

図4 ブレオマイシンによる肺障害モデルでは、タイトジャンクションの発現が変化した。
A C57BL/6マウスにブレオマイシンを腹腔内投与(0, 2, 4, 6日)し、7日、14日、28日に屠殺し、解析を行った。
B ブレオマイシン障害後の肺で、claudin-5, claudin-18, occludin, PECAMの発現量について、免疫プロットを行い、半定量的に解析した。
C claudin-5, claudin-18, occludin, PECAMの発現の変化。データはそれぞれのグループで5匹のマウスの平均と標準誤差を表す。* $p < 0.05$
D ブレオマイシン障害7日、14日、28日後の肺における、claudin-5, claudin-18 mRNAの相対的な発現量を Quantive real-time PCRを用いて解析した。データはそれぞれのグループで4匹のマウスの平均と標準誤差を表す。* $p < 0.05$
E ブレオマイシン障害28日後の肺を抗claudin-5抗体と抗PECAM抗体で免疫二重染色した。切片は claudin-5, PECAM, 及び DAPIで染色。
F ブレオマイシン障害28日後の肺を、抗claudin-18抗体と抗occludin抗体で免疫二重染色した。切片は claudin-18, occludin, 及び DAPIで染色。

BAL上清中のTGF- β 1が明らかに増加していることが観察された(各群 $n=3$) (図5A)。ヒトの肺胞上皮細胞のcell lineであるA549細胞を無血清培地で培養し、TGF- β を添加した48時間後に固定し免疫染色で観察した。occludinによる染色では、タイトジャンクションの線状の構造が断片状化していた、72時間後の染色では、細胞間のタイトジャンクションはほぼ消失した(図5B)。 α -SMAの発現の増加も認め、

細胞形態は線維芽細胞様に変化し、上皮間葉形質転換(EMT)が起きたためと考えられた。

ヒト臍静脈内皮細胞(HUVEC)の一次培養でも、claudin-5とPECAMは細胞間に染色を認めたが、TGF- β を培地に添加することにより、PECAMに比較し、claudin-5の発現は明らかに低下した(図5C)。また、血管内皮細胞成長因子(vascular endothelial growth factor : VEGF)を添加すると、claudin-5の

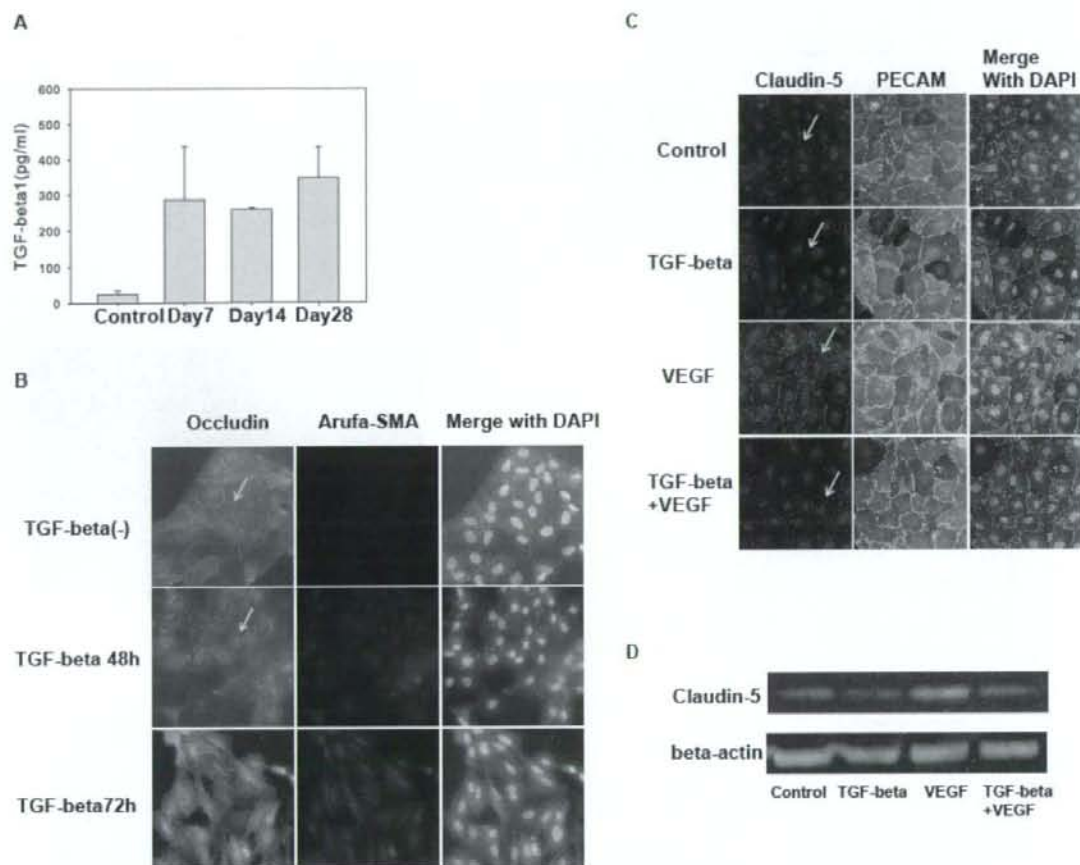


図5 TGF-βにより、培養されたA549細胞とHUVECで、タイトジャンクションの発現が変化した。
 A コントロールマウスと比較しプレオマイシン投与7日後、14日後、28日後のいずれの時点でもBAL中のTGF-β1は明らかな上昇を認めた。データはそれぞれ3匹のマウスの平均と標準誤差を示す。
 B TGF-βにより、A549細胞でEMTが誘導され、タイトジャンクションを消失した。TGF-β5ng/mlを培地に添加した。細胞は、occludin、α-SMAで免疫染色した。矢印はタイトジャンクションを示す。
 C TGF-βにより、HUVECでのclaudin-5の発現が低下した。培地にTGF-β5ng/ml、VEGF 20ng/ml、及びTGF-β5ng/ml + VEGF 20ng/mlを添加した。細胞は、claudin-5、PECAMで免疫染色した。矢印はタイトジャンクションを示す。
 D TGF-βにより、HUVECでのclaudin-5の発現が低下したことを免疫ブロットで確認した。β-Actinをタンパク量のコントロールとした。

発現は亢進した。しかし、VEGFとTGF-βの両方を添加した場合、claudin-5の発現は強く抑制された。免疫ブロットによる発現量の評価でも、同様なclaudin-5の発現の変化を確認した(図5D)。

考 察

この研究で、我々は、まずclaudin-5と claudin-18が肺で発現されている主要なclaudinであり、特に肺胞壁に分布することを明らかにした。claudin-5は血管内皮細胞に、claudin-18は肺胞上皮細胞に分

布した。第二に我々は肺障害後、内皮細胞と上皮細胞両方のタイトジャンクションに変化が認められることを示した。第三に、組織の線維化の中心的なサイトカインであるTGF-βを添加することにより、培養されたヒト上皮細胞と内皮細胞で、肺障害時と同様なタイトジャンクションの変化を認めた。これらの事実は、TGF-βが、肺障害時に肺胞壁のタイトジャンクションのバリア機能を低下させている可能性を示唆する。

我々は、肺障害により、同じ血管内皮の細胞間接着分子であるにも関わらず、claudin-5とPECAMの

発現変化に差があることを明らかにした。すなわち、肺障害後に、PECAMの発現は明らかに増加するにも関わらず、claudin-5の発現は減少した。RT-PCRによる検討により、claudin-5 mRNAの相対的な発現量の低下を認め、claudin-5のタンパク量の低下は、分解の亢進による可能性も否定はできないが、少なくとも、mRNAの発現減少が一因であることが確認された。

claudin-5欠損マウスの脳の解析により、血液脳関門でバリアが低下することが指摘されており¹⁰、claudin-5の発現の低下が、肺胞壁の内皮細胞のバリア機能の低下に関係することが推測される。

また、肺胞上皮細胞では、occludinの発現が急性期から減少したことは対照的に、claudin-18の発現は、mRNAではDay7より低下を認めたものの、タンパクレベルでは、肺損傷の急性期にあまり変化を認めなかった。occludin欠損マウスでの検討により、occludinの喪失がタイトジャンクションのバリア機能低下を起こさないことが指摘されている¹⁰。また、claudin-18は免疫染色上でもあまり変化を認めない。そのため、少なくとも、プレオマイシンの腹腔内投与モデルで、肺障害の急性期には、タイトジャンクションの発現自体が変化することが、透過性の亢進に寄与しているとは考えにくい。しかし、肺障害後の慢性期では、タンパクレベル、mRNAレベルの両方でclaudin-18の発現が低下しタイトジャンクションが障害されていることが示唆された。免疫染色によるclaudin-18の観察でも、線維化病変で点状の染色像が目立ち、タイトジャンクションが断片化し、連続性が喪失している可能性がある。

claudinの発現は、IFN γ 、TNF- α 、EGF、HGF、TGF- β 、IL-1 β などの様々なサイトカインにより影響を受ける。そのうち、TGF- β は、急性肺障害と間質性肺炎の両方で重要なサイトカインであることが広く知られている^{16,17}。これらの事実に基づき、我々は肺障害後のタイトジャンクションの変化にも、TGF- β が強い影響を与えること予想した。肺障害後には、TGF- β は急性期から慢性期にかけての上昇が知られている¹⁰。一方、*vitro*の実験では、A549細胞でTGF- β によりEMTを誘導した結果、タイトジャンクションは喪失した。我々は、さらに内皮細胞においても、TGF- β の作用によりclaudin-5の発現が抑制されることを示した。一次培養された内皮

