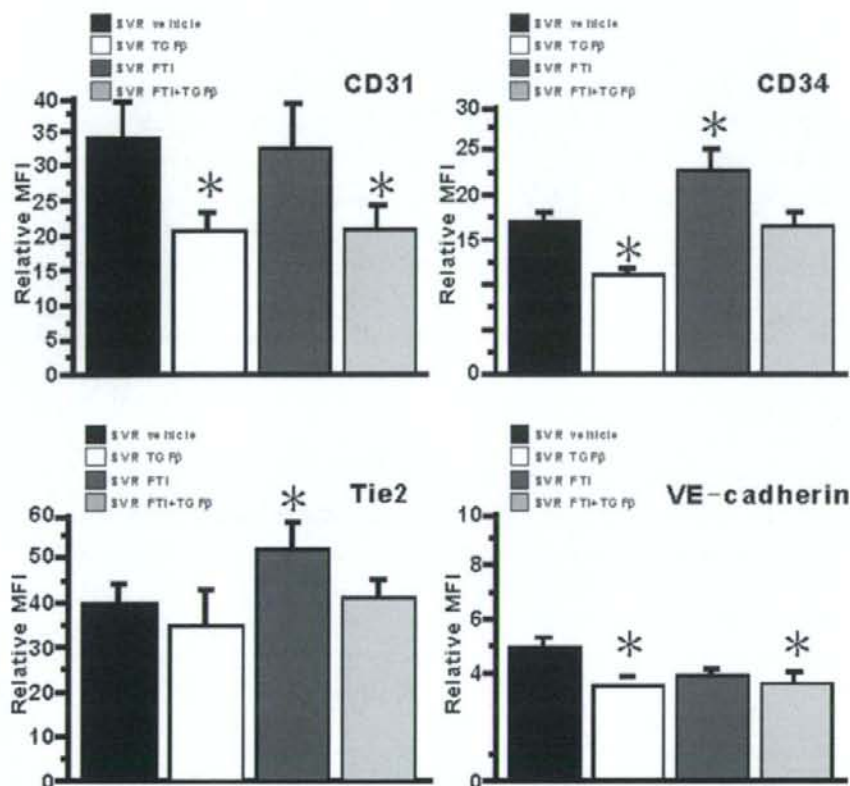


Figure 2

制させることは前回示した。今回我々は、Rasの直接の活性化刺激であり、肺線維症の病態形成に重要とされている増殖因子PDGFをTGFβと共に投与し、血管内皮細胞特異的表現型の発現をflowcytometryにて評価した。PDGFとTGFβの共刺激は、有意に血管内皮細胞特異的表現型の発現抑制を示した (Figure 1)。

b) Rasの活性化シグナルのEndothelia-MTへの直接的関与の検討

Rasの活性化シグナルのEndothelia-MTへの直接的関与を評価するために、Rasの特異的inhibitorであるFTI277を用いて、血管内皮細胞特異的表現型の発現を評価した。FTI277によるRasの抑制効果は、CD34およびTie2の発現の回復には寄与したが、CD31およびCD144では認めなかった。FTI277の投与はTGFβにより誘導される血管内皮細胞特異的表現型の発現抑制には効果を示さなかった (Figure 2)。

c) cEMT cellsへのRasの活性化シグナル制御効果

TGFβ刺激を受けた活性化Ras(+)SVR細胞は、TGFβ刺激除去後もEndothelia-MTの表現型を維持したが(cEMT cells)、それらの細胞はFTI277の投与においても評価したすべての血管内皮細胞特異的表現型の回復を認めなかった (Figure 3)。

考案・結論

我々は、Tie2Cre/CAG-CAT-LacZ double transgenic miceを作成して、その血管内皮細胞特異的LacZ発現マウスに対して、in vivo プレオマイシン誘導肺線維症モデルを作成して血管内皮細胞由来線維芽細胞の同定を行った。また、in vitroの実験においてもendothelial-MT processに、活性化RasとTGFβの共刺激が重要であることを示した。肺線維症の病態におけるRasの活性化状態を想定するために、Rasの直接的な活性をもたらす、肺線維症の病態形成に重要とされる増殖因子であるPDGFについて注目した。血管内皮細胞に対するPDGFとTGFβの