

Figure 4. Change in Serum Syndecan-4 during the Course of Antibiotic Therapy in Patients with Acute Pneumonia

結論と考察

今回、我々は肺の急性炎症における sdc4 の役割を検討した。今回の研究では、sdc4 は、LPS 気管内投与後のマウス肺組織と急性肺炎患者の血清で上昇していることが示された。

また、急性肺炎患者では肺炎の重症度と血清 sdc4 濃度に負の相関関係がみられること、軽症肺炎患者では血清 sdc4 が健常者と比較して高値であるのに対し、重症肺炎患者では差がみられないこと、軽症肺炎患者では治療経過中血清 sdc4 濃度が上昇するのに対し、重症肺炎患者では変化がみられないことから急性肺炎患者の病態への sdc4 の関与が強く示唆された。また、LPS 気管内投与後の sdc4 KO における肺への好中球遊走は WT と比較して増加し、BAL 液中の CXC chemokine である KC, MIP-2 濃度が高値であることから、sdc4 は急性肺炎において抗炎症作用を持つことが示唆される。Sdc4 は、細胞膜表面に発現する細胞表面型だけでなく、MMP などによる shedding により可溶性としても存在することが知られている⁴⁾。しかし、これまでの報告では、細胞表面型 sdc は GAG 側鎖を介して炎症性メディエーターと結合することにより、co-receptor として働き炎症性メディエーターの作用を増強するとされている⁵⁾、一方、可溶性 sdc はその作用を増強するのか、抑制するかについてははっきりしていません⁴⁾、急性の肺炎における sdc の役割ははっきりしてい

なかった。今回の検討では、sdc KO では WT と比較して肺の急性炎症が増強しており、また、我々の気道上皮細胞株 BEAS-2B を使用した *in vitro* のこれまでの検討では、recombinant sdc4 の前処置は LPS や TNF- α による IL-8/CXCL8 mRNA の増加を抑制しており、sdc4 の HS 側鎖を介した TNF- α と recombinant sdc4 の結合が、BEAS-2B 上の細胞表面型 sdc4 との結合を抑制することが IL-8/CXCL8 mRNA 増加を抑制した原因と推察される。LPS による敗血症⁹⁾、 κ -Carrageenan による腎障害¹⁰⁾、TGF- β による腎硬化症¹¹⁾、osteopontin による肝障害¹²⁾ や bleomycin による肺障害・線維症¹³⁾ にも sdc KO が感受性が高いことも報告されており、生体内においては sdc4、特に可溶性 sdc4 は抗炎症作用をもち、肺の急性炎症を抑制すると考えられる。

肺の急性炎症において可溶性 sdc4 を投与することが新しい治療法になる可能性があり、今後、更に詳細な検討が必要と考えられる。

参考文献

- 1) Brule S, Charneau N, Sutton A, et al: The shedding of syndecan-4 and syndecan-1 from HeLa cells and human primary macrophages is accelerated by SDF-1/CXCL12 and mediated by the matrix metalloproteinase-9. *Glycobiology* 2006; 16:488-501.
- 2) Fears CY, Gladson CL, Woods A: Syndecan-2 is

- expressed in the microvasculature of gliomas and regulates angiogenic processes in microvascular endothelial cells. *J Biol Chem* 2006; 281:14533-6.
- 3) Pruessmeyer J, Martin C, Hess FM, et al: A disintegrin and metalloproteinase 17 (ADAM17) mediates inflammation-induced shedding of syndecan-1 and -4 by lung epithelial cells. *J Biol Chem* 2010; 285:555-64.
 - 4) Manon-Jensen T, Itoh Y, Couchman JR: Proteoglycans in health and disease: the multiple roles of syndecan shedding. *FEBS J* 2010; 277:3876-89.
 - 5) Richardson TP, Trinkaus-Randall V, Nugent MA: Regulation of basic fibroblast growth factor binding and activity by cell density and heparan sulfate. *J Biol Chem* 1999; 274:13534-40.
 - 6) Frevert CW, Goodman RB, Kinsella MG, et al: Tissue-specific mechanisms control the retention of IL-8 in lungs and skin. *J Immunol* 2002; 168:3550-6.
 - 7) Frevert CW, Kinsella MG, Vathanaprida C, et al: Binding of interleukin-8 to heparan sulfate and chondroitin sulfate in lung tissue. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 28:464-72.
 - 8) 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; 184:2677-2685.
 - 9) Ishiguro K, Kadomatsu K, Kojima T, et al: Syndecan-4 deficiency leads to high mortality of lipopolysaccharide-injected mice. *J Biol Chem* 2001; 276:47483-8.
 - 10) Ishiguro K, Kadomatsu K, Kojima T, et al: Syndecan-4 deficiency increases susceptibility to kappa-carrageenan-induced renal damage. *Lab Invest* 2001; 81:509-16.
 - 11) Cevikbas F, Schaefer L, Uhlig P, et al: Unilateral nephrectomy leads to up-regulation of syndecan-2- and TGF-beta-mediated glomerulosclerosis in syndecan-4 deficient male mice. *Matrix Biol* 2008; 27:42-52.
 - 12) Kon S, Sue M, Kimura C, et al: Syndecan-4 protects against osteopontin-mediated acute hepatic injury by masking functional domains of osteopontin. *J Exp Med* 2008; 205:25-33.
 - 13) Jiang D, Liang J, Campanella GS, et al: Inhibition of pulmonary fibrosis in mice by CXCL10 requires glycosaminoglycan binding and syndecan-4. *J Clin Invest* 2010; 120:2049-57.

線維形成性肺障害病態における マウス肺標識保持細胞挙動の解析

西脇 徹 松島 綱治*

近年著しい発展を遂げている再生医学の領域において、生来より器官固有に常在する組織幹細胞・前駆細胞を同定し、分化に至る制御機構を解明することは、恒常性維持及び疾患発生のメカニズムを知る上で重要であるばかりでなく、iPS細胞など多能性幹細胞の治療応用実現にも大きく貢献するものである。組織幹細胞同定法の一つである標識保持細胞解析法は、成体において長期間にわたり核内に標識物質を留める細胞群、すなわち細胞分裂頻度の低い細胞群を検出する方法であり、1981年Bickenbachにより報告された。以来、皮膚における幹細胞ニッチとしての毛嚢脂腺バルジ領域の同定に始まり、腎・膵・消化管など多くの器官において組織幹細胞群とそれらが特異的に局在する場である幹細胞ニッチを見出すために応用されている。これまで我々はチミジンアナログであるブロモデオキシウリジン(5-bromo-2'-deoxy-uridine; BrdU)を標識物質として用いて、肺標識保持細胞における幹細胞的特徴(未分化状態・傷害耐性能・肺泡領域前駆細胞(2型肺胞上皮)との空間的緊密性)を見出してきた。今回、プレオマイシン肺障害モデルを用いて肺線維形成期における標識保持細胞の動態を解析し、いくつかの知見を得たのでこれを報告する。

Behavior of pulmonary label-retaining cells in murine model of fibrotic lung injury

Tetsu Nishiwaki, Kouji Matsushima

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

In recent regenerative medicine, there is great potential to know the pathological mechanisms and contribute to the clinical application of artificial pluripotent stem cells in the study of cellular behavior of tissue resident stem cells in homeostasis and disease. As one of the methods to identify the tissue stem cells, label-retention technique has been used to detect the slow cycling cells which harbor the tracer in their nucleus for long periods. Since the bulge areas in skin sebaceous glands was identified as the stem cell niches, the label-retention technique has been applied to find out the tissue resident stem cells and their niches in diverse types of organs including kidney, pancreas and intestine. We have demonstrated that pulmonary 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdU)-retaining cells possessed several stem/progenitor-like characteristics including an immaturity and stress resistance, and showed the spatial correlation with alveolar progenitors, alveolar type 2 (AT2) cells. Here we report some findings regarding the kinetics of pulmonary label retaining cells in murine model of fibrotic lung injury.

はじめに

呼吸器における線維形成病態は、感染症や急性肺傷害/急性呼吸促進症候群の付随病変であるばかりでなく、老化・環境因子・自己免疫性疾患・遺伝背景などの要因により発生することが知られており、肺癌の発生母地としての役割も示唆されている。したがって、組織の線維化に伴う細胞/分子病態を解明することは、これと関連する多様な疾患発症機構の解明および治療戦略を考えるうえで大きな意義を持つ。慢性線維症などの難治性病態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(surfactant protein-C; SP-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の生体内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、その組織幹細胞的性格を見出した。すなわち、1)フローサイトメトリーによる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)I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; BLM)傷害時においても薬剤耐性を示すこと、(図1) 5)蛍光免疫染色による定量的・組織学的解析において、BRCsと肺泡領域前駆細胞である2型肺胞上皮細胞との間に空間的緊密性(ニッチ様構造)が存在することを示した。(図2) 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いない。したがって、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示唆された。今年度の報告では、組織破壊性線維化病態下の病変形成/組織修復期において、組織幹/前駆細胞的性格を有する肺BRCsの動態を解析し、その組織再生における意義に関して考察を加えた。

方 法

マウスのBrdU標識

生後3～5日のC57BL/6Jマウスに対し、1日2回の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。

