

## 背景

特発性肺線維症 (IPF : Idiopathic pulmonary fibrosis) は、難治性・進行性の線維化病変による炎症性肺疾患である。通常 50 歳以降に発症し、労作時呼吸困難などの自覚症状から受診し、診断確定後の平均生存期間は 3 年以下である。その線維化の原因は未だに十分に解明されていない。私たちは以前 IPF 患者の生検肺において CD34 陽性の肺胞毛細血管内皮細胞が不均一に増加していることを報告した。すなわち線維化が顕著な領域では毛細血管内皮細胞が減少しているのに対して、線維化病変の周囲の肺胞壁においては血管内皮細胞が増加していた (1)。血管新生の機序に関する情報は豊富であるが、毛細血管が消失する機序に関しては不明である。私たちは線維化と血管消失の関係をつなぐものとして、生体内で初めて発見された血管新生制御因子 vasohibin (2) に注目した。vasohibin は VEGF 刺激により血管内皮細胞に誘導され、血管内皮細胞自身に作用する血管新生の負のフィードバック作用を持つことが報告された (2)。近年 VASH のホモログとして VASH2 が発見された経緯があり、VASH の原型となった分子を称して VASH-1 と呼ぶようになっている (3)。VASH-1 は主として血管新生の末端部分に発現して、その血管新生を終息させる働きがあることが明らかとなってきた (4)。私たちは VASH-1 が筋線維芽細胞巢における血管の減少に関与している可能性を考え、IPF 患者の外科的生検肺およびヒト肺線維芽細胞を用いて VASH-1 の発現およびその役割を検討した。

## 方法

**免疫病理組織学的検討：** IPF 患者の外科的生検肺を 10%ホルムアルデヒドにて固定し、パラフィンに包埋した。一次抗体として抗 VASH-1 抗体、抗  $\alpha$ SMA 抗体、抗 CD34 抗体、抗 vimentin 抗体を使用した。抗原-抗体複合体の検出には Vector Red (Vector 社) および 3,3'-ジアミノベンジジンテトラヒドロクロライドを使用した。対染色として Elastica-Goldner 染

色を行った。免疫蛍光抗体法もあわせて行い、Alexa Fluor (Molecular Probes) により蛍光標識した。この際に Propidium Iodide (PI) で核の対染色を行った。

**培養細胞：** ヒト胎児肺由来線維芽細胞株 MRC-5, IMR-90, WI-38 を 37% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した。筋線維芽細胞への分化誘導実験は、10 cm ディッシュに細胞を播種し、80% コンフルエント時に無血清培地に交換、18 時間後に TGF- $\beta$ 1 (5 ng/ml) を添加し、48 時間培養した。同時に培養上清を回収し、遠心にて細胞塊を除去後、遠心濾過フィルターを用いて濃縮した。すべての細胞実験には継代数 10 回以内の細胞を使用した。

**RNA 干渉による VASH-1 ノックダウン：** Vasohibin Stealth RNA (Invitrogen 社にて作成、配列は (5'-CAA GGA CCG GAA GAA GGA UGU UUC U-3'))、対照オリゴペプチドとして、スクランブル配列 (5'-CAA CCA AGG AGA GGA GUA UUG GUC U-3') を使用した。細胞内への siRNA 導入は Lipofectamine RNAi MAX (Invitrogen 社) を用いた。MRC5 細胞を 10 cm 培養ディッシュに播種し、80% コンフルエント時に無血清培地に交換し、Lipofectamine RNAi MAX を用いて Stealth RNA および対照オリゴペプチドをトランスフェクションした。48 時間後にそれぞれの実験系に用いた。

**抗体：** 抗  $\alpha$ SMA (マウスモノクローナル, SIGMA・ウサギポリクローナル, Epitomics), 抗 VASH-1 (マウスモノクローナル), 抗 b-actin (マウスモノクローナル, SIGMA), 抗ヒト CD34 抗体 (マウスモノクローナル, ニチレイ), 抗 vimentin 抗体 (マウスモノクローナル, Dako), ヒト組み替え蛋白 TGF- $\beta$ 1 (R&D), PDGF-BB (R&D) を用いた。

**ウエスタンブロッティング法：** 細胞を modified RIPA Buffer (50 mM NaF, 20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl, 5 mM EDTA, 0.2% triton-X, 10% glycerol, 5 mM SDS) を用いて溶解し、その細胞溶解液を 10% アクリルアミドゲルで泳動した。泳動後のゲルを PVDF メンブレンへ転写し、5% スキムミルクでブロッキング後、抗  $\alpha$ SMA (1:500), 抗 VASH-1 (1:1000), b-actin (1:5000) 抗体にて HRP で標識し、LAS-1000 化学発光で検出した。発現の定量化には Image J を用いて行った。

**DNA マイクロアレイ法：** MRC5 細胞を 10 cm 培養ディッシュに播種し、12 時間後に無血清培地に交換

<sup>1</sup> 東北大学大学院医学系研究科 呼吸器病態学

<sup>2</sup> 東北大学加齢医学研究所 腫瘍循環

\* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究分担者

し、Stealth RNAを用いてVASH-1遺伝子のノックダウンを行った。ノックダウン後48時間経過した細胞を回収し、RNeasy mini kit (QIAGEN社)を用いてtotal RNAを精製した。アジレントLow RNA Inputリニア増幅&ラベル化キットPlus(Agilent社)を用いてcDNAを合成し、引き続きcyanine-3(Cy3)ラベル化cRNAを合成した。whole human genome 4×44k (agilent社)のアレイにGene Expression Hybridization Kitを用いて65°C、17時間ハイブリダイゼーションを行った。洗浄後のアレイをAgilentマイクロアレイスキャナーによりスキャンした。アレイのスポットの数値化にはソフトウェアFeature Extraction ver 9.5を使用した。数値化したアレイのデータ

の解析には GeneSpring GX version 10.0.1 (Agilent technology)を使用、遺伝子のクオリティコントロールを行った後にunpaired t-testにて検定し、有意差をもって2倍以上の発現量の差を認める遺伝子を求めた。

**統計的解析：**ウエスタンブロットティングのバンド間の統計学的有意差はマン・ホイットニーのU検定を用いて比較を行った。すべての結果は三連の平均±標準偏差で表し、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

## 結果と考察

### 線維化肺におけるVASH-1の局在

IPF患者の外科的生検肺におけるVASH-1の発現を免疫組織学的に検討した結果、IPF患者肺の線維化病変周囲の血管増殖が顕著な肺胞壁において、血管内皮細胞にVASH-1の発現を確認した(図1)。また、筋線維芽細胞巢を含む線維化領域においてVASH-1の発現を検討したところ、筋線維芽細胞巢内にVASH-1の発現が認められた(図2)。二重免疫染色を行うと $\alpha$ SMA陽性の筋線維芽細胞ではVASH-1が発現し、また免疫蛍光抗体法でも同様に、IPF患者肺の線維化病変では $\alpha$ SMA陽性の筋線維芽細胞にVASH-1の発現を認めた。

### 培養筋線維芽細胞におけるVASH-1の発現の検討

線維芽細胞がVASH-1を産生していることを確認するためにMRC5, IMR-90, WI38の3種類の培養ヒト線維芽細胞株におけるVASH-1発現をウエスタ

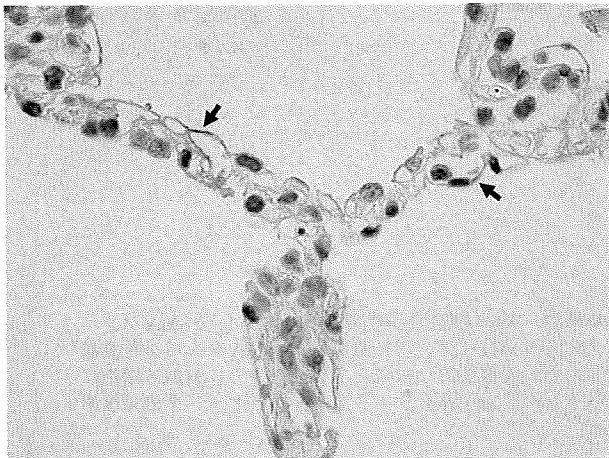


図1：IPF患者肺内血管増殖病変におけるVASH-1発現  
IPF患者の外科的生検肺において肺胞壁毛細血管増殖病変における血管内皮細胞の一部にVASH-1(矢頭)の発現を認める(X1000)。

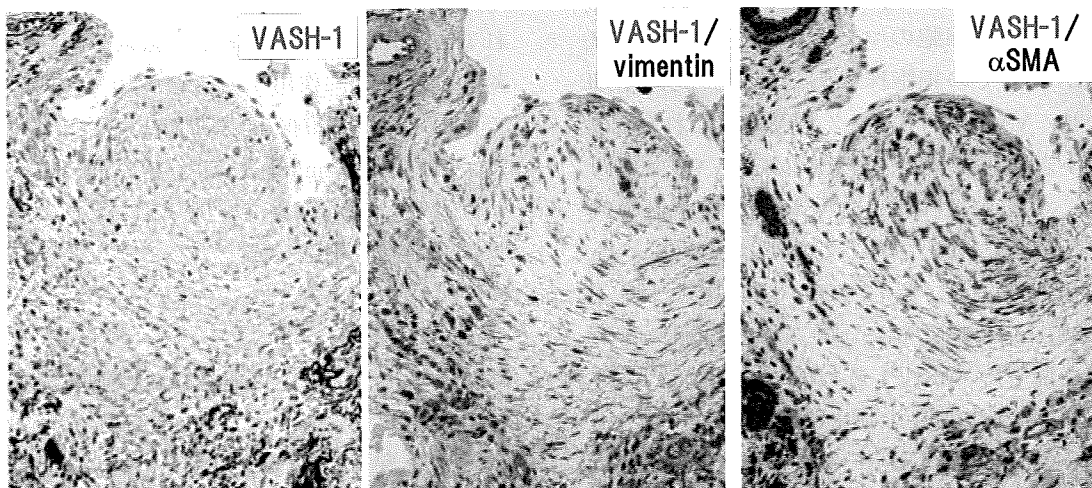


図2：IPF患者肺内線維化病変におけるVASH-1発現  
IPF患者の筋線維芽細胞巢におけるVASH-1の発現は筋線維芽細胞に認める。(X400)

