

図3. BALF中液性因子(早期一過性上昇群, n=4-7, pg/ml) シリカ点鼻前, 点鼻後1, 2, 4, 8, 12, 24週後に気管支肺胞洗浄液を施行し, 気管支肺胞洗浄液を濃縮後, 液性因子をLuminexシステムで測定した. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs シリカ投与前値.

した(図2A). ハイドロキシプロリン量は, 炎症細胞浸潤より遅れて, 4週後から有意な増加を認め, 8週後にピークを示した(図2B). 一方組織学的には, Ashcroft scoreは1週後に有意な増加を示すが, さらに遅れて12週後にピークを示し, 有意な増加は24週後まで持続した.

次に, 時間経過の背景となる機序を検討するために, BALF中の17種のサイトカイン, ケモカイン濃度を検討した. 時間経過は3つのグループに分類された. まず, 1週後の早期に上昇し, 濃度が速やかに低下するグループで(図3), IL-1 α , IL-6, IL-17, TNF- α 等の炎症性サイトカイン, Th1系サイトカインとしてIL-12, Th2サイトカインとしてIL-4, IL-5, 成長因子としてG-CSF, さらにケモカインとしてMCP-1, RANTESが早期の一過性増加のパターンを示した.

次に, 1週後にピークを迎えるが, 増加が遷延するグループで(図4), サイトカインとしてIL-1 β ,

IL-13, 成長因子としてGM-CSF, ケモカインではMIP-1 α , MIP-1 β , KCが早期増加し増加が遷延するパターンを示した.

一方, 特異な時間経過を示したのはIL-9であった. 図5に示すように, BALF中IL-9濃度は投与初期には上昇しなかったが, 投与24週に有意な上昇を示し, ピークを迎え, 他の液性因子とは異なる時間経過を示した.

考 察

シリカによる肺線維症モデルの確立を目的として, 投与後6ヶ月にわたり諸指標を検討した. シリカ投与後の時間経過としては, まず1週後をピークとする炎症細胞浸潤が生じ, それが終息する頃から, 4-8週後をピークとするハイドロキシプロリン増加, 12週後をピークとする病理学的変化が認められた. 殆どのBALF中液性因子濃度は, 1-2週後にピーク

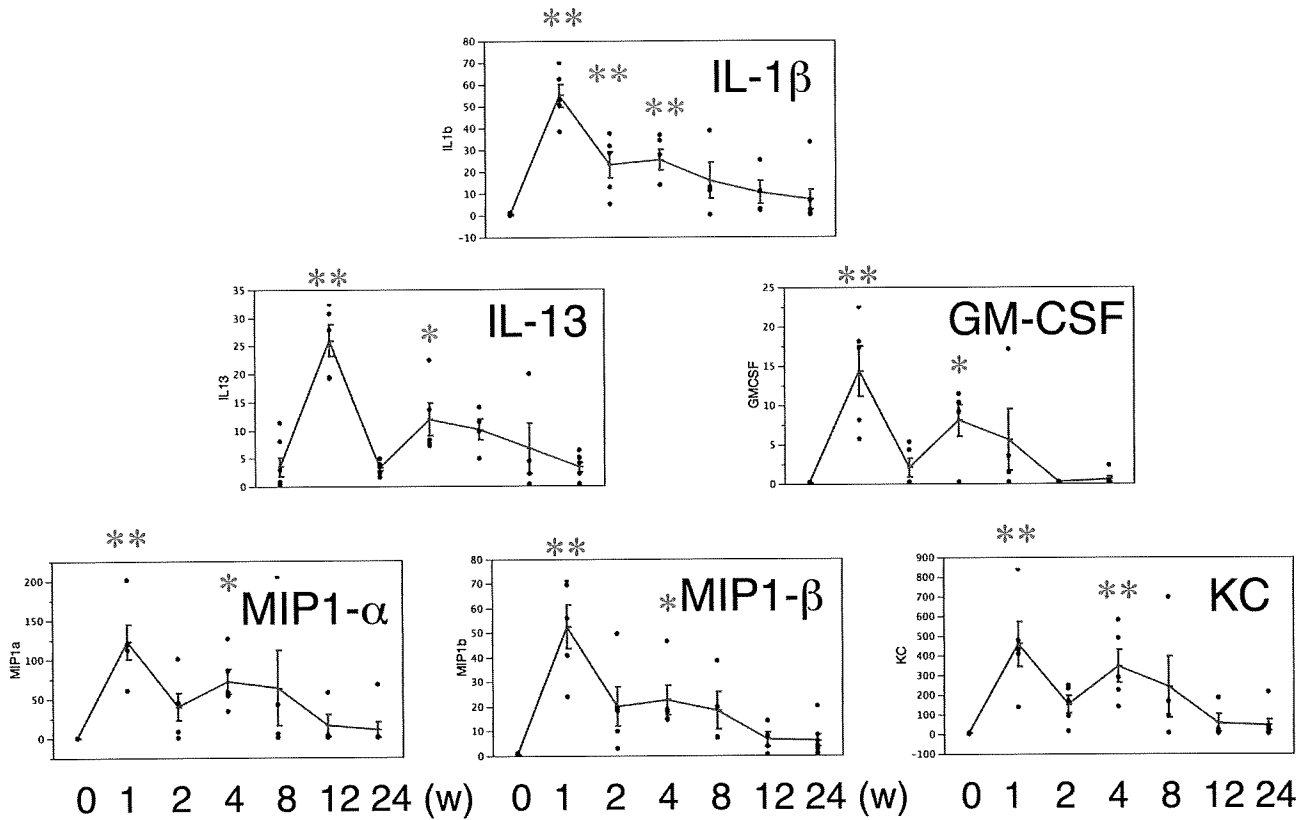


図4. BALF中液性因子(早期上昇後遷延群, n=4-7, pg/ml) シリカ点鼻前, 点鼻後1, 2, 4, 8, 12, 24週後に気管支肺胞洗浄を施行し, 気管支肺胞洗浄液を濃縮後, 液性因子をLuminexシステムで測定した. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs シリカ投与前値.

を迎えたが, IL-9のみ遅延して上昇し, 24週後にはじめて有意な増加を示した。

肺線維症モデルとしては, プレオマイシンの他に, FITC, 放射線照射, さらに今回検討したシリカが主に用いられており, なかでもプレオマイシンを用いたモデルが最もよく利用されている²⁾. プレオマイシンの投与経路は, 気管内投与, 静脈内投与等様々であるが, 気管内投与の場合, 組織学的な変化は2, 3週間後にピークを迎えるとされ^{1,4)}, 投与4週後から自己修復が生ずるとする報告が複数見られる²⁾. 一方シリカによる線維化モデルについては, ラットで投与12ヶ月後まで検討した報告があり, 線維化は緩徐に進行し, ハイドロキシプロリン量は12ヶ月後まで増加傾向を維持するとされている³⁾.

プレオマイシンによる肺傷害の機序は, 全身投与の場合は, 血管内皮傷害から血管透過性亢進と気道上皮傷害とが生じ, 引き続いてコラーゲン蓄積, 線維化が生ずると想定されている. 一方気管内投与では, 直接的な気道や肺胞上皮細胞傷害に引き続いて, 好中球やリンパ球等の炎症細胞集積が生じ, 炎

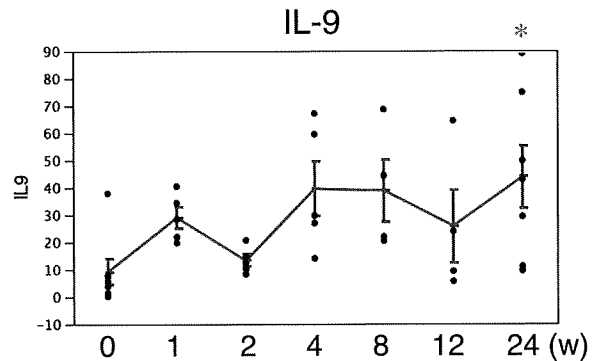


図5. BALF中IL-9濃度 (n=4-7, pg/ml) シリカ点鼻前, 点鼻後1, 2, 4, 8, 12, 24週後に気管支肺胞洗浄を施行し, 気管支肺胞洗浄液を濃縮後, IL-9濃度をLuminexシステムで測定した. * $p < 0.05$ vs シリカ投与前値.

