

Figure 3

相互作用により血管内皮細胞特異的表現型の有意な抑制を示すことができた。PDGFおよびそのレセプターであるPDGFRのautocrineの刺激がepithelial-mesenchymal transitionの維持に重要であるという報告もなされている(3)。

Endothelial-MTの過程において、活性化Rasが直接的に関与するかどうかを検討するために、RasのinhibitorであるFTI277を用いて血管内皮細胞特異的表現型を評価した。Thieryらによるreviewでも示されているように(4)、Rasの直接的な抑制による血管内皮細胞特異的表現型への効果は、おそらく活性化Rasの下流シグナルにも依存していることが推測された。また、FTI277による活性化Rasのシグナル抑制は、TGF β 刺激によって誘導される血管内皮細胞特異的表現型抑制に対しては効果を示さなかった。このことは、活性化RasとTGF β の両方のシグナル制御がEndothelial-MTを介した線維芽細胞の供給制御に重要であることが推測された。

興味深いことに、形質転換が完成・維持されたcEMT cellsにおいて、Ras inhibitorは評価したすべての血管特異的表現型の発現回復効果を認めなかった。これらの知見は、早期のPDGF刺激の抑制がブレオマイシン誘導肺線維症に有効であった報告を支持するものであると考えられる(5)。

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

今回の一連の我々の検討は、EMTと同様に、血管内皮細胞がEndothelial-MTを介して線維芽細胞の

一部を構成する可能性を示した。さらに、活性型RasとTGF β のシグナル相互作用が上皮細胞および血管内皮細胞の線維芽細胞への分化を誘導し得ることを明らかにして、そのシグナルによってもたらされる線維芽細胞への誘導をより早期に制御することが線維化病巣の形成に対する知見になりうることを示唆している。

臓器線維症の線維芽細胞の起源を同定し、その分化誘導の機序を解明することが新たな臓器線維症の治療戦略の重要な要素になることを示していると考えられる。

まとめ

血管内皮細胞株において、線維化関連増殖因子であるPDGFとTGF β の共刺激は血管内皮細胞特異的表現型の抑制を誘導した。Ras inhibitorを用いた活性化Rasの直接的な抑制は、活性化Rasにより誘導される血管内皮細胞特異的表現型の回復を誘導したが、TGF β により誘導される抑制効果を制御できなかった。また、一旦形質転換を示した細胞は活性化Rasの抑制によっては表現型の回復を認めなかった。これらの知見は、早期のEndothelial-MTに対する制御の重要性と形質転換した細胞の表現型回復(mesenchymal-endothelial transition; MET)には新たな治療戦略が必要であることを示唆した。

参考文献

- 1) Hashimoto N, Jin H, Liu T, Chensue SW, Phan SH. Bone marrow-derived progenitor cells in pulmonary

- fibrosis. *J Clin Invest*2004;113:243-252.
- 2) Kim KK, Kugler MC, Wolters PJ, Robillard L, Galvez MG, Brumwell AN, Sheppard D, Chapman HA. Alveolar epithelial cell mesenchymal transition develops in vivo during pulmonary fibrosis and is regulated by the extracellular matrix. *Proc Natl Acad Sci USA*2006;103:13180-13185.
 - 3) Gotzmann J, Fischer AN, Zojer M, Mikula M, Proell V, Huber H, Jechlinger M, Waerner T, Weith A, Beug H, Mikulits W. A crucial function of PDGF in TGF-beta-mediated cancer progression of hepatocytes. *Oncogene*2006;25:3170-3185.
 - 4) Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol*2006;7:131-142.
 - 5) 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;171:1279-1285.

マウス肺標識保持細胞の解析による 呼吸器組織幹細胞特性の探求

西脇 徹 松島 綱治*

近年、再生医学の進歩により、様々な領域の難治疾患に解決の糸口が見出されつつあるが、呼吸器領域においては、その複雑な解剖学的構造も手伝い研究開発に遅延の感が否めない。ES・iPS細胞・間葉系幹細胞等を用いた細胞治療開発は再生医療の大きな柱の一つであるが、臓器固有幹細胞(組織幹細胞)研究は、臓器発生・再生・発癌機序の解明に必須であり、再生医学研究の学術的基礎を構築する上で重要である。

組織幹細胞は各器官固有の生後発達・恒常性維持・組織再生の過程で中心的な役割を果たすと考えられている。呼吸器領域においても幾つかの上皮・間葉系組織幹細胞が提唱されているものの、未だその全体像が捉えられているとはいえ、病態形成との関連性も未知の部分が多い。

組織幹細胞同定法の一つである標識保持細胞解析は、全身投与されたBromodeoxyuridine(BrdU)や³H-thymidineを取り込み、それを保持し続ける細胞を検出するものであり、低細胞回転・薬剤(傷害)耐性・損傷部位への再置換など、幹細胞特性を有する一群を組織学的に同定するのに有用である。呼吸器領域で提唱される組織幹細胞にもこの方法により見出されたものがあるが、いずれも成体細胞を標識したものであり、皮膚・腎にて同定されているような、新生期より低細胞回転な一群とは異なる可能性がある。今回、新生マウスをBrdU標識し成体での標識保持細胞を解析するという手法を呼吸器領域で初めて適用し、幾つかの細胞特性を見出したので、これを報告する。

Characterization of label-retaining cells to explore the pulmonary adult tissue stem cells in mice

Tetsu Nishiwaki and Kouji Matsushima

Department of Molecular Preventive Medicine, School of Medicine, University of Tokyo

Recent advances in regenerative medicine have served to resolve various types of refractory diseases. In the field of pulmonary medicine, the regenerative study has seemed to be retarded likely because of the complicated anatomy of the lung. The research and development of stem cell-based therapy using potent cell sources such as embryonic stem cells, induced pluripotent stem cells or mesenchymal stem cells has been one of the central themes, whereas the study of the adult tissue stem cells is considered to be essential to clarify the mechanism of organ development, tissue repair or oncogenesis and to be as an academic basis of this field of the study.

Tissue stem cells are believed to play a central role in postnatal development, homeostasis or tissue regeneration. Although several candidates of epithelial or mesenchymal stem cells have been identified, an overview of lung tissue stem cells and the relationships with pathogenesis remain to be elucidated.

Analyzing the cells long-term retaining bromodeoxyuridine (BrdU) or ³H-thymidine is one of the promising methods to detect the slow cycling cells as tissue stem cell candidates. Some previous reports applied this technique in adult mice and demonstrated the region-specific candidates of tissue stem cells, whilst there is no paper describing the pulmonary label-retaining cells by using neonatal labeling protocol, which has been used in the study of skin or renal tissue stem cells.

Here we firstly applied the neonatal labeling method to detect the tissue stem cell candidate of the lung. Several cellular characteristics of these cells are demonstrated in this report.

はじめに

幹細胞生物学を基軸とした再生医学は近年目覚ましく発展しており、様々な臨床領域における難治性疾患治療戦略構想に対して新たな可能性を見出している。より臨床的な観点から期待される多能性幹細胞移植療法(ES細胞・iPS細胞・各種間葉系幹細胞)の研究開発が注目される一方、成体における器官固有の幹細胞(組織幹細胞)の研究は各臓器における臓器発生/発達・恒常性維持・障害からの修復再生・病態形成・発癌といった未だそのメカニズムが明らかになっていない現象を理解するうえで重要であり、学術的な基礎を構築する。

呼吸器疾患領域においても、再生医療を念頭においた基礎・臨床的研究開発が少しずつ進んでいるも

の、呼吸器が本来持つ複雑な解剖学的特性も手伝い、他領域と比べその進展が緩徐である感は否めない。昨年度まで、我々は臨床的観点から、線維形成性肺障害病態に対する骨髄間葉系幹細胞移植の有用性・効率化を課題とした仕事を報告してきたが、今年度より呼吸器組織幹細胞の探求をテーマにし、呼吸器恒常性維持機構・病態形成機構における組織幹細胞の役割を明らかにすることを目的とする。

1990年代後半より、上位/下位気管・中枢気管支・細気管支・細気管支肺胞結合部・肺泡領域といった、解剖学的区域に固有の組織幹細胞群候補がそれぞれ報告され⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾、さらには局在不明ながらも、間葉系幹細胞⁽⁴⁾・side population (SP)細胞⁽⁵⁾の存在も示されている。(図1) これらの報告のうちいくつかが用いている標識保持細胞解析という手法