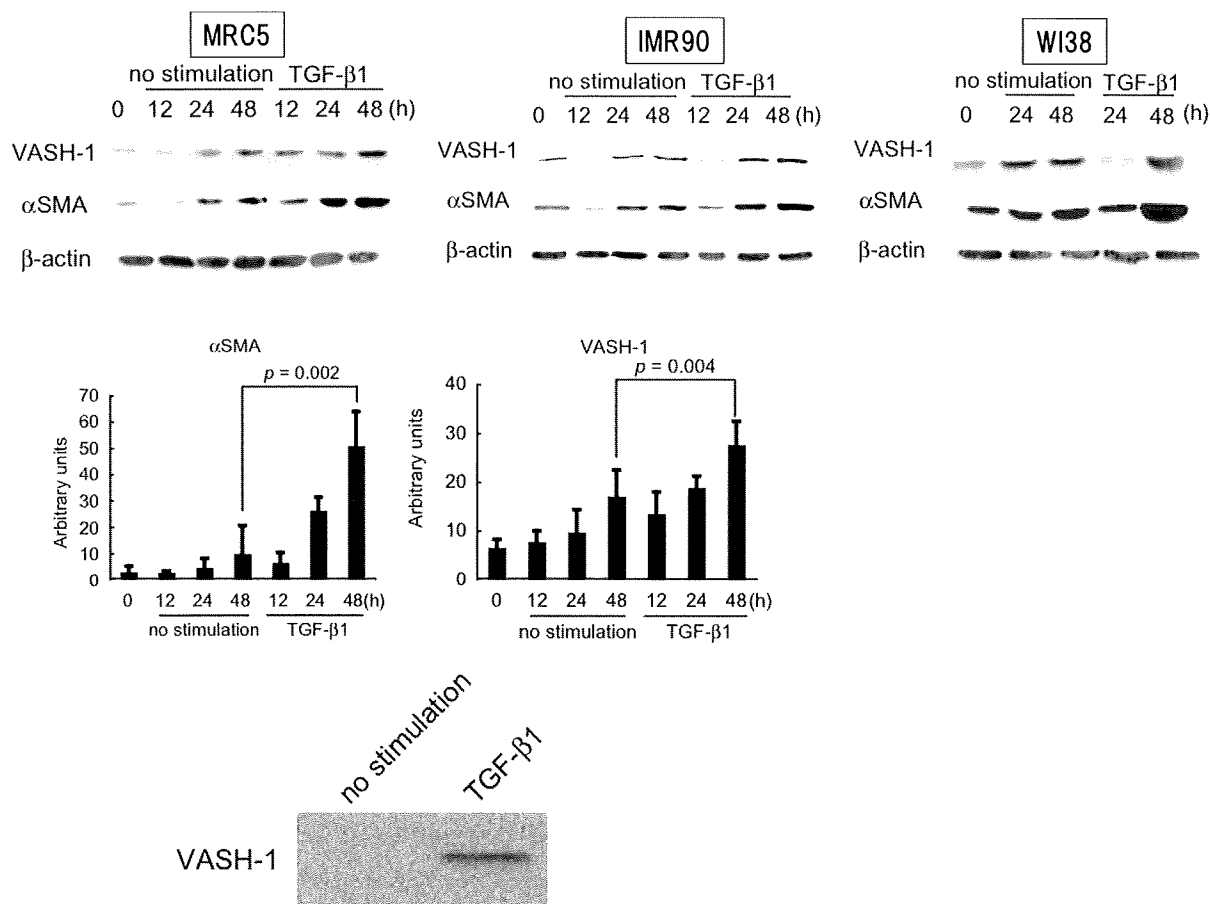


図3：ヒト肺線維芽細胞へのTGF-β1刺激によりVASH-1が誘導。

培養ヒト肺線維芽細胞にTGF-β1を添加した後、MRC細胞、IMR-90細胞、WI38細胞の各時間でのVASH-1、αSMAタンパク発現量をウェスタンブロッティング法で検出した。MRC細胞におけるVASH-1タンパク発現量とαSMAタンパク発現量を定量化したものをグラフで示した。データは少なくとも3回施行したうちの典型的なものを示した。さらにMRC5細胞にTGF-β1を添加した後48時間後の培養上清を採取し、濃縮後VASH-1タンパク発現量をウェスタンブロッティング法で検出したものを示す。

ンブロットによって検討した。その結果、定常状態ではこれらの線維芽細胞株ではVASH-1の発現は極少量であったが、TGF-β1 (5 ng/ml) にて48時間刺激後、筋線維芽細胞のマーカーであるαSMAタンパク量がすべての細胞株において経時的に増加するにつれ、VASH-1タンパク発現量はこれら3種の培養ヒト線維芽細胞株のいずれにおいても経時的に有意に増加した(図3)。VASH-1は従来血管内皮細胞から産生・分泌されることが知られているが、線維芽細胞においてもTGF-β1刺激下で産生されたVASH-1が細胞外に分泌される可能性を考え、培養上清中のVASH-1タンパク量を確認した。TGF-β1刺激前では培養上清中にVASH-1タンパクは検出できなかったが、TGF-β1刺激後、培養上清中にVASH-1タンパクが出現した(図3)。これにより線維芽細胞は、筋線維芽細胞株への分化に伴って

VASH-1タンパク産生が増加し、細胞外に分泌していることが示された。線維芽細胞から筋線維芽細胞への分化の主要な因子はTGF-β1であることが知られているが、PDGFもまた筋線維芽細胞への分化に対して促進的に作用することが知られている。そこで、PDGFによる線維芽細胞の分化について検討した。PDGF (10 ng/ml) 添加後48時間後にαSMAタンパクの発現量が有意に増加しており、TGF-β1と同様に筋線維芽細胞へ分化することを確認したが、同時にVASH-1タンパク量も有意差をもって増加した(図4)。

#### VASH-1ノックダウン細胞における筋線維芽細胞分化の検討

筋線維芽細胞への分化に対するVASH-1の影響を検討するために、RNA干渉によってVASH-1遺伝子発現を抑制した。対照RNA(scrRNA)を導入し

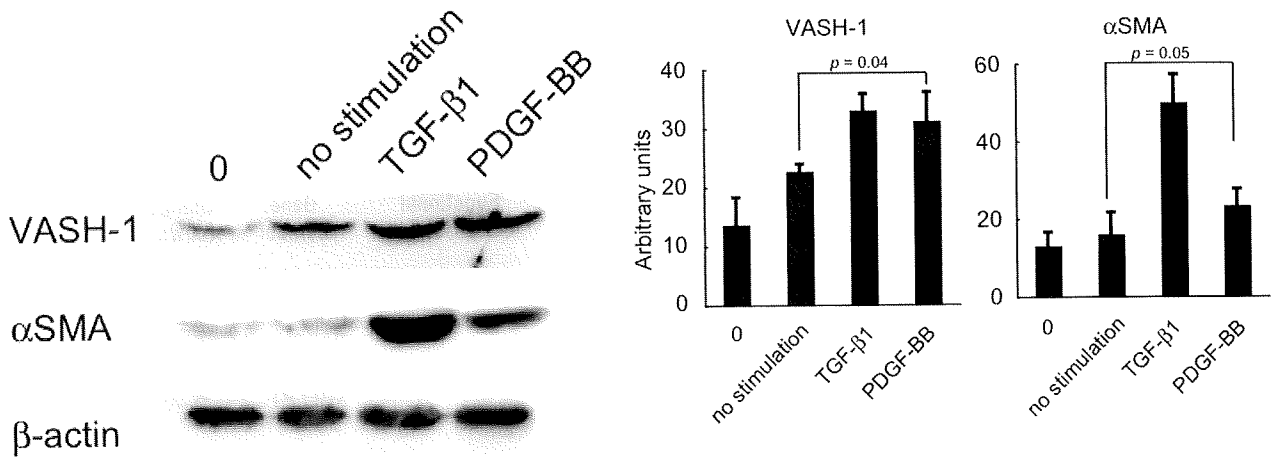


図4：PDGF-BB刺激によりVASH-1が発現。  
MRC5細胞にTGF-β1ないしPDGF-BBを添加後48時間後のαSMA，VASH-1発現量をウエスタンブロッティング法にて検出した。VASH-1発現量とαSMA発現量を定量化しグラフで示した。

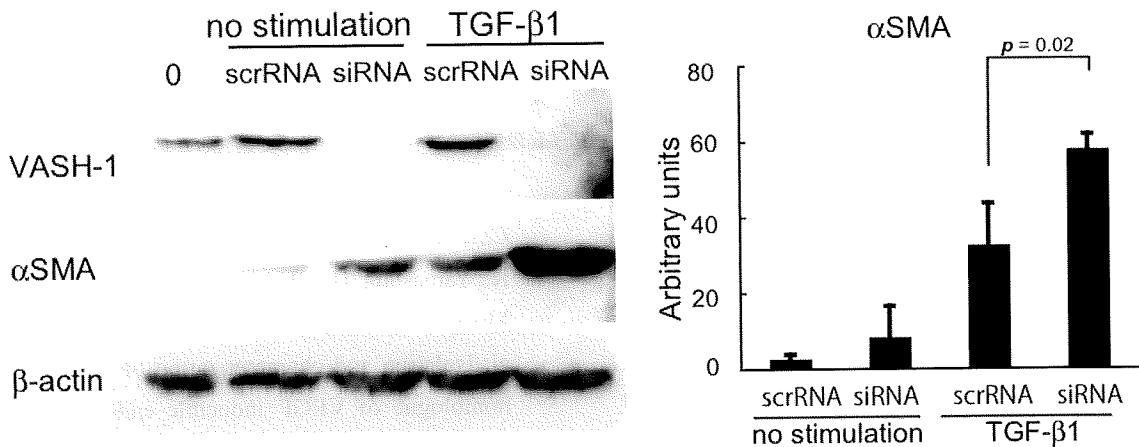


図5：VASH-1ノックダウンによりαSMAの発現が増大。  
MRC5細胞にsiRNAを用いてVASH-1のノックダウンを行った後、24時間後にTGF-β1を添加し、48時間後の細胞中のVASH-1αSMA発現量をウエスタンブロッティング法にて示した。さらにαSMAタンパク量を定量化しグラフに示した。VASH-1 siRNAのコントロールとしてはスクランブル配列を使用した。