症細胞浸潤が軽快した後に, 線維芽細胞増殖, 線維化が生じてくるが, 単回投与であれば薬剤の影響は持続せず, 自然修復へと向かう。一方, シリカは投与直後に炎症細胞浸潤が惹起され, その後炎症細胞浸潤が軽快する点はプレオマイシンと同様であるが, 一旦肺内に沈着した場合, 完全には除去されないため, 長期にわたって線維化病変が進行すると

想定される。事実今回の結果からは、ハイドロキシプロリン量のピークは8週、組織学的変化のピークは12週であり、既報のマウスに対するブレオマイシンモデルより緩徐に線維化が進行したと考えられた。

これまで、シリカによる肺線維症モデルにおいて、経時的かつ網羅的に肺局所の液性因子を検討した報告は殆どない。今回、Luminex®システムを用いた網羅的解析から新たに明らかになった点は、BALF中のIL-9が他の多くの液性因子の時間経過と異なり、シリカ投与後初期には上昇せず、24週後に有意な上昇をみた事である。

IL-9は、T細胞、B細胞、マスト細胞を活性化しうるサイトカインであり、主にTh2細胞から産生される。IL-9が肺線維化に及ぼす影響を検討した報告が一報あり、B細胞の間質性肺炎に及ぼす役割について検討するためにIL-9を強制発現し、B細胞増殖を示すTg5マウスが用いられている⁶⁾。このTg5マウスに対してシリカを投与した場合、コントロールに比してハイドロキシプロリン量の増加や組織学的変化が抑制されることから、IL-9は抗線維化作用を有することが推定されている。従って、本検討で認められた遅延したIL-9の上昇は、ネガティブフィードバックをかける形で抗線維化的に働くことが推察された。

IL-9による線維化抑制機序については不明な点が多いが、Tg5マウスでは、肺局所のIL-4濃度が低下することから、IL-9によって活性化されたB細胞から何らかの抑制性因子が分泌されている可能性があるが、今回の検討では、IL-9と時間経過が一致する因子はなく、今後の検討課題と考えられる。

結 語

シリカ投与後の時間経過として、1週後をピークとする炎症細胞浸潤、4-8週後をピークとするハイ

ドロキシプロリン増加、12週後をピークとする病理学的変化が順に認められた。既報のブレオマイシンによる線維化モデルに比較して、線維化の出現が緩徐で遷延しており、慢性の肺線維化を解析するモデルとして妥当であると考えられた。線維化の解析については8週以降が至適解析時期と考えられた。

BALF液性因子では、IL-9のみ遅延して上昇し、24週後にはじめて有意な増加を示しており、既報とあわせると、抗線維化に働くネガティブフィードバック機構を担っている可能性が推定された。

文 献

- 1) Izbicki G, Segel MJ, Christensen TG, et al. Time course of bleomycin-induced lung fibrosis. *Int J Exp Pathol* 2002; 83:111-9.
- 2) Moore BB, Hogaboam CM. Murine models of pulmonary fibrosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2008; 294:L152-60.
- 3) Callis AH, Sohnle PG, Mandel GS, et al. Kinetics of inflammatory and fibrotic pulmonary changes in a murine model of silicosis. *J Lab Clin Med* 1985; 105:547-53.
- 4) Chaudhary NI, Schnapp A, Park JE. Pharmacologic differentiation of inflammation and fibrosis in the rat bleomycin model. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:769-76.
- 5) Reiser KM, Haschek WM, Hesterberg TW, et al. Experimental silicosis. II. Long-term effects of intratracheally instilled quartz on collagen metabolism and morphologic characteristics of rat lungs. *Am J Pathol* 1983; 110:30-40.
- 6) Arras M, Huaux F, Vink A, et al. Interleukin-9 reduces lung fibrosis and type 2 immune polarization induced by silica particles in a murine model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24:368-75.

Bax 標的 siRNA による ブレオマイシン肺臓炎マウスモデル抑制の検討

前山 隆茂¹ 福元重太郎¹ 河口 知允¹ 原田 知佳¹
緒方 彩子¹ 濱田 直樹¹ 桑野 和善^{2*} 中西 洋一^{1*}

[目的] 肺の線維化過程において肺上皮細胞のアポトーシスは重要である。アポトーシス実行因子を標的とした治療は特発性肺線維症の有効な治療法となる可能性がある。近年RNA干渉を用いて特定の蛋白発現を阻害する手法が盛んに用いられるようになってきており、一部は臨床試験に至っているものもある。今回アポトーシス実行因子のひとつBaxを標的としたsiRNAを用いてマウスブレオマイシン肺臓炎に対する抑制効果を検討した。

[方法] マウスにブレオマイシンを経気管投与後、肺組織中におけるBaxの発現量を検討した。ブレオマイシン投与日をday 0としてday -3, day 0, day 3にBax siRNAを経鼻投与し、day 3, day 7の肺組織においてTUNEL染色を行い、day 14に肺組織のHE染色について肺臓炎の重症度を半定量的に評価した。

[結果] ブレオマイシン投与後肺組織でのBax発現は亢進していた。Bax siRNA投与によって肺病変は軽減された。

[結語] 本実験よりBax標的siRNAによってブレオマイシン肺臓炎モデルが抑制される可能性が示唆された。

Bax-targeted siRNAs attenuate bleomycin-induced pneumopathy in mice.

Takashige Maeyama¹, Jyutaro Fukumoto¹, Tomonobu Kawaguchi¹, Chika Harada¹,
Saiko Ogata¹, Naoki Hamada¹, Kazuyoshi Kuwano², Yoichi Nakanishi¹

¹Research Institute for Disease of the Chest, Graduate School of Medical Science, Kyushu University

²Respiratory Medicine, Department of Internal Medicine, Jikei University School of Medicine

Epithelial cell injury has been thought to be important in the pathogenesis of pulmonary fibrosis. Bax is a proapoptotic protein, which expression is upregulated in alveolar epithelial cells of pulmonary fibrosis. The purpose of this study is to determine whether Bax-targeted siRNA reduces epithelial cell apoptosis and attenuates bleomycin-induced pneumopathy in mice. C57BL/6 mice received intratracheally bleomycin hydrochloride solution at day 0. negative or Bax siRNA solution were administered intranasally at 3 days before, day 0, and 3 days after bleomycin instillation. At 7 and 14 days after bleomycin instillation, the number of TUNEL positive cells in the lung was decreased, and the histological degree of fibrosis was attenuated in mice injected with Bax siRNA compared to those injected with negative siRNA. Those results suggest that Bax may be a therapeutic target in lung epithelial injury and fibrosis.

はじめに

肺損傷・線維化の過程には何らかの刺激によって繰り返される肺上皮細胞傷害が深く関わっている。肺上皮細胞傷害の機序としてFasやTNFなどをリガンドにもつdeath-receptorシグナルを介するもの、あるいは酸化ストレスや小胞体ストレスといった細胞内シグナルを介するものが考えられている(1, 2)。

BaxはBcl-2ファミリーに属する分子量23kDの分子で、通常は細胞質に存在しているが、Fas, DNA損傷, 小胞体ストレスなどからのアポトーシス実行シグナルに呼応して、ミトコンドリアの外膜上に移動し、多量体を形成する(一種のチャンネルを形成すると考えられている)。するとミトコンドリアの膜電位や膜の透過性が変化し、チトクロムcが放出され、caspaseを中心としたアポトーシス実行因子が活性化し、DNAは断片化され、最終的に細胞はアポトーシスに陥る。ミトコンドリアを介さないアポトーシスシグナル伝達経路も知られているが、実質的にミトコンドリアはアポトーシスシグナル伝達に中心的な役割を担っており、Baxはアポトーシス実行に関わる重要な因子のひとつである。Baxは、特発性肺線維症(IPF)患者肺組織やマウス-ブレオマイシン(BLM)肺臓炎の肺上皮細胞においてその

発現が亢進していることが報告されている(3, 4)。そこでマウス-BLM肺臓炎モデルを用いて肺損傷・肺線維化過程におけるBaxの役割を検討した。

対象と方法

C57BL/6JマウスにBLMを経気管投与して肺線維化モデルとした。BLM投与日をday0として、day 1, 3, 5, 7, 10, 14に肺組織を摘出し、全肺をホモジナイズしてタンパクを抽出、western blotにてBaxの発現を検討した。配列を指定して作製したBax標的のsiRNA (SIGMA-ALDRICH)をday -3, 0, 3に経鼻投与した。対照群にはsiPerfect Negative Control (SIGMA-ALDRICH)を使用した。day 14に肺組織を摘出して病変重症度を評価した。またday 3, 7に肺組織中TUNEL陽性細胞数の検討を行った。

結 果

BLM肺臓炎モデルにおける肺内Baxの発現

肺組織中のBax蛋白はBLM投与後day3, 5, 7, 14で発現が有意に亢進しており、day5をピークにday10で一旦低下、その後day14で再度亢進する傾向を示した(図1)。