呼吸器で提唱される組織幹細胞群

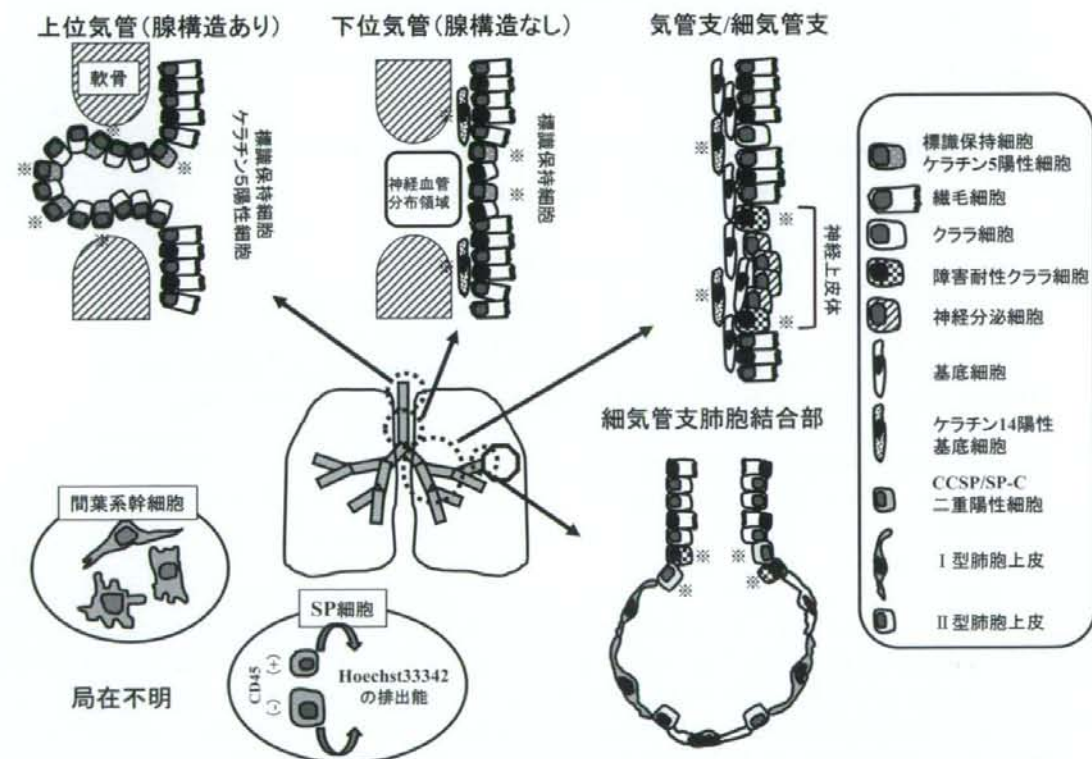


図1 呼吸器で提唱される組織幹細胞群。解剖学的局在ごとに提唱されている組織細胞群を模式図で示す。CCSP: Clara cell secretory protein

東京大学大学院医学系研究科分子予防医学

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究分担者

は、現在、組織幹細胞同定法として多くの臓器において応用されている。本法は、全身投与されたBromodeoxyuridine(BrdU)や³H-thymidineを取り込み、それを保持し続ける細胞を検出するものであり、低細胞回転・薬剤(傷害)耐性・損傷部位への再置換など、幹細胞特性を有する一群を組織学的に同定するのに有用である。一方で、標識薬剤の投与量・投与時期・投与期間・追跡期間などの違いで標識陽性細胞の様相が大きく異なってくるため、解釈には慎重を要する。2000年に発表されたTaylorらによる皮膚毛嚢胞領域における標識保持細胞群解析の仕事⁶⁾は、皮膚組織幹細胞研究の中でも代表的なものの一つであるが、ここでは新生期のマウスをBrdUによって標識したのち、成体において標識保持細胞を解析することで、それらが局在する特定の場所、いわゆる「ニッチ」を同定している。BrdUは細胞増殖期(S期)に核内に取り込まれるため、その後、細胞分裂が繰り返されると一細胞当たりのBrdU保持量は徐々に減少し、最終的には検出不能となる。したがって、このプロトコルを用いると、生後よりほとんど細胞分裂をしない細胞群が検出できるため、より幹細胞的性質の強い細胞が見出されることが期待される。上述した呼吸器標識保持細胞の仕事は、いずれも成体細胞を標識しており、皮膚・腎にて同定されているような、新生期より低細胞回転な一群とは異なる可能性が高い。今回、我々は新生マウスをBrdU標識し成体での標識保持細胞を解析するという手法を呼吸器領域で初めて適用し、幾つかの細胞特性を見出したので、それらを報告する。

方 法

マウスのBrdU標識

生後3日のC57BL/6Jマウスに対し、1日2回、連続3日間のBrdU(50mg/g(BW))(Sigma Aldrich)投与(背部皮下注射)を行い、追跡期間を経て、適宜標識保持細胞を解析する。マウスはSPF条件下で飼育管理されており、動物実験は日本国法令および施設内の倫理規定に準拠している。

フローサイトメトリー解析

マウスをネプタール[®](ペントバルビタールナトリウム)により腹腔麻酔した後、右心室よりヘパ

リン加PBSによる肺循環灌流に引き続いて肺を胸腔より取りだし、1mm四方大に細断後、コラゲナーゼ加DMEM(1% BSA)にて37°C 1時間のインキュベーションを行った。セルストレイナー濾過により得た浮遊細胞に対し、抗マウスCD16/32抗体によるFcレセプターのブロックを行った後、表面抗原染色・細胞内抗原染色を行った。核内BrdUの染色はBrdU FLOW KIT(BD Biosciences)を用いた。核内DNA量の解析には同kit内の7AAD色素を使用した。

ブレオマイシン肺障害モデル

腹腔麻酔の後、前頸から胸骨の前部を皮膚切開し、気管を露出させたのちブレオマイシン(BLM)(3mg/kg:大日本化薬より提供)を経気管的に投与した。

結 果

BrdU追跡期間における標識保持細胞の変遷を見る目的で、新生期での標識終了後より経時的にBrdU陽性細胞(BrdU retaining cells; BRCs)率を計測した。本研究では血管内皮および造血(血球)細胞系列の細胞群は対象としないため、フローサイトメトリーにおいてCD31(血管内皮細胞マーカー)およびCD45(造血系細胞マーカー)が陰性の細胞群において解析を実施した。図2に示すように、CD31⁺CD45⁻肺細胞におけるBRC存在率は4~5週齢までに急速に減少し、以後長期に渡って安定した。マウス肺においては、生後30日までいわゆる「生後発達」が続くとされており、BRC存在率が安定する時期はこの時期に一致している。なお、成体におけるBRC存在率について有意な性差は認めなかった。(図2)

成体肺におけるBRC数が予想以上に多かったため、他臓器との比較を行った。上述と同様にCD31⁺CD45⁻の細胞に限定して解析をしたところ、肝臓・脾臓・腎臓・膵臓などの実質臓器に比し、肺においては有意にBRC存在率が高かった。(図3)この結果はCD31⁺CD45⁻肺細胞が全体として低細胞回転であることを示唆したため、さらなる確認のため、成体においてBrdU標識を行い、CD31⁺CD45⁻肺細胞によるBrdUの取り込み効率を計測した。CD31⁺CD45⁻肺細胞におけるBrdU陽性細胞率(増殖期細胞率)は

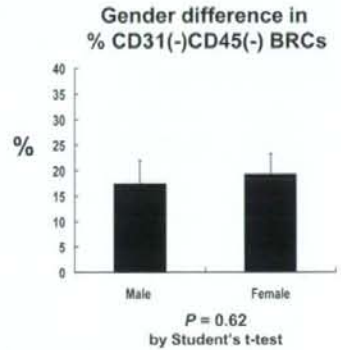
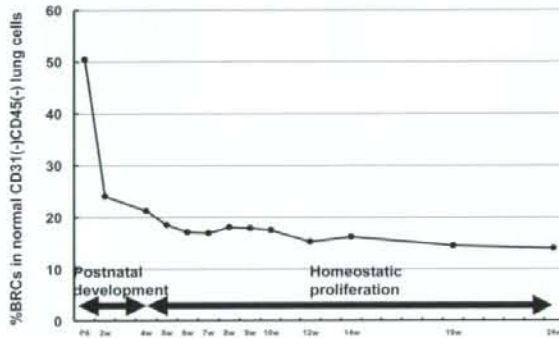
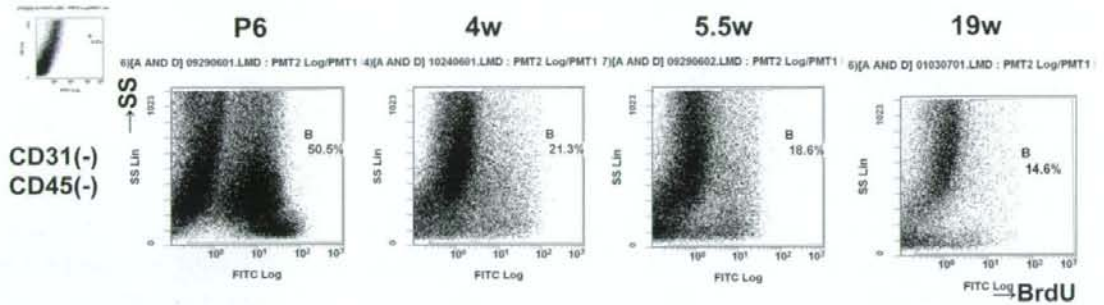