たMRC5細胞では、これまでの結果と同様にTGF-β1刺激下においてαSMAが有意に増加していることを確認した。VASH-1遺伝子発現を抑制した線維芽細胞ではTGF-β1刺激によりαSMAタンパク発現量が著明に増加していた(図5)。これらの結果、VASH-1は筋線維芽細胞への分化を抑制している可能性が示唆された。

次にVASH-1の機能をより詳細に解析するために、VASH-1をノックダウンしたMRC5細胞について遺伝子レベルでの網羅的解析を行った。定常状態のMRC5細胞でRNA干渉によってVASH-1をノックダウンした場合、複数の血管新生の促進、抑制因子双方の遺伝子発現に有意な増加がみられた。肺の

線維化に関与し筋線維芽細胞自身も産生するサイトカインIL-6、I型およびIII型コラーゲン、ファイブロネクチンの発現の増加がみられた。血管新生との関連では、Notchのリガンドであり血管新生に対して抑制的に働くDLL4の遺伝子の発現が低下していた。次にVASH-1をノックダウンしたMRC5細胞にTGF-β1を加えて48時間後の段階での細胞をマイクロアレイで解析したところ(図6)、IL-6、I型およびIII型コラーゲンの発現も同様に増加していた。また逆に線維化抑制作用のあるHGF(5)がVASH-1をブロックすることで減少していた。以上のことからVASH-1が筋線維芽細胞において線維化抑制作用を持つことが示唆された。

## VASH-1ノックダウン+TGFβ1で増減する遺伝子

VASH-1 siRNAを導入したMRC-5細胞 + TGF-β1 (5ng/ml)			vs	scrRNAを導入したMRC-5細胞 + TGF-β1 (5ng/ml)		
UP				DOWN		
Functional classification	Gene symbol	Fold change (up)		Functional classification	Gene symbol	Fold change (down)
Fibrosis	FGF1	8.61		Fibrosis	FLRT3	3.35
	FGF2	5.89			HGF	2.27
	ITGAV	5.38			NAB2	2.21
	IGFBP3	57.75			CSF1	2.80
	IL1A	119.89			KGFLP1	5.30
	IL6	38.16				
	IL8	266.43				
	IL11	8.45				
	ICAM1	2.39				
	NCAM2	6.82				
	VCAM1	11.01				
	COL1A1	7.26				
	COL1A2	3.00				
	COL3A1	2.03				
	CSPG4	2.64				
	PRG4	4.98				
	FN1	2.97				

図6：VASH-1ノックダウン後のTGF-β1による遺伝子発現変化をマイクロアレイにて検討した結果を示す

### 結 語

VASH-1は線維化肺における血管新生の抑制に関与するとともに、筋線維芽細胞の調節にも関与し、結果としてIPFの病態の進行に関わる新たな可能性が示唆された。今後はVASH-1の肺線維化抑制機能を利用した新たな治療法の確立が期待される。

### 文 献

- 1) Ebina, M., Shimizukawa, M., Shibata, N., Kimura, Y., Suzuki, T., Endo, M., Sasano, H., Kondo, T., and Nukiwa, T. Heterogeneous increase in CD34-positive alveolar capillaries in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 169:1203-1208, 2004.
- 2) Watanabe, K., Hasegawa, Y., Yamashita, H., Shimizu, K., Ding, Y., Abe, M., Ohta, H., Imagawa, K., Hojo, K., Maki, H., et al. Vasohibin as an endothelium-derived negative feedback regulator of angiogenesis. *J*

*Clin Invest* 114:898-907, 2004. Shibuya, T., Watanabe, K., Yamashita, H., Shimizu, K., Miyashita, H., Abe, M., Moriya, T., Ohta, H., Sonoda, H., Shimosegawa, T., et al. Isolation and characterization of vasohibin-2 as a homologue of VEGF-inducible endothelium-derived angiogenesis inhibitor vasohibin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1051-1057, 2006..

- 3) Kimura, H., Miyashita, H., Suzuki, Y., Kobayashi, M., Watanabe, K., Sonoda, H., Ohta, H., Fujiwara, T., Shimosegawa, T., and Sato, Y. 2009. Distinctive localization and opposed roles of vasohibin-1 and vasohibin-2 in the regulation of angiogenesis. *Blood* 2009.
- 4) Watanabe M, Ebina M, Nakamura A, Koinuma D, Akiyama K, Maemondo M, Okouchi S, Ota H, Kubota K, Orson FM, Matsumoto K, Nakamura T, and Nukiwa T. Hepatocyte growth factor gene transfer to alveolar septa efficiently prevents lung injury by bleomycin. *Mol Therapy* 12:58-67, 2005.

# 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機序

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機序を検討した。

【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、気管支肺胞洗浄液(BALF)および肺組織中の好中球エラスターゼ活性はシベレスタットで有意に抑制されていた。その動物モデルにおいてブレオマイシン投与後のBALF中の炎症細胞増加はシベレスタットで抑制され、その時の組織学的線維化と肺組織コラーゲン量の増加も有意に抑制されていた。BALFおよび肺組織中の活性型transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 値とphospho-Smad2値の増加は、シベレスタットで有意に抑制された。しかし、total TGF- $\beta$ 値とTGF- $\beta$ のmRNA発現の増加は抑制されず、シベレスタットはTGF- $\beta$ の活性化を抑制すると考えられた。

【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- $\beta$ の活性化抑制作用が関与すると考えられた。

## Anti-fibrotic mechanisms of neutrophil elastase inhibitor in mice

Akihiro Takemasa, 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 BML instillation.

RESULTS: Neutrophil elastase activity was significantly were attenuated in both BALF and homogenized lungs of sivelestat-treated mice at Day 7 and 14 after bleomycin instillation. Lung collagen content and pathological fibrosis findings in sivelestat-treated mice were attenuated at Day 7 and 14 in this animal model. Increased white blood cells in BALF were also attenuated. Active form of transforming growth factor (TGF)- $\beta$  levels in BALF and homogenized lungs were significantly decreased in sivelestat-treated mice at Day 7 and 14. Phospho-Smad2 levels in homogenized lungs demonstrated significantly low levels in sivelestat-treated mice at Day 7 and 14. However, total TGF- $\beta$  levels were not significantly altered.

CONCLUSION: These results suggested that NE inhibitor, sivelestat, ameliorated bleomycin-induced lung fibrosis through the inhibition of TGF- $\beta$  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<sup>1)</sup>。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肺組織像とその線維化に関する Aschcroft

score 比較, ②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, ③Sircol collagen assay(Biocolour)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, ⑤ELISA 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, ⑥real-time PCR(Forward primer; 5'-CGGGGCGACCTGGGCACC ATCCATGAC-3' , reverse primer; 5'-CTGCTCCACCTT GGGCTTGCACCCAC-3' )を用いた肺組織におけるTGF-βのmRNA発現量, ⑦Phospho-Smad2 (Ser465/467) sandwich ELISA kit (Cell signaling) を用いた肺組織中の phospho-Smad2 の比較である。

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

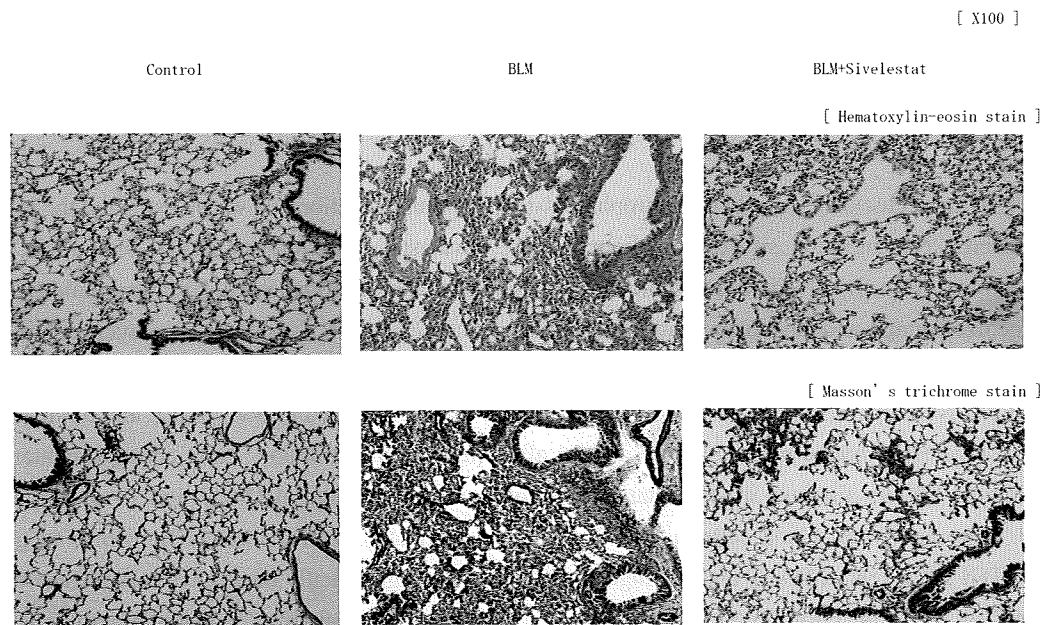


Figure 1. Histology Day 14

の炎症反応と線維化を有意に抑制した。

2. 組織所見の pathological Fibrosis Score(Figure 2)