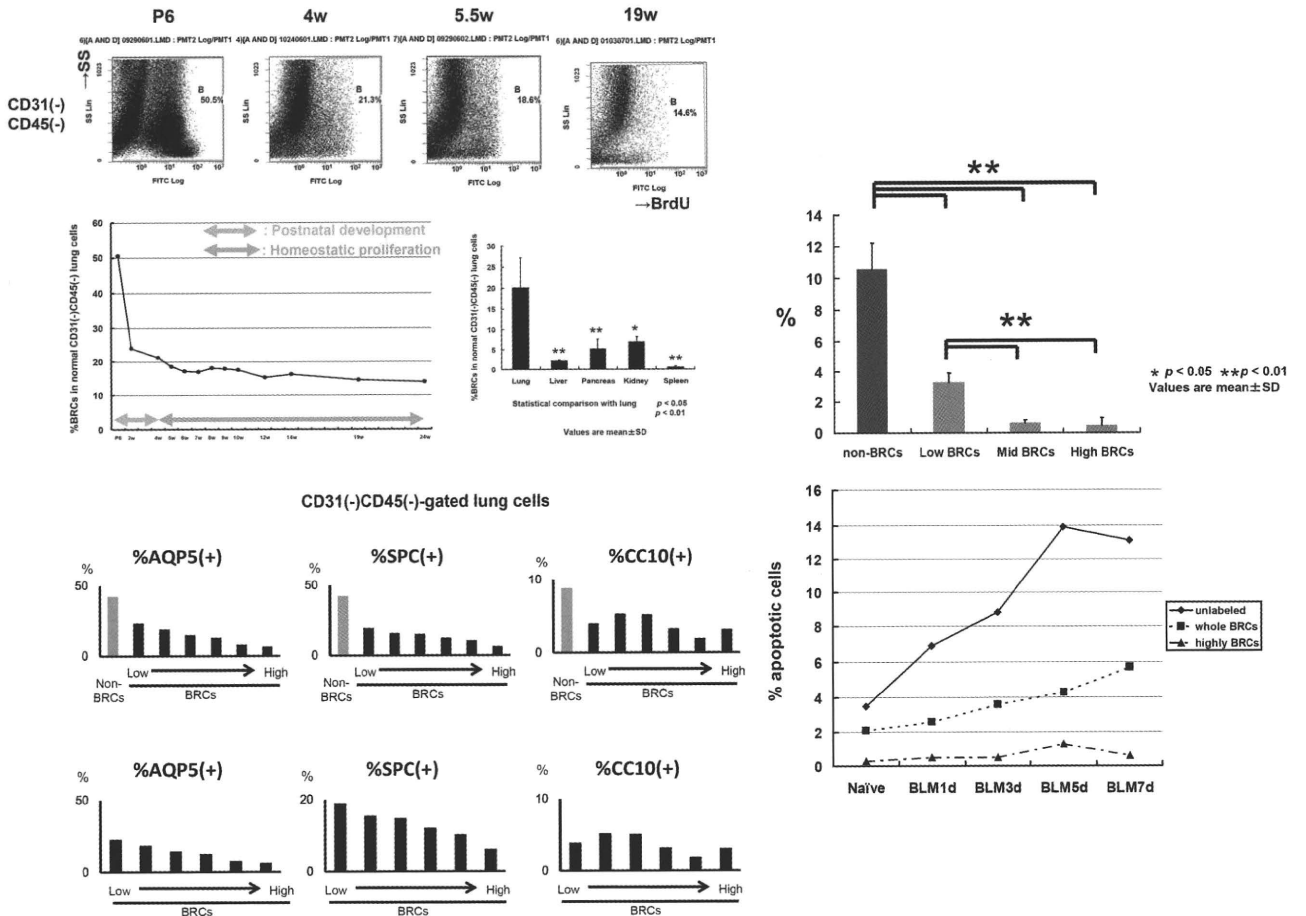


図1 (左上)正常肺発達過程における標識保持細胞(BRCs)存在率の変遷。正常成体マウスの各臓器間におけるBRC存在率の比較。N=5。
 (左下)正常成体マウス肺内BRCsにおける肺胞上皮細胞マーカー(SP-C・AQP5・CC10)の陽性率。フローサイトメトリー解析(%SP-C・%AQP5・%CC10 in CD31(-)CD45(-)lung cells)の結果をグラフ化したもの。
 (右)正常成体マウス肺内のBRCs・non-BRCsにおけるアポトーシス細胞率。上段はフローサイトメトリー解析の結果のグラフ化。N=5。下段はプレオマイシン肺障害モデルにおける肺CD31(-)CD45(-)BRC・non-BRC分画中アポトーシス細胞率の経時的変化。

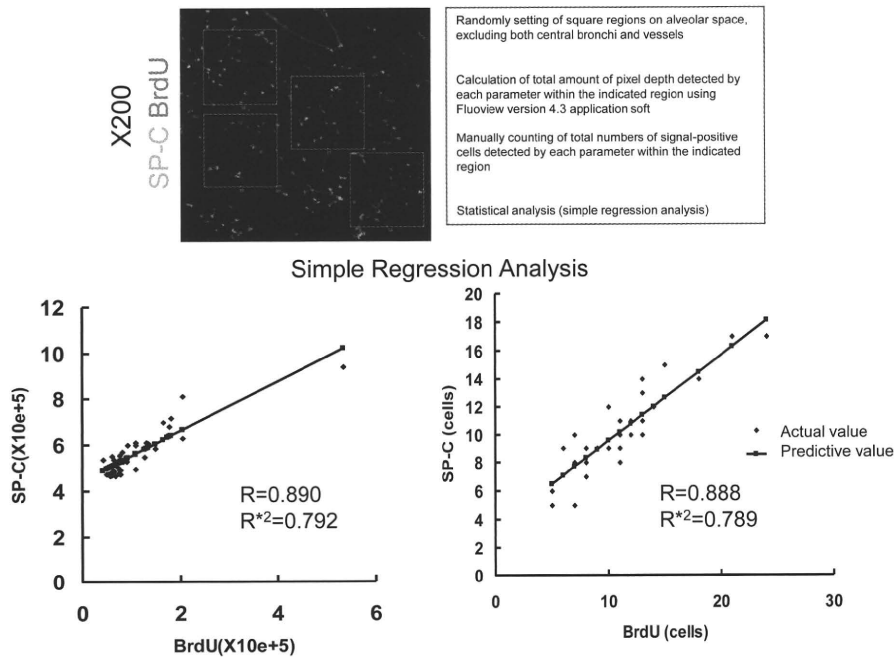
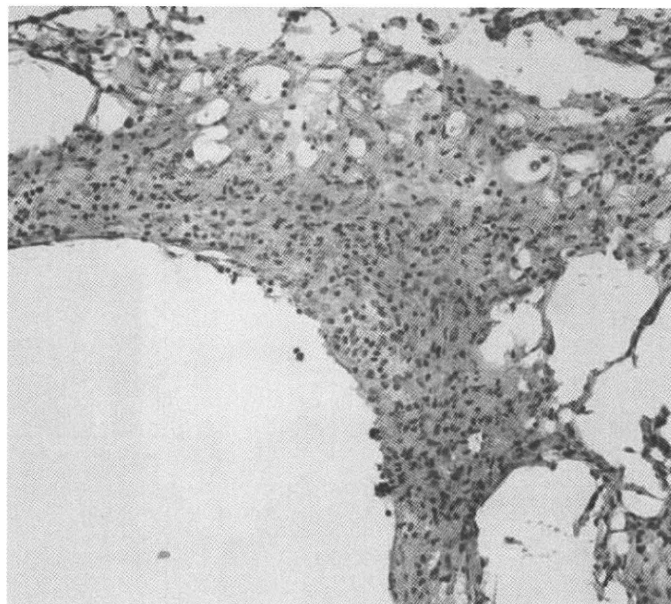


図2 BRCs・2型肺胞上皮細胞間の空間的緊密性の評価。



X20X10 Mouse: BLM1.5u→1Mo

図3 BLM投与後1か月における肺線維化病変. H-E染色像.

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、1 mm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

ケタラルー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)(3.0または1.5 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

マウスをケタラルールによる腹腔麻酔後、経気管的にOCT compound(サクラ精機)を注入。胸腔より取りだした肺をOCT compoundにて包埋し、クリオスタットにて6 μmに薄切し、スライド標本作製した。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

線維形成性肺傷害の修復期におけるBRCsの動態を解析するべく、亜致死投与量(1.5mg/kg)のBLMによる肺傷害モデルの病態評価を行った。この実験プロトコルでは多くのマウスが自然軽快の経過をたどるが、薬剤投与から1か月後の段階では、肺胞上皮細胞数の回復傾向を認めつつも線維化病変を残している。(図3)このような傷害過程において、肺BRCsの細胞数は一時的に減少するものの、薬剤投与2週以降は数的変化を認めず、遷延した病態下における低回転性および傷害耐性が示唆された。このことは、細胞分裂の際に低下するBrdU蛍光強度の平均値が、定常時と傷害遷延時(BLM投与後1か月)でほぼ変わらないことから裏付けられた。(図4)

次に、線維病変形成期における肺BRCsの動態を解析する目的で、正常および肺傷害(BLM投与後1か月)マウス(13週齢、雄)の肺組織蛍光免疫染色を行った。BrdU・SP-C・1型コラーゲンを各々異なるパラメーターで検出し、BRCs・2型肺胞上皮細胞・