図2 正常肺発達過程における標識保持細胞(BRCs)存在率の変遷。

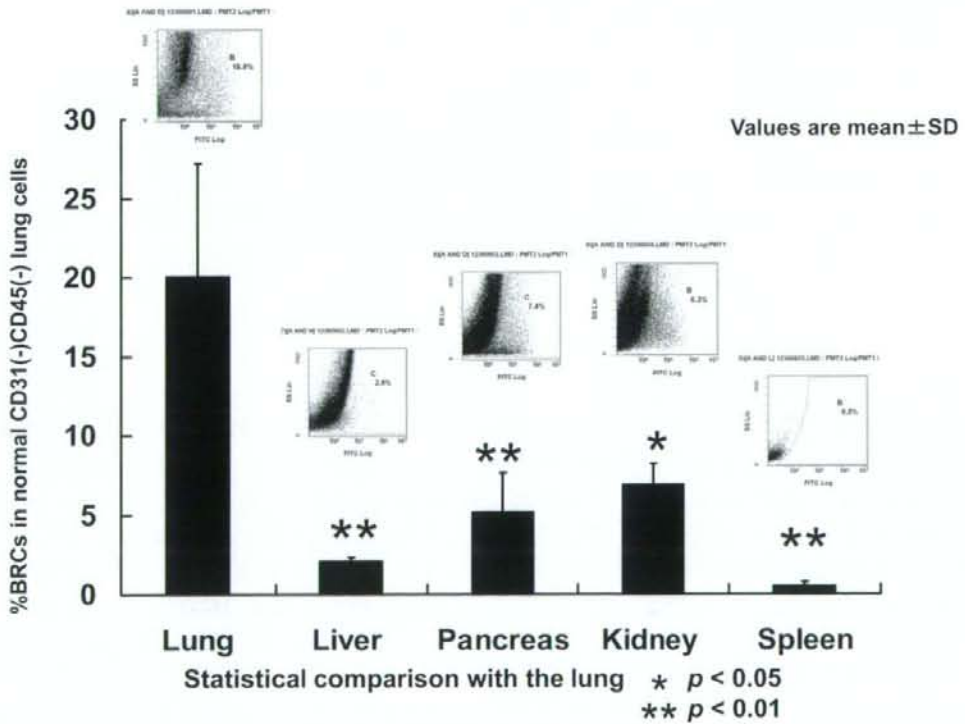


図3 正常成体マウスの各臓器間におけるBRC存在率の比較。N=5。

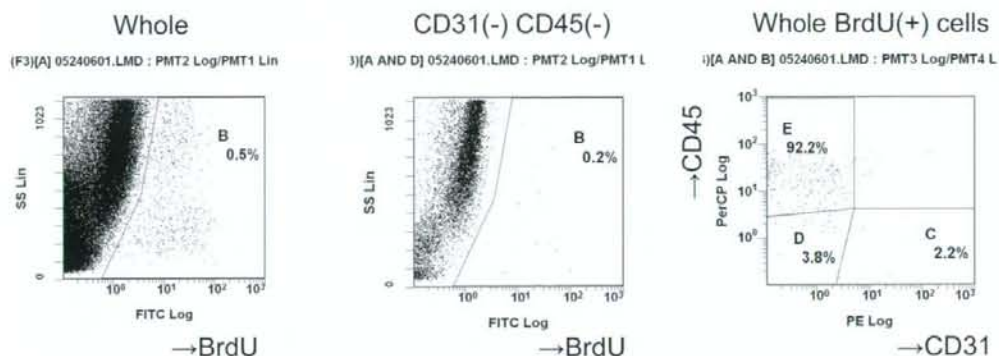


図4 成体におけるBrdU標識による増殖期細胞の検出。8週齢の正常雌マウスにBrdU(1mg/body)を腹腔内投与し、2時間後に解析した。

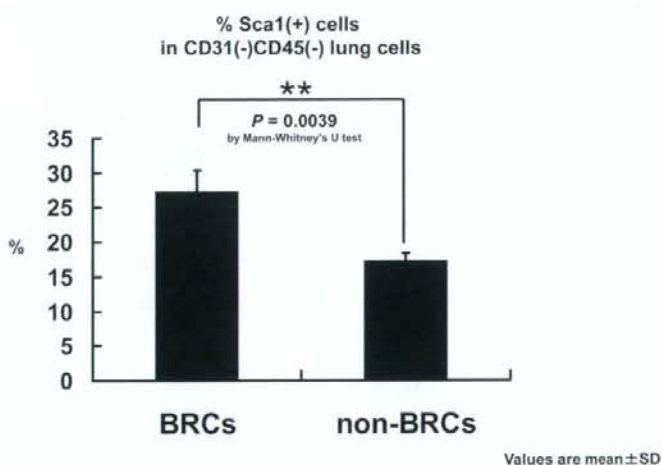


図5 BRCs・non-BRCsにおけるSca-1陽性率。フローサイトメトリー解析の結果をグラフ化した。N=5。

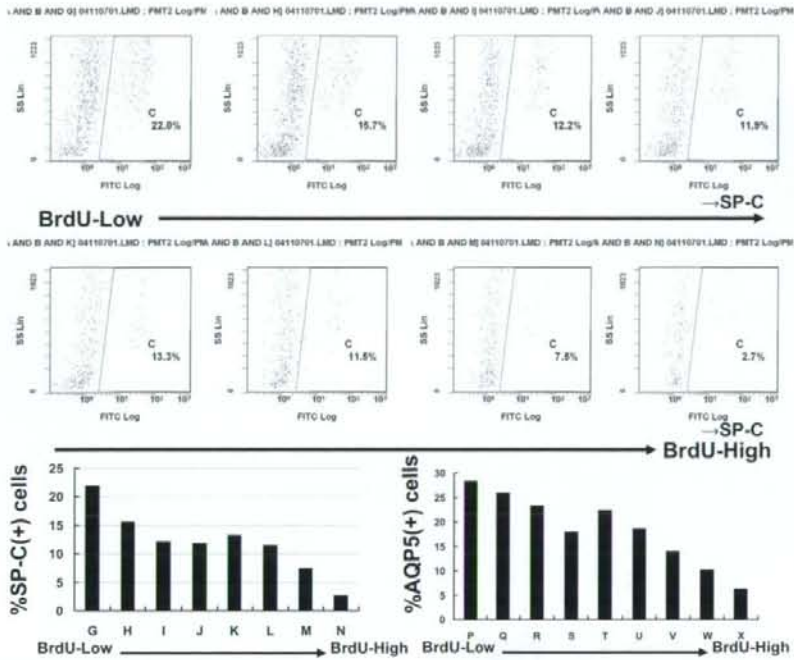
0.2%と低く、成体でBrdUを取り込む細胞はほとんどCD45⁺細胞であった。(図4)

BRCsの幹細胞的特徴を確認するために、代表的な幹細胞マーカーであるstem cell antigen-1 (Sca-1)の陽性率の比較をBRC群と非BRC(non-BRC)群間で行った。Sca-1⁺細胞率は、BRC群において有意に高く、BRCの幹細胞的性格を支持する結果であった。(図5)

フローサイトメトリーにおいて、各BRCにおけるBrdU保持量は、それぞれの蛍光強度によって表現されるため、BRCsをBrdUパラメータの蛍光強度によって分画した場合、BrdU保持量の高い群(high BRCs)や低い群(low BRCs)を区別することができる。これを利用して、正常肺におけるBRCsを8分画に区分し、各分画におけるII型肺胞上皮細胞マーカー

(surfactant protein-C; SP-C)とI型肺胞上皮細胞マーカー(aquaporin 5; AQP5)の陽性細胞数を計測すると、BrdUの保持量に反比例して分化肺胞の存在率が低下していくことが分かった。また、データは示していないが、BRCs全体における各マーカーの陽性率はnon-BRC群に比し有意に低かった。一般的に組織幹細胞群は、その孫細胞である分化細胞群に比しより未分化な集団であることから、BRCs(とくにhigh BRCs)は組織幹細胞的性格を有していることが示唆された。(図6)

抗アポトーシス能・薬剤耐性能は幹細胞の代表的な性質であるうえに、恒常性維持・障害時組織修復を担う組織幹細胞にとって必須の機能である。BRCsがこれらの機能を備えるか否かを検討するために、BRCおよびnon-BRC群におけるアポトーシ



SP-C: Marker for alveolar type 2 cell AQP5: Marker for alveolar type 1 cell

図6 BRCsにおける肺胞上皮細胞マーカー(SP-C・AQP5)の陽性率。上・中段はSP-C陽性細胞の代表的なパネル。下段はフローサイトメトリー解析(% SP-C・% AQP5)の結果をグラフ化したもの。