Aschcroft score を用いてBLM投与後14日における線維化を比較した。シベレスタットは、BLM投与後14日において肺の炎症反応と線維化を有意に抑制した。

3. Sircol collagen assayによる肺コラーゲンの定量的比較(Figure 3)

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。

4. BALF中の白血球数と分画(Figure 4)

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

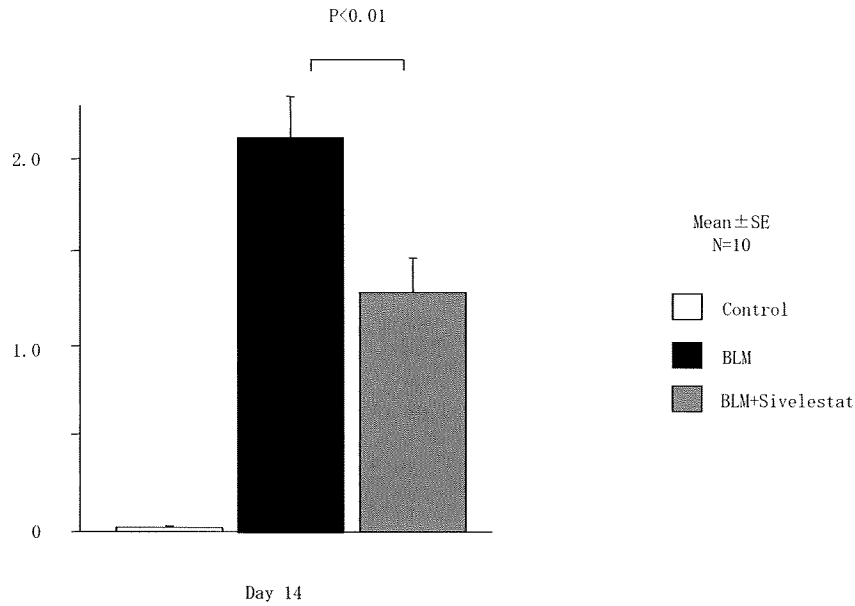


Figure 2. Pathological Fibrosis Score (Aschcroft) Day 14

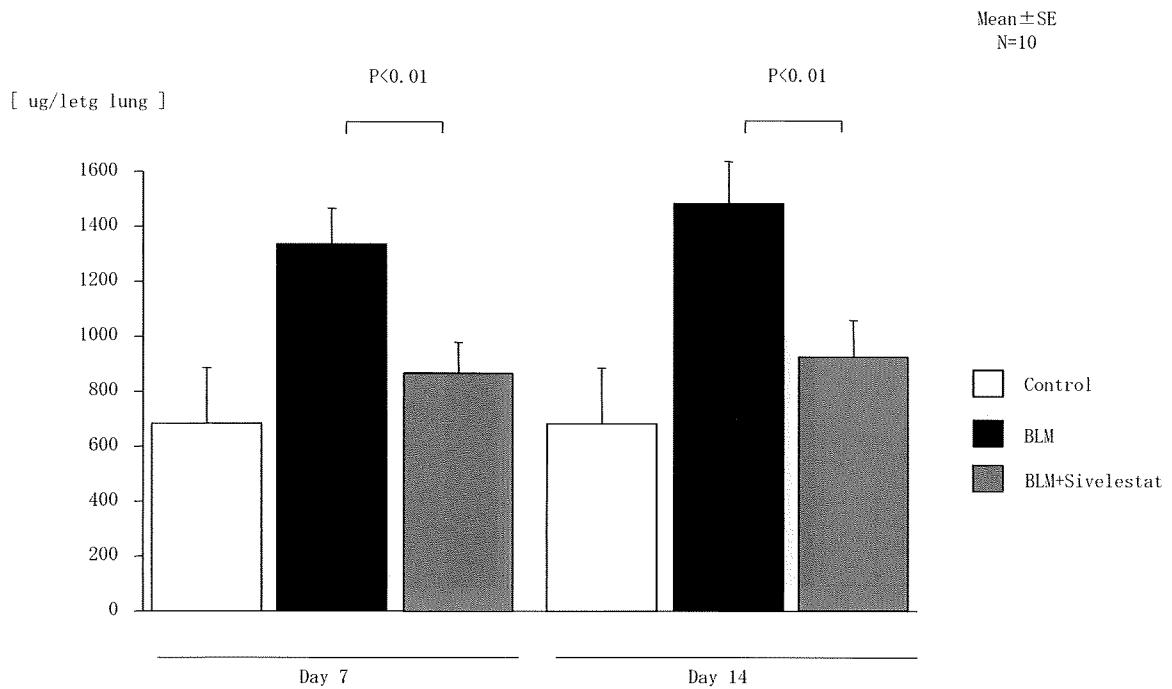


Figure 3. Collagen content



に抑制された。

5. BALFおよび肺組織中の好中球エラスターゼ活性 (Figure 5)

BLM投与後7日目および14日目にBALFおよび肺組織中の好中球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。

6. BALFおよび肺組織中の活性型および総TGF-β量 (Figure 6)

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

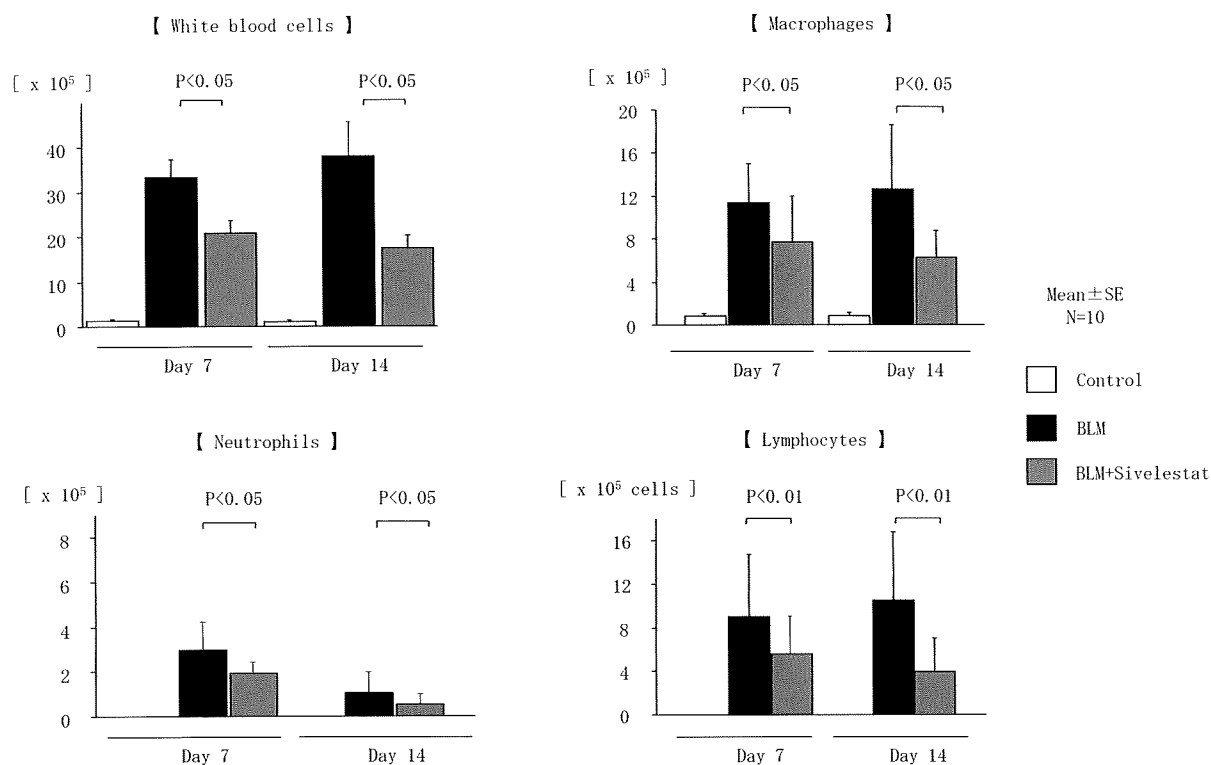


Figure 4. White blood cells and cell differentiation in BALF

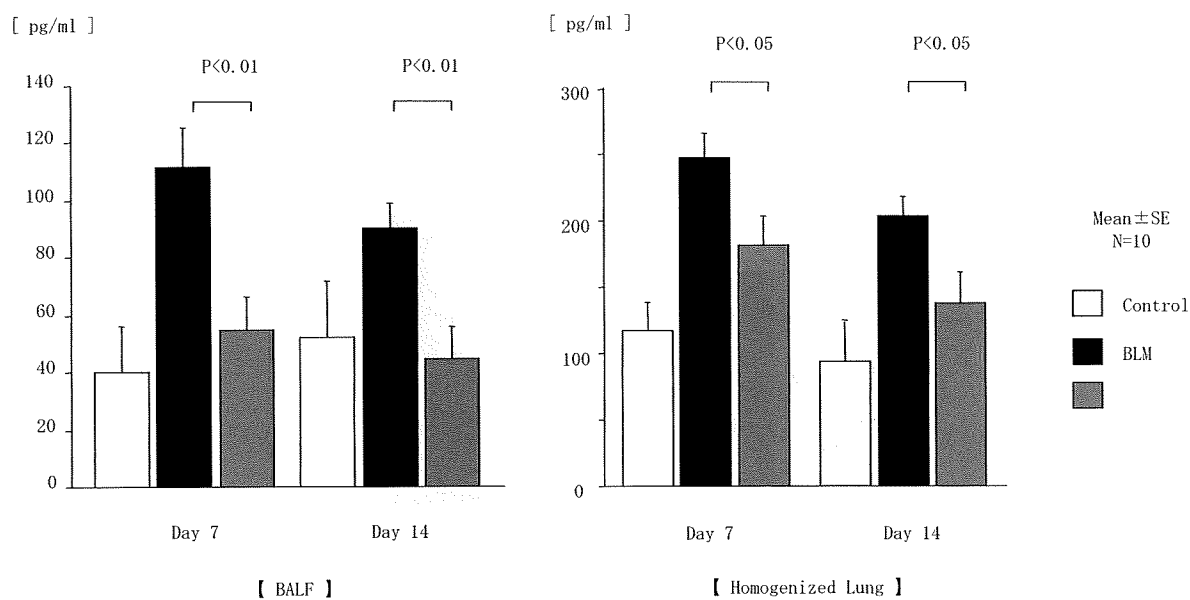


Figure 5. Neutrophil Elastase Immunocapture Activity Assay (BALF)