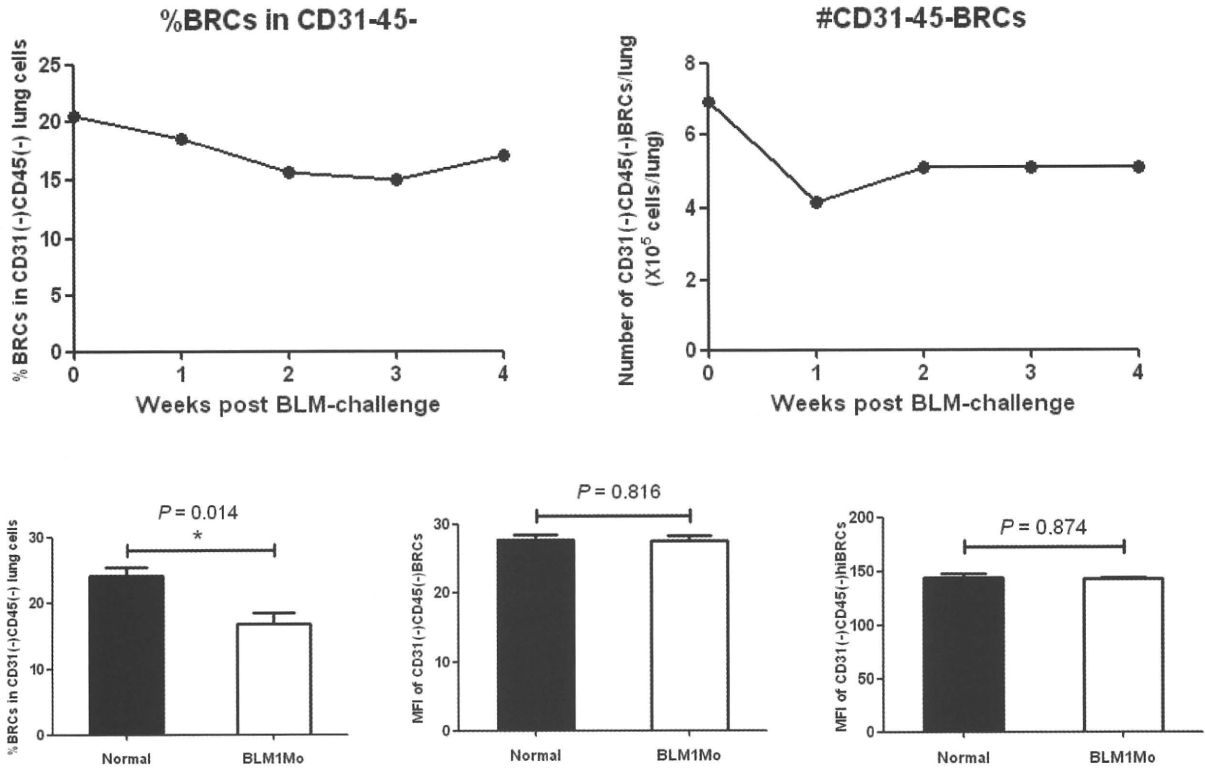
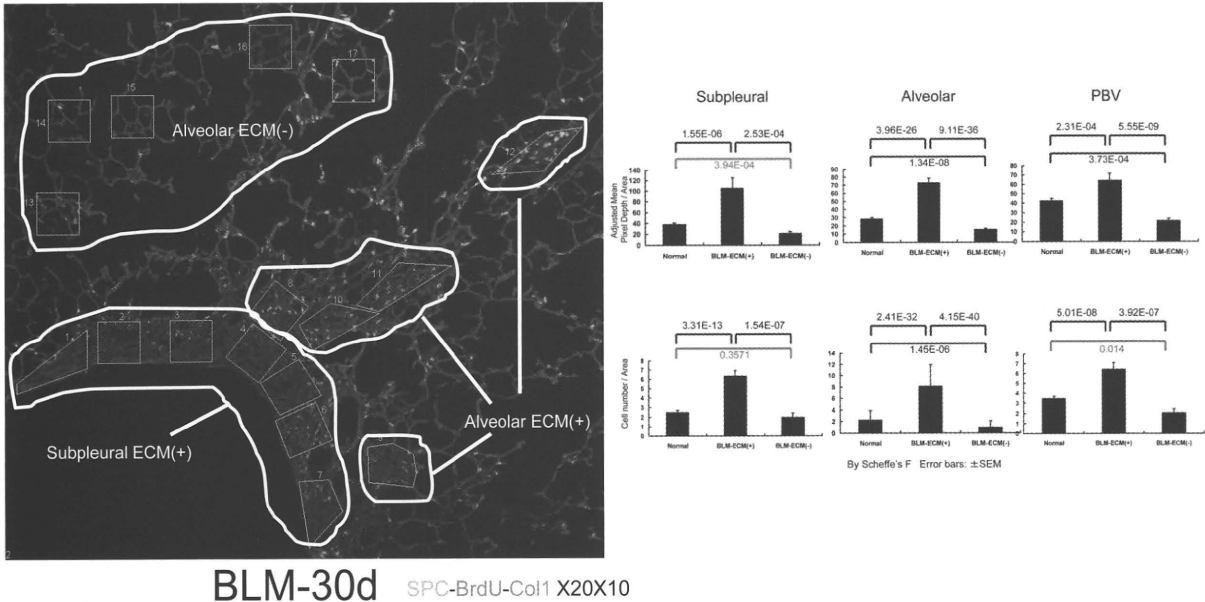


図4 (上)BLM肺傷害におけるBRCs数の変遷。(下)BLM肺傷害下のBRCsにおけるBrdU平均蛍光強度。

Multi spot-analysis of BRC-accumulation within the restricted region (10,000 μm^2)



BLM-30d SPC-BrdU-Col1 X20X10

図5 (左)BLM投与後1か月におけるBRCsと2型肺胞上皮細胞の組織内分布。白：SP-C、淡灰：BrdU、濃灰：1型コラーゲン。(右)正常・傷害肺の各区域におけるBRCs検出頻度の定量化。

細胞外基質沈着を描出したところ、傷害肺における線維化病変部に顕著なBRCsの集積が認められた。(図5) この細胞集積を客観的に評価するため、胸膜下・肺胞・気管支血管周囲の各領域別に一定面積の

関心領域を充分数設定し、BRCsの密集度を定量化したところ、正常肺に比し、傷害肺の線維化巣で有意にBRCsが集積していることが確認された。(図5) また、線維化巣周囲には2型肺胞上皮細胞の過形成

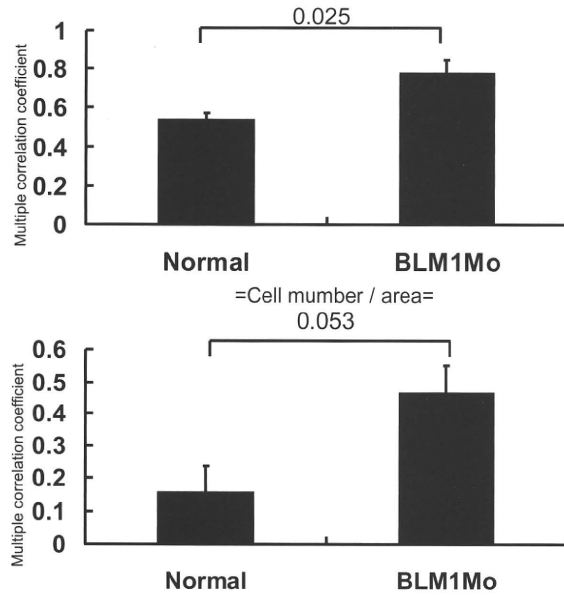


図6 正常・傷害肺におけるBRCs・2型肺胞上皮細胞間の空間的緊密性の比較.

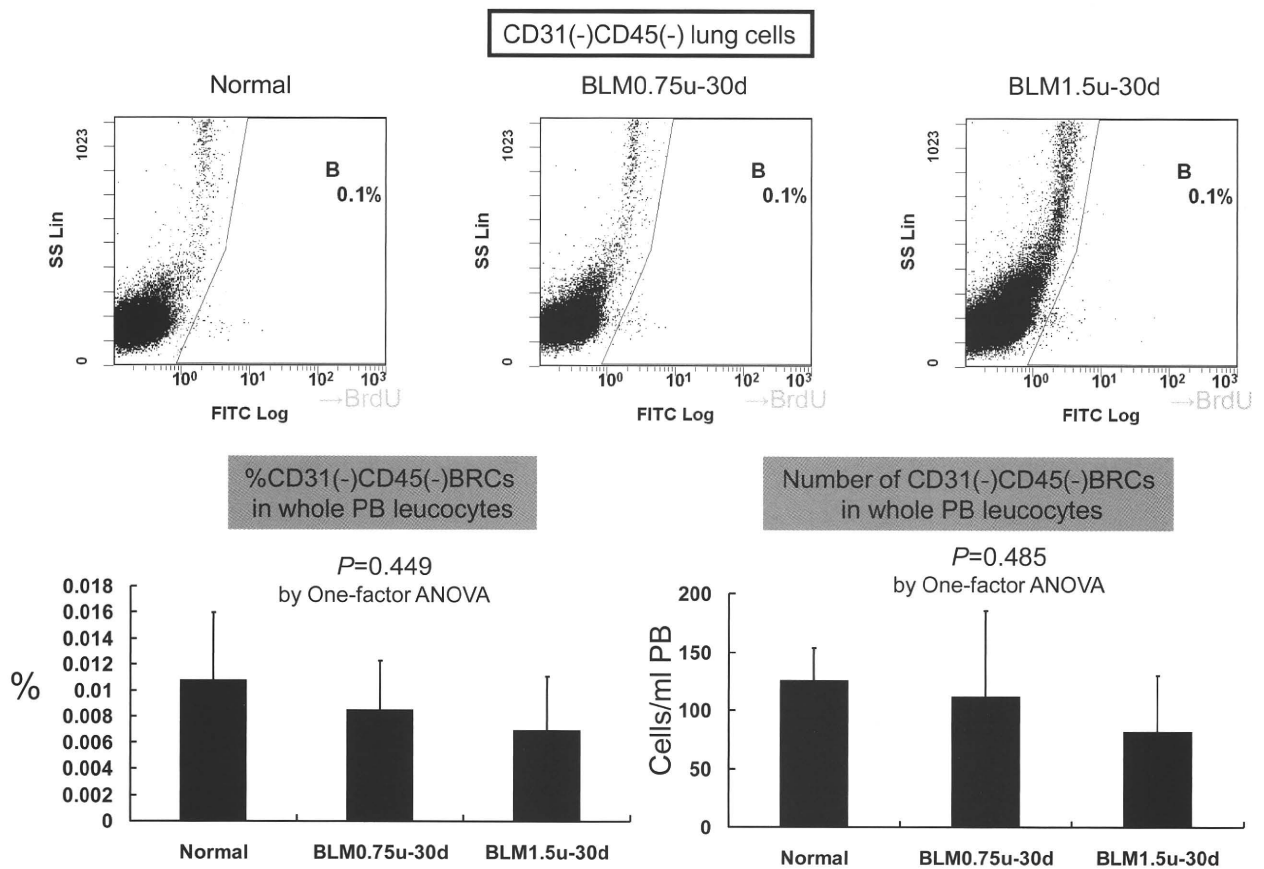


図7 正常・傷害(BLM投与後1か月)マウス循環末梢血中のBRC数.