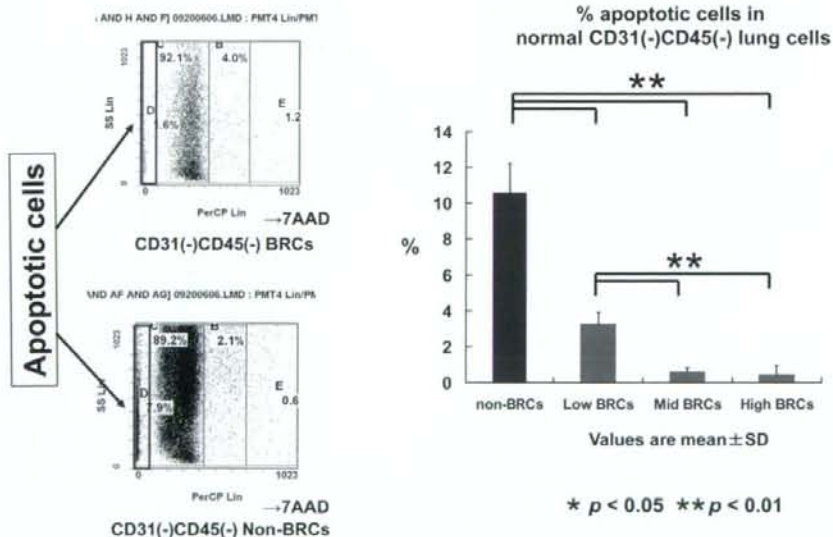


図7 正常成体マウス肺内のBRCs・non-BRCsにおけるアポトーシス細胞率。右はフローサイトメトリー解析の結果をグラフ化。N=5。

ス細胞率を、DNA染色色素(7AAD)を用いて計測した。7AAD陰性細胞(DNAが崩壊している細胞=アポトーシス細胞)の存在率はBRC群において有意に

低く、なかでもその傾向はmid BRC/high BRC群に強く認められた。(図7) さらに、BRCsについて障害性薬剤に対する耐性能を調べるために、BrdU標

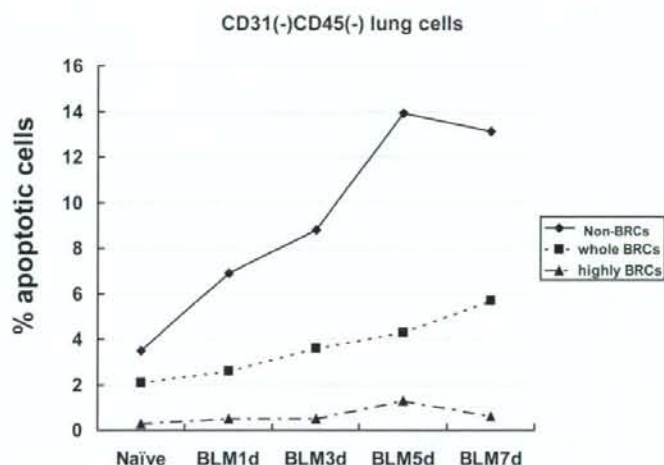


図8 プレオマイシン肺障害モデルにおける肺BRC・non-BRC分画中アポトーシス細胞率の経時的変化。

識マウスにBLMを投与し、経時的に各分画のアポトーシス細胞率を計測した。図8に示すようにnon-BRC群におけるアポトーシス細胞率は時間経過に伴い10%ほど増加するのに対し、BRCs全体では4%、high BRCsに限ると1%未満の増加しか認めなかった。この結果より、BRCsにおいてはBrdU保持量依存的に薬剤耐性能が高くなっていることが示唆された。(図8)

考 察

今回の報告では、呼吸器領域において初めて新生マウスのBrdU標識による標識保持細胞の解析を行った。標識直後より、盛んな細胞分裂によりBRC存在率は急激に低下するが、生後発達の終了する30日齢以降は安定し、結果として成体肺におけるBRC存在率は他臓器に比べ予想以上に高く、肺が器官全体として低ターンオーバーであることが再確認された。呼吸器組織幹細胞に関する先行論文において各々が提唱する幹細胞群候補の存在率が非常に低いことを考えると、肺には未だ明らかにされていない幹細胞および前駆細胞群が相当数潜んでいる可能性が否定できない。ただし、幹細胞には非対称性分裂という性格を有しているものが多く存在していると考えられており、細胞分裂を繰り返したであろうnon-BRCsにも組織幹細胞が含まれているはずである。実際、今回我々が対象にしたBRCsに既

知の呼吸器組織幹細胞候補であるbronchio-alveolar stem cells (BASCs)が重複しているか否かを検討すると、図9に示す如く、BrdU保持量が中程度のBRCsでは一部BASCsと重複するものがあるものの、high BRCsにおいては全く重複を認めなかった。(図9)さらに、データは示していないが、組織上の分布の違いから、少なくともhigh BRCsについては、BASCsを含む既知の組織幹細胞候補とは異なるものであり、これらを探求することは未知の呼吸器組織幹細胞群を解明する糸口になると考えられた。

標識保持細胞解析は組織幹細胞同定法として認知されているものの、対象の細胞群(BRCs)が真の幹細胞か否かは慎重に検討する必要がある。本報告では幹細胞マーカーや肺上皮細胞マーカーとBrdUの共染色や、核内DNA染色によるアポトーシス細胞検出法を用いて、未分化状態・抗アポトーシス能・薬剤耐性能など、BRCsの幹細胞的性格を支持する諸結果を示した。ただし、上述のように肺BRCsは高率に存在するため、その多くはより分化段階の進んだ前駆細胞である可能性は高い。実際、図6で示したようにBrdU保持量の低いBRCsでは分化した上皮細胞を含む率が高く、high BRCsに比べ成熟した細胞群であることが分かる。したがって、これからの研究ではBRCs全体像の解析に加え、よりBrdU保持量の高い群(high BRCs)に注目したアプローチも重要になるとと思われる。

組織幹細胞研究においては、対象細胞が局所での

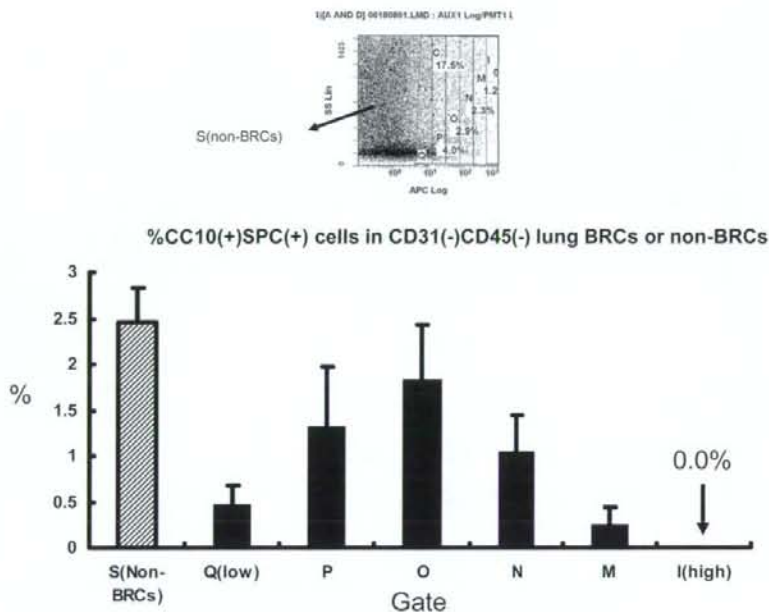


図9 BRCsにおけるBASCsの存在率

かに組織構築の維持に貢献し、またいかに障害時に再生応答に関与するのかを多角的に示すことが第一に重要である。その詳細な検討のなかで、幹細胞性格を制御する因子や再生応答に関わる因子を見出すことが難治疾患病態解明やその治療戦略に結びつくものであり、今後、本研究が掲げる大きな目的である。

参考文献

- 1) Engelhardt JF: Stem Cell Niches in the Mouse Airway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24: 649-652.
- 2) Rawlins EL and Hogan Brigid LM: Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities for many? *Development* 2006; 133: 2455-2465.
- 3) Kim CF: Paving the road for lung stem cell biology: bronchioalveolar stem cells and other putative distal lung stem cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: L1092-L1098.
- 4) Lama VN, Smith L, Thannickal VJ, et al: Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allografts. *J Clin Invest* 2007; 117: 989-996.
- 5) Giangreco A, Shen H, Stripp BR et al: Molecular phenotype of airway side population cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004; 286: L624-L630.
- 6) Taylor G, Lehrer MS, Lavker RM et al: Involvement of Follicular Stem Cells in Forming Not Only the Follicle but Also the Epidermis. *Cell* 2000; 102: 451-461.

アポリポ蛋白E欠損マウスにおけるシリカ肺傷害に対する ApoE アイソフォームの補充効果

長瀬 洋之 小島 康弘 鈴木 真徳 原 麻恵
吉原 久直 石田 博文 鈴木 直仁 大田 健*

【目的】シリカ肺傷害モデルでは肺におけるApoE mRNA発現が増強しており、ApoE欠損マウスでは、炎症細胞浸潤が減弱することを昨年報告した。本年は、病態に関与するApoEアイソフォームを同定する目的で、ApoE欠損マウスに対する、ApoE2, E3, E4補充の効果を検討した。

【方法】ApoE欠損マウス(A群: B6.KOR-Apoe^{0/0})に対し、PBS, ApoE2, E3, E4を気管内に先行投与し、翌日シリカを点鼻し14日後に解析した。コントロール群はシリカを単独点鼻したC57/BL6j(C群)を用いた。

【結果】シリカ点鼻に対し、A群では、C群と比してBALF総細胞数、好中球、リンパ球、マクロファージ数が有意に減少していた。A群に対するApoE2前投与で、総細胞数、マクロファージ数は、有意に回復したが、ApoE3, ApoE4の効果は認めなかった。好中球数、リンパ球数にはApoE2, ApoE3, ApoE4とも有意な効果を及ぼさなかった。気管支肺胞洗浄液中の、IL-12 p40, IL-1 α 濃度はA群とC群とで有意差は認めなかったが、A群に対するApoE2前投与で、PBS前投与群に比して有意に抑制された。

【結論】シリカ肺傷害において、ApoEアイソフォームのなかでも、ApoE2が肺局所のマクロファージ集積は促進するが、サイトカイン濃度は抑制した。生体内での病態に一定の役割を果たしていることが示唆されたが、その意義についてはさらなる検討が必要である。

Effect of ApoE Isoforms on Silica-induced Lung Injury in Apolipoprotein E-deficient Mice

Hiroyuki Nagase, Yasuhiro Kojima, Maho Suzukawa, Asae Hara,
Hisanao Yoshihara, Hirofumi Ishida, Naohito Suzuki, and Ken Ohta

Department of Medicine, Teikyo University School of Medicine, Tokyo, Japan

【Background】 We previously reported that ApoE mRNA expression is up-regulated in lungs of silica-induced lung injury model and accumulation of inflammatory cell in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) is diminished in ApoE-deficient mice. In this study, to identify which isoform of ApoE have functional role, we investigated the effect of supplementation of ApoE2, ApoE3, and ApoE4 to ApoE-deficient mice.