る TGF- $\beta$  値の変化は BALF における変化と同様で、活性型 TGF- $\beta$  値の増加は投与後 7 日目および 14 日目で有意に抑制された。しかし、total TGF- $\beta$  値の増加は抑制されなかった。

7. 肺組織中の TGF- $\beta$  の mRNA 発現 (Figure 7)

肺組織中の TGF- $\beta$  の mRNA 発現を real-time PCR

で評価したところ、BLM 投与後 7 日目および 14 日目ともに BLM で増強された TGF- $\beta$  の mRNA 発現はシベレスタットで抑制されなかった。

8. 肺組織中の Phospho-Smad2 の比較 (Figure 8)

TGF- $\beta$  の細胞内シグナル伝達因子である Phospho-Smad2 を ELISA を用いて比較した。BLM 投与後

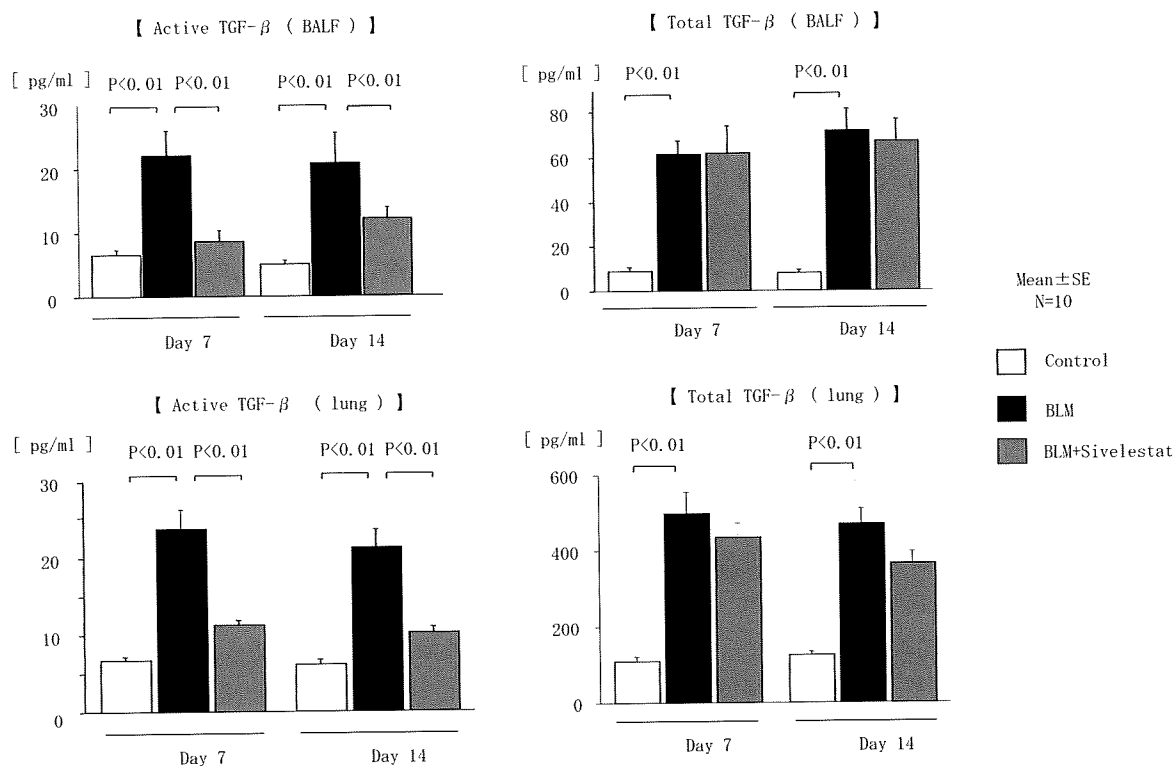


Figure 6. Active and total TGF- $\beta$  in BALF and lung homogenized sample

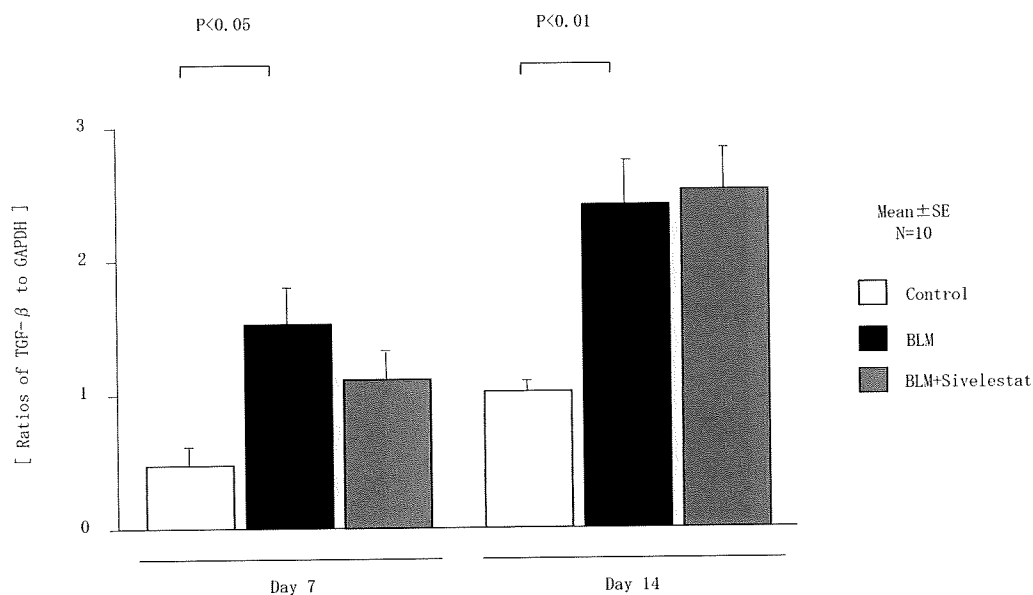


Figure 7. TGF- $\beta$  real-time PCR in lung homogenized sample

7日目および14日目の肺組織において、Phospho-Smad2はシベレスタットで有意に抑制された。

**【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<sup>2),3)</sup>。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<sup>2)</sup>、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<sup>1)</sup>、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<sup>1)</sup>。

今回のNE阻害薬を用いた実験において、BALFおよび肺組織中で好中球エラスターゼ活性は有意に抑制されていた(Figure 5)。それを確認した上で、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。さらに、TGF-βの細胞内シグナル伝達因子である Phospho-Smad2は、シベレスタット投与により肺組織中で有意に抑制されていた。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(Figure 9)。

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<sup>4)</sup>、放射線照射<sup>5)</sup>、pH<sup>6)</sup>、活性酸素種<sup>6)</sup>、αvβ6インテグリンによる立体構造変化<sup>6),7)</sup>、インターロイキン-13<sup>8)</sup>、thrombospondin-1<sup>9)</sup>、CD44抗原<sup>10)</sup>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<sup>1)</sup>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用しうると考えられ、治療上の有効性が期待される。

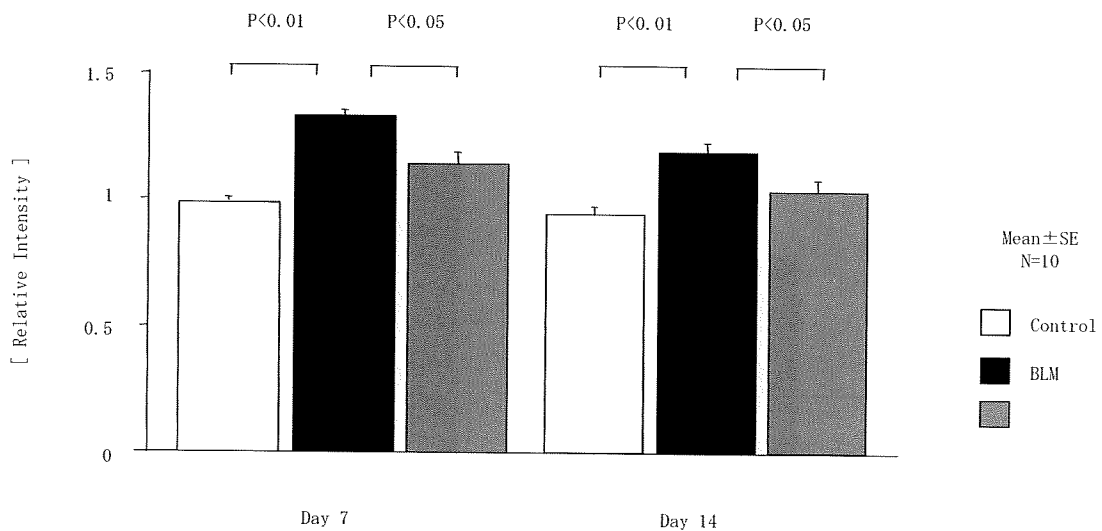


Figure 8. Phospho-Smad2 (Ser465/467) (Homogenized Lung)