細胞にTGF- β を加えることにより、内皮細胞のタイトジャンクションに特異的なclaudin-5の発現は、PECAMの発現に比較し低下した。TGF- β は、ES細胞から誘導された内皮細胞でclaudin-5の発現を抑制することが報告されており^{19,20}。一方、HUVECでは、TGF- β で刺激してもPECAMの発現は比較的变化しない²¹ことも既に報告されている。また、マイクロアレイによる実験系では、TGF- β I受容体であるactivin receptor-like kinase (ALK-5)の刺激により発現が低下する遺伝子群にclaudin-5は含まれている²²。同時に、マイクロアレイの結果によれば、PECAMの低下はclaudin-5に比較し軽度である。これらの研究は我々の結果と矛盾せず、TGF- β がタイトジャンクションに作用し、内皮細胞間のバリアを低下させる可能性を示唆する。

結 論

今回の結果により、肺損傷とそれに引き続く線維化の過程で、上皮細胞と内皮細胞のタイトジャンクションのclaudinの発現が変化することが観察された。血管内皮細胞のタイトジャンクションに特異的なclaudin-5はその発現が、急性期から低下し、肺胞上皮細胞のタイトジャンクションに特異的なclaudin-18は線維化病変周辺で断片化する。また、TGF- β は、上皮細胞と血管内皮細胞の培養細胞系で、肺障害時と同様なタイトジャンクションの変化を誘導した。このことは、肺障害時にTGF- β が上皮細胞と内皮細胞のバリアの機能不全を引き起こす鍵となる因子として作用する可能性を示唆する。

文 献

- 1) Suresh R, Kupfer Y, Tessler S. Acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med* 2000;343:660-1.
- 2) Crandall ED, Matthay MA. Alveolar epithelial transport. Basic science to clinical medicine. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;163:1021-9.
- 3) Tager AM, LaCamera P, Shea BS, et al. The lysophosphatidic acid receptor LPA1 links pulmonary fibrosis to lung injury by mediating fibroblast recruitment and vascular leak. *Nat Med* 2008;14:45-54.

- 4) Idell S. Coagulation, fibrinolysis, and fibrin deposition in acute lung injury. *Crit Care Med* 2003;31:S213-20.
- 5) Gon Y, Wood MR, Kiosses WB, et al. SIP3 receptor-induced reorganization of epithelial tight junctions compromises lung barrier integrity and is potentiated by TNF. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:9270-5.
- 6) Mazzone E, Cuzzocrea S. Role of TNF- α in lung tight junction alteration in mouse model of acute lung inflammation. *Respir Res* 2007;8:75.
- 7) Schneeberger EE. Heterogeneity of tight junction morphology in extrapulmonary and intrapulmonary airways of the rat. *Anat Rec* 1980;198:193-208.
- 8) Schneeberger EE, Lynch RD. Structure, function, and regulation of cellular tight junctions. *Am J Physiol* 1992;262:L647-61.
- 9) Furuse M, Tsukita S. Claudins in occluding junctions of humans and flies. *Trends Cell Biol* 2006;16:181-8.
- 10) Niimi T, Nagashima K, Ward JM, et al. claudin-18, a novel downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodomain transcription factor, encodes lung- and stomach-specific isoforms through alternative splicing. *Mol Cell Biol* 2001;21:7380-90.
- 11) Wang F, Daugherty B, Keise LL, et al. Heterogeneity of claudin expression by alveolar epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;29:62-70.
- 12) Budinger GR, Sznajder JI. The alveolar-epithelial barrier: a target for potential therapy. *Clin Chest Med* 2006;27:655-69; abstract ix.
- 13) Izbicki G, Segel MJ, Christensen TG, Conner MW, Breuer R. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int J Exp Pathol* 2002;83:111-9.
- 14) Nitta T, Hata M, Gotoh S, et al. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* 2003;161:653-60.
- 15) Saitou M, Furuse M, Sasaki H, et al. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 2000;11:4131-42.
- 16) Ebina M. TGF- β in pulmonary fibrosis. *In TGF- β in Cancer Therapy. Part III : TGF- β in inflammation and fibrosis.* Jakowlew SB ed. New Jersey, pp 569-78, 2007
- 17) Pittet JF, Griffiths MJ, Geiser T, et al. TGF- β is a critical mediator of acute lung injury. *J Clin Invest* 2001;107:1537-44.
- 18) Kaminski N, Allard JD, Pittet JF, et al. Global analysis of gene expression in pulmonary fibrosis reveals distinct programs regulating lung inflammation and fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:1778-83.
- 19) Watabe T, Nishihara A, Mishima K, et al. TGF- β receptor kinase inhibitor enhances growth and integrity of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J Cell Biol* 2003;163:1303-11.
- 20) Watabe T, Yamashita JK, Mishima K, Miyazono K. TGF- β signaling in embryonic stem cell-derived endothelial cells. *Methods Mol Biol* 2006;330:341-51.
- 21) RayChaudhury A, Elkins M, Kozien D, Nakada MT. Regulation of PECAM-1 in endothelial cells during cell growth and migration. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001;226:686-91.
- 22) Ota T, Fujii M, Sugizaki T, et al. Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for transforming growth factor- β in human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Physiol* 2002;193:299-318.

ブレオマイシン誘導肺線維化モデルにおける エラスターゼ阻害薬の抗線維化作用

武政 聡浩 石井 芳樹*

【目的】好中球エラスターゼ阻害薬であるシベレスタットの肺における抗線維化作用を検討した。

【方法】マウスに対しブレオマイシンを経気道的に投与し、肺線維化モデルを作成した。ブレオマイシン投与直後からシベレスタットを1日1回腹腔内投与し、7日後と14日後に抗線維化効果を比較した。

【結果】ブレオマイシン投与後7日目および14日目において、組織学的線維化と肺組織コラーゲン量の増加をシベレスタットは有意に抑制した。気管支肺胞洗浄液および肺組織中の活性型 transforming growth factor (TGF)- β 値の増加もシベレスタットで有意に抑制されたが、total TGF- β 値とTGF- β のmRNA発現の増加は抑制されず、シベレスタットはTGF- β の活性化を抑制すると考えられた。また、ブレオマイシン投与後の気管支肺胞洗浄液中の炎症細胞増加もシベレスタットで抑制された。

【結論】好中球エラスターゼ阻害薬シベレスタットの抗線維化作用の機序には、炎症細胞抑制作用と好中球エラスターゼの酵素活性で惹起されるTGF- β の活性化抑制作用が関与すると考えられた。

Neutrophil elastase inhibitor ameliorates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice

Akihiro Takemasa, and Yoshiki Ishii

Department of Pulmonary Medicine and Clinical Immunology, Dokkyo Medical University School of Medicine

RATIONAL: Neutrophil elastase (NE) has been thought to be implicated in the pathogenesis of lung fibrosis.

METHODS: To elucidate the role of neutrophil elastase in pulmonary fibrosis, we investigated the efficacy of a specific NE inhibitor, sivelestat sodium hydrate (sivelestat), in a murine model of intratracheally instilled bleomycin (BLM)-induced pulmonary fibrosis. Analyses of bronchoalveolar lavage fluid (BALF), homogenized lungs and histopathology were performed at 7 and 14 days after bleomycin instillation. Sivelestat was administered intraperitoneally once a day after BLM instillation.

RESULTS: Lung collagen content and pathological fibrosis findings in sivelestat-treated mice were attenuated at Day 7 and 14 after bleomycin instillation. Increased white blood cells in BALF were also attenuated. Active form of transforming growth factor (TGF)- β levels in BALF and homogenized lungs were significantly decreased in sivelestat-treated mice at Day 7 and 14. However, total TGF- β levels were not altered.

CONCLUSION: These results suggested that NE inhibitor, sivelestat, ameliorated bleomycin-induced lung fibrosis through the inhibition of TGF- β activation and inflammatory cell recruitment.