【Methods】 We administered ApoE2, ApoE3, or ApoE4 intratracheally to six weeks old male ApoE-deficient B6.KOR-Apoe^{0/0} mice and in the next day, silica was administrated intranasally. Fourteen days after silica administration, bronchoalveolar lavage was performed and cell counts, the concentrations of cytokines were determined by using Luminex system.

【Results】 As compared to wild-type C57/BL6j mice, total cell counts, the number of neutrophils, lymphocytes and macrophages in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were significantly decreased in ApoE-deficient mice after silica administration. Supplementation of ApoE2 to ApoE-deficient mice partially but significantly recovered the number of BALF macrophages, but ApoE3 and ApoE4 had no significant effects. Although the concentrations of IL-12 p40, IL-1 α in BALF were not significantly different between wild-type and ApoE-deficient mice, supplementation of ApoE2 to ApoE-deficient mice significantly suppressed the concentrations of BALF IL-12 p40 and IL-1 α .

【Conclusions】 Among three ApoE isoforms, only ApoE2 could partially recover the number of BALF macrophages in ApoE deficient mice. In contrast, the levels of BALF cytokines were suppressed by ApoE2 supplementation. Although the potential roles of ApoE2 in lung inflammation was suggested, the precise mechanisms should be further clarified.

はじめに

様々な原因による肺傷害, および続発する線維化に関与する分子は広く探索されてきているが, その治療戦略は完全には確立していない。昨年度までのシリカ肺傷害モデルを用いた研究で, シリカによる肺傷害においては, アポリポ蛋白E (ApoE)が発現増強することをcDNAアレイを用いて明らかにした。また, ApoE欠損マウスでは, 炎症細胞浸潤が減弱することを昨年報告した。ApoEには, ApoE2, E3, E4のアイソフォームがあるが, 本年は, 病態に関与するApoEアイソフォームを同定する目的で, ApoE欠損マウスに対する, ApoE2, E3, E4補充の効果を検討した。

方 法

● 試薬と動物

6週齢のC57BL/6♂マウス及び, ApoE欠損マウスであるB6.KOR-Apoe^{0/0}マウス (Japan SLC)を用いた。郡山市由来のKORマウスの中で, 毛並みの異常マウスが発見され, その原因がアポE欠損による自然発症高脂血症であることが明らかとなり, SHL (Spontaneously Hyperlipidemic mouse)マウスと命名された。B6.KOR-Apoe^{0/0}マウスは, SHLマウスとC57BL/6マウスの交配を繰り返して得られたコンジェニックマウスであり, SHLマウスの遺伝的背景は0.02%以下とされている¹⁾。B6.KOR-Apoe^{0/0}マウスでは, 8-51週齢において, 総コレステロール値が, 350-480 mg/dL, 中性脂肪値が, 140-230 mg/dLと高脂血症を呈するとされている¹⁾。シリカ粒子 (石英標準試料/JAWE451/遊離珪酸分析用, 日本作業環境測定協会, 東京)は, 生理食塩水に懸濁後, ultrasonicしたものをを用いた。

● 実験プロトコル

B6.KOR-Apoe^{0/0}マウスに対し, 50 µlのPBSに溶解した, 30 µgのApoE2, E3, E4, またはPBSを気管内に先行投与し, 翌日16 mgのシリカ粒子を単回点鼻し14日後に解析した。C57BL/6マウスにも16 mgのシリカ粒子を単回点鼻し14日後に解析した。

評価項目として, 気管支肺胞洗浄液 (BALF)中の細胞数, 細胞分画, BALF中サイトカイン・ケモカイン濃度を検討した。BALFは, マウスの気管内に28 Gのカニューレを挿入し, 生理食塩水0.7 mlを注入, 回収することを繰り返し5 mlのBALFを採取した。遠心分離後, 凍結した上清はFreeze dry処置後に-80°Cで保存し, 測定時に10倍濃縮となるように, PBSで溶解した。BALF中サイトカイン・ケモカイン濃度は, Mouse Cytokine 17-Plex Panel Kit (BIO-RAD, Hercules, USA)を用い, 蛍光マイクロビーズアレイシステムであるLuminex[®] (Hitachi, Tokyo)で測定し, G-CSF, GM-CSF, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-17, monocyte chemotactic protein (MCP-1), macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α), MIP-1 β , RANTES, keratinocyte chemoattractant (KC)の17ターゲットの濃度を測定した。各ターゲットに対する特異的二次抗体には, ターゲット毎に異なる蛍光強度で標識された17種類のビーズが結合しており, ビオチン結合特異的二次抗体, ストレプトアビジン-PEでターゲットの濃度を検出した。すなわち, Freeze dry後のBALF上清50 µlをビーズ結合一次抗体と30分反応させ, 洗浄後二次抗体と30分反応, さらに洗浄後, ストレプトアビジン-PEと10分反応させ, Luminex[®]で測定した。

● 統計: C57BL/6マウス及び, B6.KOR-Apoe^{0/0}マウスにおける群間比較は, Studentのt検定で行った (図1)。多群間の比較は, one-way ANOVA検定を行い, 有意差を認めた場合, 個別の群間をTukey-KramerのHSD検定を用いて比較した (図2, 3)。

結 果

シリカ点鼻に対し, ApoE欠損マウス群では, 野生型のC57BL/6マウス群と比してBALF総細胞数が有意に少なかった (図1)。細胞分画としては, 好中球, リンパ球, マクロファージ数が有意に減少していた (図1)。

次に, ApoE欠損マウスにApoE2, ApoE3, ApoE4を補充し, いかなるApoEアイソフォームが炎症細胞浸潤を回復させるかを検討した。図2に示すように, BALF総細胞数は, ApoE3, E4の補充では, 有意な回復を認めなかったが, ApoE2を補充すると,

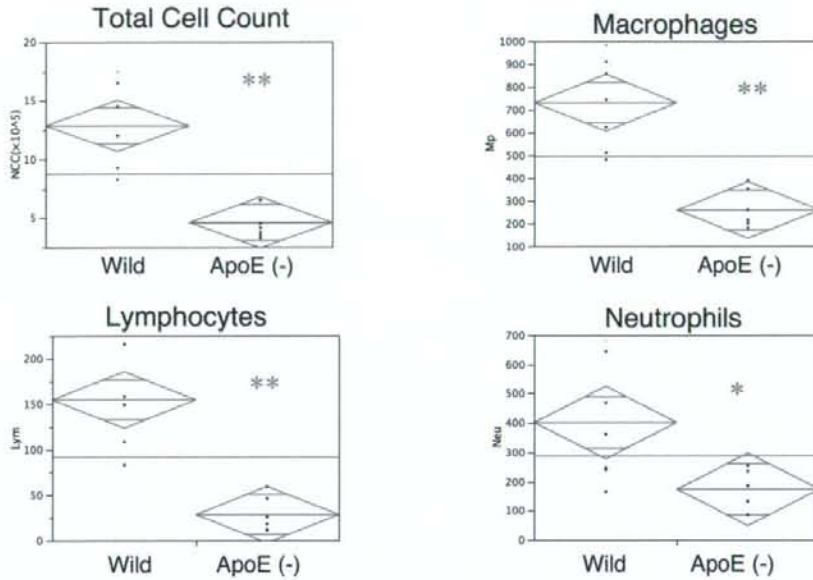


図1. BALF中の細胞分画
野生型マウスとApoE欠損マウスにシリカを点鼻投与し、14日後に気管支肺胞洗浄を施行し、細胞分画を計数した。

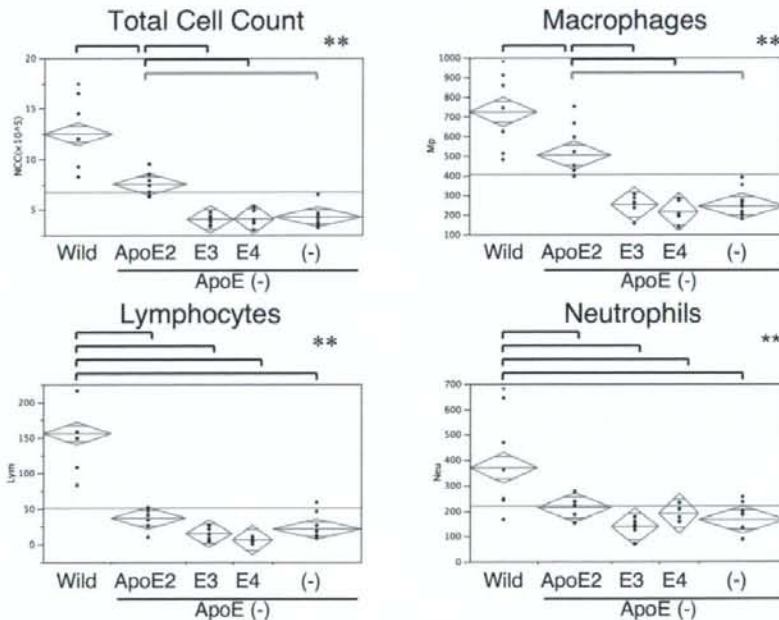


図2. BALF細胞分画に及ぼすApoEアイソフォームの補充効果
ApoE欠損マウスにApoE2, ApoE3, またはApoE4を気管内投与し、翌日にシリカを点鼻投与、14日後に気管支肺胞洗浄を施行し細胞分画を計数した。コントロールとして、シリカのみを投与した野生型マウスを検討した。