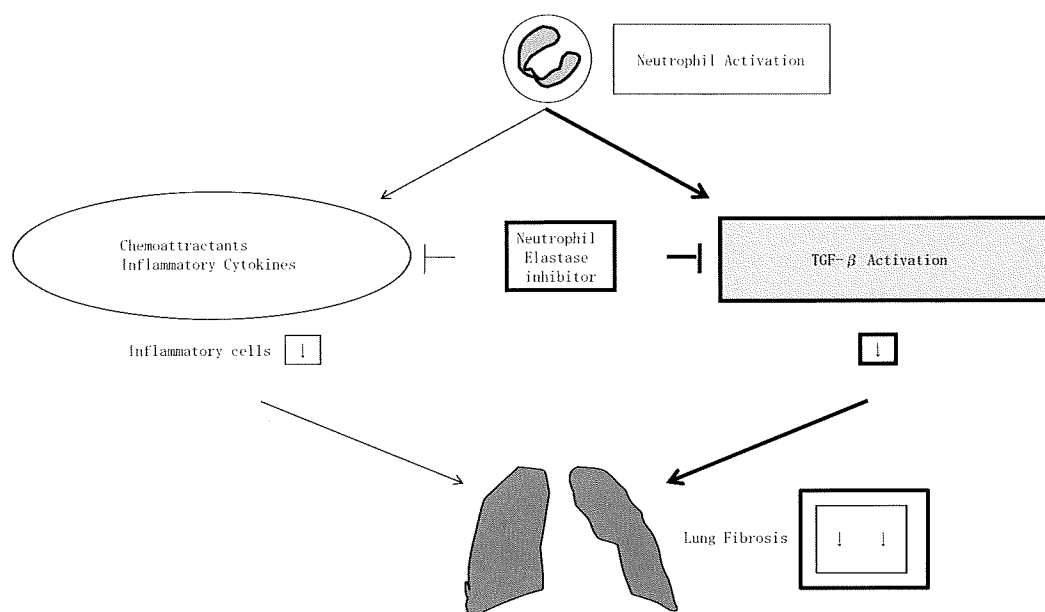


Figure 9. Anti-fibrotic mechanisms of neutrophil elastase inhibitor

## 【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 αvβ6 binds and activates latent TGFβ1: 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-beta1 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 beta(1). *J Exp Med* 2001; 194: 809-82.

## B. サルコイドーシス

# サルコイドーシスにおける syndecan-4 の役割

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

Syndecan は細胞表面に発現しているヘパラン硫酸プロテオグリカンのひとつで、炎症や組織の修復に重要な役割を果たしている。これまで我々は、syndecan-4 が特発性肺線維症 (IPF) において上皮細胞やマクロファージに強く発現し、気管支肺胞洗浄 (BAL) 液中で増加していることを報告したが、syndecan-4 のその他の肺疾患における役割についてはまだよく知られていない。そこで、サルコイドーシス患者の血清・気管支肺胞洗浄 (BAL) 液中の syndecan-4 を測定し、健常者、IPF 患者と比較。次に、サルコイドーシス肺組織における syndecan-4 の発現を免疫組織学的に検討。更に、サルコイドーシスにおける血液中パラメーター、呼吸機能検査値との関連を比較し、最後にサルコイドーシス患者診断における血清 syndecan-4 濃度の有用性について検討した。Syndecan-4 は、BAL 液中では健常者より高値であったが、IPF 患者とは差が認められず、一方血清では健常者、IPF 患者より高値を示した。また、サルコイドーシス肺組織では、肉芽腫周囲の細胞に強く発現し、肺胞内の単核球と肉芽腫自体にも発現がみられ、血清 syndecan-4 濃度は血清 ACE 濃度を正の相関関係を認めた。更に、血清 syndecan-4 濃度は 27.6ng/ml を cut off とすると感度 94.7%、特異度 100% でサルコイドーシスを非サルコイドーシス (健常者と IPF 患者) と区別できた。以上の結果より、syndecan-4 はサルコイドーシスにおいて肺における肉芽腫形成に関与し、血清 syndecan-4 の測定はサルコイドーシス診断に有用であると考えられる。

## Role of Syndecan-4 in Sarcoidosis

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

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

**Background:** Syndecan-4 (Sdn-4) is a transmembrane heparan sulfate proteoglycan which is expressed in a variety of cells such as B lineage lymphocyte and neutrophils. Heparan sulfate glycosaminoglycan side chains of Sdn-4 have been reported to bind to several proteins such as growth factors and cytokines suggesting to have various biological roles. Sdn-4 exists as soluble forms by shedding as well as on cell surfaces. We have previously demonstrated that Sdn-4 is upregulated in bronchial epithelial cells and alveolar macrophages, and increased in BAL fluid (BALF) from patients with IPF. Our goal was to clarify the role of Sdn-4 in sarcoidosis.

**Methods:** The concentrations of Sdn-4 in serum and BALF of patients with sarcoidosis (n=24), IPF (n=26) and healthy subjects (n=32) were measured, and compared to several clinical parameters in patients with sarcoidosis. Immunohistochemical analysis for Sdn-4 was performed using lung tissues obtained by transbronchial lung biopsy from patients with sarcoidosis.

**Results:** The serum concentration of Sdn-4 was significantly higher in patients with sarcoidosis than in patients with IPF and controls. Serum levels of Sdn-4 significantly correlated with ACE, not with ESR and soluble IL-2 receptor in patients with sarcoidosis. In BALF, the concentration of Sdn-4 was higher in patients with both sarcoidosis and IPF than controls. The strong staining of Sdn-4 was evident in cells surrounding granulomas and mononuclear cells, and the expression was also seen in granulomas. In ROC curve analyses to distinguish patients with sarcoidosis from others (healthy subjects and patients with other lung diseases), serum Sdn-4 gave a great area under the curve (AUC 0.99). When 27.6 ng/ml of serum Sdn-4 was used as a cut off value, the sensitivity and specificity were 94.7 and 100%, respectively.

**Conclusions:** These findings suggest that Sdn-4 plays an important role in the sarcoidosis lungs, and the serum level of Sdn-4 may be clinically useful as a biomarker for sarcoidosis.

## はじめに

Syndecanは細胞表面に発現しているヘパラン硫酸プロテオグリカンのひとつで、ヒトではsyndecan-1から-4の4つのisoformがあり、そのisoformにより発現細胞が異なり、syndecan-1は上皮細胞、syndecan-2は線維芽細胞と血管内皮細胞、syndecan-3は神経細胞、syndecan-4は種々の細胞に発現していると報告されている<sup>1)</sup>。これまで、我々は特発性肺線維症 (IPF) においてsyndecan-4が上皮細胞や肺泡マクロファージに強く発現していることを報告し<sup>2)</sup>、syndecan-4が間質性肺炎の病態に関与していることを示した。Syndecanなどのプロテオグリカンは細胞外マトリックスの構成成分であるが、近年、組織の構造を維持する単なるglue(接着剤)ではなく、肺の発生や炎症、組織の修復過程に重要な役割を担っていることが報告され、我々は肺においてchemokineとプロテオグリカンの結合が肺への好中球に重要な役割を果たしていることを報告し<sup>3)</sup>、肺の炎症におけるプロテオグリカンの重要性が示された。

本研究においては、syndecan-4のサルコイドーシスにおける役割を検討するために、血清・BAL液を用い健康者、IPF患者と比較。次に、サルコイドーシス肺でのsyndecan-4の発現を検討し、更にサルコ

イドーシスにおける臨床パラメーターと比較検討した。

## 方 法

当科に入院したサルコイドーシス、IPF患者の血清とBAL液中syndecan-4濃度を測定し、健康者と比較した (Table)。次に、サルコイドーシス患者からの経気管支肺生検 (TBLB) と上部消化管内視鏡下吸引リンパ節生検によって得られた肺組織、縦隔リンパ節におけるsyndecan-4の発現を免疫組織学的に検討。更にサルコイドーシス患者の血清syndecan-4濃度と血液中パラメーター、呼吸機能検査値との関連を比較検討した。最後に、サルコイドーシスにおける血清syndecan-4濃度を非サルコイドーシス(健康者とIPF患者)と比較し、血清syndecan-4濃度のサルコイドーシス診断への有用性を検討した。

## 結 果

Syndecan-4は、BAL液中では健康者より高値を示したが、IPF患者とは差がみられなかった。一方、血清では健康者、IPF患者よりも高値を示した (Figure 1)。サルコイドーシス肺組織と縦隔リンパ節における免疫組織学的検討ではsyndecan-4は肉芽

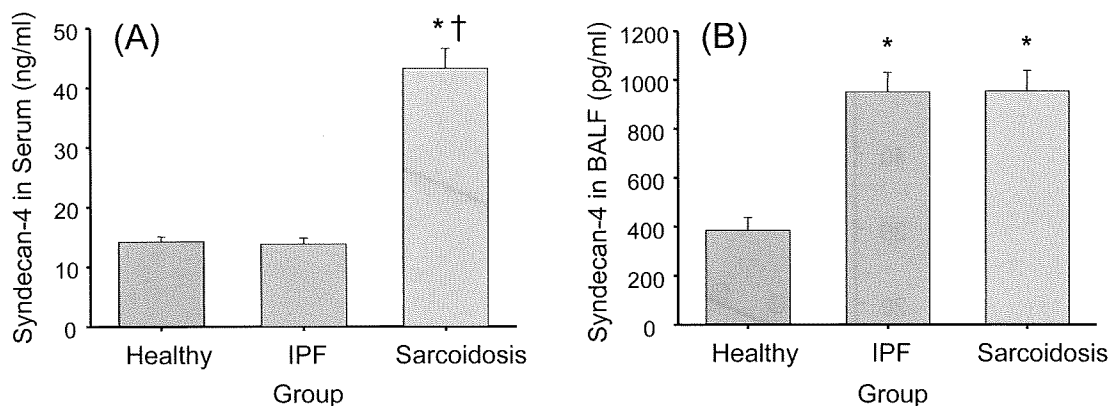
Table. Clinical Characteristics of Healthy Volunteers and Patients with Sarcoidosis and IPF