【目 的】

現在のところ特発性肺線維症に有効な治療法は確立されておらず、肺線維化機序の究明とともに抗線維化薬をはじめとする新たな治療戦略が模索されている。肺の線維化において、好中球エラスターゼ (neutrophil elastase, NE) が transforming growth factor (TGF)- β の活性化を介して関与することが、ノックアウトマウスを用いた検討で報告された¹⁾。そこで、ブレオマイシン (bleomycin, BLM) 誘導肺線維化マウスモデルにおいて、NE 阻害薬であるシベレスタットが肺における抗線維化作用を示しうるかを検討した。

【対 象】

C57BL/6 マウスに BLM (5mg/kg) を経気道的に投与し肺線維化モデルを作成した。BLM+ sivelestat 群では、BLM の投与後に NE 阻害薬 (シベレスタット, sivelestat) 100mg/kg を連日腹腔内投与した。BLM 群にはシベレスタットの代わりに生理食塩水を投与した。また、control 群では、BLM の代わりに生理食塩水を気道内投与した後、生理食塩水を連日腹腔内投与した。以上の3群間で以下の項目を比較した。

比較項目は、①気管支肺胞洗浄液 (bronchoalveolar lavage fluid, BALF) における炎症細胞数とその分画、②肺組織像、③Sircol collagen assay (Biocolor) を用いた肺のコラーゲン量、④合成基質 (Meo-Suc-Ala-Ala-Pro-Val-AMC) を用いた Immunocapture activity assay kit (Carbiochem) による BALF におけるエラスターゼ活性、⑤ ELISA kit (R&D Systems) を用いた BALF と肺組織における活性型 TGF- β 値および total TGF- β 値、⑥ real-time PCR (Forward primer; 5'-CGGGGCGACCTGGGCACCATCCATGAC-3', reverse primer; 5'-CTGCTCCACCTTGGGCTTGGCAGCCAC-3') を用いた肺組織における TGF- β の mRNA 発現量である。

また、BALF は細胞を除去後に凍結乾燥を用いた濃縮処理を行って各測定を行った。肺組織も homogenize した後に同様の濃縮処理を行って各測定を行った。

統計学的有意差の検定には paired t-test を使用した。

【結 果】

1. 組織所見 (Figure 1)

シベレスタットは、BLM 投与後 14 日において肺

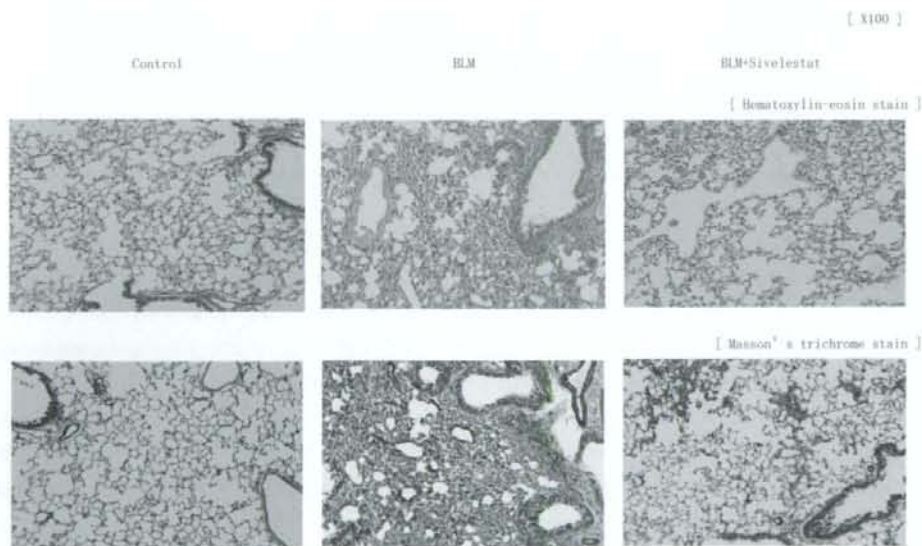


Figure 1. Histology Day 14

獨協医科大学 呼吸器・アレルギー内科

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

の炎症反応と線維化を有意に抑制した。

2. Sircol collagen assayによる肺コラーゲンの定量的比較 (Figure 2)

シベレスタットは、BLM投与後7日目および14日目におけるコラーゲン量の増加を有意に抑制した。

3. BALF中の白血球数と分画 (Figure 3)

BLM投与後7日目および14日目のBALFにおける白血球数の増加は、シベレスタットで有意に抑制された。また、マクロファージ数、好中球数およびリンパ球数の増加もそれぞれシベレスタットで有意に抑制された。

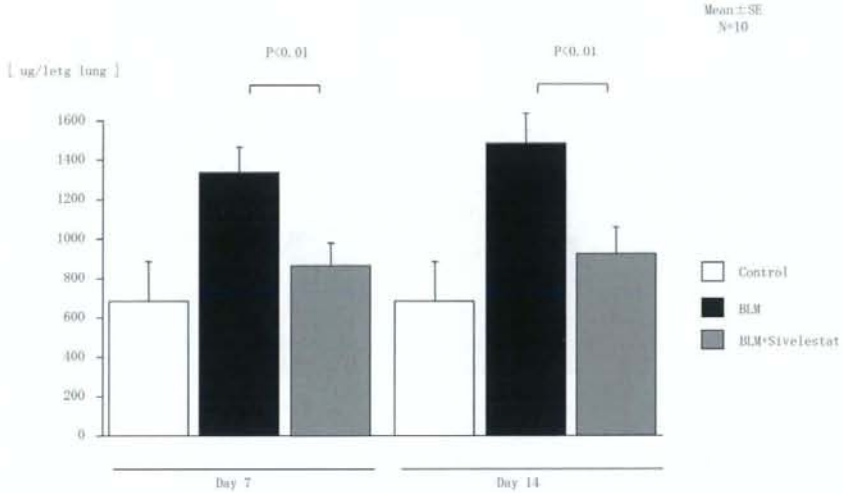


Figure 2. Collagen content

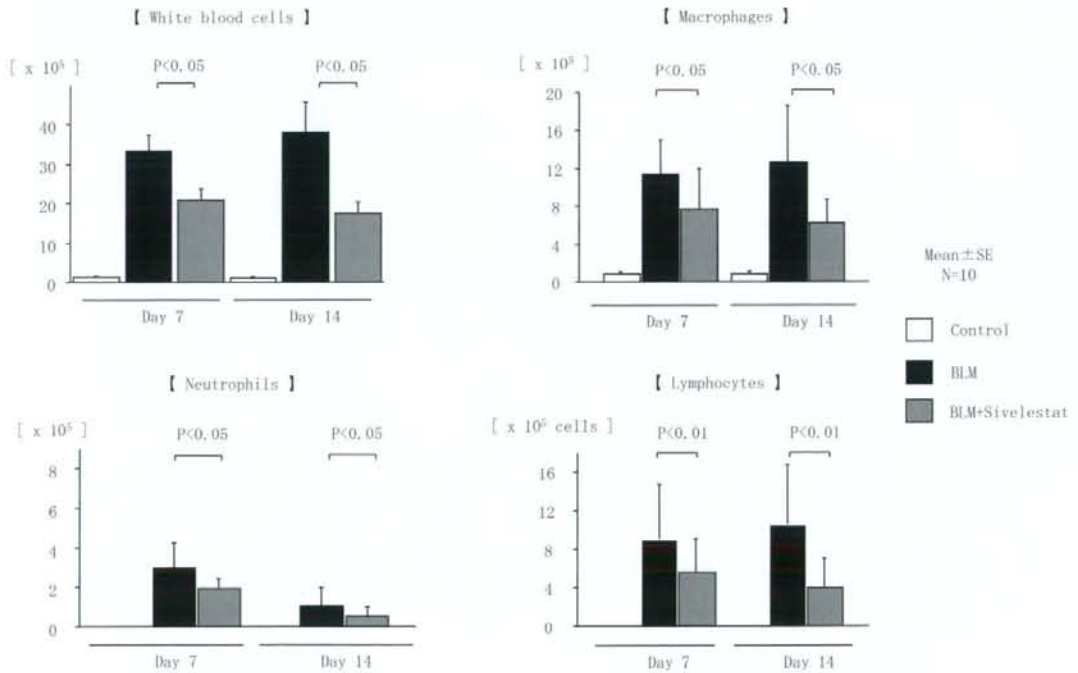


Figure 3. White blood cells and cell differentiation in BALF)

4. BALF中エラスターゼ活性

BLM投与後7日目および14日目にBALF中のエラスターゼ活性の増加は、シベレスタット投与によって有意に抑制された(Fig. 4).