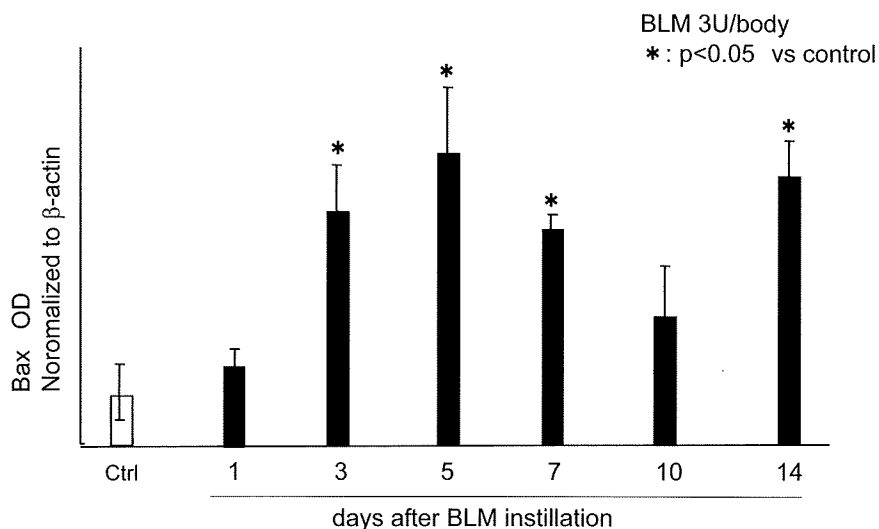


図1. ブレオマイシン投与後肺組織中内因性Baxの発現

¹ 九州大学大学院 医学研究院 附属胸部疾患研究施設

² 東京慈恵会医科大学 内科学講座 呼吸器内科

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

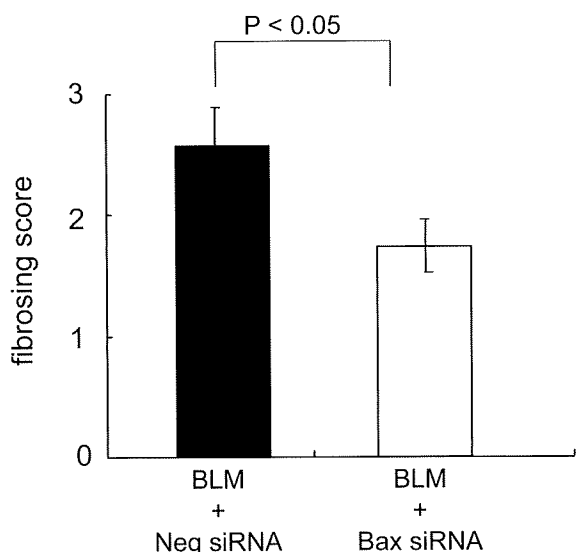


図2. 肺組織中TUNEL陽性細胞数に対するBax標的siRNAの効果

病変重症度および肺組織中TUNEL陽性細胞に対するBax標的siRNAの効果

Bax標的siRNA投与群では肺組織での病変重症度は軽減していた(図2)。BLM投与後Day3, 7における肺組織中TUNEL陽性細胞数は増加していたが、Bax標的siRNA投与群ではTUNEL陽性細胞数増加は有意に抑制されていた(図3)。

考 察

Baxはミトコンドリアを介したアポトーシスシグナルの中心を担っていると考えられ、種々のアポトーシス誘導刺激に関与する。IPF患者肺組織やマウス肺線維化モデルの肺上皮細胞ではBax発現亢進が報告されており、肺上皮がアポトーシスに陥りやすい状態にあることが示唆される(3, 4)。さらに線維化におけるBaxの関与も報告されている。KangらはTGF-beta1トランスジェニックマウスにおいてTIMP1発現亢進やMMP9低下が誘導され、肺線維化が生じること、この系でBaxをノックアウトするといずれも抑制されることを報告した(5)。以上から上皮傷害のみならず線維化過程においてもBaxが重要な働きをもっていることが示唆される。今回の実験ではBLM投与後の肺組織中Bax発現は炎症期(day5)に亢進し、一旦低下後、線維化移行期(day14)に再度亢進しており、肺損傷・線維化へのBax関与が示唆された。Bax標的siRNAの予防的投与によ

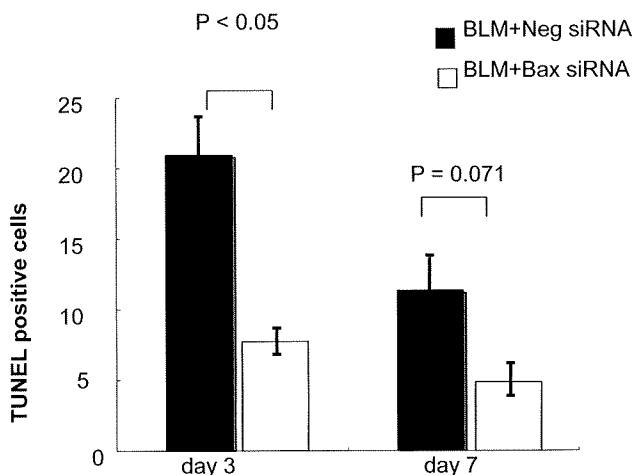


図3. Bax標的siRNAによるマウスプレオマイシン肺臓炎の抑制各検体を100倍下で観察、一検体について独立した10視野において病変程度をスコア化した。グラフは各グループ(n=9)の平均値±標準誤差を示す。

て肺傷害の指標であるTUNEL陽性細胞数は抑制された。今後は、Bax標的siRNAの線維化への影響、さらに肺組織内でのsiRNAの分布やノックダウン効果の持続時間、siRNA投与と炎症反応の関係などを詳細に検討し、更に、治療的投与をした場合の肺臓炎抑制効果についても検討していく予定である。

参考文献

- 1) Platakis M, Koutsopoulos AV, Darivianaki K, Delides G, Sifakas NM, Bouros D. Expression of apoptotic and antiapoptotic markers in epithelial cells in idiopathic pulmonary fibrosis. *Chest* 127: 266-274, 2005
- 2) Barbas-Filho JV, Ferreira MA, Sesso A, Kairalla RA, Carvalho CR, Capelozzi VL. Evidence of type II pneumocyte apoptosis in the pathogenesis of idiopathic pulmonary fibrosis (IPF)/usual interstitial pneumonia (UIP). *J Clin Pathol*. 2001 Feb;54(2):132-8.
- 3) Korfei M, Ruppert C, Mahavadi P, Henneke I, Markart P, Koch M, Lang G, Fink L, Bohle RM, Seeger W, Weaver TE, Guenther A. Epithelial endoplasmic reticulum stress and apoptosis in sporadic idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Oct 15;178(8):782-3.
- 4) Kuwano K, Hagimoto N, Tanaka T, Kawasaki M, Kunitake R, Miyazaki H, Kaneko Y, Matsuba

- T, Maeyama T, Hara N. J Pathol. Expression of apoptosis-regulatory genes in epithelial cells in pulmonary fibrosis in mice. 2000 Feb;190(2):221-9.
- 5) Kang HR, Cho SJ, Lee CG, Homer RJ, Elias JA. Transforming growth factor (TGF)-beta1 stimulates pulmonary fibrosis and inflammation via a Bax-dependent, bid-activated pathway that involves matrix metalloproteinase-12. J Biol Chem. 2007 Mar 9;282(10):7723-32. Epub 2007 Jan 5.

マウス肺標識保持細胞によるニッチ形成 およびⅡ型肺胞上皮細胞との空間的関連性の解析

西脇 徹 松島 綱治*

難治性疾患の発症機序を解明するにあたり、器官固有の組織恒常性維持機構・傷害応答(組織再生)機構の詳細を明らかにすることは重要な課題であり、学術的基礎を構築するものである。組織幹細胞研究は、この課題を達成するうえで要となる研究領域であり、呼吸器再生医学においても新たな研究成果が求められている。

今日までの呼吸器組織幹細胞研究において、組織幹細胞は気管・気管支・細気管支・肺胞領域など解剖学的区分毎に提唱されている。とくに、ガス交換の主座である肺胞領域における組織幹細胞の同定・解析は、肺線維症・肺気腫症など強い呼吸機能障害を伴う難治性疾患の研究においても重視されており、現時点では(マウスにおいて)細気管支肺胞結合領域に存在するCC10・サーファクタント蛋白C二重陽性の細胞群がその候補とされている。しかしながら、最近の遺伝子改変マウスを用いた細胞系譜追跡の報告により、その生体における実質的な貢献が疑問視されており、肺胞領域における組織再生担当細胞群の同定および組織再生機構の解明を目的とする研究は、より多角的な観点から柔軟性をもって取り組まれる必要があると考えられる。

前回までの報告において、我々は組織幹細胞同定法の一つとして知られる長期標識保持細胞解析法によって肺標識保持細胞群を検出し、その幹細胞的性格を報告した。今回、肺標識保持細胞の組織学的検出および既知の肺胞領域前駆細胞であるⅡ型肺胞上皮細胞との空間的関連性について解析し、肺胞領域を中心とした肺組織恒常性における役割について考察を加えたのでここに報告する。

Analysis of the spatial relationship between label-retaining cells and type 2 alveolar cells: a possible participation of label-retaining cells in lung progenitor cell-niche formation

Tetsu Nishiwaki, Kouji Matsushima

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

The study of organ-specific mechanisms for tissue homeostasis and regeneration contributes to the resolution of refractory diseases with unknown pathogenesis and serves an academic basis of regenerative medicine. The tissue stem cell-research has been considered to be essential to understand the nature of tissue maintenance and repair, and major achievements have been desired in the field of pulmonary regenerative medicine.

There have been several candidates for lung tissue stem cells corresponding to their locations such as trachea, bronchi, bronchioles and alveoli. To date, bronchio-alveolar stem cells (BASCs) localized at bronchioalveolar duct junction and expressing both CC10 and surfactant protein C have drawn the attention of pulmonologists because of their possible function to repopulate the gas-exchanging alveoli in the pathologies with severe pulmonary dysfunction such as lung fibrosis and pulmonary emphysema. However, because the recent lineage-tracing study questioned the essential contribution of BASCs to alveolar homeostasis and regeneration, a zero-based review will be required to elucidate the mechanism for alveolar regeneration.

In our previous report, we demonstrated that pulmonary label-retaining cells, which were detected by long term BrdU-chasing method, possessed several stem cell-like characteristics. Here we report the feature of histological distribution of label-retaining cells and their spatial relationship with type 2 alveolar cells, known progenitor in alveoli, and discuss their possible role in alveolar homeostasis.