が認められ、BRCsとの間の空間的緊密性は定常時より有意に高くなっていった。(図6) BLM投与から解析(1か月後)に至るまで、循環血流中のBRCsは増加せず(図7)、幼少期にBrdU標識したマウス骨髄細

胞の移入を受けたBrdU非標識BLM肺傷害マウスにおいて、線維化巣にBRCsが集積しないことから、図5で認められたBRCsの集積は、血流を介さず肺内の連続した部位からの細胞遊走により形成された

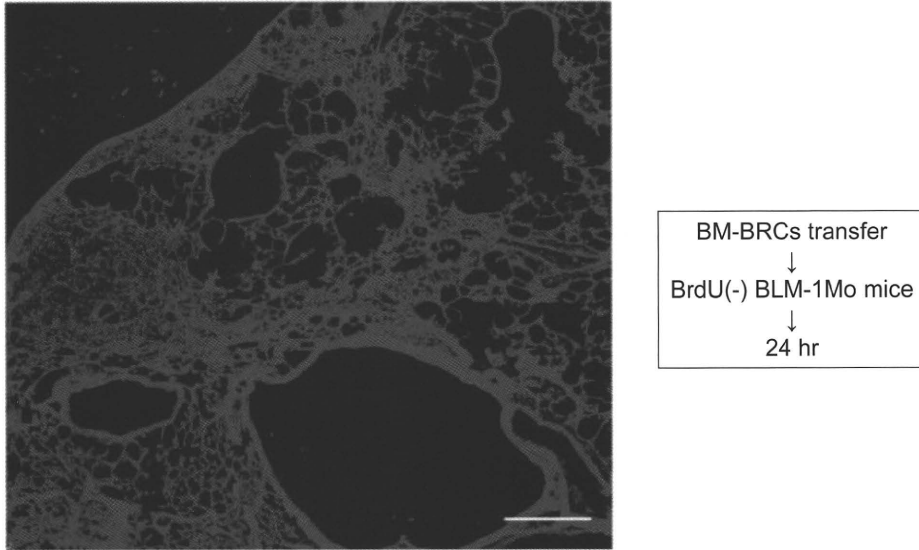


図8 BrdU標識骨髄細胞の移入を受けたBrdU非標識BLM肺傷害マウスの線維化巣. Scale Bar; 200 μ m

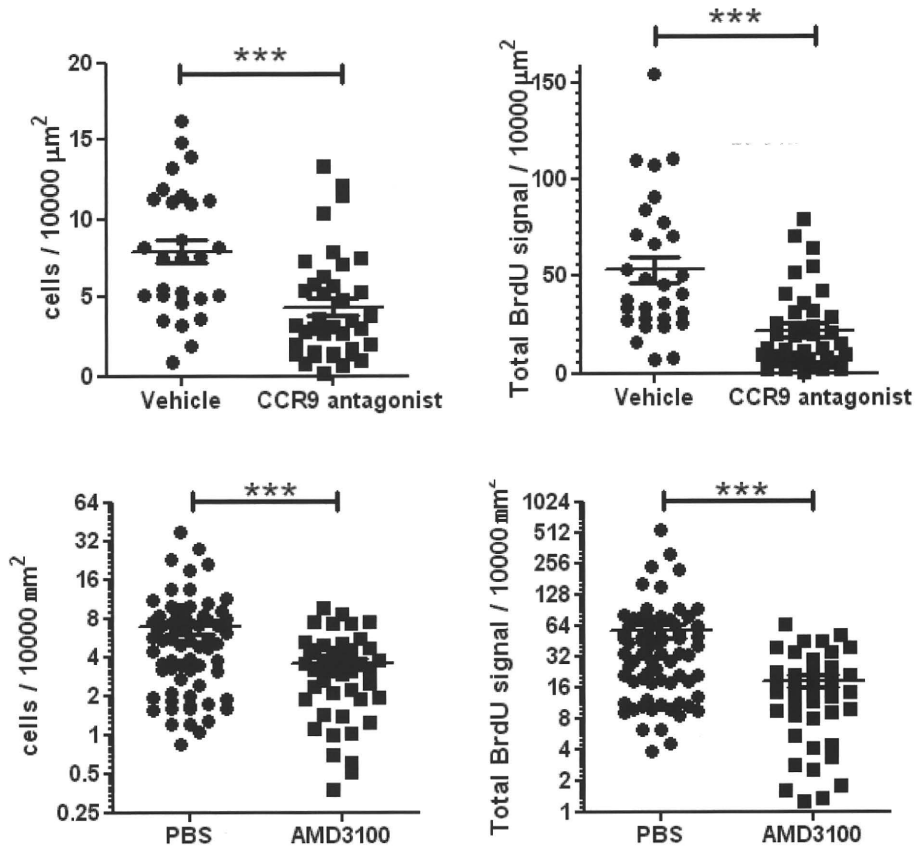


図9 ケモカインレセプター拮抗剤投与による線維化巣へのBRCs遊走の抑制. CCR9拮抗剤(米国 ChemoCentryx社より提供): 3 mg/day 連日投与. CXCR4拮抗剤(Sigma Aldrich): 10 mg/day 連日投与.

ことが示唆された。(図8) さらに、BRCsの細胞遊走の潜在能力を知るべくケモカインレセプターの発現を解析したところ、CCR9・CXCR4などが非BRCsに比しBRCsにより高く発現しており、特異

的な受容体拮抗剤の投与によりBRCsの集積が抑制されたため、線維化肺におけるケモカイン・ケモカインレセプター軸を利用したBRCsの肺内遊走が示唆された。(図9)

考 察

生体内外からの刺激により惹起される組織構築の破壊・炎症・線維化・修復/再生といった病態の混在は、組織の「創傷治癒」として捉えられており、とくに皮膚領域において古くから注目されている。近年の幹細胞生物学の発展により、この創傷治癒現象にも組織幹細胞群が貢献していることが明らかになりつつあるが、呼吸器においては現在まで検討されていない。特発性間質性肺炎に代表される肺線維症における病像も複数の病態が併存する創傷治癒現象の一環と考えられており、呼吸器組織幹細胞の関与が推察される。

呼吸器組織幹細胞については、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候補細胞群が提唱され³⁾⁴⁾⁵⁾、さらには局在不明ながらも、間葉系幹細胞⁶⁾・side population (SP)細胞⁷⁾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が同定されており、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組織幹細胞のニッチとなり、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¹⁾、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型肺胞上皮細胞に分化・置換する」⁸⁾という極局所的な現象を基軸にしたものに留まっているのが現状である。

今回の報告において、我々は線維形成性肺傷害の修復期、すなわち創傷治癒過程において、呼吸器常在で複数の幹/前駆細胞的性格を有するBRCsが肺内遊走によって線維化巣に集積することを示した。解析した傷害肺は正常肺に比し肺胞上皮細胞数が減少した状態であるにも拘らず、線維化巣周囲では2型肺胞上皮細胞の過形成が認められていたことから、線維化巣は呼吸器自己再生応答の拠点「ニッチ」となっていることが示唆された。また、集積した

BRCsはBrdU蛍光強度を保ち、ほとんど細胞分裂をせずに遊走していることから、上皮細胞に分化して障害組織を置換する役割よりむしろバイスタンダーとして組織再生を補助する「ニッチ形成細胞群」として創傷治癒に貢献している可能性が示唆された。呼吸器創傷治癒における組織幹/前駆細胞群の動態やそれらを中心とした病像形成の概念モデルを提唱した仕事は本報告が初であり、今後の肺線維症病態解明において呼吸器固有低回転細胞群に着目した解析は有意義なものであると考えられる。

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) Engelhardt JF: Stem Cell Niches in the Mouse Airway. Am J Respir Cell Mol Biol 2001; 24: 649-652.
- 4) Rawlins EL and Hogan Brigid LM: Epithelial stem cells of the lung: privileged few or opportunities for many? Development 2006; 133: 2455-2465.
- 5) 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.
- 6) Lama VN, Smith L, Thannickal VJ, et al: Evidence for tissue-resident mesenchymal stem cells in human adult lung from studies of transplanted allograftes. J Clin Invest 2007; 117: 989-996.
- 7) 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.
- 8) 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.