5. BALFおよび肺組織中の活性型および総TGF-β量 (Fig. 5)

BLM投与後7日目および14日目のBALFにおける活性型TGF-β値の増加は、シベレスタットで有意に抑制された。しかし、BALFにおけるtotal TGF-β値の増加は抑制されなかった。肺組織におけるTGF-β値の変化はBALFにおける変化と同様で、活性型TGF-β値の増加は投与後7日目および14日

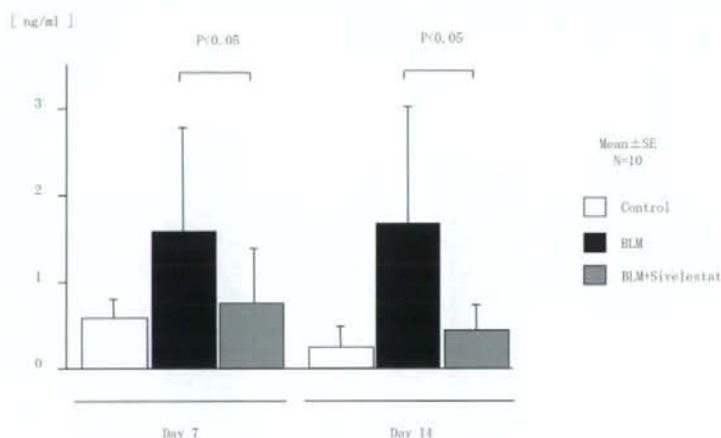


Figure 4. Elastase activity in BALF

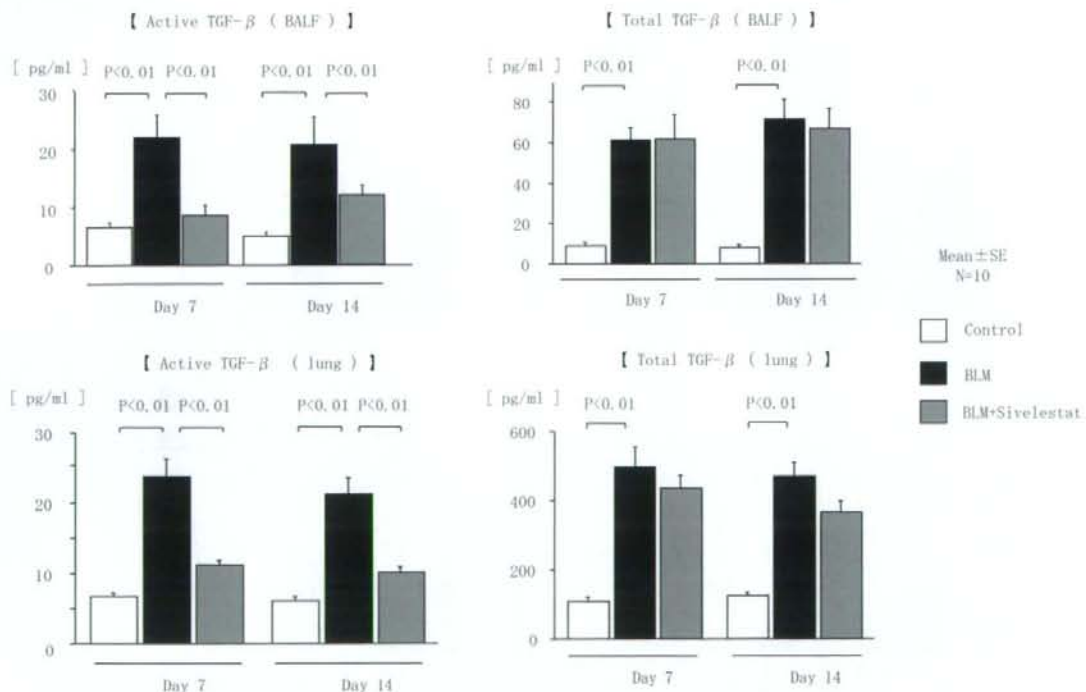


Figure 5. Active and total TGF-β in BALF and lung homogenized sample

目で有意に抑制された。しかし、total TGF- β 値の増加は抑制されなかった。

6. 肺組織中における TGF- β の mRNA 発現 (Fig. 6)

肺組織中の TGF- β の mRNA 発現を real-time PCR で評価したところ、BLM で増強された TGF- β の mRNA 発現はシベレスタットで抑制されなかった。

【考 察】

肺線維化に関与する NE の機序に関しては、十分に解明されていない。BLM を用いた動物モデルでは、シベレスタットには急性期炎症反応抑制作用が認められている^{21,23}。急性期から慢性期の線維化に関わるサイトカインの産生を抑制することも報告されており²¹、これらがシベレスタットの抗線維化機序の1つと考えられている。これに対し、NE のノックアウトマウスを用いた BLM 誘導肺線維化モデルの検討では¹¹、NE が抑制された状態では肺に急性期炎症反応は生じたが、肺の線維化は抑制された。その機序として、TGF- β の活性化抑制の関与が示唆されている¹¹。

今回の NE 阻害薬を使用した検討では、シベレスタット投与で急性期炎症反応の抑制と TGF- β の活性化抑制が確認された。BLM により total TGF- β 値の上昇は誘導されるが、シベレスタットにより TGF- β の活性化が抑制された。このことから、NE はその酵素活性で TGF- β の活性化を惹起し肺線維

化を形成するが、シベレスタットの抗線維化作用には炎症細胞抑制作用以外に TGF- β の活性化抑制作用が関与すると考えられた。

TGF- β の活性化に関わる機序には、plasmin などのプロテアーゼによる分解⁴、放射線照射⁵、pH⁶、活性酸素種⁶、 $\alpha v \beta 6$ インテグリンによる立体構造変化^{6,7}、インターロイキン-13⁸、thrombospondin-1⁹、CD44 抗原¹⁰ などさまざまな因子の関与が示唆されている。今のところ、TGF- β 活性化に NE がどの程度関与するかは不明である。しかし、今回の結果は NE ノックアウトマウスを用いた報告¹¹ を支持するもので、NE の肺線維化作用に TGF- β の活性化の関与が示唆された。NE は、その酵素活性により TGF- β の活性化を惹起し肺の線維化形成に関与する。シベレスタットは、TGF- β の活性化を抑制し抗線維化作用を発揮することが示唆された。

Acute lung injury や ARDS の病態では、late phase における肺の線維化形成の程度が予後を大きく左右することが示されている。病態の早期よりシベレスタットを使用することで NE の活性化を抑制できれば、急性期炎症のみならず後期の線維化形成を抑制し救命率の向上に繋がるものと期待される。また、NE は特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) の急性増悪の病態でも増加しており、シベレスタットの投与はびまん性肺胞傷害 (diffuse alveolar damage, DAD) の急速進行にも抑制的に作

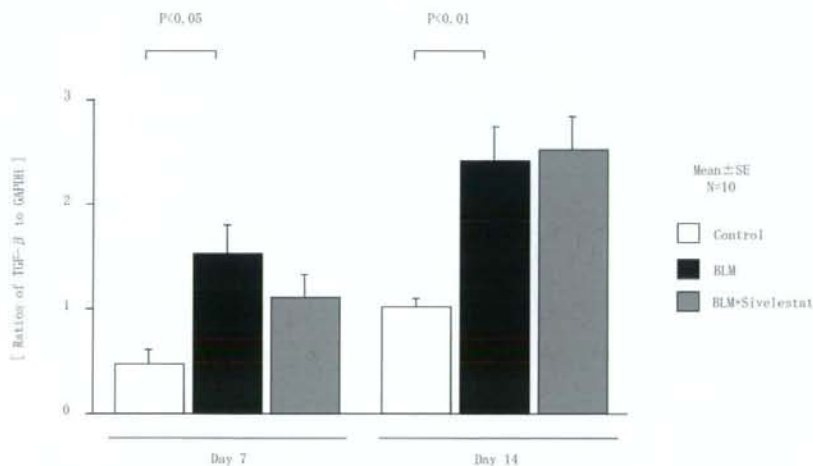


Figure 6. TGF- β real-time PCR in lung homogenized sample

用しうると考えられ、治療上の有効性が期待される。

【結 論】

好中球エラスターゼ阻害薬シベレスタットの抗線維化作用の機序には、炎症細胞抑制作用のみならず、好中球エラスターゼの酵素活性で惹起されるTGF- β の活性化抑制作用の関与が示唆された。

【参考文献】

- 1) Chua F, Dunsmore SE, Clingen PH, Mutsaers SE, Shapiro SD, Segal AW, Roes J, Laurent GJ. Mice lacking neutrophil elastase are resistant to bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 2007; 170: 65-74.
- 2) Taooka Y, Maeda A, Hiyama K, Ishioka S, Yamakido M. Effects of neutrophil elastase inhibitor on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156: 260-265.
- 3) Kawabata K, Hagio T, Matsumoto S, Nakao S, Orita S, Aze Y, Ohno H. Delayed neutrophil elastase inhibition prevents subsequent progression of acute lung injury induced by endotoxin inhalation in hamsters. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 2013-2018.
- 4) Gleizes PE, Munger JS, Nunes I, Harpel JG, Mazziere R, Noguera I, Rifkin DB. TGF- β latency: biological significance and mechanisms of activation. *Stem Cells* 1997; 15: 190-197.
- 5) Barcellos-Hoff MH. Latency and activation in the control of TGF- β . *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 1996; 1: 353-363.
- 6) Khalil N. TGF- β : from latent to active. *Microbes Infect* 1999; 1: 1255-1263.
- 7) Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJD, Dalton SL, Wu J, Pittet JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, et al. The integrin $\alpha v \beta 6$ binds and activates latent TGF β 1: a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* 1999; 96: 319-328.
- 8) Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro SM, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouck N. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- β 1 in vivo. *Cell* 1998; 93: 1159-1170.
- 9) Teder P, Vandivier RW, Jiang D, Liang J, Cohn L, Pure E, Henson PM, Noble PW. Resolution of lung inflammation by CD44. *Science* 2002; 296: 155-158.
- 10) Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, Lanone S, Wang X, Kotliansky V, Shipley JM, Gotwals P, Noble P, Chen Q, Senior RM, Elias JA. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor β (1). *J Exp Med* 2001; 194: 809-821.