はじめに

器官特異的な難治性疾患発症機序を解明するにあたり、その器官固有の組織恒常性維持機構・傷害応答(組織再生)機構の詳細を明らかにすることは重要な課題であり、種々の病態学において学術的基礎を構築するものである。皮膚・神経・腸管・血液をはじめとする多くの領域において固有組織幹・前駆細胞の同定および生体内における組織恒常性維持に対する貢献が、分子マーカーの網羅的検索や、限定した細胞内において特定条件下で蛍光蛋白を発現する遺伝子改変マウスを用いた解析などにより少しずつ明らかになってきている中、呼吸器領域においても組織幹・前駆細胞の探求・同定、およびそれらの組織恒常性における役割解明を目的とした研究が散見されるようになってきている。

現在、呼吸器固有組織幹細胞は気管・気管支・細気管支・肺泡領域など解剖学的区分毎に各々提唱されている。とくに、ガス交換の主座である肺泡領域における組織幹細胞の同定・解析は、肺線維症・肺気腫症など強い呼吸機能障害を伴う難治性疾患の研究において重視されており、現時点では(マウスにおいて)細気管支肺泡結合領域に存在す

るCC10・サーファクタント蛋白C二重陽性の細胞群(bronchio-alveolar stem cells ; BASCs)がその候補とされている¹⁾。しかしながら、最近の遺伝子改変マウスを用いた細胞系譜追跡の報告により、BASCsの生体における実質的貢献が疑問視されており²⁾、肺泡領域における組織再生担当細胞群の同定および組織再生機構の解明を目的とする研究は、より多角的な観点から柔軟性をもって取り組まれる必要があると考えられる。

前年度までの報告において、我々は幼少時にBromodeoxyuridine (BrdU) を投与されたマウスの成体肺においてBrdUを保持している細胞(標識保持細胞)を検出し、その幹細胞的性格を見出した。標識保持細胞解析法は1980年代より皮膚領域にて用いられている手法であり³⁾、現在は腎臓・消化管・血液など多岐にわたる領域で幹・前駆細胞群の同定法として認知されているが、呼吸器においては幼少時に標識する手法による同細胞群の解析は報告されておらず、我々が検出したBrdU保持細胞(BrdU retaining cells; BRCs)が新たな幹・前駆細胞群の候補である可能性があるため、今年度、更なる検討を続けた。(図1)

これまでの研究成果では、1)フローサイトメト

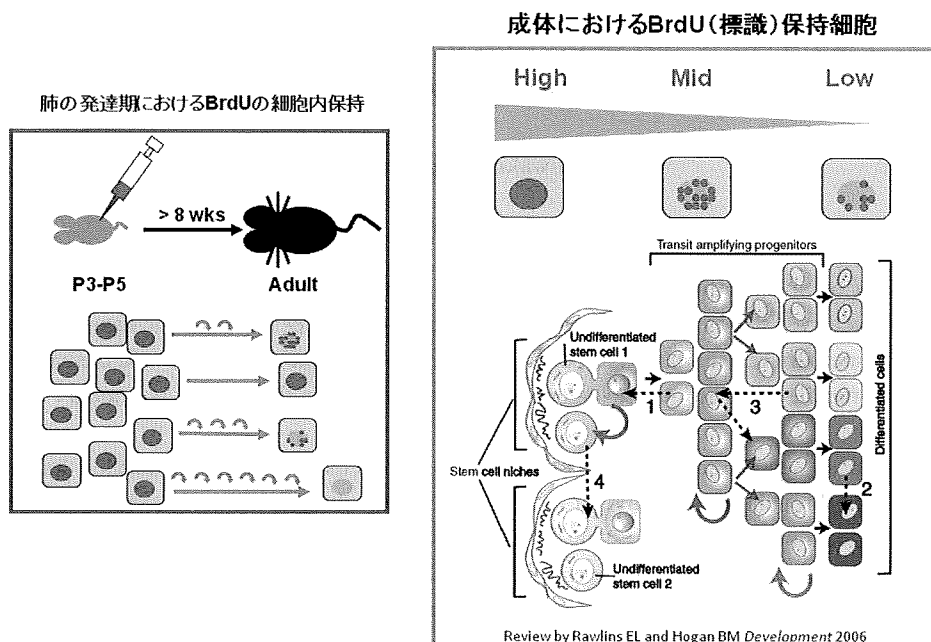


図1 マウス標識保持細胞解析法の模式図。成体においてBrdUの核内保持量が高い細胞は肺発達過程において低細胞回転であった細胞であるため、BrdUの核内保持量に応じて分化度の階層がある可能性がある。

東京大学大学院医学系研究科 分子予防医学

* びまん性肺疾患調査研究班 研究分担者

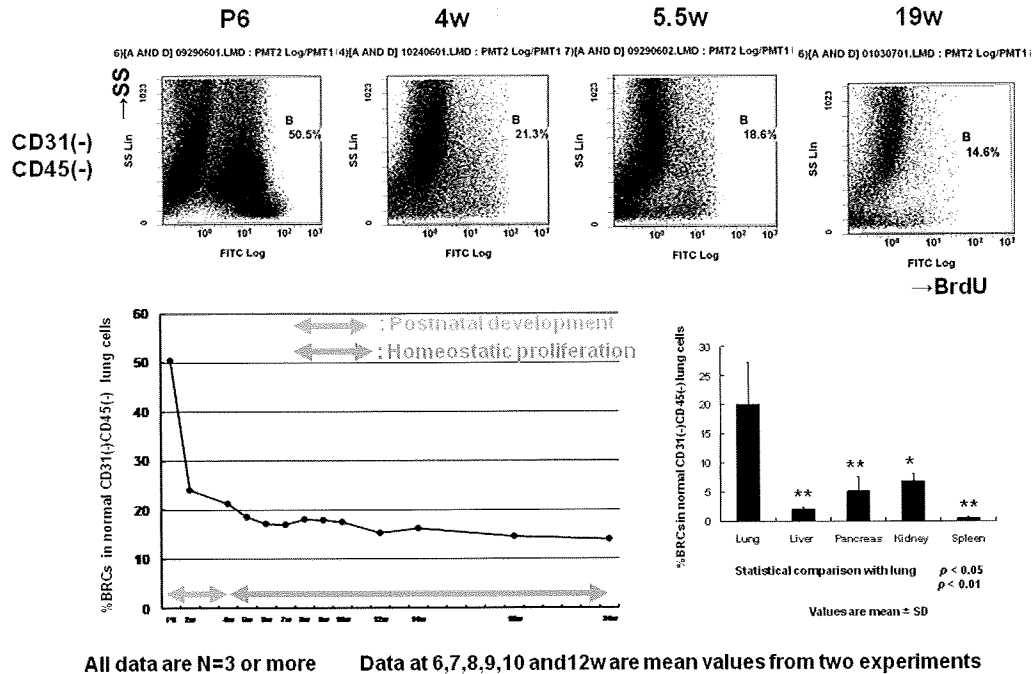


図2 正常肺発達過程における標識保持細胞(BRCs)存在率の変遷。正常成体マウスの各臓器間におけるBRC存在率の比較。N=5。

リーによるBRCs存在率が、生誕から生後30日までのいわゆる「生後発達期」において急速に低下し、以降安定すること、2)生体マウス肺におけるBRCs存在率は他臓器に比し有意に高いこと、3)1型・2型肺胞上皮細胞およびクララ細胞の各々のマーカーによる存在率定量において、BRCsは非BrdU保持細胞(non-BrdU retaining cells; non-BRCs)に比し、分化細胞の保有率が低く、その性格はBrdUの保持率が高い細胞(high BRCs)であるほど顕著であること、4)核内DNA染色色素(7AAD)によるアポトーシス細胞存在率定量において、定常時BRCsはnon-BRCsに比し抗アポトーシス的であり、薬剤(ブレオマイシン)傷害時においても薬剤耐性を示すことなどが見出された。(図2・図3・図4)これらの結果は肺BRCsが幹細胞的性格とされる「低細胞回転」「未分化」「抗アポトーシス能・薬剤耐性能」を有することを示唆するものであったため、今回、肺BRCsの組織内局在と、すでに肺胞領域の前駆細胞として認知されている2型肺胞上皮細胞との空間的関連性を組織学的な解析を中心に行い、肺BRCsが多く密集して存在する特異的な部位、いわゆる細胞ニッチの存在有無および2型肺胞上皮細胞恒常性への関与について検討したものを報告する。

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

マウスをケタラルール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

CD31(-)CD45(-)-gated lung cells

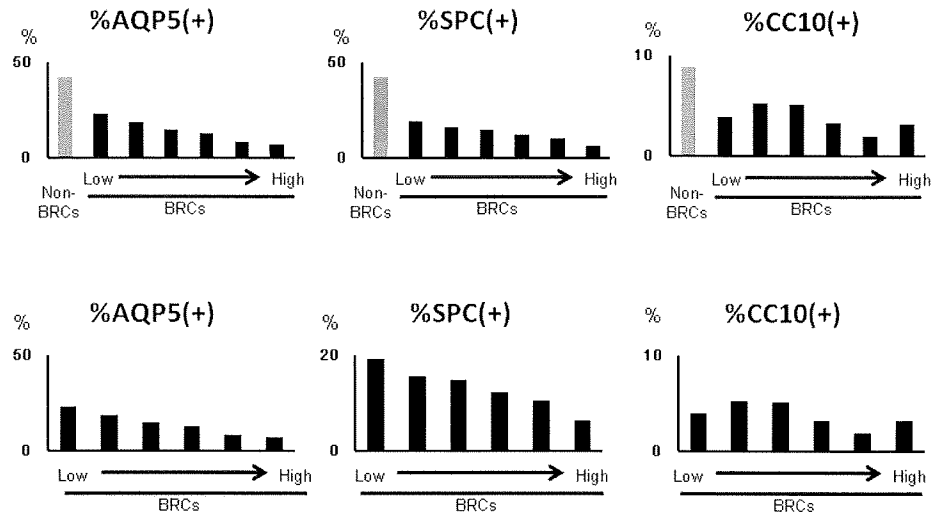


図3 正常成体マウス肺内BRCsにおける肺胞上皮細胞マーカー(SP-C・AQP5・CC10)の陽性率. フローサイトメトリー解析(% SP-C・% AQP5・%CC10 in CD31(-)CD45(-)lung cells)の結果をグラフ化したもの.