	Healthy Volunteer	Sarcoidosis	IPF	P value
Subjects (n)	31	22	25	
Age (yrs)	56.8 ± 1.6	54.8 ± 4.1	66.2 ± 1.6	p < 0.05
Gender (M/F)	18/13	6/18	21/4	p < 0.05
WBC (/μL)	N/A	5581 ± 369	7565 ± 308	p < 0.05
CRP (mg/dl)	N/A	0.2 ± 0.2	0.3 ± 0.0	NS
ACE (U/L)	N/A	28.0 ± 3.1	N/A	
sIL-2R (U/ml)	N/A	1128 ± 177	N/A	

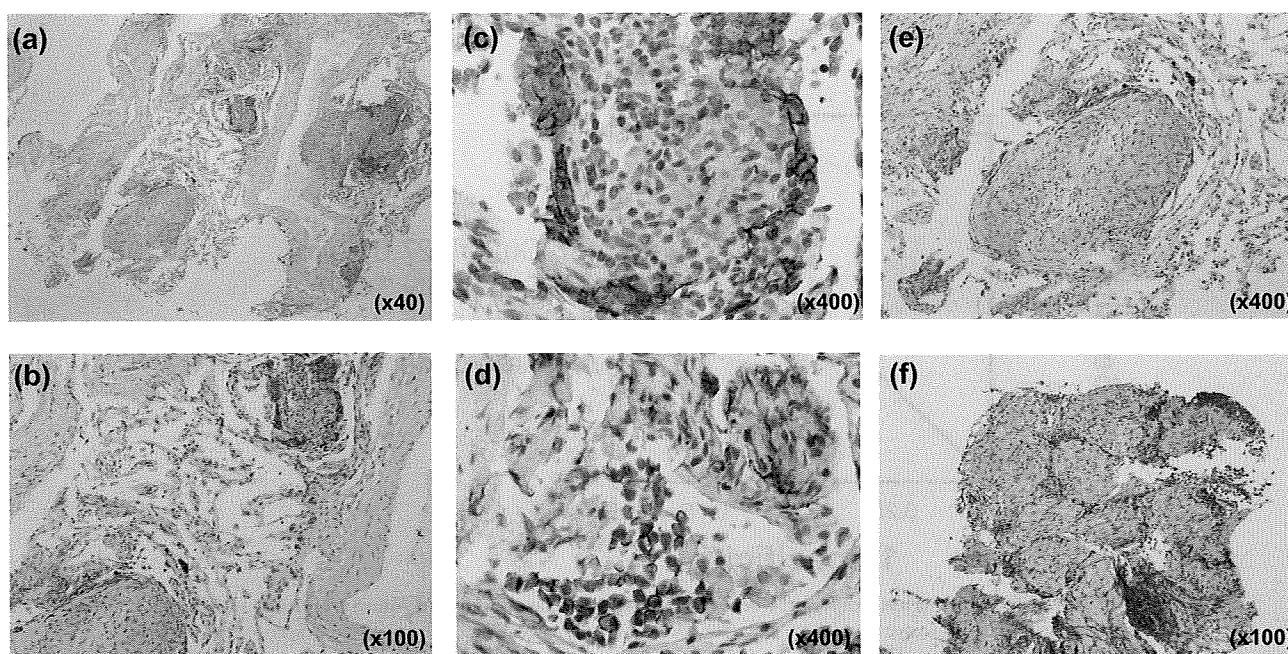
(Mean±SEM)

福島県立医科大学呼吸器内科

\* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究分担者



**Figure 1: Syndecan-4 in Serum and BAL Fluid in Healthy Volunteers and Patients with Sarcoidosis and IPF.** (A) Syndecan-4 in serum was significantly higher in patients with Sarcoidosis than healthy volunteers (Healthy) and IPF. (B) Syndecan-4 in BAL fluid was significantly higher in patients with Sarcoidosis than Healthy. There was no difference in syndecan-4 in BAL fluid between IPF and Sarcoidosis. \*  $p < 0.05$  vs Healthy. †  $p < 0.05$  vs IPF. Mean  $\pm$  SEM



**Figure 2: Immunohistochemistry for Syndecan-4 in Lung Tissues and Mediastinal Lymph Nodes.** (a-e): Lung tissues obtained by TBLB. (f) Mediastinal Lymph nodes obtained by endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration. The strong staining of syndecan-4 was seen in cells surrounding granulomas and mononuclear cells (a-d). Syndecan-4 was also expressed in granulomas (e,f).

腫周囲の細胞に強く発現し、肺胞内の単核球と肉芽腫自体にも発現がみられた (Figure 2)。また、血清 syndecan-4 濃度は血清 ACE 濃度を正の相関関係を認めた (Figure 3) が、BAL 液中 syndecan-4 濃度やその他の血中パラメーター、呼吸機能検査値との関連は認められなかった。更に、血清 syndecan-4 濃度は 27.6ng/ml を cut off とすると感度 94.7%、特異度 100% でサルコイドーシスを非サルコイドーシス (健康者と IPF 患者) を区別することができた (Figure 4)。

### 結論と考察

本研究で、我々はヘパラン硫酸プロテオグリカンのひとつである syndecan-4 のサルコイドーシスにおける役割を検討した。Syndecan-4 はサルコイドーシスにおいて血清、BAL 液中で上昇し、肺組織では肉芽腫周囲の細胞や単核球、肉芽腫に発現し、血清 syndecan-4 濃度が血清 ACE 値と正の相関、更に血清 syndecan-4 濃度によりサルコイドーシスと非サルコイドーシスを区別できることを示すことにより、



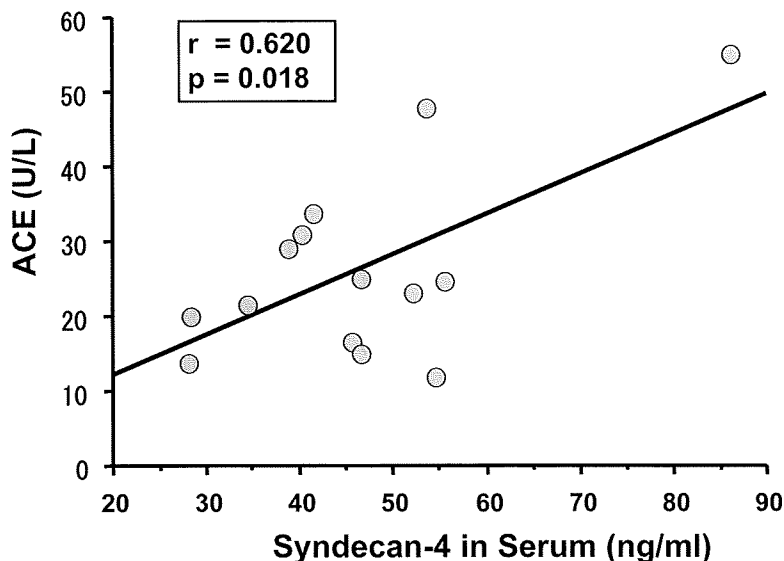


Figure 3: Correlation between Serum Syndecan-4 and ACE. Serum syndecan-4 had positive correlation with serum ACE.

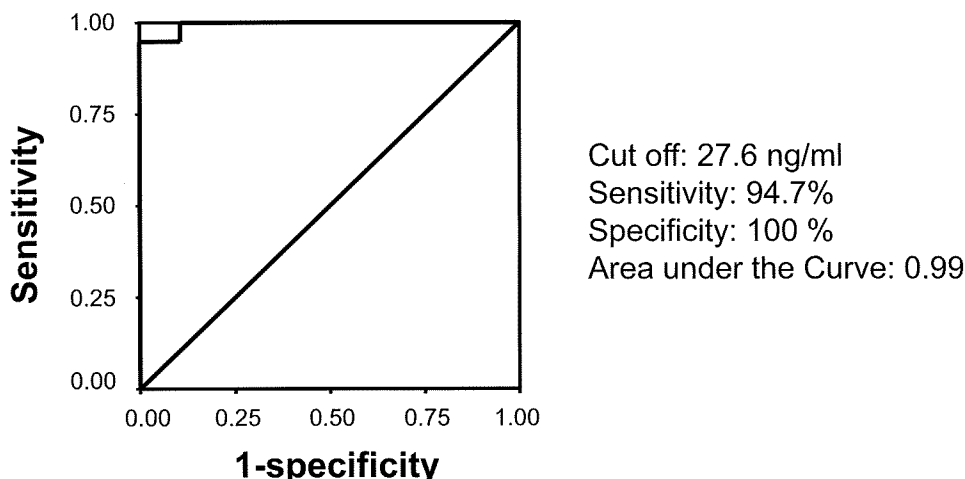


Figure 4: ROC Curve for Serum Syndecan-4 between Patients with Sarcoidosis and Non-Sarcoidosis. In ROC curve analyses of serum syndecan-4 gave a great area under the curve (AUC 0.99). When 27.6 ng/ml of serum syndecan-4 was used as a cut off value, the sensitivity and specificity were 94.7 and 100%, respectively.