シアリルルイスA糖鎖を有するKL-6(SLAK)の 間質性肺疾患におけるバイオマーカーとしての有用性

吉岡 宏治 服部 登 堀益 靖 田中惣之輔 石川 暢久
藤高 一慶 春田 吉則 村井 博 河野 修興*

間質性肺疾患患者103例の血清及び気管支肺胞洗浄液中の sialyl Lewis^a を有するKL-6(以下SLAKとする)濃度を測定し、その臨床的意義について検討した。全体での血清SLAKの陽性率は35.9%であったが、特発性肺線維症、膠原病関連間質性肺炎、慢性過敏性肺炎では約40-60%と他の疾患と比べて高い陽性率を示した。一方、急性過敏性肺炎や非特異的間質性肺炎における血清SLAKの陽性率は5-15%であり、高い陽性率を示したKL-6と大きな乖離が認められた。抗KL-6抗体及び抗sialyl Lewis^a抗体を用いた免疫組織染色では、特に蜂窩肺の内腔を覆う気管支上皮細胞にて共に強い陽性所見を認めた。血清SLAKは線維化に特異性を高めた新しいマーカーとして有望な分子であると考えられた。

Analysis of circulating KL-6 carrying sialyl Lewis^a (SLAK) levels in patients with interstitial lung diseases

Noboru Hattori, Koji Yoshioka, Yasushi Horimasu, Sonosuke Tanaka, Nobuhisa Ishikawa,
Kazunori Fujitaka, Yoshinori Haruta, Hiroshi Murai, and Nobuoki Kohno

Department of Molecular and Internal Medicine, Graduate School of Biomedical Sciences, Hiroshima University

We have already reported that KL-6 carrying sialyl Lewis^a named SLAK can be detected in sera of lung adenocarcinoma patients and its serum level serves as a prognostic factor. In the present study, we hypothesized that SLAK could be also detected in sera of patients with interstitial lung diseases and its level would show a different significance from KL-6. To measure SLAK levels, we developed a double-sandwich electro chemiluminescence immunoassay using anti-sialyl Lewis^a and anti-KL-6 antibodies. ROC curves were drawn to determine the optimal cut-off value, and we decided to establish 20 U/ml as the cut-off value. We measured SLAK levels in serum and bronchoalveolar lavage fluid (BALF) from the 103 patients with interstitial lung diseases (24 idiopathic pulmonary fibrosis; IPF, 17 nonspecific interstitial pneumonia; NSIP, 6 cryptogenic organizing pneumonia; COP, 24 collagen-vascular disease associated interstitial pneumonia; CVD-IP, 8 acute hypersensitivity pneumonia; AHP, 24 chronic hypersensitivity pneumonia; CHP). Positive rates of SLAK in the 103 patients with interstitial lung diseases (ILD) were 35.9%. The positive rate of SLAK in IPF, CVD-IP and CHP was shown to be high (41.7%, 45.8%, and 58.3%, respectively) compared with those in other ILD. Although high positive rates of KL-6 were observed in AHP and NSIP patients (100% and 100%, respectively), positive rates of SLAK was shown to be low (12.5% and 5.9%, respectively). Immunohistochemical staining showed that KL-6 was co-localized with sialyl Lewis^a particularly in bronchiolar epithelial cells lining honeycomb lesion. The results of this study strongly support the potential of SLAK as a new serum biomarker for fibrosing types of ILDs.

背景

KL-6はMUC1ムチンにクラスター分類される高分子量糖蛋白であり、我々はこれまでにKL-6が間質性肺炎の診断、活動性の評価、予後予測に有用なバイオマーカーであることを報告してきた(1-5)。

大腸癌や乳癌のMUC1上にはセレクチンと結合可能なルイス血液型物質が存在するという報告を基に(6,7)、実際にセレクチンリガンドを有するKL-6が存在するのかを検討したところ、sialyl Lewis^xを有するKL-6(以下SLAKとする)がヒト肺腺癌細胞株PC-3の培養上清中に検出されることを見出した。この結果を受けてまず、SLAKがELISA法にて肺腺癌患者の血清中で測定可能であり、遠隔転移群で高値を示すとともに肺腺癌患者の独立した予後不良因子となりうることを報告した(8)。またAcute Respiratory Distress Syndrome(ARDS)患者の血清中にもSLAKが検出され、DIC合併の予後因子となりうることを明らかとした(9)。

本研究ではKL-6の垂分子であるSLAKが、間質性肺疾患においてKL-6とは異なる動向を示すのではないかとの仮説をもとに、種々の間質性肺疾患患者の血清及び気管支肺胞洗浄液(BALF)における濃度を測定し、その臨床的意義について検討した。

対象と方法

2001年から2010年までに広島大学病院を受診した特発性肺線維症(IPF)24例、非特異的間質性肺炎(NSIP)17例、特発性器質化肺炎(COP)6例、膠原病関連間質性肺炎(CVD-IP)24例、急性過敏性肺炎(AHP)8例、慢性過敏性肺炎(CHP)24例の間質性肺疾患計103例を対象とし、診断時の血清及びBALFを用いてSLAKを測定した。またコントロールとして健常者86名の血清を用いた。

気管支肺胞洗浄は、原則として中葉あるいは舌区のB4又はB5のいずれかに気管支鏡を楔入し、37℃生理食塩水50mlを3回注入しBALFを回収した。BALFは遠心洗浄し上清と細胞成分を分離し

た。

SLAK値はサンドイッチ法による電気化学発光免疫測定法(ECLIA: Electro-chemiluminescence Immunoassay)にて測定した。抗sialyl Lewis^x抗体を結合させたビーズを固相とし、ルテニウム標識抗KL-6抗体を検出抗体として用いた。測定装置はピコルミ8220(三光純薬株式会社)を使用した。ヒト肺腺癌細胞株PC-3の培養上清をスタンダードとして用いた。Cut off値はROC曲線の結果より20U/mlとした。なお、ELISA法とECLIA法に関して良好な相関関係を示すことは確認している。血清KL-6値はピコルミKL-6(エーザイ・三光純薬株式会社)を用いて測定した。

またSLAKの局在について検討するため、胸腔鏡下肺生検を施行した症例(NSIP6例、CHP6例、IPF6例)の肺組織を用いて抗sialyl lewis^x抗体及び抗KL-6抗体による免疫組織染色を行った。

統計学的解析に関しては、独立した2群間の差の比較にはMann-Whitney U testを用いた。データの相関にはSpearman's rank correlation coefficient analysisを用いた。

尚、研究対象となった全症例に研究主旨を説明し文書で同意を得た。

結果

1) 各疾患における血清SLAK値の分布(図1)

IPF、NSIP、CVD-IP、CHP症例では、血清SLAKは健常者と比べ有意に高値であったが、COP、AHP症例では有意差を認めなかった。

血清SLAKの間質性肺疾患103例での陽性率は35.9%であった。各疾患別ではIPF:41.7%、NSIP:5.9%、COP:0%、CVD-IP:45.8%、CHP:58.3%、AHP:12.5%であり、特にIPF、CVD-IP、CHP症例で高い陽性率を認めた。NSIP、AHP症例における血清SLAKの陽性率は低値であり、高い陽性率を示したKL-6と大きな乖離が認められた。

2) 各疾患におけるBALF中のSLAK値の分布(図2)