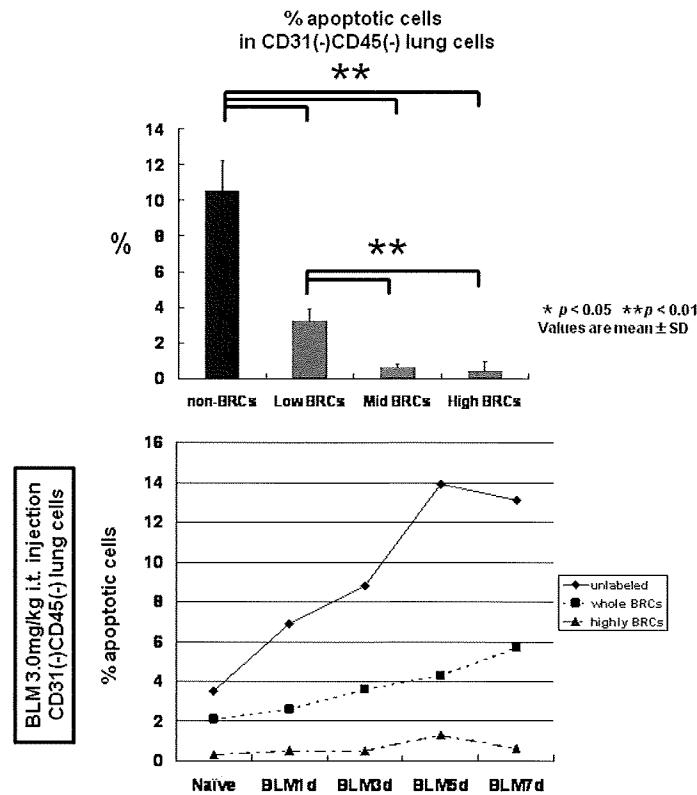


図4 正常成体マウス肺内のBRCs・non-BRCsにおけるアポトーシス細胞率. 上段はフローサイトメトリー解析の結果のグラフ化. N=5. 下段はプレオマイシン肺障害モデルにおける肺BRC・non-BRC分画中アポトーシス細胞率の経時的変化.

ケタラルによる腹腔麻酔の後, 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)(3 mg/kg: 大日本化薬より提供)を経気管的に投与した.

蛍光免疫染色

マウスをケタラルによる腹腔麻酔後, 経気管的にOCT compound(サクラ精機)を注入. 胸腔より取り出した肺をOCT compoundにて包埋し, クリオス

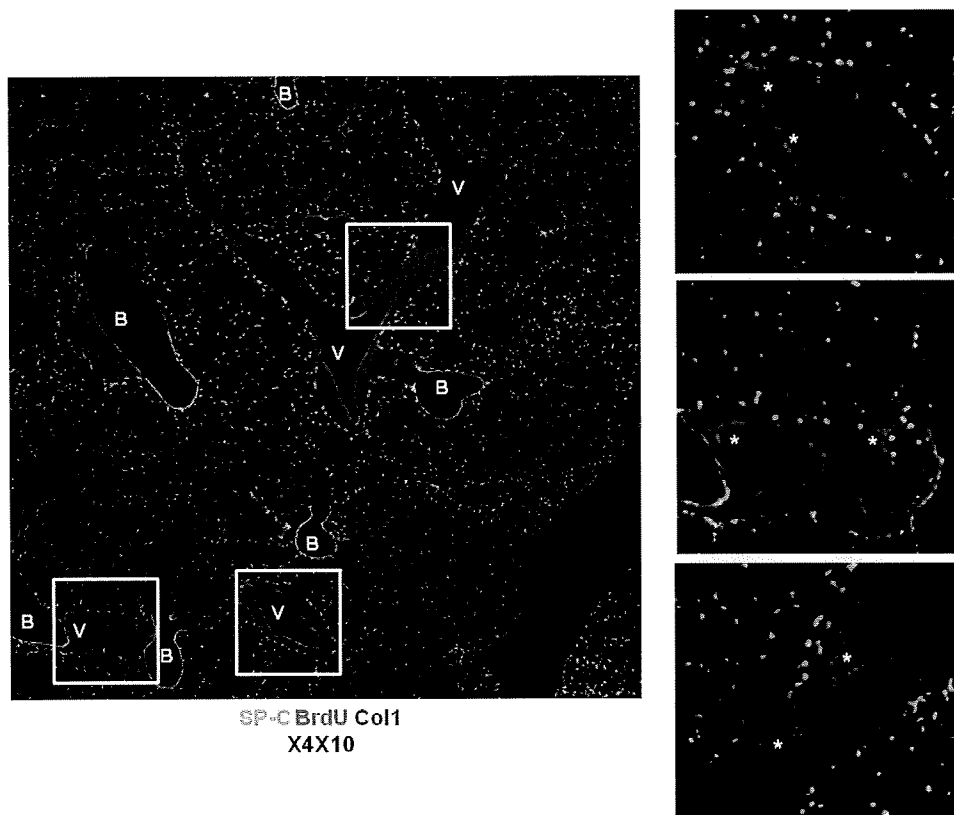


図5 BRCsと2型肺胞上皮細胞の組織内分布。白：SP-C、淡灰：BrdU、濃灰：I型コラーゲン。B：気管支および細気管支、V：血管。アスタリスク：BRCsの群在する部位。なお気管支上皮は自家蛍光が高いため随所で非特異的に白色陽性になっている。

タットにて6 μ mに薄切し、スライド標本を作製した。免疫染色の際、スライド標本はアセトン固定、ブロックエース(大日本製薬)によるブロッキングを経て抗体による染色を行った。標本観察・画像解析はOlympus社製共焦点レーザー走査型顕微鏡FV-300を用いて行った。

結 果

定常時における肺BRCsと2型肺胞上皮細胞の組織内局在を確認する目的で、正常マウス(13週齢,雄)肺組織の蛍光免疫染色を行った。2型肺胞上皮細胞の描出には特異的分泌蛋白であるサーファクタントプロテインC (surfactant protein-C; SP-C)を認識する抗体を使用し、肺組織構造・肺間質の描出のためにI型コラーゲンを認識する抗血清を用いた。フローサイトメトリ解析の結果が示すように、BRCsは正常肺組織の随所(肺胞隔壁・血管壁・肺胞間質・気管支血管周囲間質・胸膜下間質など)に観察され、特定の部位にのみ存在するという偏在性はなかつ

た。しかしながら、とくに気管支血管周囲間質など間質に富む部位に輝度の高いBRCsが集積している像が認められた。一方、2型肺胞上皮細胞は細胞質内SP-C陽性の肺胞領域立方上皮細胞として明瞭に描出されたが、その分布密度およびSP-Cの輝度は局在する部位によって異なり、間質の豊富な領域の周囲に、SP-C輝度が高い2型肺胞上皮細胞が高頻度に存在する傾向が認められた。(図5) また、血管周囲間質領域における高倍率の観察では、SP-C陽性BRCs(矢頭)および密集する2型肺胞上皮細胞に隣接したBRCs(矢印)が多く認められ、両者の空間的緊密性が示唆された。(図6)

また、組織学的観察の結果を定量的に検証する目的で、蛍光免疫染色により得られた画像上で一定面積(0.01mm²)の関心領域を多数設定し、設定された部位による対象細胞(2型肺胞上皮細胞)の分布密度を統計学的に検討した。これにより、2型肺胞上皮細胞は間質に富む領域の周囲において、分布密度・SP-C輝度総和・一細胞数当たりのSP-C輝度が有意に高いことが明らかとなり、上記の観察結果を確証

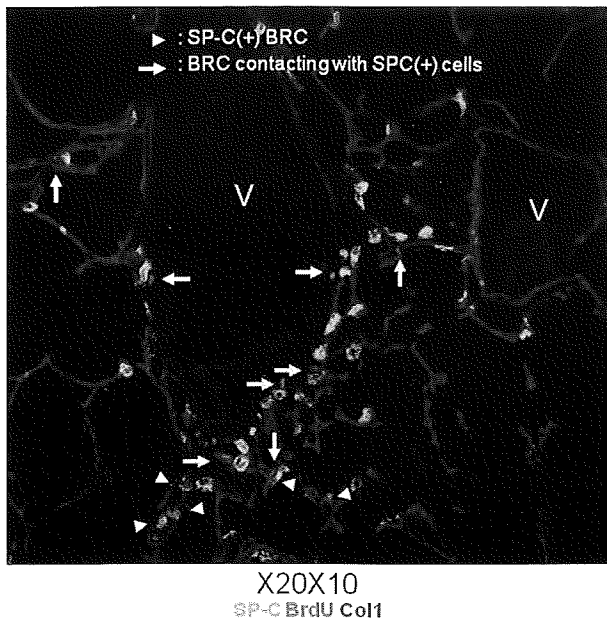


図6 BRCsと2型肺胞上皮細胞の組織内分布(強拡大像)。白: SP-C、淡灰: BrdU、濃灰: I型コラーゲン。V: 血管。矢頭: SP-C陽性BRCs、矢印: SP-C陽性に接するBRCs。