サルコイドーシスにおいて syndecan-4 が肺での肉芽腫形成に関与し、血清 syndecan-4 濃度測定がサルコイドーシス診断に有用である可能性を示した。

ヒトの肺疾患におけるプロテオグリカンの発現は、これまでARDS, IPF, サルコイドーシス, 過敏性肺炎において versican と decorin の発現が増加していること<sup>4,5)</sup> が報告されているが、syndecan など他のプロテオグリカンの発現についてはよく知られていない。Syndecan は、細胞表面に存在するヘパラン硫酸プロテオグリカンで syndecan-1 から -4 の4つの isoform が存在し、それぞれ主な発現部位は syndecan-1 は上皮細胞, syndecan-2 は線維芽細胞

と血管内皮細胞, syndecan-3 は神経細胞であり, syndecan-4 は種々の細胞に発現していると報告されている<sup>1)</sup>。Syndecan はコア蛋白とそれに結合するヘパラン硫酸グリコサミノグリカンの側鎖からなるが、MMP などによって shedding をうけ可溶性型でも存在することが知られ<sup>6)</sup>、これら細胞表面や可溶性 syndecan のヘパラン硫酸グリコサミノグリカン側鎖が cytokine や growth factor などのメディエーターと結合することにより、局所でのメディエーター濃度を高めその作用を増強したり<sup>7)</sup>、メディエーターの oligomerization に関与したり<sup>8)</sup>、proteolysis から保護したりすることにより作用を増強する<sup>9)</sup> と考えら

れている。また、syndecan-4はそのコア蛋白を介してPKC $\alpha$ の活性化に関与していると報告され<sup>10)</sup>、コア蛋白自体にも生物学的活性があることも示唆されている。

これまで我々は、プロテオグリカンの側鎖であるグリコサミノグリカンに対する結合性の弱いmutant CXCL8/IL-8をマウスに気管内投与し、肺への好中球遊走におけるchemokineとグリコサミノグリカン結合の役割を検討した。Mutant CXCL8/IL-8はwild type CXCL8/IL8よりもより早く肺内から血中に移行し、マウス肺へより早くより多くの好中球を遊走させたことから、肺への好中球遊走におけるchemokineとグリコサミノグリカン結合の重要性が示された<sup>3)</sup>。これらの結果は、syndecan-4などプロテオグリカンが肺の炎症に重要な役割を果たしていることを示している。

今回、サルコイドーシス患者においてsyndecan-4が血清・BAL液中ともに上昇していたが、IPF患者では血清での上昇は認められなかった。サルコイドーシスは、眼、皮膚など多臓器に病変が存在する全身性疾患であり、病変が肺に限局しているIPFとの違いは興味深い。Syndecan-4は、肺では肉芽腫周囲の細胞や炎症細胞、肉芽腫に発現がみられたが、血清syndecan-4が血清ACEと正の相関関係が認められたことは、syndecan-4は肺のみではなく全身のサルコイドーシス病変に関与し、活動性のマーカーである可能性を示唆している。更に、本研究では血清syndecan-4濃度の測定がサルコイドーシスの診断に有用である可能性も示唆され、今後IPF以外の他の肺疾患を含めた検討による確認が必要と考えられる。

以上の結果から、syndecan-4は、サルコイドーシスにおける肉芽腫の形成に関与し、また血清syndecan-4の測定がサルコイドーシスの診断に有用である可能性が示唆された。今後、サルコイドーシスにおけるsyndecan-4の役割を更に明らかにすることは、サルコイドーシスの病態解明や新たな臨床的マーカーとしての有用性を検討するために重要であると考えられる。

## 参考文献

- 1) Fears CY, Woods A: The role of syndecans in disease and wound healing. *Matrix Biol* 2006; 25:443-56.
- 2) 谷野功典, 王新涛, 佐藤俊, 他: 厚生労働科学研究「特発性肺線維症の予後改善を目指したサイクロスポリン+ステロイド療法ならびにNアセチルシステイン吸入療法に関する臨床研究」班平成19年度研究報告書 2007:125-128.
- 3) Tanino Y, Coombe DR, Gill SE, et al: Kinetics of chemokine-glycosaminoglycan interactions control neutrophil migration into the airspaces of the lungs. *J Immunol* 2010 (In Press).
- 4) Bensadoun ES, Burke AK, Hogg JC, et al: Proteoglycan deposition in pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;154:1819-1828.
- 5) Bensadoun ES, Burke AK, Hogg JC, et al: Proteoglycans in granulomatous lung diseases. *Eur Respir J* 1997;10:2731-2737.
- 6) Fitzgerald ML, Wang Z, Park PW, et al: Shedding of syndecan-1 and -4 ectodomains is regulated by multiple signaling pathways and mediated by a TIMP-3-sensitive metalloproteinase. *J Cell Biol* 2000;148:811-824.
- 7) Nugent MA, Edelman ER: Kinetics of basic fibroblast growth factor binding to its receptor and heparan sulfate proteoglycan: A mechanism for cooperativity. *Biochemistry*. 1992;31:8876-8883.
- 8) Frevert CW, Goodman RB, Kinsella MG, et al: Tissue-specific mechanisms control the retention of IL-8 in lungs and skin. *J Immunol* 2002;168:3550-3556.
- 9) Saksela, O, Moscatelli D, Sommer A, et al: Endothelial cell-derived heparan sulfate binds basic fibroblast growth factor and protects it from proteolytic degradation. *J Cell Biol* 1988;107:743-751.
- 10) Oh ES, Woods A, Couchman JR, et al: Syndecan-4 proteoglycan regulates the distribution and activity of protein kinase C. *J Biol Chem* 1997;272 :8133-8136.

# サルコイドーシスにおける 血清 Cathepsin S 濃度の臨床的意義

山口 悦郎\*

我々は昨年度から transcriptome scan により選び出した血清カテプシン S (CTSS) 濃度の、サルコイドーシスの診断における意義について検討している。今年度はさらに対照疾患を広げて検討した。

対象は健常者29名(年齢範囲20-31歳),サルコイドーシス患者54名(23-84歳)。疾患対照として,特発性間質性肺炎患者19名(UIP, NSIP, OPを含む)(56-86歳),肺癌患者11名(41-79歳),慢性閉塞性肺疾患患者12名(64-78歳),喘息患者22名(23-87歳),塵肺患者150名(54-93歳),肝硬変症患者20名(43-83歳),甲状腺機能亢進症患者19名(20-72歳),肺抗酸菌症患者17名(45-83歳)である。血清CTSS濃度はHuman Cathepsin S Duo Set® (R & D)を用いて,300倍に希釈後測定した。血清ACE活性はACE Color® (Fuji Rebio)を用いて測定した。

血清CTSS濃度は,健常者と比較して今回新たに追加した塵肺,肝硬変症,甲状腺機能亢進症,肺抗酸菌症で上昇していた。サルコイドーシスでは,それら4疾患の内,肝硬変症を除く疾患対照より血清CTSS濃度は有意に高値であった。サルコイドーシスと塵肺の鑑別に関して,ROC解析では曲線下面積は0.869と十分に高値であり,CTSS濃度72ng/mlにおける感度は78%,特異度は79%であった。

血清ACE活性は健常者と比較して,肝硬変症と甲状腺機能亢進症で上昇していた。サルコイドーシスと塵肺の鑑別に関して,CTSS同様にROCカーブによる解析を行うと,曲線下面積は0.697で,CTSS濃度より有意に低かった( $p<0.05$ )。ACE活性13.9 IU/l 37°Cにおける感度は68%,特異度は69%とやや低値であった。血清CTSS濃度と血清ACE活性は,健常者と全患者を含めると全体として有意な相関を示した( $\rho=0.371, p<0.0001$ )。しかしその相関係数はさほど高値ではなく,両者が高い領域では分布が拡散する様相を示した。

以上より血清CTSS濃度は,疾患特異性は高くはないが疾患によってはACEより高い鑑別能を有する有用なマーカーと言える。

## The role of serum cathepsin S levels in sarcoidosis

Etsuro Yamaguchi

*Division of Respiratory Medicine and Allergology, Department of Medicine, Aichi Medical University School of Medicine*

We have been assessing the significance of serum levels of cathepsin-S (CTSS) selected by the transcriptome scan from the previous year. We added disease controls in this year.

The study subjects included 29 healthy volunteers and 54 patients with sarcoidosis. Other disease controls were 19 patients with idiopathic interstitial pneumonia (IPs) (including UIP, NSIP, and OP), 11 with lung cancer, 12 with chronic obstructive lung disease, 22 with bronchial asthma, 150 with pneumoconiosis, 20 with liver cirrhosis, 19 with hyperthyroidism, and 17 with pulmonary mycobacteriosis. Serum levels of CTSS were measured using an ELISA kit (Human Cathepsin S Duo Set<sup>®</sup>, R & D Systems) after diluting sera 300 fold.

Serum levels of CTSS in pneumoconiosis, hyperthyroidism, liver cirrhosis, and pulmonary mycobacteriosis which were added to this year's study were all significantly increased compared with those in healthy controls. The levels in sarcoidosis were significantly higher than those in newly-added disease control groups except for liver cirrhosis. Regarding the differential diagnosis of sarcoidosis and pneumoconiosis by the receiver operating characteristics (ROC) curve, the area under the curve (AUC) was enough large (0.869). The sensitivity and specificity of serum CTSS levels for discriminating sarcoidosis patients from patients with pneumoconiosis were 78% and 79% at a CTSS level of 72 ng/ml, respectively.

Serum ACE activities in liver cirrhosis and hyperthyroidism were significantly increased compared with those in healthy controls. As in the case of serum CTSS levels, ROC curve was used for the differential diagnosis of sarcoidosis and pneumoconiosis. AUC was 0.697, and was significantly lower than that for CTSS. The sensitivity and specificity of serum ACE activities for discriminating sarcoidosis from pneumoconiosis were 68% and 69%, respectively, at a ACE activity of 13.9 IU/l 37°C. Serum CTSS levels and ACE activities significantly correlated in healthy controls and patients with all the disease controls studied ( $p=0.371$ ,  $p<0.0001$ ), but the correlation coefficient was not large enough; the distribution of the two markers widely scattered at their high levels.

These results indicate that the serum CTSS level is a useful serum marker for differential diagnosis with a higher discriminating capability than ACE depending on diseases concerned, though its disease specificity is not very high.