IPF症例との比較において、NSIP、CVD-IP、CHP症例では有意差を認めなかったが、COP、AHP症例では有意に低値であった。

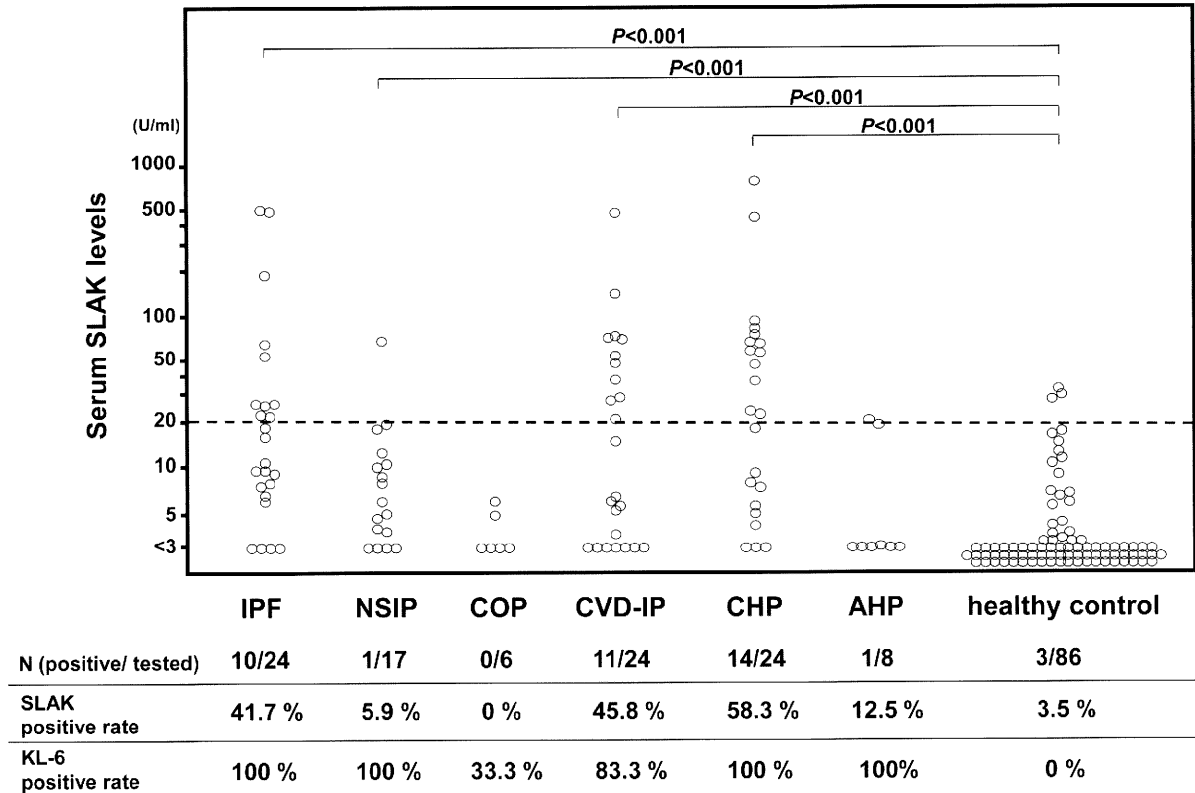


図1 Serum SLAK and KL-6 levels in patients with ILDs

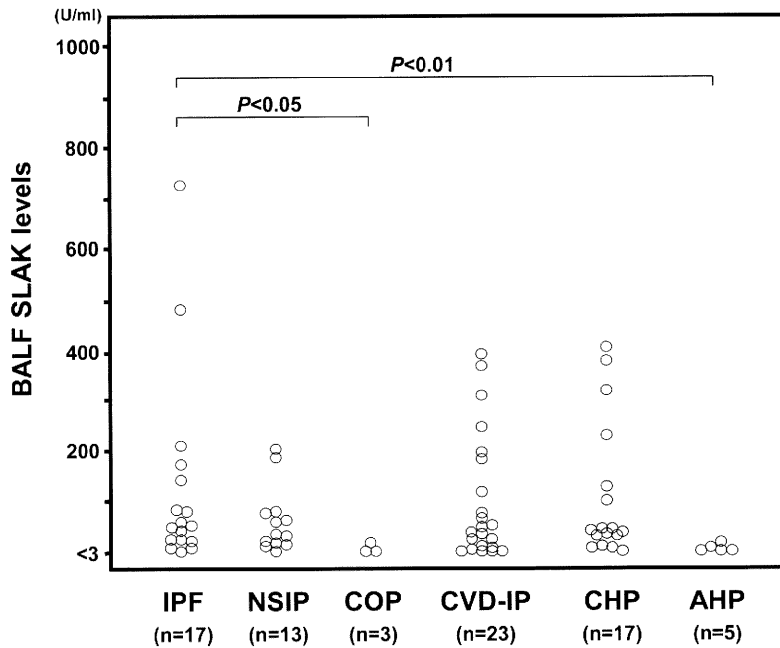


図2 The SLAK levels in bronchoalveolar lavage fluid (BALF) of patients with ILDs

3) 血清およびBALF中のSLAK値の相関(図3)

血清とBALF中のSLAK値の間に有意な正の相関関係が見られた。

4) 血清およびBALF中のSLAK値と臨床パラメータとの相関に関する検討(表1)

血清SLAKは、%VC、%DLco、BALF中のリンパ球比率と有意な負の相関を認め、マクロファージ比率

表1 Correlation between the levels of SLAK in the serum and BALF and clinical parameters in patients with ILDs

	Serum SLAK		BALF SLAK	
	Rs	P value	Rs	P value
Age	0.097	0.330	0.044	0.704
Pack-years	0.093	0.357	0.052	0.654
Pulmonary function test				
VC (% predicted)	-0.244	0.014†	-0.094	0.425
DLco (% predicted)	-0.245	0.030†	-0.095	0.476
BALF				
Total cell count	-0.187	0.064	-0.101	0.377
Macrophages (%)	0.245	0.015†	0.195	0.088
Lymphocyte (%)	-0.298	0.003†	-0.302	0.007†
Neutrophils (%)	0.126	0.214	0.221	0.052
Eosinophils (%)	0.023	0.823	0.217	0.056

† p<0.05 Spearman's rank correlation test

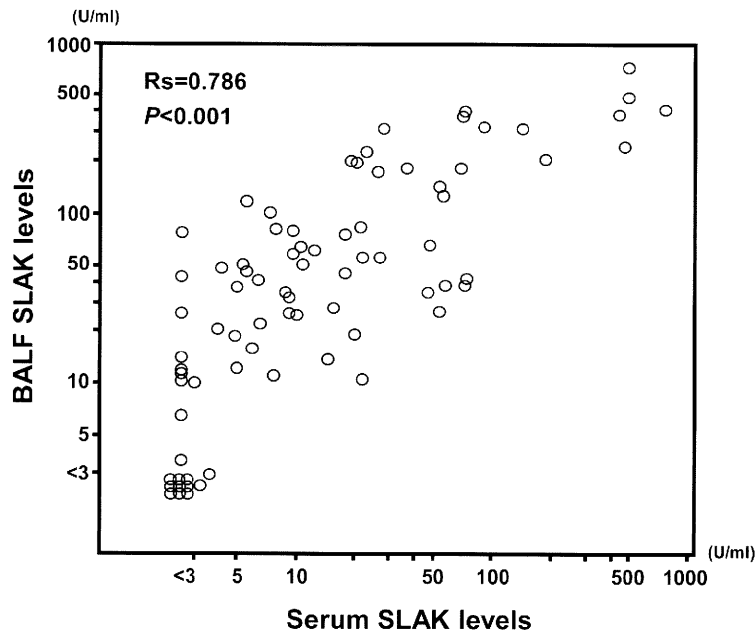


図3 Correlation between the SLAK levels in serum and those in BALF in patients with ILDs

と有意な正の相関を認めた。またBALF中のSLAKは、BALF中のリンパ球比率と有意な負の相関を認めた。

5) 抗KL-6抗体および抗sialyl Lewis^a抗体による免疫組織染色(図4, 5)

NSIP症例での早期の線維化病変において、抗KL-6抗体では気腔面が線状に染色され、再生肺胞

上皮細胞にて強い陽性所見を認めた(図4a)。抗sialyl Lewis^a抗体での検討では抗KL-6抗体と異なり、間質の一部や再生肺胞上皮細胞に軽度の陽性所見が認められた(図4b)。これに対して、CHP症例での強い線維化領域で認められた蜂窩肺において、蜂窩肺の内腔を覆う気管支上皮細胞で抗KL-6抗体(図5a)および抗sialyl Lewis^a抗体(図5b)ともに強い陽性所見を認めた。

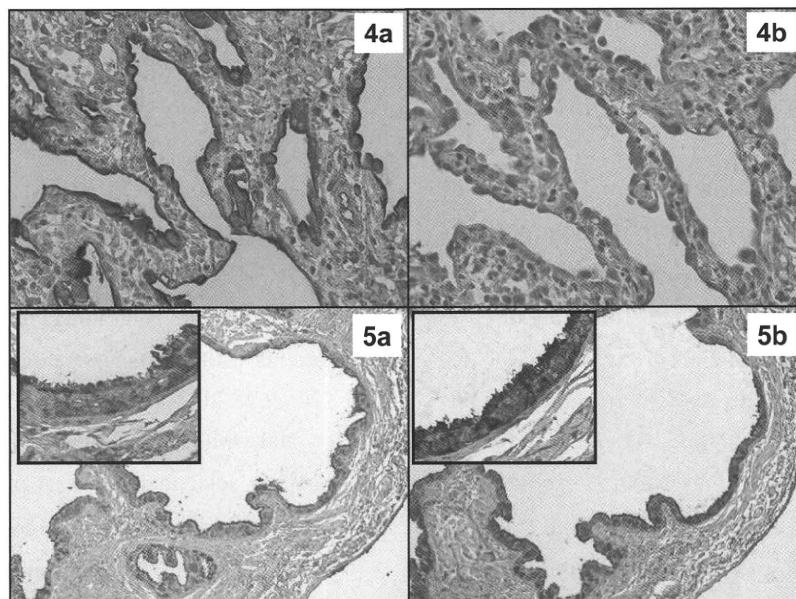


図4 Expression of KL-6 (a) and sialyl Lewis^a (b) in a case of NSIP
 図5 Expression of KL-6 (a) and sialyl Lewis^a (b) in a case of CHP

考 察

我々は、これまでに間質性肺疾患血清中における KL-6 と CA19-9(sialyl Lewis^a), SLX(sialyl Lewis^x) の測定を行い、CA19-9 や SLX は間質性肺疾患患者の 30-60% において上昇を認めるものの、KL-6 と比べて感度が低いことを報告している (10)。今回の検討では、間質性肺疾患における SLAK の陽性率は約 35% であり、診断マーカーとしての有用性は高くないと考えられる。しかしながら血清 KL-6 が高い陽性率を示す AHP や NSIP 症例での SLAK の陽性率は約 5 ~ 15% と低値であるのに対して、IPF, CVD-IP, CHP 症例での SLAK の陽性率は約 40 ~ 60% と高値を示した。SLAK は KL-6 が上昇する間質性肺疾患の中でも限られた疾患でのみ上昇しており、間質性肺疾患における subtype の鑑別に有用である可能性がある。

呼吸機能検査所見と SLAK の相関関係の検討において、血清 SLAK は %VC や %DLco と有意な負の相関を認め、疾患の重症度評価における SLAK の有用性が示唆された。

本研究において、IPF, CVD-IP, CHP などの症例における血清 SLAK 値は健常者と比較して有意に高値であったが、一般に治療により肺の既存構造の破壊を伴わず治療可能である COP や AHP のような疾患における血清 SLAK 値は、健常者と有意差を認めな

かった。また免疫組織染色では、早期の線維化病変では KL-6 抗体のみ強い陽性所見を認めたが、線維化の終末像である蜂窩肺において抗 KL-6 抗体及び抗 sialyl Lewis^a 抗体共に強い陽性所見を示したことから、蜂窩肺のような強い線維化病変に SLAK が局在している可能性が示唆された。これらの結果より SLAK は、線維化などの肺の構造改変を反映している可能性があると考えられる。

結 論

間質性肺疾患における血清 SLAK は KL-6 とは異なる動態を示し、特に IPF, CVD-IP, CHP 症例などの線維化をきたす疾患にて高値であった。血清 SLAK は線維化に特異性を高めた新しいマーカーとして有望な分子である。

参考文献

- 1) Kohno N, Kyoizumi S, Awaya Y, et al: New serum indicator of interstitial pneumonitis activity. Sialylated carbohydrate antigen KL-6. Chest 1989; 96: 68-73.
- 2) Kohno N, Awaya Y, Oyama T, et al: KL-6, a mucin-like glycoprotein, in bronchoalveolar lavage fluid from patients with interstitial lung disease. Am Rev Respir Dis 1993; 148: 637-642.