野生型の細胞集積には及ばないが、部分的に細胞数
が有意に回復した。細胞分画については、マク
ロフェージが、ApoE2の補充で有意に回復していたが、
リンパ球や好中球は有意な回復を認めなかった。

ApoE2で部分的に炎症細胞浸潤が回復した機序を
検討する目的で、BALF中のサイトカイン濃度を検
討した。17種のサイトカイン、ケモカイン濃度
について、群間で有意差を認めた因子は、IL-12 (p40)

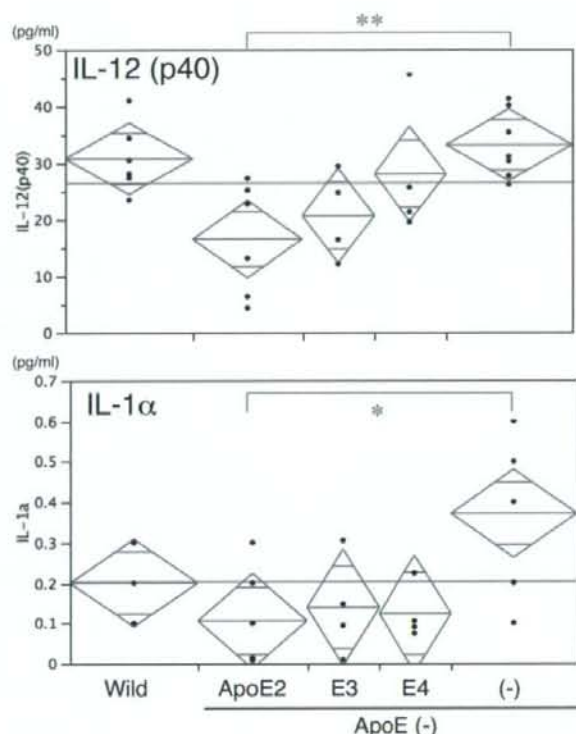


図3. BALF中サイトカイン濃度に及ぼすApoEアイソフォームの補充効果
ApoE欠損マウスにApoE2, ApoE3, またはApoE4を気管内投与し, 翌日にシリカを点鼻投与, 14日後に気管支肺胞洗浄を施行し, BALF中サイトカイン濃度を検討した. コントロールとして, シリカのみを投与した野生型マウスを検討した.

および, IL-1 α であった (図3). IL-12 (p40), IL-1 α 濃度はともに, ApoE欠損マウスと野生型において有意差を認めなかったが, BALF中総細胞数が抑制されていたApoE欠損マウスにおいて, 野生型と比較して抑制されておらず, IL-1 α 濃度については, 逆に高値傾向であった. さらに, ApoE欠損マウスに対するApoE2の前投与で, 炎症細胞浸潤は部分的に回復し増加していたが, IL-12 (p40), IL-1 α 濃度は逆に有意に抑制されていた.

考 察

昨年度の研究では, ApoE欠損マウスではシリカ投与で惹起される炎症細胞浸潤が抑制されていることが明らかとなったことから, ApoEはシリカ肺傷害モデルにおいて, 向炎症作用を有していることが示唆された. 本年度の研究では, ApoE欠損マウスに対して, ApoEアイソフォームの中でもApoE2の補充によって, マクロファージを中心とする炎症細

胞浸潤が回復することが明らかとなった. しかしながら, BALF中のIL-12 (p40), IL-1 α 濃度は, ApoE2の補充で, むしろ有意に濃度が低下しており, 炎症細胞浸潤とサイトカイン濃度に及ぼす影響については乖離が認められた.

ApoEはコレステロール, 中性脂肪, リン脂質などの脂質と結合するアポ蛋白のひとつであり, 脂質はApoEと結合することで, LDL受容体を介して肝細胞への取り込みが可能となる. 従って, ApoEを欠損すると脂質の細胞内取り込みが障害され, 高脂血症を呈するため, ApoEノックアウトマウスや欠損マウスは実験的な高脂血症モデルとして用いられている.

ApoEの主要産生臓器は肝であるが, 肝細胞の他に, マウスやラットの腹腔由来マクロファージ², 神経由来線維芽細胞³での発現が報告され, ヒト線維芽細胞では核内に優位に局在すること⁴が報告されている. さらに近日, I型肺胞上皮細胞でのApoE蛋白発現が報告された⁵. このような多彩な産生細

胞のレパトリーに加えて、血清中のApoEは、脂質代謝にはその総量の2-10%で十分であることから^{6,7}、ApoEの脂質代謝以外における役割が示唆されてきている。

そのひとつの側面として、ApoEが免疫系の細胞に及ぼす影響が検討されている。ApoEは、PHA刺激によるリンパ球活性化を抑制すること^{8,9}、urateによる好中球活性化を抑制することが報告されており¹⁰、炎症細胞の活性化を抑制するという報告が多い。また、ApoE発現は、神経由来線維芽細胞に対する冷却ストレス¹、LPSの静脈内注射¹¹、スタウロスポリンによるヒト線維芽細胞のアポトーシス誘導時¹などのストレス環境下において、増強することが報告されている。さらに、高濃度酸素による肺傷害で、肺組織におけるApoE蛋白発現が増強することも示されており²、種々のストレス下でApoE発現が増強することが示されている。ApoEがストレス保護的に働くのか、あるいは起炎物質として働くのかに関しては、ApoEノックアウトマウスでは、リステリア腹腔内感染において菌体排除が障害され、致死率が高いこと¹²や、野生型ラットにおける高濃度酸素による肺傷害が、ApoE2の気管内先行投与で抑制されたことから³、ApoEは正常な免疫反応形成に必要な、保護的分子として働いていることが示唆されている。

299のアミノ酸からなるApoEの遺伝子には、112番目と158番目のアミノ酸残基の違いによる3種のアリルがあり、ApoE3 (Cys¹¹²Arg¹⁵⁸)、ApoE4 (Arg¹¹²Arg¹⁵⁸)、ApoE2 (Arg¹¹²Arg¹⁵⁸)が存在し、ApoE3が野生型と考えられている。日本人では、ApoEの表現形として、ApoE2が3%、ApoE3が84%、ApoE4が11%を占めるとされている¹³。ApoE4は、家族性アルツハイマー病発症の危険因子とされているが¹⁴、炎症病態に対するApoEアイソフォームの影響については不明な点が多い。今回の検討では、ApoE2が炎症細胞集積を促進させる可能性が示唆されたが、BALFサイトカイン濃度は、抑制傾向に働いており、複雑な制御機構が存在する可能性がある。今後は、炎症面のみならず、肺線維化に及ぼす影響を明らかにする事や、ヒト肺線維症における肺局所のApoE発現調節、また、ヒトにおけるApoEアイソフォームと肺線維症との関連等が検討すべき課題と考えている。

文 献

- 1) Matsushima Y, Sakurai T, Ohoka A, Ohnuki T, Tada N, Asoh Y, et al. Four strains of spontaneously hyperlipidemic (SHL) mice: phenotypic distinctions determined by genetic backgrounds. *J Atheroscler Thromb* 2001; 8:71-9.
- 2) Driscoll DM, Getz GS. Extrahepatic synthesis of apolipoprotein E. *J Lipid Res* 1984; 25:1368-79.
- 3) Saada A, Dunaevsky-Hutt A, Aamar A, Reichert F, Rotshenker S. Fibroblasts that reside in mouse and frog injured peripheral nerves produce apolipoproteins. *J Neurochem* 1995; 64:1996-2003.
- 4) Quinn CM, Kagedal K, Terman A, Stroikin U, Brunk UT, Jessup W, et al. Induction of fibroblast apolipoprotein E expression during apoptosis, starvation-induced growth arrest and mitosis. *Biochem J* 2004; 378:753-61.
- 5) Chen J, Chen Z, Chintagari NR, Bhaskaran M, Jin N, Narasaraaju T, et al. Alveolar type I cells protect rat lung epithelium from oxidative injury. *J Physiol* 2006; 572:625-38.
- 6) Van Eck M, Herijgers N, Yates J, Pearce NJ, Hoogerbrugge PM, Groot PH, et al. Bone marrow transplantation in apolipoprotein E-deficient mice. Effect of ApoE gene dosage on serum lipid concentrations, (beta)VLDL catabolism, and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:3117-26.
- 7) Linton MF, Atkinson JB, Fazio S. Prevention of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation. *Science* 1995; 267:1034-7.
- 8) Avila EM, Holdsworth G, Sasaki N, Jackson RL, Harmony JA. Apoprotein E suppresses phytohemagglutinin-activated phospholipid turnover in peripheral blood mononuclear cells. *J Biol Chem* 1982; 257:5900-9.
- 9) Laskowitz DT, Lee DM, Schmechel D, Staats HF. Altered immune responses in apolipoprotein E-deficient mice. *J Lipid Res* 2000; 41:613-20.
- 10) Terkeltaub RA, Dyer CA, Martin J, Curtiss LK. Apolipoprotein (apo) E inhibits the capacity of

monosodium urate crystals to stimulate neutrophils. Characterization of intraarticular apo E and demonstration of apo E binding to urate crystals in vivo. *J Clin Invest* 1991; 87:20-6.