エンドセリン1(ET-1)受容体拮抗薬は、 間質性肺炎に影響を及ぼすか。

瀬戸口靖弘^{1*} 河野 雄太¹ 田中韶基親¹ 富樫 佑基¹
山田 嘉仁² 山口 哲生²

ET-1は、強い血管収縮物質であると同時に線維芽細胞の増殖因子でもある。ET-1受容体拮抗薬であるボセンタンは、現在、肺動脈性肺高血圧症の治療薬として用いられている。一方、肺線維症の治療薬としての国際臨床試験が実施されている。本研究では、肺高血圧を伴った間質性肺炎に対し、ボセンタンを使用し、肺高血圧症だけでなく、間質性肺炎の進展にも影響を及ぼすか検討を行った。

(方法)当施設でボセンタンを使用した8例(強皮症3例(61±2.5歳)、特発性肺線維症5例(71.7±5歳)、肺線維症は重症度Ⅲ～Ⅳ)について、ボセンタン投与前後のHRCTによる間質性肺炎の画像の変化、右室圧(RVP)またKL-6、LDHの変化を検討した。

(結果と考察)画像の変化は特発性肺線維症(IPF)、強皮症(SSC)とも薬剤投与前後で明らかに変化はなかった。RVPの変化は、65±8.4mmHg v.s 53.8±5.7mmHg(p=0.3)、KL-6の変化は、1448±459U/ml v.s 1343±372U/ml(p=0.8)、LDHの変化は、208±17.5mg/dl v.s 204±10.6(p=0.8)とRVP、KL-6、LDHはボセンタン使用前後で低下しているように見えるものの、統計学的には有意な変化ではなかった。次年度多施設による調査を行い評価をおこなう。

Impact of endothelin -1 receptor antagonist to interstitial pneumonia with pulmonary hypertension

Yasuhiro Setoguchi¹, Yuta Kono¹, Motochika Tanakadate¹, and Yuki Togashi¹
Yoshihito Yamada², and Tetsuo Yamaguchi²

¹Division of pulmonary medicine, Department of Internal medicine, Tokyo Medical University Hospital

²Division of pulmonary medicine, JR Tokyo general Hospital

Endothelin-1(ET-1) is not only a pulmonary vasoconstrictor but also a potent mitogen to endothelial cells, smooth muscle cells, myofibroblast, and fibroblast. Since elevated ET-1 levels and increased expression of ET receptors in lung tissue have been demonstrated not only in pulmonary hypertension but also in pulmonary fibrosis without PH, the use of dual ET-receptor antagonist bosentan, which is already approved for treatment of pulmonary arterial hypertension, might positively influence the fibrogenic process and the course of IPF. The international clinical trial of bosentan for IPF is ongoing as primary endpoints such as combined incidence of death or treatment failure. Based on these findings, we try to evaluate whether bosentan could have any impact in pulmonary fibrosis with pulmonary hypertension. Eight patients with pulmonary fibrosis combined with pulmonary hypertension were enrolled in this preliminary study (3 cases with SSC and five cases with IPF). Evaluation was performed in change of RVP by sequential Doppler cardiography, serum level of KL-6 and LDH. Each parameter showed no statistically significant decline between before and after treatment with bosentan, but positive trend.

はじめに

特発性肺線維症は、持続していく線維化が主体をなす予後不良の呼吸器疾患である。副腎皮質ホルモンに対する治療効果も乏しく、有効な治療法の開発が望まれていたが、平成21年抗線維化作用を有する低分子化合物Pirfenidonが使用可能となった。また、欧米、韓国、本邦によるエンドセリン-1(ET-1)受容体拮抗薬ボセンタンの国際臨床試験(BUILD-3)が開始されている。ET-1は血管の内皮細胞から強力な血管収縮物質として発見された21個のアミノ酸で構成される分子である(1)。ETは、その受容体ETA、ETBを通じて血管平滑筋に主に発現し強い血管収縮を生みだすことが明らかになっている(2)。このためET-1受容体拮抗薬ボセンタンは、現在、肺動脈性肺高血圧の治療薬として使用されている。ET-1は、血管収縮物質としてだけでなく平滑筋、筋平滑筋、線維芽細胞のmitogenとしての作用、また膠原線維などの細胞外基質の合成促進にも作用していることが明らかになっている(3)(4)(図1)。肺組織にはET受容体の発現も多く、肺高血圧のない肺線維症においてET-1、ET受容体発現が亢進していることが明らかになっており(5)、特発性肺線維症の抗線維化治療薬としてET-1受容体拮抗薬ボセンタンが注目され臨床試験が実施されている。本研究では、ボセンタンが特発性肺線維症、強皮症による間質性肺炎に合併した肺高血圧症で使用された場合の肺高血圧への効果と間質性肺炎への効果を評価する意味で計画した。この報告書は、あくまで本計画の前段階の調査報告書である。

方 法

対象は、特発性肺線維症或いは、間質性肺炎合併強皮症のなかで肺高血圧症と診断されボセンタン投与が行われた8症例(東京医科大学6症例、JR東京総合病院2症例)とした。その内訳は表1に示すように強皮症(SSC)3例(61±2.5歳)、特発性肺線維症(IPF)5例(71.7±5歳)、重症度はⅢ～Ⅳ。ボセンタ

表1. 対象

	SSC (n=3)	IPF (n=5)	p
AGE	61±2.5	71.7±5	
KL-6	2396±1089	879±141.5	p=0.11
RVP	47.7±2.1	75.5±11.3	p=0.12
LDH	225±18.6	198.2±26.3	p=0.5
重症度	3±0	3.4±0.4	p=0.5

ン投与前と投与後1ヶ月の間質性肺炎重症度、血清マーカー LDH, KL-6、肺高血圧の指標として心臓超音波による予測RVPの比較を行った。比較法は、投与前を基準にした変化量で行った。検定はt検定を行った。

結果と考察

心臓超音波による予測RVPは、IPFとSSCを含めた全体では、ボセンタン使用前後で75.4±11.2 vs 59.8±8.09 mmHg (p=0.29)と低下傾向をしめしたが、有意差は出なかった。症例数は少ないがIPFとSSCに分割して検討してみるとSSCに比較してIPFの肺動脈圧の低下が大きい傾向にあった(図2A)。間質性肺炎については、重症度の変化はなかった。血清学的マーカー KL-6とLDHについては、それぞれ1448±1343 (p=0.86)、208±204 (p=0.83)と低下傾向はしめしたものの有意ではなかった。これらの指標は、IPFとSSCに区別してみても同様の傾向であった(図2B,C)。画像の変化は特発性肺線維症(IPF)、強皮症(SSC)とも薬剤投与前後で明らかな変化はなかった。

間質性肺炎に随伴する肺高血圧に対する効果

WHO 2003 Venice分類でSSCに伴う肺高血圧は1群いわゆる肺動脈性肺高血圧に属し、間質性肺炎にともなう肺高血圧は3群いわゆる肺疾患或いは低酸素血症に伴う肺高血圧に分類される。SSCにおいては、少なくとも26.7%が肺高血圧を呈し(6)、間質性肺炎と肺高血圧が死因に結びつく、肺高血圧は間質性肺炎では少なくとも32%(mPA>35mmHgのとき)に認められ、IPFにおいては後ろ向き研究において95%に肺高血圧を認めsPAPは平均48mmHgあったと報告されている(7)。また、肺高血圧を伴う間質

¹ 東京医科大学内科学第一内科(呼吸器内科学)