するものとなった。(図7)さらに、BRCsと2型肺胞上皮細胞の空間的緊密性を確認するべく、前述の如く一定面積(0.09mm²)の関心領域を設定し、領域内におけるBRCsと2型肺胞上皮細胞各々の輝度総和および細胞数データを集計し、単回帰分析によって2細胞群間の相関をみたところ、重相関係数がそれぞれ0.792と0.789となり、両細胞群間の高い空間的緊密性が示された。(図8)

考 察

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・肺胞領域といった、解剖学的区域毎に固有の組織幹細胞群候補が次々と提唱され⁴⁾⁵⁾⁶⁾、さらには局在不明ながらも、間葉系幹細胞⁷⁾・side population (SP)細胞⁸⁾の存在も示唆されている。とくに気道上皮の組織幹細胞については

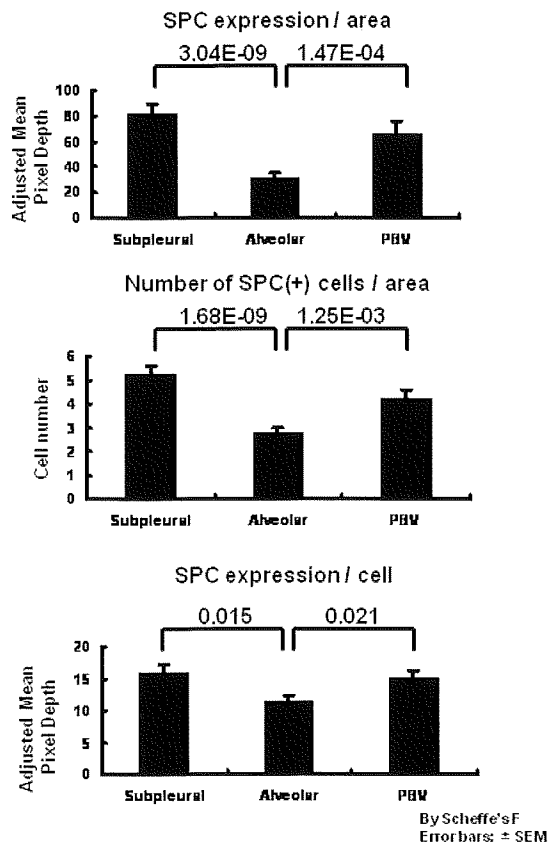
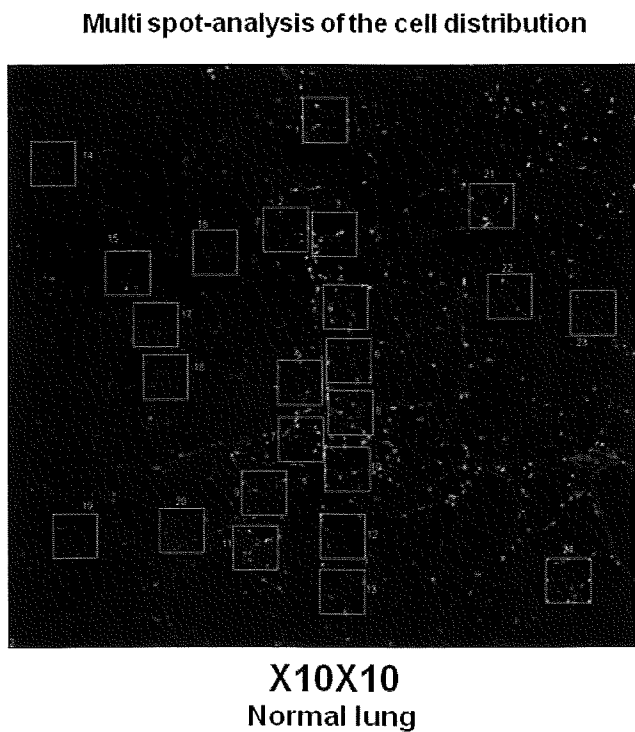


図7 2型肺胞上皮細胞の組織内局在(定量化)。PBW: 気管支血管周囲領域。

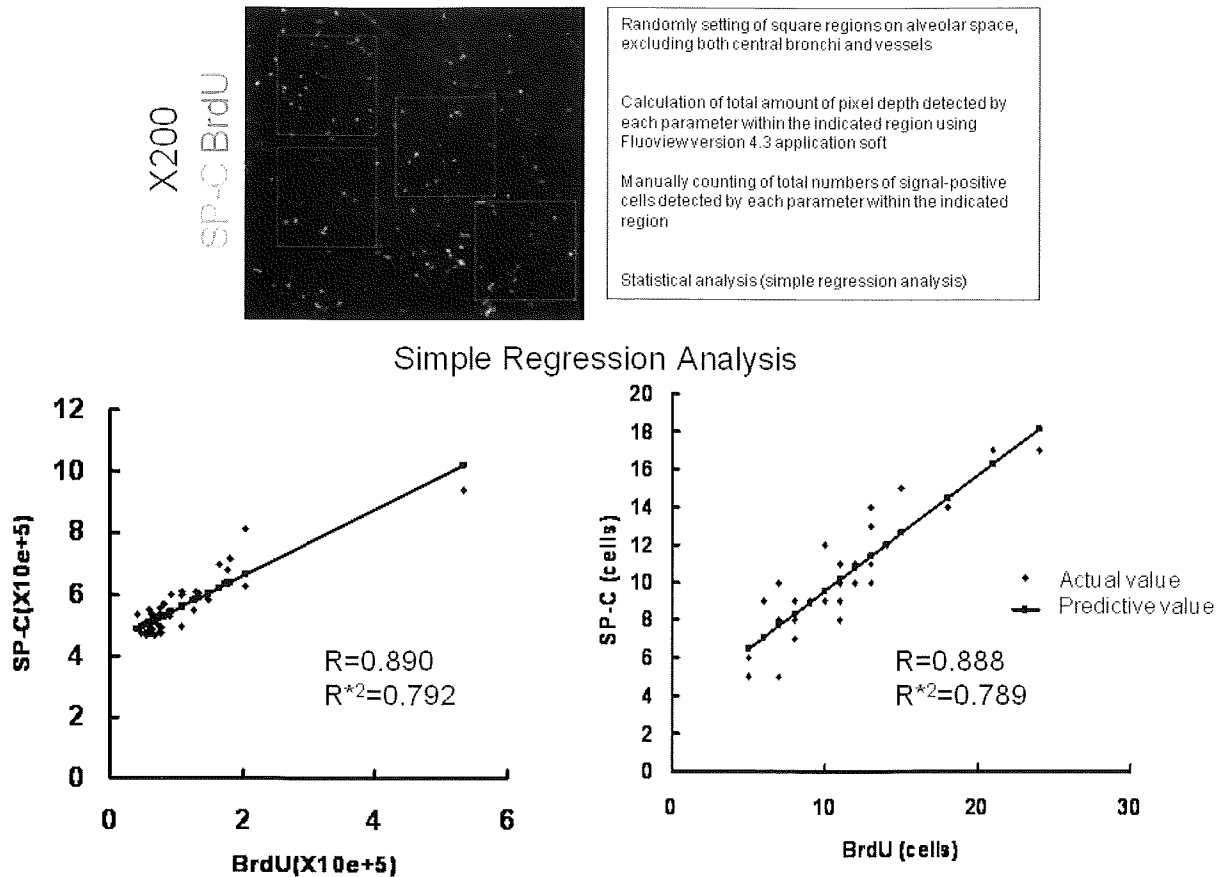


図8 BRCs・2型肺胞上皮細胞間の空間的緊密性の評価。

標識保持細胞解析法(成体における標識)を用いて組織学的にニッチを同定し、これを中心とした組織修復機構の概念モデルが提唱されている。肺胞領域については、細気管支肺胞結合部がBASCsのニッチとなり、近傍の肺胞上皮傷害に対する上皮再生応答の中心となることが提唱されていたが、前述の如く最近の報告により肺胞再生への寄与が疑問視されているため、肺胞領域における組織再生モデルは、「2型肺胞上皮細胞が脱落した1型肺胞上皮細胞に再置換する」⁹⁾という極局所的な現象を基軸にしたものに留まっており、2型肺胞上皮細胞の恒常性維持機構を説明する概念モデルは実質的に確立していないのが現状である。

今回の報告において、我々は正常マウス肺における2型肺胞上皮細胞の組織内分布には遍在性があり、「低細胞回転」「未分化」「抗アポトーシス能・薬剤耐性能」など複数の幹細胞的性格を有する標識保持細胞が2型肺胞上皮細胞と高い空間的緊密性をもつことを示した。現時点において、標識保持細胞が直接2型肺胞上皮細胞に分化するか否かについて洞察

を与える知見は得られていないが、組織幹細胞学において、幹細胞と前駆・分化細胞が生体内において近接していることは、幹細胞の組織構築維持機構への直接および間接的な寄与を示唆する重要な事実である。今後、組織傷害時において標識保持細胞がどのような振る舞いを示すか、また2型肺胞上皮細胞の脱落・修復に対する関与の有無について検討することが必要であり、肺における組織構築維持機構の解明に結びついていくものと考えられる。

参考文献

- 1) Kim CF, Jackson EL, Jacks T et al: Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer Cell 2005; 121: 823-835.
- 2) Rawlins EL, Okubo T, Hogan BL et al: The role of Scgbl1+ Clara cells in the long-term maintenance and repair of lung airway, but not alveolar, epithelium. Cell Stem Cell 2009; 4: 525-534.
- 3) Bickenbach JR: Identification and behavior of

label-retaining cells in oral mucosa and skin. *J Dent Res* 1981; 60: 1611-1620

- 4) Engelhardt JF: Stem Cell Niches in the Mouse Airway. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001; 24: 649-652.
- 5) Rawlins EL and Hogan Brigid LM: Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities for many? *Development* 2006; 133: 2455-2465.
- 6) 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.

- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Evans MJ, Cabral LJ, Freeman G et al: Renewal of alveolar epithelium in the rat following exposure to NO₂. *Am J Pathol* 1973; 70: 175-198.

びまん性肺疾患における肺の免疫学的恒常性維持に関する CD40分子の役割

長谷川好規

サーファクタントは表面活性物質としてのみではなく自然免疫においても重要な役割を果たすと考えられる。サーファクタントはII型肺胞上皮から産生され肺胞マクロファージとII型肺胞上皮自身で代謝されるが、この恒常性の破綻により引き起こされる病態の一つに肺胞蛋白症がある。肺胞蛋白症はサーファクタントが肺内に貯留する稀な疾患であるが、その多くは自己免疫性で肺胞マクロファージの分化成熟に重要な顆粒球マクロファージコロニー刺激因子の不十分な作用による肺胞マクロファージのサーファクタント代謝障害が原因であると考えられている。他方、二次的に発生する続発性肺胞蛋白症に関しては、その発症機序は不明とされている。CD40は抗原提示細胞に発現しイムノグロブリンのクラススイッチに重要な役割を果たす分子として発見された。本研究では、CD40遺伝子欠損マウスに発症した続発性肺胞蛋白症を解析し、その発症機序が自己免疫性肺胞蛋白症とは異なり肺胞上皮のサーファクタント産生亢進であることを明らかにした。CD40-CD154系は獲得免疫に重要であるばかりでなく、自然免疫に重要なサーファクタントの産生を調節し、肺の免疫学的恒常性を維持している可能性がある。

The role of CD40 for the pathogenesis of diffuse lung diseases as one of key molecules of surfactant-associated protein homeostasis

Yoshinori Hasegawa

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

Although Pneumocystis infection might be one of the causes of secondary pulmonary alveolar proteinosis (PAP), the mechanism of its pathogenesis is uncertain. We analyzed a mouse model of secondary PAP resulting from Pneumocystis infection using mice deficient in CD40 (CD40KO), and evaluated the mechanism of the pathogenesis of secondary PAP from the viewpoint of surfactant-associated protein (SP) homeostasis. After long-term exposure to ovalbumin, CD40KO mice showed Pneumocystis infection and accumulation of surfactants in the alveoli (ApCD40KO). The amounts of SP production were up-regulated in ApCD40KO mice compared with wild-type mice treated using the same procedure. On the other hand, AMs from ApCD40KO mice did not show either phagocytic dysfunction or down-regulation of PU.1 expression. Furthermore, the stimulation of CD40-CD40 ligand (CD154) pathway regulated the production of SPs in H441 cells or primary alveolar epithelial cells. These results suggested that surfactant accumulation was due to the overproduction in our model of secondary PAP. The CD40-CD154 interaction plays an important role in the regulation of surfactant-associated protein production and the homeostasis of the lung.

はじめに

肺サーファクタントは脂質とタンパク質の複合体であり、肺の表面活性物質としての役割のみならず自然免疫においても重要な役割を果たすと考えられる。肺サーファクタントは、II型肺胞上皮と clara 細胞から産生され、そのうち約70%がII型肺胞上皮細胞、約30%が肺胞マクロファージ(alveolar macrophage; AM)で代謝されると考えられている。II型肺胞上皮細胞に取り込まれたサーファクタントの半分は再利用され、残りの半分は分解されるとされる。このようなメカニズムにより肺胞内のサーファクタント量は一定に保持され、恒常性が保たれている。この恒常性の破綻により引き起こされる病態の一つに肺胞蛋白症がある。サーファクタントの産生・代謝のバランスが崩れることにより肺胞内に大量のサーファクタントが蓄積して肺胞蛋白症(pulmonary alveolar proteinosis; PAP)が発症する(1)。我々は、CD40遺伝子欠損(knock-out; KO)マウス(2)に卵白アルブミン(ovalbumin; OVA)を長期間吸入させたところ肺内において病理学的にPAPに一致する病態を呈することを発見した。本研究では、CD40遺伝子欠損マウスに発症したPAPのメカニズムの解析とCD40の役割、ならびに肺の免疫学的恒常性の維持におけ

る肺サーファクタントの役割について報告する(3)。

方 法

生後8～10週齢のCD40KOマウスと野生型(以下WT)マウスをOVAの腹腔内投与にて感作し、その後、3週間週5日吸入によるOVAの長期曝露を行った。肺病理、SPの発現量および気管支肺胞洗浄により得られた肺胞マクロファージを中心とする細胞について検討した。また肺胞上皮由来の細胞株H441、マウスより単離した肺胞上皮細胞を可溶性CD40リガンド、または抗CD40抗体で刺激しSPの遺伝子発現量の変化を検討した。

結 果

OVA処置したWTマウスは病理学的には変化がなかったのに対して、OVA処置CD40KOマウスの肺胞内には肺サーファクタントの著明な貯留が認められ、ヒト肺胞蛋白症と類似の病理像を示した。Gomori methenamine silver染色(以下GMS)において、*Pneumocystis*感染による続発性肺胞蛋白症に矛盾しない所見であった(この実験群のマウスを以下ApCD40KOマウスとする)(Figure 1)。肺

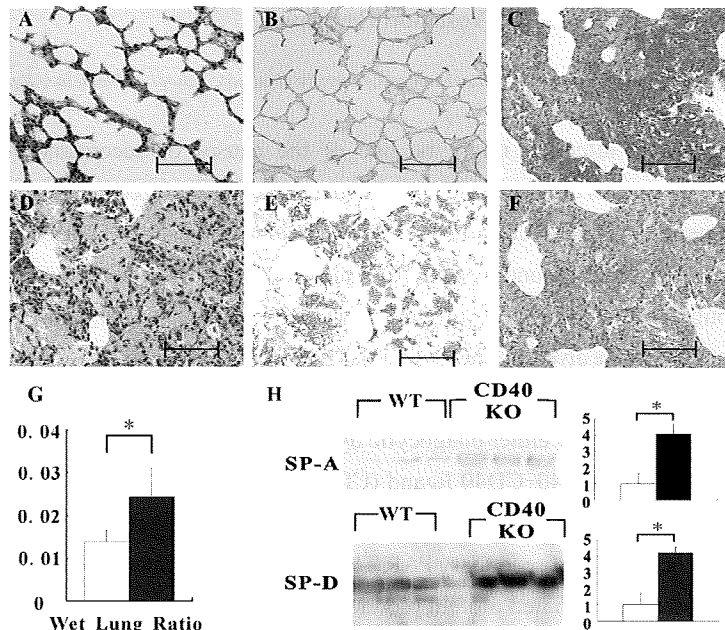


Figure 1

名古屋大学大学院医学系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

サーファクタント貯留の発症機序を解明するために、肺内の SP 発現量を検討した結果、ApCD40KO マウスで mRNA レベル、タンパク質レベルともに、SP 発現量が上昇していた (Figure 2). 処理機能について ApCD40KO マウスは OVA 処置 WT マウスに比べて食食能の低下を示さなかった. また肺胞マクロファージ成熟過程に重要な影響を与える転写因子 PU.1 の発現量 (4) についても ApCD40KO マウスは OVA 処置 WT マウスに比べ低下していなかった (Figure 3). 以上より、本モデルにおける *Pneumocystis* 感染による続発性肺胞蛋白症の発症機

序は、肺サーファクタントの産生亢進によると考えられた. II 型肺胞上皮における SP 産生調節への CD40 の関与を検討するために、H441 細胞株における SP 遺伝子の発現量を *in vitro* で解析した. CD40 が H441 細胞株に発現していることを確認し、可溶性 CD40 リガンド刺激により SP 遺伝子の発現量が濃度依存性に抑制されることを証明した. さらに、マウスより単離した肺胞上皮細胞において抗 CD40 抗体による CD40 の刺激により SP 遺伝子の発現量が抑制されることを確認した (Figure 4).