11) Van Oosten M, Rensen PC, Van Amersfoort ES, Van Eck M, Van Dam AM, Breve JJ, et al. Apolipoprotein E protects against bacterial lipopolysaccharide-induced lethality. A new therapeutic approach to treat gram-negative sepsis. *J*

Biol Chem 2001; 276:8820-4.

12) Roselaar SE, Daugherty A. Apolipoprotein E-deficient mice have impaired innate immune responses to *Listeria monocytogenes* in vivo. *J Lipid Res* 1998; 39:1740-3.

13) Moore RJ, Chamberlain RM, Khuri FR. Apolipoprotein E and the risk of breast cancer in African-American and non-Hispanic white women. *Oncology* 2004; 66:79-93.

TGF- β は肺障害後の線維化の過程で、 肺胞上皮と内皮細胞のバリアの低下を誘導する。

太田 洋充 海老名雅仁* 廣田 直 小野 学
光石陽一郎 大河内信也 久田 修 貫和 敏博

肺障害とそれに引き続く肺線維化において、肺胞上皮と血管内皮のバリア機能の破綻が重要と考えられるが、具体的な分子生物学的な機序についてはほとんど理解されていない。近年、正常組織ではタイトジャンクションが細胞間のバリアを形成し、上皮細胞シートの透過性を規定することが明らかにされた。今回、我々は、肺障害とそれに続く線維化がタイトジャンクションに及ぼす影響と、その病理的な意義を検討するため、タイトジャンクションの主要な構成成分である claudin の発現が、肺障害モデルマウスの肺でどのように変化するかを検討した。claudin family として claudin-1 から claudin-24 まで 24 のアイソタイプが知られているが、ノーザンブロットによる解析により、正常肺において claudin-5 と claudin-18 が強く発現されていることを同定した。免疫染色による観察の結果、肺胞壁の毛細血管内皮細胞には claudin-5 が発現しており、肺胞上皮細胞には claudin-18 が発現していることを明らかにした。次に、プレオマイシン腹腔内投与により引き起こされたマウス肺障害モデルで claudin の発現の変化を検討した。プレオマイシン投与後、claudin-5 は急性期より、claudin-18 は慢性期においてタンパクレベル、mRNA レベルの両方で発現の低下を認めた。in vitro の実験では、臓器の線維化の主要な調節因子であるトランスフォーミング増殖因子 β (Transforming growth factor- β :TGF- β)は、上皮細胞では、タイトジャンクションの消失と α -SMA の発現、また、線維芽細胞状への形態変化を誘導し、上皮間葉転換(Epithelial-mesenchymal transition: EMT)を起こしたと考えられた。一方、内皮細胞では claudin-5 の発現を低下させた。これらの実験結果は、肺障害時に上皮細胞と内皮細胞の両方のタイトジャンクションが影響を受けた結果、細胞間のバリアが破綻し透過性が亢進する可能性を指摘するものであり、また、上皮と内皮両方のタイトジャンクションの変化がTGF- β の作用により引き起こされていることを示唆するものである。

Transforming growth factor- β induced altered expression of tight junction molecules in alveolar septa, during lung injury.

Hiromitsu Ohta, Masahito Ebina, Nao Hirota, Manabu Ono,
Yoichiro Mitsuishi, Sinnya Oukouchi, Syuu Hisata, and Toshihiro Nukiwa

Department of Respiratory Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai 980-8574, Japan

While dysfunction of alveolar barriers is a critical factor in the development of lung injury and subsequent fibrosis, the molecular mechanisms underlying this dysfunction remain poorly understood. To clarify the pathogenic roles of tight junctions in lung injury, we examined the altered expression of claudins, the major components of tight junctions, in the lungs of disease models and in those of patients with pulmonary fibrosis. Among the 24 claudins, claudin-5 and -18 were identified as the major components of alveolar tight junctions; these claudins were expressed in endothelial cells and in alveolar epithelial cells, respectively. In bleomycin-induced lung injury, the levels of claudin-5 and claudin-18 expression decreased, and the integrity of epithelial tight junctions was disturbed in the fibrotic lesions. Attenuated claudin-5 and claudin-18 expression were observed in the lungs of patients with pulmonary fibrosis. Transforming growth factor- β (TGF- β), a critical mediator of pulmonary fibrosis, was up-regulated after bleomycin-induced lung injury. In cultured cells, the addition of TGF- β decreased the expression of claudin-5 in endothelial cells (HUVEC), and disrupted tight junctions in epithelial cells (A549). These results suggest that TGF- β may play a pivotal role in the disruption of epithelial and endothelial tight junctions through modified expression of claudins and contribute to dysfunction of alveolar barrier during lung injury.

研究目的

急性肺障害(ALI)は難治性の疾患であり、30-40%以上の高い死亡率が認められる¹⁾。ウイルス感染症、敗血症、毒性物質の吸入、薬剤、多発外傷のような様々な誘因により肺の間質に炎症が起こり、急性の肺障害の原因となる。肺障害の急性期(滲出期)には、肺胞壁の浮腫と肺胞内への滲出によりガス交換が阻害される。その後、肺胞壁と肺胞腔内の線維化を認める器質期に移行する。このような肺胞への滲出と線維化に関する分子的機構はまだ不明確なままだが、肺胞でのair-fluid barrierの破綻が重要と考えられる^{2,3)}。急性肺障害後の血管の透過性亢進が線維化につながるとする報告もなされている⁴⁾。正常な組織では、上皮の透過性はタイトジャンクションにより規定されており、肺胞における透過性の亢進は、肺胞上皮細胞と血管内皮細胞のタイトジャンクションの機能不全が重要な役割を担っていると考えられる。例えば、sphingosine 1-phosphateはタイトジャンクションを急速に解離させることにより肺水腫を誘発するという報告⁵⁾、また、TNF- α の抑制により、炎症時の肺で、タイトジャンクションの透過性の亢進が减弱する⁶⁾とした報告もあり⁶⁾、これらの事実は、肺におけるタイトジャンクションによるバリアの重要性を示唆するものである。

タイトジャンクションは脊椎動物細胞での細胞間結合のうち最もapical面に位置する細胞間接着装置である^{7,8)}。claudinの他にoccludin、ZO-1、ZO-2とZO-3などがこれまで、タイトジャンクションの構成分子として同定された。その中で、claudinがタイトジャンクションを単独でも形成する主要な構成成分と考えられている⁹⁾。claudinは約23 kDaのタンパクで、ヒトとマウスでは24のアイソタイプからなるファミリーを形成している。claudinの発現パターンは臓器により異なり、その構成パターンの差が、臓器でのタイトジャンクションの性質の差を説明するものと考えられている。これまでに、マウスでは、claudin-1、-3、-4、-5、-7、10、-15、及び-18が肺で発現している事実が報告されている^{10,11)}。しかし、多くの研究は培養細胞で行われており、また、claudin

の肺での正確な分布はまだ明らかにされていない。また、肺障害後のclaudinの変化についてはほとんど知られていない。

我々は肺損傷と線維化の過程の中で、タイトジャンクションの障害がバリアの破綻の一因になっていると予想し、肺障害時のタイトジャンクションの構成分子の変化、特にclaudinの変化を中心に検討を行った。

研究方法

動物とブレオマイシンによる肺障害モデル

マウスはCharles River Japan(横浜, 日本)から10-12週齢の野生型 C57BL/6を購入した。ブレオマイシンによりマウス肺障害モデルを作成した。1.0mg/body、ブレオマイシン塩素酸塩(日本化薬, 東京, 日本)を0.1mlの生理食塩水に溶解し7日間、隔日(0日、2日、4日、6日)で当該マウスの腹腔内に投与した。7日、14日、28日に、苦痛を与えないように配慮し、マウスは屠殺した。動物実験はアメリカ国立衛生研究所のガイドライン「*Guide for the Care and Use of Laboratory animals*」に従って行った。

細胞培養

ヒトA549肺癌細胞株は、ウシ胎児血清を10%添加したDulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)培地で培養した。ヒトの臍静脈内皮細胞(Human Umbilical Vein Endothelial Cells: HUVEC)はCambrex Bio Science Walkersville(Clonetics, Walkersville, MD)から購入した。メーカーのプロトコールに従い、内皮細胞添加因子セット(EGM-2 singlequots)を添加した内皮細胞増殖培地(EGM-2)でHUVECを培養した。

ELISA

マウスのBAL上清中のTGF- β 1を、市販のELISAキット(R&D)を用い、メーカーのプロトコールに従い測定した。マウスはControl、ブレオマイシン投与7日後、14日後、28日後の4つの群でそれぞれ3匹ずつ測定した。

マウス肺免疫ブロット

マウス肺の免疫ブロットは、マウス肺を、protease inhibitorを加えた3mlのRIPAバッファーを用いて、ホモジナイズし、遠心分離を行い、上清を回収し行った。1次抗体として、claudin-5、claudin-18、