² JR東京総合病院

³ びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

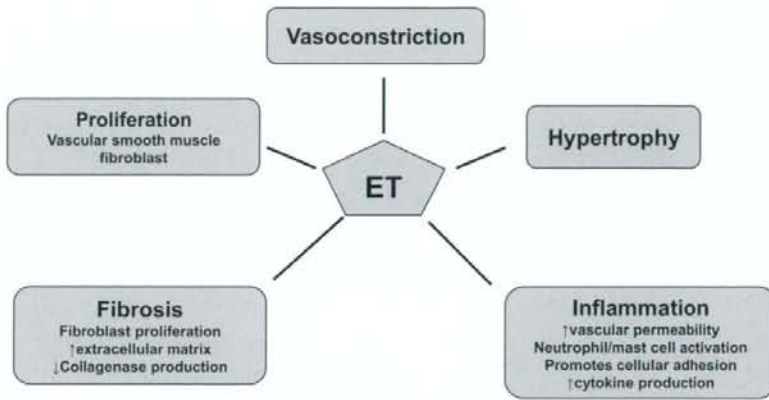


図1. エンドセリンの作用

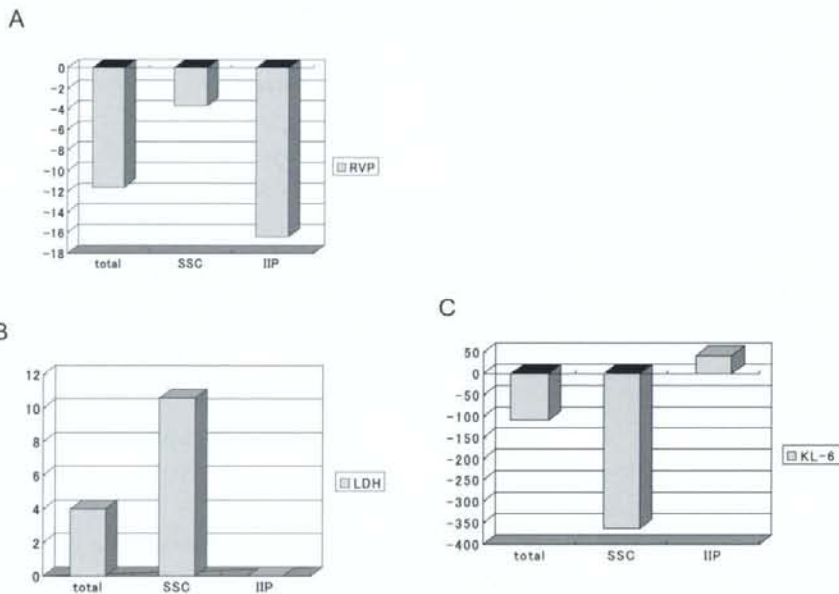


図2. ボセンタン投与前後のRVP,LDH,KL-6の変化

性肺炎は予後不良でsPAP>50 mmHgにおける median survivalは0.7年である(8)。このように肺高血圧合併症例においては予後不良の要因となっている。したがって肺高血圧の治療は、間質性肺炎の治療と並んで重要な位置を占める。SSCにおいてボセンタンは、NYHA class II～IIIのmoderately severe 肺動脈性肺高血圧のfirst line治療に対してはsildenafilとともにエビデンス2Bに位置づけられている。一方IPFに対しては、SSCと異なりNYHA III～IVの重症の肺高血圧をもつ間質性肺炎患者にたいして有用かもしれないとい評価である。肺動脈拡張薬は、肺動脈

血管抵抗を低下させるために換気血流比のミスマッチが助長され低酸素血症を悪化させることが危惧された。しかしepoprostenol以外の薬剤では、酸素化の改善を認めている(9)(10)。これに対しては詳細な前向き研究が必要と考えられる。本研究では、RVPの低下傾向はあったが低酸素血症の進行は認めていない。

間質性肺炎に対する効果

ボセンタンの間質性肺炎特にIPFに対しての期待

される効果は、線維化抑制という作用で米国を中心に BUILD-1 study が実施された。BUILD-1 の結果は、Primary endpoint である 6 分間歩行試験に対しては有意な結果は得られなかったが、secondary endpoint である呼吸機能の悪化や死亡の頻度については $p=0.07$ と有効な傾向を示し(11)、現在 国際臨床試験 BUILD-3 が進行中である。Primary endpoint は、BUILD-1 における secondary endpoint のひとつである無増悪期間の比較であり secondary endpoint は、呼吸機能、QOL の比較となっている。IPF には肺高血圧を伴う頻度も高く、また肺高血圧を合併した IPF は、肺高血圧のない症例に比し予後が極めて悪いことが明らかになっている。本邦においても IPF の肺高血圧に対して種々の治療を試み効果がなかった症例に対してボセンタンの投与を試みている施設は多く存在している。その評価については明らかでないのが現状である。当施設の結果としては図示したとおりである。従って本邦の有する間質性肺炎のバイオマーカー KL-6、SP-A、SP-D そして右心負荷のマーカー BNP などを含めて後ろ向き研究ではあるが情報の集積を試みることは、今後の当薬剤の本邦での使用に向けての基礎データとなると考えられ、次年度へ向け計画を作成中である。

文 献

- 1) Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988 ;332:411-415
- 2) Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature*. 1990, 348:730-2.
- 3) McMillen MA, Sumpio BE. Endothelins: polyfunctional cytokines. *J Am Coll Surg*. 1995, 180:621-37.
- 4) Sun G, Stacey MA, Bellini A, Marini M, Mattoli S. Endothelin-1 induces bronchial myofibroblast differentiation. *Peptides*. 1997;18:1449-51.
- 5) Uguccioni M, Pulsatelli L, Grigolo B, Facchini A, Fasano L, Cinti C, Fabbri M, Gasbarrini G, Meliconi R. Endothelin-1 in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Clin Pathol*. 1995, 48:330-4.
- 6) Wigley FM; Lima JA; Mayes M; McLain D; Chapin JL; Ward-Able C The prevalence of undiagnosed pulmonary arterial hypertension in subjects with connective tissue disease at the secondary health care level of community-based rheumatologists (the UNCOVER study). *Arthritis Rheum* 2005, 52:2125-32.
- 7) Leuchte HH; Baumgartner RA; Nounou ME; Vogeser M; Neurohr C; Trautnitz M; Behr J Brain natriuretic Peptide is a prognostic parameter in chronic lung disease *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 173:744-50.
- 8) Nadrous HF; Pellikka PA; Krowka MJ; Swanson KL; Chaowalit N; Decker PA; Ryu JH Pulmonary hypertension in patients with idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 2005 128:2393-9.
- 9) Strange C; Bolster M; Mazur J; Taylor M; Gossage JR; Silver R Hemodynamic effects of epoprostenol in patients with systemic sclerosis and pulmonary hypertension. *Chest*. 2000 118:1077-82
- 10) Ghofrani HA; Wiedemann R; Rose F; Schermuly RT; Olschewski H; Weissmann N; Gunther A; Walrath D; Seeger W; Grimminger F Sildenafil for treatment of lung fibrosis and pulmonary hypertension: a randomised controlled trial. *Lancet* 2002 360:895-900.
- 11) King TE Jr, Behr J, Brown KK, du Bois RM, Lancaster L, de Andrade JA, Stahler G, Leconte I, Roux S, Raghu G. BUILD-1: a randomized placebo-controlled trial of bosentan in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 177:75-81

Ⅱ. サルコイドーシス

サルコイドーシス発症機構におけるアクネ菌細胞内感染とオートファジーの役割

峰岸 佳菜¹ 萬 巴里子¹ 古川あすか¹ 西川 絵理¹ 内田 佳介¹
鈴木 好美¹ 三輪 彩¹ 鈴木 高成¹ 武村 民子² 江石 義信²

【目的】サルコイドーシスの病因と深部臓器の細胞内に潜伏感染しているアクネ菌との関連が研究されている。本研究では細胞内アクネ菌が過敏性免疫反応を惹起する機序を明らかにすることを目的とし、細胞侵入性の病原細菌に対し宿主の防御機構としてはたらくオートファジーとの関与を調べた。【材料と方法】オートファジーのマーカーとなるGFP-LC3融合蛋白を遺伝子導入したHeLa細胞株に細胞侵入能を有するアクネ菌を感染させ、蛍光および電子顕微鏡によりリソソーム融合阻害剤であるBafilomycin添加・非添加での観察を行った。【結果】細胞内に感染したアクネ菌はエンドソーム・リソソーム系で消化されていたが、一部の菌体は感染後18時間をピークにLC3陽性膜に囲まれていた。Baf存在下ではファゴソームのマーカーであるLAMP-1陽性の空胞から菌体が脱出し、LC3に囲まれた菌体が増加していた。【考察】本研究ではBafilomycinを用いたことで細胞内消化が阻害され、アクネ菌がエンドソームから細胞質へと脱出し、その結果オートファジーが亢進したものと考えられる。オートファジーの亢進はTh1型免疫反応を誘導することから、生体内でもアクネ菌が細胞内増殖し細胞質への脱出する際オートファジーが亢進することでTh1型過敏性免疫反応が誘導され、サルコイドーシス肉芽腫が形成されるものと推察される。

Implication of autophagy induced by intracellular infection of *Propionibacterium acnes* in the etiology of sarcoidosis

Kana Minegishi¹, Pariko Yorozu¹, Asuka Furukawa¹, Eri Nishikawa¹, Keisuke Uchida¹,
Yoshimi Suzuki¹, Aya Miwa¹, Takashige Suzuki¹, Tamiko Takemura², and Yoshinobu Eishi¹

¹Department of Human Pathology, Tokyo Medical and Dental University

²Department of Pathology, Japanese Red Cross Medical Center

【Background】Intracellular proliferation of *Propionibacterium acnes* (*P. acnes*) may cause Th1 hypersensitivity and subsequent granuloma formation after antigen-processing via autophagy since some bacteria proliferating in cells can escape from phagosomes where they reside latently. In the study, we examined whether intracellular infection of *P. acnes* can induce autophagy under certain environments.

【Materials and Methods】HeLa-LC3 cells, which were transformed to express GFP-LC3 fusion proteins, were infected by an invasive isolate of *P. acnes* and the process of *P. acnes* infection and intracellular trafficking within nonphagocytic cells were examined. After immunofluorescent staining, HeLa-LC3 cells infected by *P. acnes* were observed during 24 hours by fluorescence microscopy and electron microscopy. The number of viable *P. acnes* in the cells was determined by so-called invasion assay. The same experiment was done under the culture conditions where fusion between phagosome and lysosome was blocked by using bafilomycin. 【Results】*P. acnes* entered the cells by endocytosis. Most of them were degraded by endosomal enzymes (lysozyme and cathepsin D) in the cells. A few *P. acnes* were localized in LC3-positive autophagosome-like vacuoles that appeared most abundant 18 hours after the infection. When treated with bafilomycin, *P. acnes* escaped from LAMP-1 positive vacuoles and many of them were captured by LC3-positive autophagosomes. 【Discussion】These results suggest that *P. acnes* can induce autophagy escaping from degradation. Increased induction of autophagy by *P. acnes* infection under bafilomycin pretreatment may simulate the intracellular proliferation of the bacterium that seems to have occurred in patients with sarcoidosis.