- 3) Yokoyama A, Kohno N, Hamada H, et al: Circulating KL-6 predicts the outcome of rapidly progressive idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1998; 158: 1680-1684.
- 4) Ohnishi H, Yokoyama A, Kondo K, et al: Comparative study of KL-6, surfactant protein-A, surfactant protein-D, and monocyte chemoattractant protein-1 as serum markers for interstitial lung disease. *Am J Respir Crit Care Med* 2002; 165: 378-381.
- 5) Yokoyama A, Kondo k, Nakajima M, et al: Prognostic value of circulating KL-6 in idiopathic pulmonary fibrosis. *Respirology* 2006; 11: 164-168.
- 6) Fernandez-Rodriguez J, Dwir O, Alon R, et al: Tumor cell MUC1 and CD43 are glycosylated differently with sialyl-Lewis a and x epitopes and show variable interactions with E-selectin under physiological flow conditions. *Glycoconj J* 2001; 18: 925-930.
- 7) Sikut R, Zhang K, Baeckstrom D, Hansson GC: Distinct sub-populations of carcinoma-associated MUC1 mucins as detected by the monoclonal antibody 9H8 and antibodies against the sialyl-Lewis a and sialyl-Lewis x epitopes in the circulation of breast-cancer patients. *Int J Cancer* 1996; 66: 617-623.
- 8) Inata J, Hattori N, Yokoyama A, et al: Circulating KL-6/MUC1 mucin carrying sialyl Lewis a oligosaccharide is an independent prognostic factor in patients with lung adenocarcinoma. *Int.J.Cancer* 2007; 120: 2643-2649.
- 9) Nakashima T, Yokoyama A, Kohno N, et al: Mucin carrying selectin ligands as predictive biomarkers of disseminated intravascular coagulation complication in ARDS. *Chest* 2010 (in press)
- 10) Yokoyama A, Kohno N, Kondo K, et al: Comparative evaluation of sialylated carbohydrate antigens, KL-6, CA19-9, and SLX as serum markers for interstitial pneumonia. *Respirology* 1998; 3: 199-202.

オートファジーによる細胞老化の制御

荒屋 潤 原 弘道 藤井さと子 高坂 直樹 小島 淳 弓野 陽子
石川 威夫 沼田 尊功 河石 真 斉藤 圭介 中山 勝敏 桑野 和善*

加齢は特発性肺線維症 (IPF) の重要な危険因子であり, replicative な老化を制御するテロメア長の短縮が IPF の肺胞上皮細胞で報告されている。我々は, IPF において肺上皮細胞の老化が亢進し, その病態に関与している可能性をこれまで報告してきた。喫煙は細胞老化を亢進させ, IPF 発症の重要な危険因子である。オートファジーは, リソソームを介した細胞内蛋白質や小器官の分解機構であり, 生理的役割だけでなく, 傷害時の細胞内環境維持, 細胞老化など, 様々な病態においても重要性が報告されている。今回, 我々は, 喫煙による細胞老化誘導に関して, オートファジーが傷害された蛋白質の分解除去により抑制的な役割を果たしていると考え, 気道上皮細胞を用いて検討を行った。その結果, タバコ抽出液 (CSE) 刺激により, オートファジーは一過性に亢進した後に低下し, それに伴いユビキチン化した蛋白質が蓄積し, 細胞老化が誘導された。またオートファジーの抑制により CSE によるユビキチン化した蛋白質の蓄積が増加し, 細胞老化が亢進した。一方, オートファジーの亢進により CSE によるユビキチン化した蛋白質の蓄積が減少し, 細胞老化が抑制された。以上の結果から, 喫煙刺激後のオートファジーによる処理機能の相対的な低下により, 細胞内に傷害を受けたユビキチン化蛋白質が蓄積し, これが細胞老化誘導の引き金となる可能性が示された。つまりオートファジー機能が細胞老化制御により IPF 病態に関与する可能性が示唆された。

Impairment of autophagic clearance of ubiquitinated proteins enhances CSE-induced HBEC senescence.

Jun Araya, Hiromichi Hara, Satoko Fujii, Naoki Takasaka, Jun Kojima, Yoko Yumino, Takeo Ishikawa, Takanori Numata, Makoto Kawaishi, Keisuke Saito, Katsutoshi Nakayama, and Kazuyoshi Kuwano.

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

Idiopathic pulmonary fibrosis (IPF) occurs in older individuals and increased cellular senescence is a major feature of advanced age, raising the possibility that cellular senescence may contribute to the pathogenesis of IPF. Indeed, recent reports demonstrate that telomere shortening in alveolar epithelium, indicating replicative cell senescence, is a risk factor for the development of IPF. We have recently reported an important role for increased senescence of epithelial cells in IPF lung tissue, which seems to be involved in IPF pathogenesis in terms of aberrant cytokine secretions. Cigarette smoke exposure has been shown to be a major risk factor for the development of IPF. Autophagy, a lysosomal degradation pathway, occurs continuously during homeostatic turnover of cytoplasmic proteins and organelles but is also induced in response to a variety of stress stimuli, including cigarette smoke-induced oxidative stress. Recent advances in our understanding of the molecular mechanisms of autophagic degradation indicate the pivotal regulatory role of autophagy in a variety of cell functions and cell fates, including cellular senescence. In this context, we examined the regulatory role of autophagy in cigarette smoke extract (CSE)-induced cellular senescence of human bronchial epithelial cells (HBEC). We demonstrate that CSE induces only transient activation of autophagy directly after treatment, followed by accelerated cellular senescence and concomitant accumulation of ubiquitinated proteins, which is accompanied by a corresponding decline in autophagy. Treatment with an autophagy inhibitor further enhanced accumulation of ubiquitinated proteins, resulting in increased senescence. Conversely, autophagy activation suppresses accumulation of ubiquitinated proteins and cellular senescence. Taken together, this evidence indicates autophagic clearance of ubiquitinated proteins might be involved in the regulation of tobacco smoke-induced HBEC senescence in association with IPF pathogenesis.

(はじめに)

特発性肺線維症(IPF)は加齢とともにその頻度が増加する老化関連肺疾患といえる。事実IPFは50歳以上の患者に多く、加齢はその発症の最も重要なリスクファクターの一つとされている¹⁾。近年IPFの病態とテロメア機能との関連性が示唆されており、家族歴のあるIPF患者の8-15%にtelomeraseコンポーネントのhuman telomerase reverse transcriptase (hTERT)及びhTRの遺伝子異常があり²⁾、さらに肺胞上皮細胞のテロメア長の短縮がIPFの危険因子である事が報告された³⁾。我々もIPF肺組織における上皮細胞の細胞老化亢進を、代表的な細胞老化の指標であるsenescence associated(SA) β -galactosidase (gal)染色とp21の発現により明らかにし、さらにこの細胞老化亢進がサイトカイン産生の亢進によりIPF病態に関与している可能性も明らかにした⁴⁾。しかしながら、この老化亢進の制御の機序は十分に解明されていない。

オートファジーとは、細胞内自己成分の分解処理機構である。オートファゴソームと呼ばれるリン脂質の2重膜様構造からなる小胞によりタンパク質や細胞小器官を囲い込み、リソソームに移送し融解・分解する。オートファジーは、古典的には飢餓時に誘導されるとされていたが、通常の状態でも基底レベルで働いており、新陳代謝に関与している。近年様々なストレスやホルモン刺激により、オートファジーが誘導される事が明らかにされ、生理的なアミノ酸供給だけではなく、細胞内環境維持、免疫応答、感染症制御、発癌抑制、プログラム細胞死、細胞老化など、様々な病態においてもその重要性を示す結果が数多く報告されている⁵⁾。

喫煙はIPF進展の危険因子であり、また慢性閉塞性肺疾患(COPD)の病態において上皮細胞老化を誘導する事が報告されている^{6,7)}。タバコの煙は約4000の化学物質からなり、多くの致死性有害物質を含む。その中でも活性酸素種が果たす役割が注目されている。活性酸素種による酸化ストレスはDNA傷害だけでなく、細胞内たんぱく質やミトコンドリアを含む小器官に傷害を与え、それらが適切

に除去されず蓄積する事が細胞老化を含む病態に影響すると考えられている。これまでオートファジーが喫煙により誘導され、アポトーシス亢進を介してCOPD病態に関与する事が報告されている⁸⁾。しかしながら、喫煙刺激による細胞老化誘導に与えるオートファジーの役割に関して、これら傷害を受けた細胞内成分の分解除去の観点からは十分に検討されていない。

今回我々は、IPF肺組織における上皮細胞の老化亢進の機序の一端を明らかにする目的で、喫煙刺激が誘導する気道上皮細胞老化に対するオートファジーの役割を検討した。

(対象と方法)

細胞分離培養: 気道上皮細胞は肺がん手術検体の気管支より、蛋白分解酵素処理により分離した(学内倫理委員会承認済み)。気道上皮細胞は10 μ g/mlのtype I collagenでコートした培養プレート上でbronchial epithelial growth medium (BEGM)にて継体培養した。

発現遺伝子導入による安定発現株作成とsiRNAによるknock down: LC3-GFP発現プラスミド(LC3 cDNA 東京医科歯科大学 水島教授より供与)をlipofectamine 2000を使用してBeas2B細胞に遺伝子導入し、G418により選択培養し作成した。LC3 siRNAはAmamax Neuclofactor systemを使用し導入した。