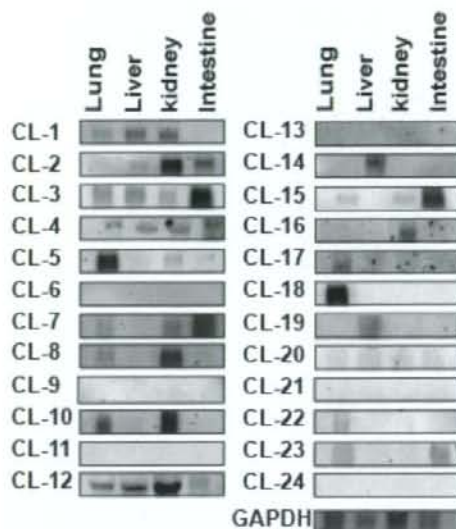


図1 肺、肝、腎及び小腸におけるノーザンブロット法による claudin-1 から-24(CL-1 to CL-24)の発現解析。これらの臓器から total RNA を抽出し、DIG でラベルした claudin-1 から-24の DNA プローブを作成し検出した。

occludin, PECAM に対する抗体を使用した。2次抗体として、ペルオキシダーゼと共役した2次抗体を使用した。β-Actin 抗体を定量性のコントロールとして使用した。結果は、Image J ソフトウェアを使用し半定量的に解析した。

ノーザンブロット法

マウスの臓器から、Acid guanidinium-Phenol-Chloroform(AGPC)法により、total RNA を抽出した。ノーザンブロットにより RNA を定量した。

Quantive real-time PCR

コントロールマウスの肺と、プレオマイシン障害7日後、14日後、28日後のマウス肺から、AGPC法により、total RNA を抽出した。それらの total RNA を用いて、claudin-5 及び claudin-18 の mRNA の発現レベルを、 $\Delta\Delta Ct$ 法による相対定量法で解析した。GAPDH をリファレンス遺伝子とした。

免疫蛍光顕微鏡検査法

マウス肺及び培養細胞を固定後、免疫染色法により観察した。

研究結果

肺での claudin family の発現

我々は、まず全24の claudin(claudin-1 to -24)の、

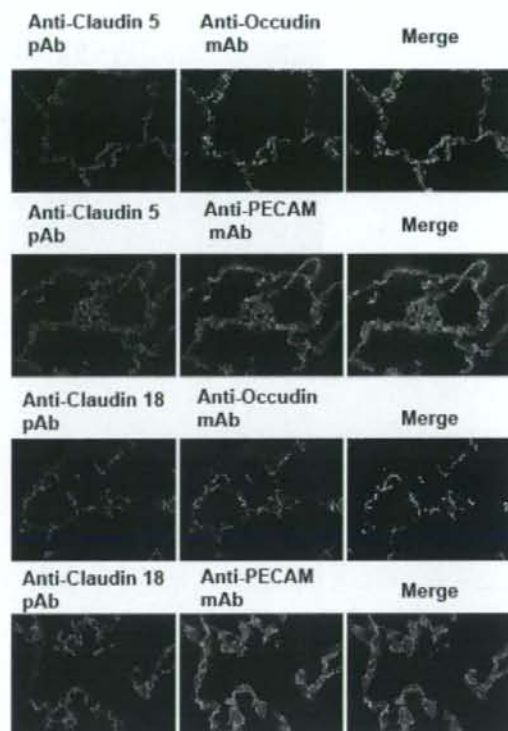


図2 claudin-5 と claudin-18 の免疫蛍光染色による、肺胞壁での発現部位の同定。標本切片は、抗 claudin pAbs, 抗 PECAM mAb あるいは抗 occludin mAb で免疫二重染色した。

マウス肺での発現を、ノーザンブロットで検討し、どの種類の claudin が肺で強く発現しているか検討した。肝臓、腎臓と小腸の claudin の発現を、コントロールとして同時に解析した。その結果、肺で主に発現するものとして claudin-5 と claudin-18 を同定した(図1)。特に、claudin-18 はこれらの臓器の中では肺でのみ発現し、肺に対する臓器特異性が高いものと考えられた。

claudin-5 は血管内皮細胞に claudin-18 は肺胞上皮細胞に発現する。

claudin-5 と claudin-18 はいずれも肺胞壁で線状の染色を認めるものの、occludin の染色と一致したのは claudin-18 のみであった。つまり、claudin-18 は肺胞上皮細胞に特異的と考えられた。一方、claudin-5 は、occludin とではなく、血管内皮細胞のマーカーである血小板内皮細胞接着分子(PECAM)の染色と一致した。そのため、claudin-5 は、血管内皮細胞に特異的と考えられた(図2)。さらに、ラッ

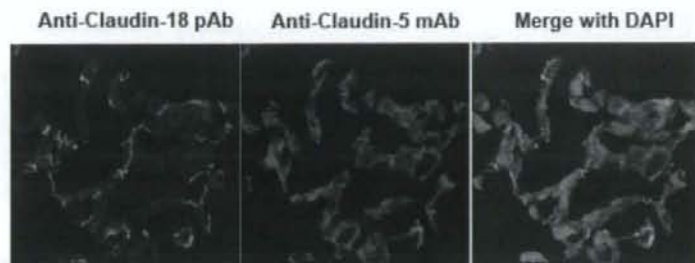


図3 Ratの肺凍結切片での抗claudin-5 mAbと抗claudin-18 pAbによる免疫二重染色。凍結切片は抗claudin-5 mAbと抗claudin-18 pAbで免疫二重染色を行った。核はDAPIで染色した。

ト肺の凍結切片をマウス抗claudin-5 mAbとウサギ抗claudin-18 pAbで染色した。強拡大でclaudin-5とclaudin-18の両方で肺胞壁に線状の染色を認めたが、一致はしなかった(図3)。これらの結果により、claudin-18が肺胞上皮細胞のタイトジャンクションを形成する主要なclaudinであり、claudin-5は毛細管内皮細胞のタイトジャンクションを形成することが示された。

肺損傷後のタイトジャンクションの変化

我々は、肺障害とそれに続く線維化が、どのように肺胞上皮細胞と毛細管内皮細胞のタイトジャンクションに影響したのかを評価した。プレオマイシン腹腔内投与により、肺障害を誘導し、7日後、14日後、28日後に肺組織の変化を検討した^{12,13}。7日後、肺胞壁にわずかな細胞浸潤を認めた。14日後には、肺胞壁の肥厚と、肺胞壁、肺胞腔内両方に筋線維芽細胞を伴う線維化からなるびまん性の変化を認めた。28日後には、14日後とほぼ同様の变化を認めたが、その変化は軽度から重度まで様々であった(図4A)。

タイトジャンクションの変化は、7日後、14日後、28日後の時点で免疫プロットと免疫蛍光染色により評価した。免疫プロットの染色性を評価することにより、半定量的な解析を行った(図4B)。

claudin-18の発現は、7日後、急性期においてはほとんど変化しなかった(相対比 day7/コントロール: 0.97 ± 0.12 , $n = 5$, $p = 0.69$)。しかし、occludinの発現は、急性期より明らかに低下した(0.60 ± 0.08 , $n = 5$, $p = 0.008$)。28日後、慢性期には、occludinの発現は、コントロールの半分程度に減少したが(0.54 ± 0.14 , $n = 5$, $p = 0.008$)、claudin-18の発現減少も有

意に認めた(0.74 ± 0.11 , $n = 5$, $p = 0.008$)。

一方、血管内皮細胞での細胞間接着分子として、PECAMの発現は、7日後には統計学的有意差をもって亢進していた(1.59 ± 0.30 , $n = 5$, $p = 0.008$)。

28日後には、PECAMの発現は、統計的有意差は認めないが増加した。(1.55 ± 0.40 , $n = 5$, $p = 0.151$) 対照的にclaudin-5の発現は、7日後より減少傾向を認め(0.79 ± 0.12 , $n = 5$, $p = 0.151$)、28日後には有意に減少した(0.43 ± 0.08 , $n = 5$, $p = 0.008$)(図4C)。

また、Quantitative real-time PCRを用いて、 $\Delta\Delta Ct$ 法により、claudin-5とclaudin-18のmRNAの発現量のコントロールに対する相対的变化を検討した。claudin-5、claudin-18ともに組織学的な変化が少ない7日後から低下し、14日後、28日と時間経過とともに回復を認めた(図4D)。

免疫蛍光染色では、血管内皮のタイトジャンクションの成分であるclaudin-5とPECAMについては、肺の大部分では線状の染色を示し共在していた。しかし、一部の線維化病変では、claudin-5の発現が低下し、PECAMのみの線状の染色を認めた(図4E)。occludinの染色は肺胞壁においては明らかな減弱を認めた。しかし、気道上皮においては減弱を認めなかった。一方、occludinの染色が減弱したにも関わらず、claudin-18の染色は、明らかな変化は観察されなかった。しかし、線維化病変の周囲では、28日後、claudin-18の断片状の染色が目立ち、occludinと共在した。線維化病変では一部のタイトジャンクションが断片化していると考えられた(図4F)。

TGF- β が培養細胞でタイトジャンクションに関連する分子の発現を変化させる。

プレオマイシンによるマウス肺障害モデルでは、