【はじめに】

サルコイドーシス(サ症)は原因不明の全身性肉芽腫病変を特徴とした疾患である。肉芽腫形成には通常マクロファージによる抗原物質の細胞内消化不全や細胞内停留に起因していることから、サ症の本体として何らかの抗原物質に対する細胞性免疫反応が考えられている。

これまでにサ症患者の病変部リンパ節から高率・多量にアクネ菌(*Propionibacterium acnes*)が検出されていることから¹⁾、その抗原物質としてアクネ菌が疑われている。アクネ菌は皮膚常在性細菌であるが、近年細胞侵入能を有することが判明し、ヒトの深部臓器に細胞壁を欠失した冬眠型の状態で潜伏感染していることが示唆されている²⁾。疾病素因を有する患者において、冬眠型の細胞内潜伏感染アクネ菌が何らかの内因性活性化因子により細胞内増殖することでサ症を発症すると考えられる。

一方細胞内増殖現象が肉芽腫形成にいたるTh1型過敏性免疫反応を誘導する機序としては、「オートファジー」との関連が疑われている。オートファジー(自食現象)は従来細胞質内の蛋白質を分解することで細胞内の蛋白質の品質管理や飢餓適応を行うとされてきたが、オートファジーは食食機構から逃れて生存を図る多くの細胞内侵入性細菌の殺菌・分解という自然免疫反応にも関与していることが判明し、研究が進んでいる³⁾。実際細胞内抗原がオートファジーによりMHC class IIに抗原提示されることも報告されている⁴⁾。

本研究では細胞内のアクネ菌が過敏性免疫反応を惹起する機序を明らかにすることを目的とし、リソソーム阻害剤を使用することでアクネ菌の細胞内増殖を再現し、オートファジーの亢進を引き起こしうるかを検討した。

また、アクネ菌のオートファジー誘導機序について、すでに報告されている細胞内侵入性細菌の誘導機序と比較検討した。

【材料と方法】

I. 菌株

アクネ菌は細胞侵入能を有するサ症患者分離株を使用し、GAM broth (Nissui)にて37°C 3日間嫌気培養した菌体を実験に用いた。*Porphyromonas gingivalis* (標準株)はウサギ血液寒天培地(BD)にて37°C 4日間嫌気培養した菌体を実験に用いた。*Streptococcus pyogenes* (JRS4株)、*Staphylococcus eidermidis* (標準株)はそれぞれTHY broth [Todd Hewitt Broth (BD) + 0.2% yeast extract (BD)], GAM brothにて好気下37°Cで一晩前培養を行い、翌日log phaseに達した菌液を遠心して回収した菌体を実験に用いた。

II. 細胞株

ヒト子宮頸癌細胞由来のHeLa細胞株、GFP-LC3融合蛋白を遺伝子導入したHeLa-LC3細胞株(東京大学医科学研究所の中川先生より譲与)を用いた。

HeLa細胞株はDulbecco MEM培地 +10% FBS (以下10% FBS/DMEM)+50 µg/ml gentamycinにて継代培養した。HeLa-LC3細胞株は10% FBS/DMEM +50 µg/ml gentamycinに選択薬として500 µg/ml neomycinを加えて継代培養した。

III. 感染

各細胞株は感染前日、10%FBS/DMEM antibiotics (-)にて24-well plateに5x10⁴/wellとなるようにまきなおした。蛍光標識による観察用には10% gelatin/PBSにてコーティングした丸カバーガラスをwellに入れ、その上に細胞をまいた。

各菌株は10% FBS/DMEM antibiotics (-)で2回洗浄後吸光度(OD₆₀₀)にて一定濃度に調整した菌体浮遊液を作製し、細胞株に加えた(Multiplicity of Infection = 1000)。37°C・CO₂インキュベーターにて2時間感染後、PBSにて3回洗浄し、細胞外殺菌するために高濃度抗生剤(400 U/ml penicillin, 1 mg/ml streptomycin 添加DMEM)を添加し、さらに3時間培養した。*(P. gingivalis*は500 µg/ml gentamycinにて殺菌。)

リソソーム阻害剤として使用したBafilomycinは最終濃度が100nMとなるように感染2時間前に添加した。対照群にはDMSOを最終濃度が1%となるように添加した⁵⁾。

¹⁾ 東京医科歯科大学人体病理学分野

²⁾ 日本赤十字医療センター病理部

³⁾ びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究分担者

タイムコースで細胞を回収する場合は細胞外殺菌後 10% FBS/DMEM antibiotics (-)にて培養を続けた。

IV. 蛍光標識による観察

初期エンドソーム、ファゴソーム、リソソームのマーカーとしてそれぞれ Rab5, LAMP-1 抗体, 抗リゾチーム抗体, 抗カテプシン D 抗体を用いた。

1) Rab5 transfection

前日 10%FBS/DMEM antibiotics (-)にて 24-well plate に 4×10^4 /well とするようまきなおした。

150mM NaCl 100 μ l に 1 μ g/ml Rab5 plasmid DNA 0.4 μ l とポリエチレニミン 2 μ l 入れて vortex し、室温で 20 分置いた後、全量を well に添加した。6 時間後 10%FBS/DMEM antibiotics (-) で液替えを行った。Transfection 24 時間後アクネ菌を感染させ、1 時間ごとに丸カバーガラスを 4% パラホルムアルデヒド液に回収し、固定した。

2) 免疫染色 (LAMP-1 抗体, 抗リゾチーム抗体, 抗カテプシン D 抗体)

4% パラホルムアルデヒド液で細胞を固定後、0.1% Triton/PBS により細胞膜に穴をあけた。RNase (10 μ g/ml) 添加ブロッキング剤にて室温 15 分処理をした。1 次抗体として LAMP-1 抗体 (Santa cruz Biotechnology, 1:100 希釈) をかけ、室温にて 1 時間反応させた。次に二次抗体として Cy5-conjugated anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch, 1:200 希釈) を用い、室温にて 30 分反応させた。PI (200 ng/ml, 1:1000 希釈) にて核染色後封入し、観察を行った。

LAMP-1 抗体と抗リゾチーム抗体の二重染色は、ブロッキング処理後、1 次抗体として LAMP-1 抗体と抗リゾチーム抗体 (DAKO A099, 1:40 希釈)、2 次抗体として Cy5-conjugated anti-mouse IgG と polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins / Biotinylated (DAKO E0432, 1:500 希釈) を反応させた後、抗リゾチーム抗体の 3 次抗体として Streptavidin/FITC (DAKO F0422, 1:50 希釈) を室温で 30 分反応させた。PI にて核染色後封入し、観察を行った。

LAMP-1 抗体と抗カテプシン D 抗体の二重染色では、感染細胞をメタノールにて固定後ブロッキング処理し、1 次抗体として LAMP-1 抗体と抗カテプシン D 抗体 (SIGMA C0715, 1:200 希釈)、2 次抗体として Cy5-conjugated anti-mouse IgG と polyclonal

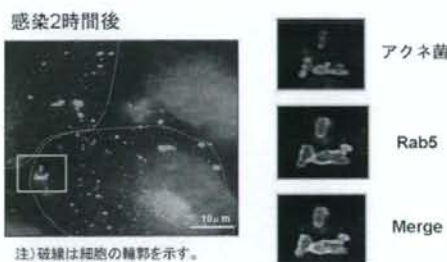


図1: エンドサイトーシスにより侵入したアクネ菌

Goat anti-Rabbit Immunoglobulins / Biotinylated (DAKO E0432, 1:500 希釈) を反応させた後、抗カテプシン D 抗体の 3 次抗体として Streptavidin/FITC (DAKO F0422, 1:50 希釈) を室温で 30 分反応させた。PI にて核染色後観察を行った。

V. 電子顕微鏡用試料

直径 3 cm の dish にまいた細胞を 2% グルタルアルデヒドで固定。その後エポン樹脂にて包埋し、超薄切、ウラン・鉛染色後透過型電子顕微鏡にて観察を行った。

VI. Colony assay

感染細胞は抗生剤による細胞外殺菌後経時的に細胞をトリプシン 100 μ l で剥がして回収し、滅菌水 900 μ l を入れて計 1 ml とした。そこから原液と 10 倍希釈液をそれぞれ GAM 寒天培地に 20 μ l 塗布し、嫌気培養を行った。4 日後発育したコロニー数を測定した。