考案・結論

特発性肺胞蛋白症は、肺胞マクロファージの機能異常による肺サーファクタントの処理障害が発

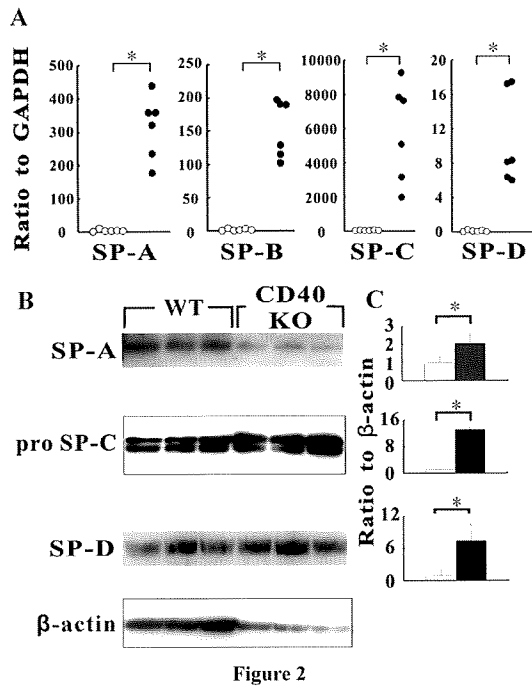


Figure 2

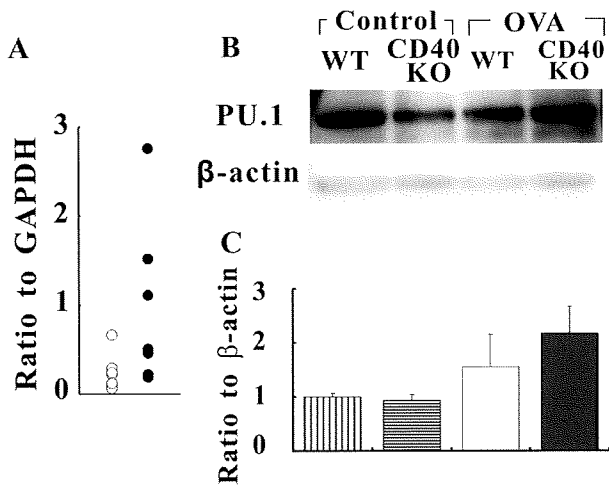


Figure 3

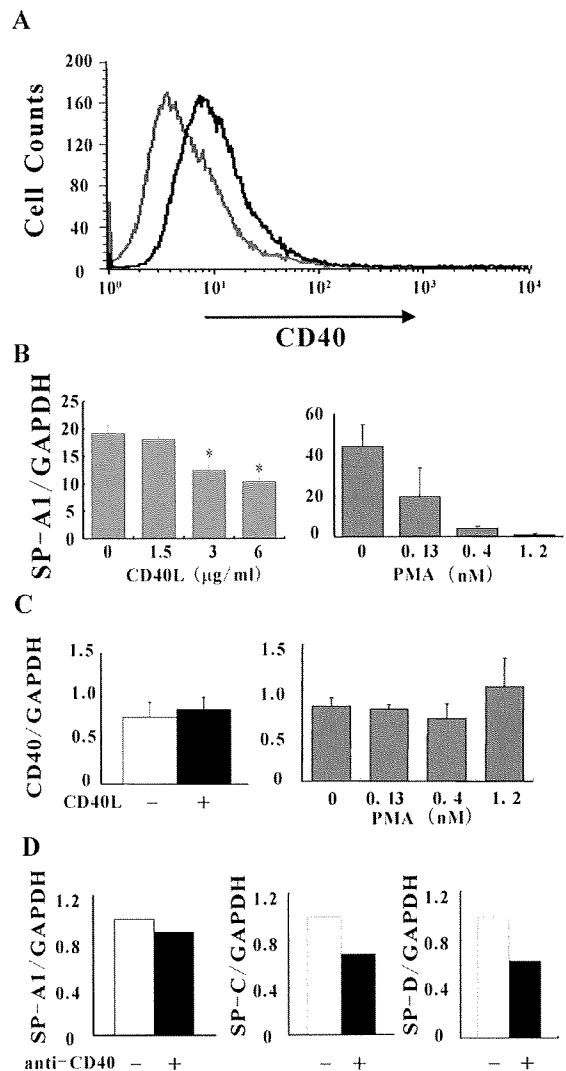


Figure 4

症機序と考えられているが、続発性肺胞蛋白症の発症機序は不明であった。*Pneumocystis*感染は続発性肺胞蛋白症の原因の一つであるが、我々のモデルではOVA処置をした全例のCD40KOマウスが*Pneumocystis*感染に伴う続発性肺胞蛋白症を発症していた。これらのマウスモデルでは肺胞マクロファージの機能異常はなく、II型肺胞上皮のわずかな過形成と、それを上回るSP発現量の増加を認め、*Pneumocystis*感染に伴う続発性肺胞蛋白症の発症機序の一つがSP産生亢進であることを証明した。さらにSP産生亢進におけるCD40の関与を検討したところ、H441細胞株および初代培養のマウス肺胞上皮においてCD40がSP産生制御に関与していることが明らかとなった。以上の結果は、自然免疫に重要なSPが獲得免疫の作動とともにCD40による産生調節を受け、肺の恒常性の維持に重要な役割を果たしている可能性を示唆するものである。

本研究はCD40KOマウスが*Pneumocystis*感染による続発性肺胞蛋白症の疾患モデルマウスとして用いることが可能であり、その発症機序がSPの産生増強であること、さらに、CD40がSP産生制御に関与していることを証明した。

まとめ

CD40KOマウスにおける続発性PAPモデルの発症

機序は、自己免疫性PAPの原因であるAMによるサーファクタントの代謝・分解の障害ではなく、肺胞上皮によるサーファクタントの産生亢進であった。CD40-CD154系を含めた獲得免疫系が、自然免疫に重要なサーファクタントの産生を調節することにより、肺の免疫学的恒常性を維持している可能性がある。

参考文献

- 1) Trapnell, B. C. & Whitsett, J. A. Gm-CSF regulates pulmonary surfactant homeostasis and alveolar macrophage-mediated innate host defense. *Annu Rev Physiol* 64, 775-802, 2002
- 2) Kawabe, T. *et al.* The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1:167-178, 1994
- 3) Shibasaki, M. *et al.* Up-regulation of surfactant protein production in a mouse model of secondary pulmonary alveolar proteinosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40:536-42, 2009
- 4) Trapnell, B. C., Whitsett, J. A. & Nakata, K. Pulmonary alveolar proteinosis. *N Engl J Med* 349:2527-2539, 2003

血管抑制因子 vasohibin の線維化病態における役割

玉井ときわ^{1,2} 廣田 直¹ 柴田 尚子¹ 太田 洋充¹
久田 修¹ 貫和 敏博¹ 佐藤 靖史² 海老名雅仁^{1*}

特発性肺線維症 (IPF) は、小葉間隔壁および胸膜下組織の線維化を本態とした難治性・進行性の肺疾患である。その線維化の病態に置いて中心的な役割を果たしている筋線維芽細胞は主として TGF- β 1 の刺激を受け、線維芽細胞より分化誘導されることが知られている。Vasohibin-1 (VASH 1) は VEGF 刺激に応じて血管内皮細胞で誘導される血管新生抑制因子である。私たちはこれまでに IPF 患者肺の線維化病変においては肺泡毛細血管が著明に減少していることを見出し報告したが、この現象に VASH1 が影響している可能性を考え検討を行った。IPF 患者肺における VASH1 発現を免疫組織染色にて検討したところ、VASH1 は線維化病変周辺の毛細血管増殖病変の血管内皮細胞のみならず、線維芽細胞巢の筋線維芽細胞に VASH1 の発現を確認した。TGF- β 1 により分化誘導した 3 種のヒト胎児肺由来筋線維芽細胞から VASH1 タンパク発現が亢進し、さらに培養上清中の VASH1 増加したことから、筋線維芽細胞が VASH1 を産生および分泌していること確認した。次に、VASH1 の筋線維芽細胞にける機能をみるために siRNA を用いて VASH1 遺伝子の発現を抑制したところ、定常状態で α SMA タンパク発現量が著明に増加し、TGF- β 1 刺激後にはさらに顕著な α SMA の発現亢進を認めた。これらの結果から VASH1 は線維化病態において血管抑制作用のみならず線維化過程を制御している可能性が初めて示された。

Vasohibin-1, a negative feedback regulator of angiogenesis, is expressed by myofibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis to modulate fibrogenesis

Tokiwa Tamai^{1,2}, Nao Hirota¹, Naoko Shibata¹, Hiromitsu Ohta¹,
Shu Hisata¹, Toshihiro Nukiwa¹, Yasufumi Sato², and Masahito Ebina¹

¹Department of Respiratory Medicine, Tohoku University Graduate School of Medicine,
1-1 Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai, 980-8574, Japan,

²Department of Vascular Biology, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University,
4-1 Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai, 980-8575, Japan.

Vasohibin-1 (VASH-1) is identified as an angiogenesis inhibitor expressed by vascular endothelial cells for negative feedback regulation. We examined whether VASH-1 might be involved in pulmonary fibrogenesis because we previously reported a significant decrease of alveolar capillaries in fibrotic lesions in the lungs of patients with idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) (Ebina M, et al., AJRCCM 2004). The immunohistochemical examination of lung biopsy samples taken from IPF patients showed that alpha smooth muscle actin (α SMA)-positive myofibroblasts expressed VASH-1 in fibrotic lesions. The expression VASH-1 protein was elevated in human fetal lung myofibroblasts in culture. Interestingly, this differentiation to myofibroblast was abrogated by the knockdown of VASH-1 expression with small interference RNA. A comprehensive analysis using DNA microarray approach further revealed that the knockdown of VASH-1 expression led to the up-regulation of TGF- β 1, SMAD3 and α SMA genes. These results showed for the first time the expression of VASH-1 in myofibroblasts and further suggested its additional function to modulate fibrogenesis.