遺伝子発現: RT-PCRにより評価した。

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

細胞老化の検討: p21の発現とSA β -gal (β -galactosidase staining kit)染色で検討した。

オートファジー機能は3MAおよびbafilomycin AまたはLC3siRNAの導入により抑制し、Torrin1により亢進させた。

(結 果)

1. CSEは一過性にオートファジーを亢進させる。

オートファジーは短時間でその活性が変化するダイナミックな系であり、その評価方法は重要である。一般的には蛋白分解阻害剤(E64d, pepstatinA)によ

東京慈恵会医科大学 呼吸器内科

* びまん性肺疾患に関する調査研究班 研究協力者

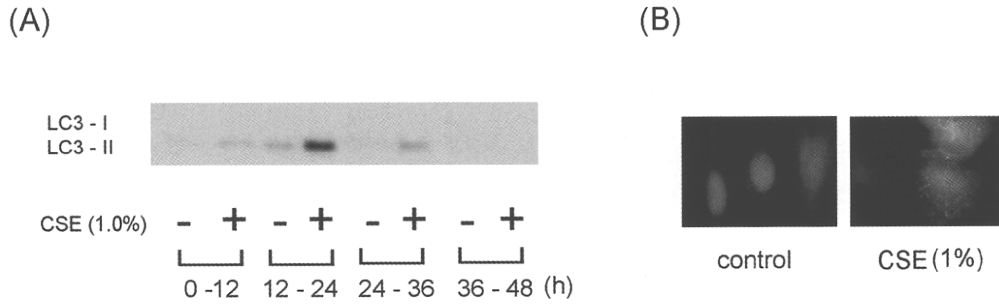


図1 CSEによるオートファジーの亢進

A. LC3のwestern blotting

1% CSE刺激後に12時間毎に区切って蛋白分解阻害剤を加え、各時間におけるオートファジー活性を明らかにした。

B. LC3-GFPのドット形成

LC3-GFP安定発現株のBeas2B細胞を用いて、CSE刺激48時間後に蛍光顕微鏡で撮影した。

り、リソソームでの分解を抑制した状態で、オートファゴソームの構成成分であるLC3のIからIIへの変換をwestern blotting法により判定する。CSE刺激後、12時間ごとに蛋白分解阻害剤を加えて評価したところ、CSEによるオートファジー機能亢進は一過性であり、12時間から24時間後にピークを認め、その後は低下する事が明らかとなった。もう一つの標準的なオートファジー機能評価方法であるLC3-GFPのdot形成に関しても、CSEによるオートファジーの亢進があきらかとなった(図1 A, B)。

2. オートファジーがCSEによる細胞老化を制御する。

CSE刺激は48時間後に、気道上皮細胞に老化を誘導した。オートファジー機能を3MA投与もしくはLC3に対するsiRNAで抑制すると、CSEによる細胞老化はさらに亢進した。一方、Torin1によりオートファジー機能を亢進させるとCSEによる細胞老化亢進が抑制されることがあきらかとなった(図2)。

3. オートファジーは細胞内ユビキチン化たんぱく質の蓄積を制御する。

傷害された蛋白質や小器官の細胞内蓄積は、細胞老化の指標の一つであり、なかでもユビキチン化蛋白質が分解されず蓄積する事は細胞老化制御の上で重要である。近年、本来プロテアソームで分解されるはずのユビキチン化蛋白質が、p62を介して選択的にオートファジーで分解されることが明らかになってきている。そこでオートファジー機能とユビキチン化蛋白質の蓄積に関して検討を行った。CSEはユビキチン化蛋白質を蓄積させ、時間的経過からその蓄積はオートファジー機能の低下に一致してい

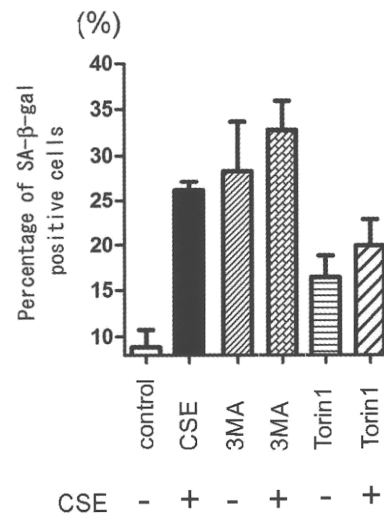


図2 CSEで誘導される細胞老化のオートファジーによる制御 (SA β-gal 染色)

CSE(1%)刺激48時間後に細胞老化を評価した。

オートファジー阻害剤として3MAを使用し、またTorin 1により亢進させた。

た。オートファジー機能をbafilomycin AもしくはLC3に対するsiRNAで抑制するとユビキチン化蛋白質の蓄積がさらに亢進することが明らかとなった。一方Torin1によりオートファジー機能を亢進させるとCSEによるユビキチン化蛋白質の蓄積が抑制された(図3)。

4. オートファジーは senescence-associated secretory phenotype を制御している

細胞老化の特徴の一つは過剰なサイトカイン産生であり senescence-associated secretory phenotype(SASP)として知られており⁹⁾、interleukin(IL)-8はその代表的サイトカインである。オートファジーが、CSEに

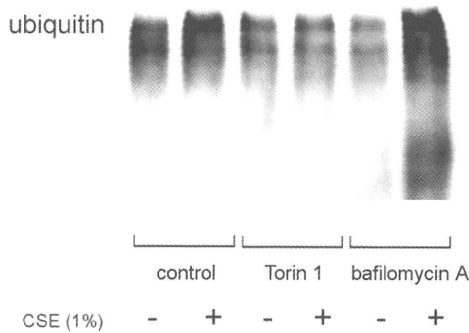


図3 CSEによるユビキチン化蛋白質の細胞内蓄積とオートファジーによる制御

CSE刺激48時間後にユビキチンに対するwestern blottingにより評価した。オートファジー阻害剤としてbafilomycinAを使用し、またTorin 1により亢進させた。

より誘導される細胞老化だけでなくSASPにも影響を与えている可能性を考えてIL-8産生を検討した。CSEはIL-8分泌を誘導し、bafilomycinAによりオートファジーを抑制し、細胞老化を亢進させるとIL-8分泌も亢進した(図4)。

(考 察)

今回の我々の検討から、オートファジーがユビキチン化蛋白質の分解により、CSEで誘導される細胞老化を抑制し、さらにはSASPをも制御している可能性が示唆された。喫煙刺激により引き起こされる代表的な呼吸器疾患は慢性閉塞性肺疾患(COPD)であり、やはり加齢と喫煙による細胞老化の加速が、その病態に関与する点ではIPFと同様である。しかしながら、SA β-gal染色による我々の検討では、IPF肺の上皮細胞の老化はCOPD肺にくらべて顕著であった⁴⁾。COPDでは細胞老化の増殖への悪影響が重要と考えられている¹⁰⁾。一方、我々はIPFでは老化した上皮細胞がむしろアポトーシス抵抗性となり、その内腔を覆ってSASPにより、線維芽細胞を含む周囲微小環境に影響を及ぼし、線維化を誘導しているのではないかと考えている。つまり細胞老化亢進の機序及びその制御機構を明らかにする事は、IPF病態の理解と、新たな治療法を開発する上で重要な知見を与えてくれる可能性がある。

ユビキチン化は従来プロテアソームで分解されるためのメカニズムと考えられてきたが、近年p62が

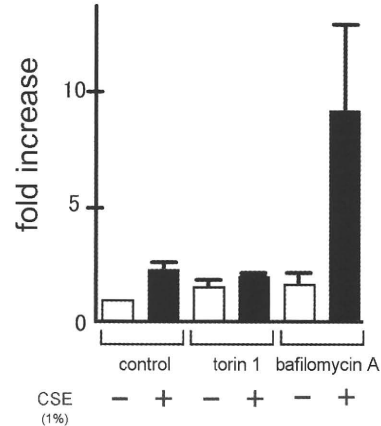


図4 CSEによるinterleukin(IL)-8分泌に及ぼすオートファジーの影響

CSE刺激48時間後の細胞培養液中のIL-8をELISA法により測定した。

オートファジー阻害剤としてbafilomycinAを使用し、またTorin 1により亢進させた。

ユビキチンとLC3の両方に結合し、選択的なオートファジーによるユビキチン化蛋白質分解の上で重要である事が明らかにされた¹¹⁾。プロテアソームは構造的に、可溶性蛋白質の分解が中心である。しかしながら細胞老化と関与する不溶性タンパク凝集体、さらにはミトコンドリアを含む細胞内小器官はオートファジーにより分解される。今回我々の検討では、CSEは細胞内にユビキチン化蛋白質を集積させ、同時に細胞老化を誘導した。またこのユビキチン化蛋白質の集積と細胞老化はオートファジーにより制御されていた。しかしながら、どのような蛋白質または小器官がCSEによりユビキチン化され、またオートファジーにより分解されているのか、さらにはそのユビキチン化蛋白質の蓄積がどのように細胞老化に関与するかなどの詳細な機序は明らかでなく今後の検討課題である。

近年COPD肺において、オートファジー機能が亢進し、アポトーシス誘導によりその病態に悪影響を及ぼしている可能性が報告された⁸⁾。オートファジーは当初II型のprogrammed cell deathを引き起こすと考えられていたが、細胞死誘導における役割に関しては議論のあるところである。むしろ、様々な病態において、細胞保護的に働いているという理解が一般的である。実際のIPF病態においてオートファジー機能がどのように働き、関与しているのかは明らかでない。しかしながら、IPFにおいて上皮細胞