【結 果】

1. 細胞内アクネ菌の局在およびオートファジーの関与

1) アクネ菌と初期エンドソーム

Rab5 plasmid DNA を transfection した HeLa 細胞への感染 0.5, 1, 2, 3, 4, 6, 8 時間後の観察を行った。Rab5 はすべての時間帯において発現していた。中でも感染 2 時間後が Rab5 の発現のピークであり、菌が Rab5 に囲まれている像を確認できた [図 1]。感染 3 時間以降では細胞内に菌体は存在するも Rab5 に囲まれている菌体は見つけられなかった。

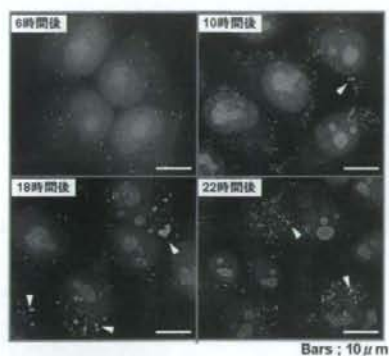


図2: アクネ菌感染によるLC3発現の経時観察

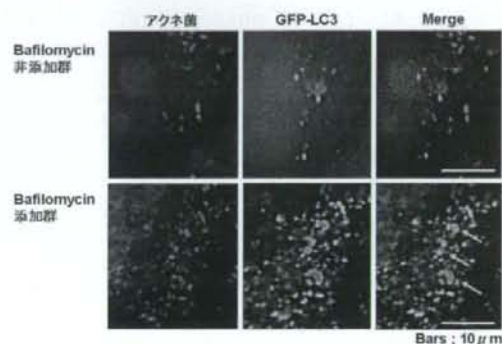


図3: LC3に捕われた細胞内アクネ菌(感染24時間後)

2) アクネ菌とLC3

HeLa-LC3細胞にアクネ菌を感染後蛍光顕微鏡により経時的に観察を行った。細胞内に存在したほとんどの菌体はオートファジーの隔離膜のマーカーであるLC3に捕獲されてはいなかったものの、一部の菌体が感染18時間後をピークにLC3陽性膜に囲まれていた[図2, ▲印]。

Bafilomycin添加群では感染後6時間ころからLC3の発現が多く観察され、LC3とアクネ菌が共局在している数が増加した。強拡大での観察により、GFPで標識されたLC3がアクネ菌を取り囲んでいる様子が観察された[図3]。

3) アクネ菌とファゴソーム・リソソーム

細胞内に感染したアクネ菌は時間経過と共にLAMP-1陽性の空胞内に含有される菌体数が増え、感染後24時間の時点ではほぼすべての菌がLAMP-1に囲まれていた、またそれらの菌体は桿菌状から小型円形化し、消化されていると思われた。

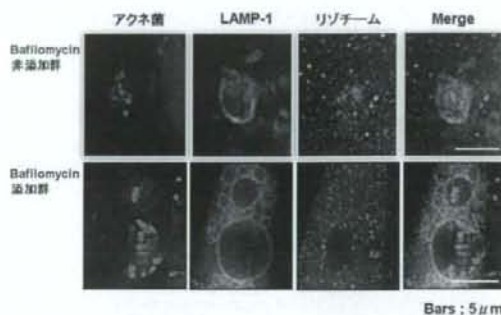


図4: アクネ菌感染細胞のLAMP-1とリゾチームの二重染色(感染24時間後)

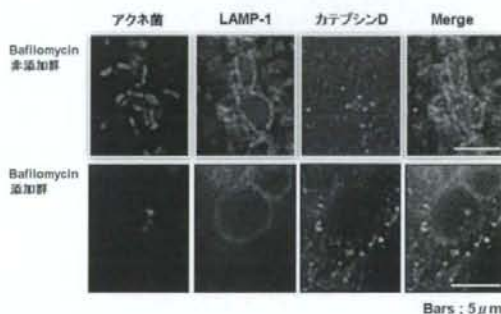


図5: アクネ菌感染細胞のLAMP-1とカテプシンD二重染色(感染24時間後)

LAMP-1抗体と抗リゾチーム抗体および抗カテプシンD抗体の二重染色を行ったところ、アクネ菌を囲んでいるLAMP-1空胞内にリゾチーム、カテプシンDを確認した[図4, 図5: 上段]。

これに対し、Bafilomycin添加群ではLAMP-1陽性の空胞が小型化するとともに、逆に菌体を含むものは巨大化して観察された。また、LAMP-1抗体と抗リゾチーム抗体および抗カテプシンD抗体の二重染色を行ったところ、LAMP-1陽性膜内に菌体とともにリゾチームおよびカテプシンDは観察されなかった[図4, 図5: 下段]。

4) 電子顕微鏡による観察

Bafilomycin非添加(1% DMSO添加)群では図6の矢印で示すように複数の菌体が一重膜内に観察され、それらは消化され始めていた。これに対し、Bafilomycin添加群では蛍光標識による観察と同様に一重膜の空胞から菌体が抜け出ていた(*), さらに細胞内消化を逃れた菌体が細胞外へと脱出している像が観察された(▲印)。

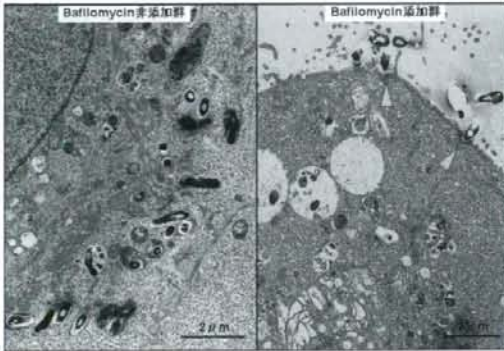


図6: 電子顕微鏡像

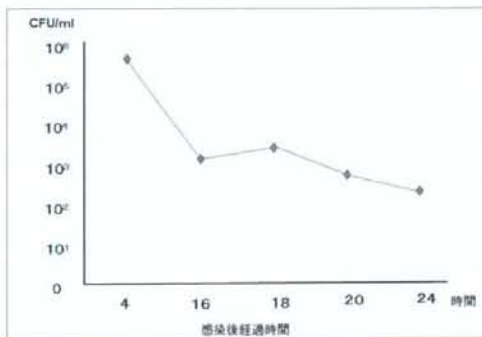


図7: 細胞内生菌数の経時的変化

2. Colony assay

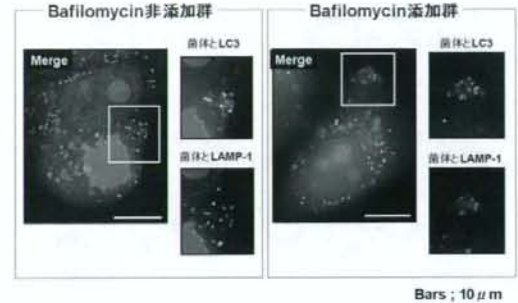
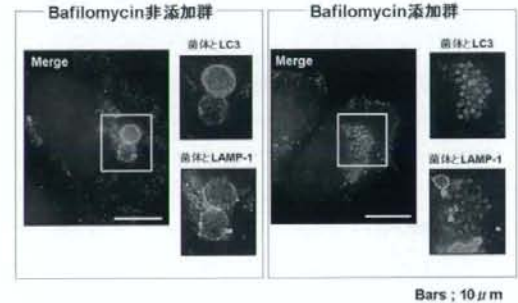
細胞内生菌数は感染後4時間から16時間に急激に減少した。感染後16時間から24時間においてはさらに減少をみせたが、18時間をピークにわずかな増加もみせた[図7]。

Bafilomycin添加群では細胞内に侵入した菌数が非添加群に比べ少なかったが、感染後4時間から24時間にかけては非添加群と同様に減少していた。

3. 他の細胞侵入性細菌の観察結果

1) *P. gingivalis*

感染初期においてBafilomycin添加・非添加群どちらにおいても菌体はLC3に囲まれていた。また両者ともLC3に囲まれた菌体はLAMP-1には囲まれていなかった[図8]。感染後時間経過とともにLC3に囲まれた菌体がLAMP-1に覆われる像が確認されるようになった。Bafilomycin添加群では感染24時間後には顕微鏡下ではあるが増菌が確認された。

図8: *P. gingivalis* 感染細胞の観察(感染後4時間)図9: *S. pyogenes* 感染細胞の観察(感染後6時間)

2) *S. pyogenes*

S. pyogenes は文献7で報告されているように細胞内に侵入後細胞質へ脱出しLC3陽性隔離膜により迅速に捕われ、さらにLAMP-1が囲い込みオートリソソームによって消化されているであろう像が観察された。またBafilomycin添加群では、菌がLC3に取り囲まれてはいるがリソソームの結合を阻害しているためLAMP-1には囲まれていない像を確認した[図9]。

3) *S. epidermidis*

細胞内に菌体が侵入している像は見つけれず、観察したどの時間帯においてもLC3やLAMP-1に囲まれている菌体は確認出来なかった。

【考 察】

S. pyogenes は細胞内侵入後SLOと呼ばれる毒素によってエンドソームから細胞質へと脱出するが、オートファジーは菌体を効率良く捕獲し、消化する²⁾。それに対し*P. gingivalis* は*S. pyogenes* と同様に